



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013014155-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102013014155-0

(22) Data do Depósito: 07/06/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2015

(51) Classificação Internacional: C08K 3/00; A61K 31/00; A61K 9/20.

(52) Classificação CPC: C08K 3/00; A61K 31/00; A61K 9/2027.

(54) Título: BIONANOCOMPÓSITO PARA RECUPERAÇÃO ÓSSEA, USO DO BIONANOCOMPÓSITO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA, -. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075-900, Brasileira; INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARÁ, -. CGC/CPF: 10763998000130. Endereço: AV. JOÃO PAULO II, S/N, CASTANHEIRA, BELÉM, PA, BRASIL(BR), 66645-240, Brasileira; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 46068425000133. Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz - Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, BRASIL(BR), 13083-970

(72) Inventor: CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA; SABINA DA MEMÓRIA CARDOSO DE ANDRADE; GILMARA DE NAZARETH TAVARES BASTOS; ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES; CARMEN GILDA BARROSO TAVARES DIAS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 07/06/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 31/08/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

BIONANOCOMPÓSITO PARA RECUPERAÇÃO ÓSSEA, USO DO BIONANOCOMPÓSITO

Campo da Invenção

[01] A presente invenção se refere a um bionanocompósito restaurador ósseo relacionado a perdas causadas ou não por traumas. Mais especificamente, o presente invento trata de um bionanocompósito de poli(álcool vinílico) (PVAI), poliuretano (PU) e hidroxiapatita (HA).

[02] O bionanocompósito pode ser utilizado para enxerto de buco maxilo facial, reconstituição e preenchimento da calota craniana e preenchimento de falhas ósseas após retiradas de tumores de câncer ósseo nas diferentes regiões do esqueleto.

Fundamentos da Invenção

[03] No reparo do esqueleto humano, a necessidade de materiais para preenchimento de defeitos é grande, por exemplo, na reconstrução crânio facial, na revisão de implantes de ortoplasia, após a remoção de cistos ósseos, perda de osso por traumas, infecções ou reabsorção. Na forma macroporosa os implantes aceleram o processo de cura, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno com a seguinte mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados (Zavaglia, 2003).

[04] O osso é um tecido dinâmico, pois tem uma capacidade única de auto-regeneração ou de auto-remodelação na medida certa por toda a vida sem deixar cicatriz, no entanto, muitas necessidades de enxertos ósseos são devido a defeitos ósseos, causados ou não por traumas. A necessidade de enxertos ósseos sintéticos depende da complicação dos defeitos ósseos. Por exemplo, se o defeito é menor, o osso tem a própria capacidade de se auto-regenerar dentro de algumas semanas. Assim, a cirurgia não é necessária. No caso de graves defeitos e perda de volume ósseo que não cicatrizam normalmente, ou seja, quando há dificuldade para fechamento do tecido, o enxerto é necessário para restabelecer a função sem

danificar os tecidos. Existem vários métodos disponíveis para o tratamento de defeitos ósseos, que inclui os métodos tradicionais de auto-enxerto e enxerto por transplante. Embora essas duas terapias sejam consideradas clinicamente boas existem limitações. Por exemplo, o fornecimento de material de auto-enxerto é limitado e no enxerto a partir do transplante há uma possibilidade de transferência de patógenos, desta forma existe uma grande necessidade para o uso de enxertos ósseos sintéticos (Murugan e Ramakrishna, 2005).

[05] Atualmente, estão disponíveis inúmeros materiais de enxerto ósseos sintéticos, mono e multifásicos, que são capazes de melhorar algumas das complicações associadas com as práticas autógenas ou alógenas dos ossos. Embora haja bons progressos na utilização de enxerto ósseo sintético, a maneira em que se executam as suas funções in vivo é muito diferente e a maioria deles diferem de enxertos ósseos naturais, quer na composição ou na estrutura. Além disso, uma única fase material também chamada monolítica, nem sempre fornece todas as características essenciais necessárias para o crescimento ósseo, o que conduz à incessante pesquisa na busca de um enxerto ósseo ideal. Eis, portanto, uma grande necessidade de materiais multifase ou compósitos, com estrutura e composição semelhantes ao osso natural, obtidos pela engenharia de materiais, mais especificamente pela engenharia tecidual.

[06] Nanocompósitos baseados particularmente em hidroxiapatita (HA) e colágeno, ganharam imenso reconhecimento como enxertos ósseos não só devido à sua composição, estrutura e similaridade com o osso natural, mas também, devido às propriedades funcionais, como superfície e resistência mecânica superior a dos seus constituintes monofásicos. Além disso, pode-se dizer que o próprio osso é um nanocompósito natural, com matriz composta principalmente de nanocristalitos de hidroxiapatita (HA), ricos em colágeno na matriz orgânica, assim é uma boa escolha optar-se por um nanocompósito HA/colágeno como

um material de enxerto ósseo. Uma extensa análise de informações sobre biomateriais sugere que a HA/colágeno é um sistema indicativo para terapia regenerativa óssea, provavelmente como um dos mais adequados (Murugan e Ramakrishna, 2005; Liu, 2009; Wang, 2009).

[07] Quando acontecem pequenas perdas ósseas, o enxerto muitas vezes é realizado com osso do próprio paciente. Quando a perda de crista óssea é muito grande como nos casos dos defeitos deixados por extrações dentárias extensas na anatomia dos ossos da mandíbula utilizam-se enxertos com biomateriais e assim é garantida a preservação da crista óssea o que irá favorecer um subsequente implante ou restauração de prótese dentária (Weiss, 2007).

[08] A estabilidade inicial da mandíbula comparada com a estabilidade da maxila possibilita considerar a carga imediata de implantes, que na maioria dos casos é muito mais problemático em relação à qualidade e quantidade óssea. Pacientes com menor qualidade e menor quantidade de osso foram excluídos do tratamento com implantes por um longo tempo. No entanto, o advento da reconstrução óssea de áreas deficientes, tanto da mandíbula como da maxila, melhorou a possibilidade de tratamento para os pacientes com deficiência óssea. Diferentes técnicas de enxertia óssea foram desenvolvidas e procedimentos cirúrgicos ortognáticos adaptados às exigências especiais da cirurgia de implante fizeram com que a maioria dos problemas de ossos agora seja resolvida (Kahnberg, 2005).

[09] Os dentes naturais têm sido substituídos por uma variedade de materiais, incluindo osso, dentes de animais, dentes humanos, marfim, conchas marinhas, cerâmicas e metais. Atualmente são empregados em odontologia quatro grupos de materiais que são metais, cerâmicas, polímeros e resinas compostas. Apesar de aperfeiçoamentos frequentes nas propriedades físicas desses materiais, nenhum deles é permanente (Anusavice, 2005).

[010] A prática de implantodontia é citada atualmente como o método mais moderno quando são discutidos assuntos que tratam da reabilitação oral. Antes desse método o problema de reabilitação oral era resolvido pela utilização de próteses convencionais, removível ou fixa. Mas o sucesso clínico dos implantes está relacionado ao fenômeno da osteointegração ou osseointegração, que nada mais é do que a união física do implante osseointegrado com o osso receptor. Branemark e seu grupo de pesquisadores após décadas de pesquisa e desenvolvimento laboratoriais e clínicos descobriram um sistema de implante que pode substituir os dentes naturais perdidos e atingir essa osseointegração (Martins, 2011).

[011] Através dos conceitos de osseointegração, as cirurgias de reabilitação de deformidades crânio-faciais apresentaram um grande avanço. A utilização de implantes devidamente confeccionados e instalados com técnicas cirúrgicas corretas é uma boa alternativa para a confecção de pilares de sustentação das próteses buco-maxilo-faciais, conferindo ao paciente a possibilidade de colocação e remoção destas, de maneira rápida e simples, uma melhor retenção, estabilidade e estética. Os implantes osteointegrados mostram excelentes resultados, mas socializar esses benefícios ainda constitui-se em grande desafio devido a questão econômica, não sendo de fácil acesso aos mais carentes que geralmente são os mais necessitam desse tipo de reabilitação (Antunes, 2008).

[012] Os biomateriais têm se apresentado como uma alternativa nos processos de reabilitação óssea. O êxito do implante de um biomaterial está associado às reações do organismo do paciente, como severidade do processo inflamatório desencadeado, nível de satisfação do paciente, tempo necessário para o restabelecimento das atividades básicas e tempo de permanência do implante no organismo hospedeiro.

[013] Os biomateriais devem ser projetados e construídos já especificamente programados para atuar em uma determinada aplicação, para que satisfaça as características fundamentais como biocompatibilidade

em que o material implantado e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar disfunções no organismo ao longo do tempo, ser quimicamente inerte e estável, de fácil esterilização e possuir biofuncionalidade, ou seja, o material deve atender às características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada, pelo tempo que for necessário.

[014] Muitos materiais são desenvolvidos com finalidade de aplicações médicas, como dispositivos para terapias, contraste por diagnóstico de imagens, dispositivos de distribuição controlada de fármacos (Guo, 2010) e também direcionados para reparo de nervos e tecidos por determinado período.

[015] O Poli(álcool vinílico) PVAI é um polímero sintético biodegradável que desperta especial atenção como biomaterial devido a sua transparência, resistência e biocompatibilidade. É solúvel em água a temperaturas superiores a 70°C e atualmente encontram-se disponíveis no mercado composições de PVAI tanto em líquido como em partículas e dependendo de sua estrutura e mistura estereoquímica haverá influência nas propriedades específicas do produto final.

[016] Grupos acetato residuais do PVAI são essencialmente hidrofóbicos, os quais enfraquecem as ligações intra e intermoleculares entre os átomos de hidrogênios adjacentes dos grupos hidroxila. Quando hidrolisado completamente, o ponto de fusão é registrado entre 210°C e 240°C e temperatura de transição vítrea em torno de 85°C (Bavaresco, 2004). Pode apresentar normalmente de 20 a 35% de cristalinidade, mas após tratamento térmico acima de sua temperatura de transição vítrea (T_g), esta pode ser aumentada em até 70% e melhorar significativamente suas propriedades mecânicas (Pepas, 1987).

[017] Os isocianatos são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura química o grupo ($-N=C=O$). Esses grupos NCO reagem facilmente com compostos que possuam átomos de hidrogênio ativo

disponíveis, com no mínimo dois grupos funcionais. A reação do grupo isocianato acontece quando o hidrogênio suficientemente ativo está ligado a átomos com um par de elétrons disponível, como no nitrogênio e no oxigênio, e quando o hidrogênio está ligado ao oxigênio da hidroxila, esta reação é denominada reação uretânica. Além destas reações com compostos contendo hidrogênio ativo, os isocianatos também podem reagir entre si formando polímeros (Pinto, 2007).

[018] Encontram-se atualmente disponíveis isocianatos com estrutura química alifática e aromática. Cerca de 95% de todos os isocianatos consumidos são à base de tolueno diisocianato (TDI) e metileno-difenil-isocianato (MDI), e derivados. No entanto uma das reações de importância comercial é a trimerização que leva à formação de estruturas rígidas chamadas de poliisocianatos, como por exemplo, o HDT trímero do HDI, usado neste trabalho. Esses grupos conferem rigidez e boa estabilidade térmica às estruturas de que fazem parte (De Carlo, 2002). O HDT é um poliisocianato alifático de viscosidade média, sem solventes, baseado no trímero do diisocianato de hexametileno (HDI homopolímero).

[019] Os poliuretanos (PUs) são de uma ampla família de polímeros que pode ser potencialmente útil na engenharia tecidual em muitos tipos de tecidos, para um grande número de aplicações médicas.

[020] Poliuretano biodegradável é um dos materiais biocompatíveis utilizado como matrizes scaffolds em tecido ósseo de engenharia (HILL, 2007 e HUANG, 2009). No entanto, a preocupação principal associada com poliuretano biodegradável é a falta de grupos bioativos, o que limita a sua aplicação (HUANG, 2009). Uma solução é misturar os poliuretanos com partículas de cerâmica bioativas, tais como fosfato tricálcio ou hidroxiapatita (HA) (HUANG, 2009; Brovarone e Verne, 2007). Uma combinação de cerâmica e de poliuretano pode melhorar a bioatividade e as propriedades mecânicas de scaffolds (Mathieu, 2001). A HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tem atraído interesse como um material de implante para

os dentes e os ossos devido à semelhança da sua cristalografia e composição química para tecido humano (Liu, 2001; Kui, 2001).

[021] Já a hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada devido à sua semelhança química com o osso e a boa biocompatibilidade (Cystera, 2005). Essa hidroxiapatita biológica é ainda composta por íons em concentrações diversas, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , CO_3^{2-} , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais por meio da sua liberação ou armazenamento.

[022] Uma das características importantes da estrutura da hidroxiapatita é que ela permite que os grupos hidroxila (OH^-) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os hexágonos formados pelos íons de cálcio, por onde podem ser conduzidos para dentro da estrutura do material cerâmico, outros íons e moléculas (Hench, 1991).

[023] A hidroxiapatita é uma biocerâmica que tem composição e estrutura similares à fase mineral de ossos e dentes. Dependendo de sua pureza, ela pode suportar aquecimentos superiores a 1.200°C , sem se decompor. Além disso, pode ser modelada como a maioria dos materiais cerâmicos (Zavaglia, 1993).

[024] Hidroxiapatita, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ é o principal componente mineral do osso, e a sua forma sintética é um dos biomateriais mais utilizados para a reconstrução do esqueleto, devido à falta de toxicidade local ou sistêmica em conjunto com suas propriedades de osteocondução (Díaz, 2009). Para implantes ósseos ou dentários, duráveis por muitos anos utiliza-se um material pouco solúvel, constituído por hidroxiapatita pura. Quando se deseja que o implante seja reabsorvido pelo corpo, cedendo lugar ao tecido ósseo novo, usa-se uma cerâmica mais solúvel, geralmente constituída por uma mistura de hidroxiapatita com outros fosfatos.

[025] Outra característica da HA é sua capacidade de adsorção, isto é, de fixar em sua superfície moléculas de outra substância. Essa propriedade faz com que ela possa ser usada em implantes, como suporte

para antibióticos e drogas anticancerígenas, além de poder ser empregada também em tratamentos prolongados de infecções e doenças ósseas. Neste último caso, liberando aos poucos, na região afetada, a medicação necessária. O tamanho e a morfologia dos poros de espumas altamente porosas podem ser controladas dependendo dos parâmetros do processo (Cystera, 2005).

[026] Encontram-se na literatura diversos documentos relacionados que descrevem biocompósitos para regeneração óssea e os mais relevantes estão citados a seguir.

[027] Nos estudos realizados por Machado (MACHADO, 2010) são apresentados compósitos de PU/HA. A processabilidade dos polímeros permitiu a preparação de compósitos com teor de carga relativamente elevada e com boa homogeneidade. No entanto, as partículas de HA para proporções mais elevadas, não foram totalmente envolvidas pela matriz polimérica. Futuras pesquisas com esses materiais envolvem o estudo de sua estabilidade química e avaliação de desempenho mecânico e de biocompatibilidade in vitro. Eventualmente seria necessária a melhoria da ligação química entre HA e a matriz polimérica. A presente invenção mostrou que a proporção de HA ficou distribuída de maneira uniforme dentro da matriz, portanto em uma proporção adequada. Além disso, no trabalho de (MACHADO, 2010), não há comprovação de biocompatibilidade do material, pois não foram realizados testes biológicos in vivo e in vitro.

[028] Dong (DONG, 2009) obteve scaffold contendo 30% em peso de nano hidroxapatita-(n-HA) e 70% em peso de poliuretano (PU) por um método de formação de espuma. Os resultados mostraram que as partículas n-HA ficaram dispersas homogeneamente na matriz de PU, com porosidade de 80% e resistência à compressão 271 KPa. A estrutura porosa forneceu um microambiente de boa aderência para o crescimento celular, e proliferação, tendo o compósito requisito básico para a engenharia tecidual e sendo potencial para ser aplicado na reparação e substituição de meniscos

humanos de cartilagem do joelho e articular. O valor de resistência à compressão é bem menor que o apresentado no presente invento, que foi da ordem de 60 a 110 Mpa. O nível de porosidade do material da pesquisa citada embora tenha favorecido o ambiente celular deve ter sido responsável pela baixa resistência mecânica, que inviabiliza uma aplicação em reparação e substituição de meniscos humanos de cartilagem do joelho e articular por se tratar de locais absorvedores de impactos o que não acontece com o material da presente invenção que possui um absorvedor de impactos na sua constituição, o PVAI.

[029] Vital (VITAL, 2006) avaliou compósitos de hidroxiapatita sintética e carbono (HAC) e hidroxiapatita sintética, carbono e fosfato biácido de sódio (HACF), ambos na forma sólida, como substituto ósseo em 36 coelhos adultos. Aos 150 dias foi verificado que tanto nos grupos tratados quanto no grupo controle, já existia medula óssea e, praticamente não visualizou mais a presença de tecido cartilaginoso. Nos dois grupos havia tecido ósseo maduro na região da falha, mostrando processos bem adiantados de reparação de óssea e concluíram que ambos os tipos de hidroxiapatitas usadas mostraram-se biocompatíveis, por não ter havido, em nenhum dos animais, qualquer indício de rejeição do implante ou de reação inflamatória. Nos animais tratados, o processo de regeneração óssea ocorreu mais cedo do que nos animais do grupo-controle, o que comprova a capacidade osteocondutora da hidroxiapatita. A pesquisa citada utilizou compósitos bifásicos de hidroxiapatita sintética e carbono (HAC) e hidroxiapatita sintética, carbono e fosfato biácido de sódio (HACF) e nas avaliações clínicas diárias da ferida foram observadas presença de reação inflamatória, sensibilidade à dor e deiscência da ferida. Já no presente invento, devido a fase de poliuretano com ação antibactericida, não foram observadas tais reações.

[030] Nos estudos realizados por Liu (LIU, 2009) foi verificado que o carregamento de PU alifático com até 50% em peso de HA mostrou

resultados que indicaram o tamanho médio de macroporos e microporos de 100µm a 510µm, o que demonstra uma boa perspectiva para ser usado como scaffold em tecido ósseo. Os resultados da resistência à compressão da pesquisa para 30% de HA foram bem inferiores, da ordem de 227 KPa, aos apresentados no presente invento. O bionanocompósito deste invento apresentou, para 25% e 33% de HA, valores de resistência à compressão da ordem de 60 MPa e 111 MPa respectivamente. Além disso, a pesquisa não realizou testes in vivo, portanto não há comprovação da biocompatibilidade do material obtido, diferentemente dos resultados apresentados na presente invenção.

[031] Chetty (CHETTY, 2007) estudou um implante para cartilagem auricular à base de PU revestido com solução de HA e observou que após 24 e 72 h, as superfícies de HA exibiram, significativamente maior número de células metabolicamente ativas em comparação com as superfícies de PU virgens. Isto indica que as superfícies de HA são citocompatíveis para fibroblastos e podem potencialmente serem aplicadas à substituição do tecido de cartilagem. Porém, desvantajosamente, foi revelado, através de exame microscópico, que os espécimes apresentaram defeito de revestimento. Já a presente invenção evidencia uma interação química entre o HA e PU que impede o registro de falhas no bionanocompósito.

[032] Dou (DOU, 2011) obteve nanocompósitos de HA-gelatina minociclina antibacteriano e concluiu que o nanocompósito tem boa bioactividade e pode ter a atividade antimicrobiana, e pode ser um biomaterial promissor para utilização como reparação e regeneração de tecido ósseo. Os pesquisadores realizaram apenas testes in vitro para um material nanocompósito, com minociclina, que é um medicamento antibiótico, o que já garante ao material ação antibactericida. Já no presente invento é comprovado os bons resultados através dos testes in vitro e in vivo, sem a necessidade de se empregar nenhum tipo de medicamento, pois a ação

antibactericida do poliuretano é eficiente para que não provocar inflamações e infecções. Além disso, diferentemente do bionanocompósito apresentado neste invento, o material desenvolvido por Dou não apresenta resistência mecânica.

[033] Huang (HUANG, 2009) utilizou um fator bioativo para melhorar essa propriedade no poliuretano e obteve scaffolds de HA com elevadas porosidades, de 61 a 65%, e tamanhos adequados de macroporos, de 200 a 600µm, e resistência à compressão de 4,0 a 5,8MPa. Já a presente invenção associa ao poliuretano à bioatividade da hidroxiapatita e o bionanocompósito apresenta propriedades mecânicas bem superiores às propriedades do material citado, por empregar o PVAI em sua composição.

[034] Hill (HILL, 2007) descrevem scaffolds biodegradáveis de poliuretano (PU) em engenharia tecidual para criar um novo osso. Discos de PU foram semeados com osteoblastos e implantados em camundongos do tipo nude. Um grupo continha discos implantados de PU puro, enquanto o outro grupo continha discos implantados de PU/HA. Após 5 semanas ambos os grupos apresentaram evidência radiográfica e histológica à formação de osso significativa, com tendência para a maior formação de osso no grupo do que continha implantes do compósito PU/HA. Já na presente o bionanocompósito proposto além da presença de PU e HA, o PVAI, também presente, tem a função de absorver impactos e resistir aos esforços causados pela mastigação. É admitido que a mandíbula trabalha tal qual uma alavanca de terceiro gênero. O fulcro é a própria articulação temporomandibular (ATM) que juntamente com os dentes recebe uma carga de força durante o movimento da mastigação. A força desenvolvida pode ser mais ou menos absorvida pelo fulcro de acordo não apenas com a quantidade gerada, mas também com o tamanho da distância entre os elementos de resistência, no caso os dentes e o fulcro (ATM). Neste caso, a mastigação com os incisivos faz aumentar o braço de resistência e a carga no fulcro também é aumentada. Os ossos maxilares e a ATM são adaptados para a mastigação molar. Forças

mecânicas desenvolvidas ao nível dos molares são mais bem absorvidas e escoadas. Na mastigação incisiva, a carga transferida para ATM é quase duas vezes maior. Dessa forma, para uma composição voltada para um enxerto maxilo facial o scaffold desenvolvido pelo autor citado acima não poderia ser indicado por não possuir na composição o material com propriedades de absorver impactos, importante para a ação de mastigação, como o Poli(álcool vinílico) que existe na composição do bionanocompósito da presente invenção. Além disso, no presente invento foram testados o possível efeito inflamatório após o implante no tecido subcutâneo, o que demonstrou maior biocompatibilidade, diferente do trabalho de Hill (Hill, 2007) que não comprova a ausência deste efeito. Portanto a invenção trata-se de um biomaterial com a comprovada ação antibactericida do poliuretano associada à bioatividade da nanohidroxiapatita, à dispersividade e propriedade de absorvedor de impacto do poli(álcool vinílico), o qual permanece na composição após a síntese do poliuretano formando com este uma blenda, características de grande importância para enxerto de maxilo facial e que não são verificadas no scaffold descrito acima.

[035] Wang (Wang, 2009) também trabalhou com scaffolds HA/PU e concluiu que os mesmos tiveram boa afinidade para as células e são adequados para a regeneração ou substituição de defeitos ósseos. Esses scaffolds possuíam de 20 a 60% em peso de HA. Porém, desvantajosamente, o poliuretano foi utilizado especificamente como modelador de poros sem ação efetiva no scaffold. E a citocompatibilidade do scaffold HA/PU do trabalho foi avaliada através da cultura de um único tipo de células, MG63, que são derivadas de sarcoma ósteo humano, com traços característicos de osteoblastos. Diferentemente do proposto por Wang a presente invenção além de manter o PU em sua estrutura final também apresenta um componente adicional, o PVAI, que garante a absorção de impactos. As propriedades mecânicas de compressão da presente invenção, que é importante para enxertos de ossos de maior esforço mecânico, como é o caso

de ossos maxilares foi da ordem de 60 a 111 MPa, muito superior a 114 kPa do trabalho citado acima. Além disso, no presente invento é comprovada a citocompatibilidade e a ação antibactericida da composição proposta, empregando células de ovário de rato chinês CHO, células embrionárias fibroblastos de ratos - NIH3T3 e células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos recomendadas para testes de citotoxicidade e comprovou sua ação antibactericida, já que os animais não apresentaram nenhum tipo de dor, inflamação e/ou infecção durante o período pós-operatório quando foram observados.

[036] O pedido de patente US2011/0313538 de 09/08/2007 descreve um scaffold para reparação óssea, onde o PU é utilizado para a formação forçada de poros e evaporado com a temperatura de processamento, portanto ele não permanece na composição do final. Já no presente invento a presença da fase PU, que é preferencialmente obtido a partir do poli(álcool vinílico), comprova excelente compatibilidade sanguínea e propriedades antibactericidas, o que garante uma proposta promissora do presente bionanocompósito para reparar perdas ósseas e aplicações ortodônticas. A formação de microporos e macroporos é obtida naturalmente no momento do processamento do bionanocompósito pela reação do carbono com o oxigênio diferente da patente US2011/0313538 A1.

[037] O pedido de patente US2012/0029653 de 16/11/2010 descreve um material para regeneração óssea, composto por materiais reabsorvíveis e colágeno. Diferentemente deste pedido o presente invento é aplicado para enxerto maxilo facial e promove a produção de colágeno quando implantado no organismo vivo após sete dias, demonstrando sua superioridade já que não é necessário adicionar mais um produto à reação, diferente do biomaterial da patente US2012/0029653 que possui uma fase colágeno na sua constituição. Além disso este pedido de patente US2012/002965 refere-se a um material para tratamento de defeitos e lesões de tecidos ósseos enquanto que as características físicas do presente

bionanocompósito, devido a presença do poli(álcool vinílico), promove um alto índice de absorção de impacto, o que o especifica para a área mandibular onde os ossos dessa região recebem grande impacto diariamente.

[038] Diante do exposto, a presente invenção apresenta vantagens sob vários aspectos. Primeiro porque propõe um novo bionanocompósito indicado para enxertos ósseos de maxilo facial que permite o fluxo de nutrientes e de íons onde a regeneração óssea é promovida na área em torno do scaffold em implantes ósseos. Além disso, o referido bionanocompósito apresenta constituição trifásica, à base de poliuretano (PU), poli(álcool vinílico) (PVAI) e hidroxiapatita (HA). A presença do PU possibilita excelente compatibilidade sanguínea e propriedades antibactericidas, o que garante uma proposta promissora do presente bionanocompósito para reparar perdas ósseas e aplicações ortodônticas, além de permitir a formação de microporos e macroporos na estrutura. O presente invento emprega vantajosamente PVAI, que devido às propriedades físicas, garante elevada elasticidade de impacto e resistência à abrasão além de uma elevada biocompatibilidade e alta propriedades de barreira. O próprio PVAI atua como dispersante na mistura, não havendo necessidade de outros recursos para essa função. Outro ponto crucial é a presença de HA nanoestruturada que contribuiu para o controle, quantidade, geometria aleatória e interconexão de poros e microporos que são características excelentes para a osteocondução. Outra vantagem é que esse bionanocompósito promove a produção de colágeno quando implantado no organismo vivo após 7 dias.

Breve Descrição da Invenção

[039] A presente invenção se refere a um bionanocompósito restaurador ósseo composta por poli(álcool vinílico) (PVAI), poliuretano (PU) e hidroxiapatita (HA).

[040] O poliuretano empregado é produto da reação de um isocianato e um poliálcool poli(álcool vinílico), podendo o isocianato ser

selecionado dentre os isocianatos alifáticos, 4,4-diisocianato butano (BDI), 1,6-diisocianato hexano (HDI), 4,4-metileno diciclohexil diisocianato (HMDI), preferencialmente o poli-isocianato HDT, trímero do hexametileno diisocianato (HDI), empregado entre 1 e 2g, preferencialmente 2g. E a hidroxiapatita é adicionada em uma proporção entre 25% e 33%, preferencialmente 25% em massa.

[041] É objeto adicional do presente invento o referido bionanocompósito restaurador ósseo com componentes opcionais para proporcionar alguma característica desejável não alcançada com os componentes principais.

[042] É objeto adicional o uso do referido bionanocompósito para enxerto de buco maxilo facial, reconstituição e preenchimento da calota craniana e preenchimento de falhas ósseas após retiradas de tumores de câncer ósseo nas diferentes regiões do esqueleto.

Breve Descrição das Figuras:

[043] A estrutura da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser melhor entendidas mediante referência aos anexos e à seguinte descrição:

- A Figura 1 apresenta os espectros do biomaterial PVAI-PU/HA no FTIR monitorado de 25°C até 150°C.

- A Figura 2 mostra os espectros do biomaterial PVAI-PU/HA com aquecimento no FTIR.

- A Figura 3 apresenta as curvas reologia de formação de PVAI-PU.

- A Figura 4 mostra curvas de reologia do biomaterial PVAI-PU/HA.

- A Figura 5 apresenta o difratograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 25% de HA.

- A Figura 6 apresenta o difratograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 33% de HA.

- A Figura 7 mostra um gráfico indicando a resistência média à compressão da blenda PVAI-PU e dos bionanocompósitos PVAI-PU/HA com 25% e 33% de HA.

- A Figura 8 apresenta a curva TG-DSC do biomaterial com 25% de HA.

- A Figura 9 apresenta a curva TG-DSC do biomaterial com 33% de HA.

- A Figura 10 apresenta o bionanocompósito da presente invenção para caracterizações e ensaios biológicos nas dimensões, $\varnothing$ 4mm e altura igual a 60mm (1) $\varnothing$ 4mm e altura igual a 1mm (2) $\varnothing$ 6mm e altura igual 3mm (3) e 2cm×2cm (4).

- A Figura 11 mostra uma imagem da superfície da blenda PVAI-PU observada por MEV.

- A Figura 12 mostra uma imagem da superfície interna do biomaterial com 25% de HA, observada por MEV.

- A Figura 13 apresenta espectros do bionanocompósito analisados por EDS.- A Figura 14 mostra as lâminas após o corte para análise histológica da região preenchida com o biomaterial PVA-PU/HÁ.

- A Figura 15 mostra as lâminas do material de controle.

- A Figura 16 apresenta imagem do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 14 dias, observada em microscopia eletrônica de varredura, onde C: material fibroso; BM: biomaterial; CL: camada fibrosa; CC: camada córnea.

Descrição Detalhada da Invenção

[044] A presente invenção descreve um bionanocompósito para restauração óssea que compreende os seguintes componentes principais: poli(álcool vinílico) (PVAI), poliuretano (PU) e hidroxiapatita (HA).

[045] O processo mais utilizado na produção dos poliuretanos é o que envolve a reação de um composto com dois ou mais grupos funcionais álcool, tal como, um poliol poliéter ou poliol poliéster com um isocianato, di ou

polifuncional (Cordeiro, 2007), (Zhang, 2011) formando ligações uretânicas. Além do isocianato e poliálcool pode-se utilizar ainda um extensor de cadeia na reação, com proporções na razão molar.

[046] Mais especificamente, a preparação do bionanocompósito do presente invento pode ser iniciada pelo emprego de um isocianato, ser selecionado dentre os isocianatos alifáticos, como 1,4-diisocianato butano (BDI), 1,6-diisocianato hexano (HDI), 4,4-metileno diciclohexil diisocianato (HMDI), preferencialmente o poli-isocianato HDT, trímero do hexametileno diisocianato (HDI) e um poliálcool poli(álcool vinílico), na proporção em peso e sem o uso do extensor de cadeia.

[047] Para obter-se o pré polímero PU são utilizados 1 a 2 g, preferencialmente 2g do material viscoso HDT com preferencialmente 1g de partículas de poli(álcool vinílico) a cada reação. A hidroxiapatita é adicionada em proporções variando entre 25 e 33%, preferencialmente 25% do bionanocompósito, resultando uma mistura com proporção preferencial de 1 para 2 para 1 respectivamente dos materiais de partida PVAI, HDT e HA em massa.

[048] Além destes componentes, o bionanocompósito da presente invenção ainda pode compreender componentes opcionais para proporcionar alguma característica desejável não alcançada com os componentes já citados. Alguns destes compostos que podem ser adicionados ao biocompósito são os seguintes:

- Agentes anti-inflamatórios;
- Fatores de crescimento;
- Citocinas;
- Hormônios;
- Células-tronco;
- Células da medula óssea;
- Células de cartilagem;
- Células ósseas;

- Células sanguíneas.

[049] O bionanocompósito pode ser envasado em moldes diferentes, de acordo com a região em que será aplicada, inseridos em estufa para a cura e depois retirados e resfriados naturalmente até a temperatura ambiente, desmoldados e encaminhados para as caracterizações morfológicas, mecânicas e biológicas.

[050] O bionanocompósito do presente invento apresenta propriedades mecânicas de compressão, que são importantes para enxertos de ossos de maior esforço mecânico, como é o caso de ossos maxilares, variando entre 60 e 111 MPa. Além de ser um material com capacidade de absorção de água que varia entre 2,2% e 6,3%, com densidade aparente variando entre $\rho=1,1$ g/cm³ e $\rho=1,3$ g/cm³ e com porosidade variando entre $p=21,5\%$ e $38,2\%$.

Exemplo 1: Obtenção do bionanocompósito PVAI-PU/HA

[051] Inicialmente foram realizadas as reações para a síntese do poliuretano (PU). Misturou-se dois gramas do material viscoso HDT com um grama de partículas de Poli(álcool vinílico) a cada reação, em um becker de polipropileno, em agitação magnética com aquecimento, na faixa da temperatura ambiente até atingir a temperatura de 80°C, para obter-se o pré polímero PU. Em seguida adicionou-se hidroxiapatita à mistura em três proporções distintas de 25%, 33% e 40% em massa em cada reação, de forma lenta e por 15 minutos, tempo que segundo analisado por FTIR os materiais já iniciaram reação na mistura, ainda com o controle de temperatura em 80°C. A mistura foi retirada do becker e envasada em três moldes diferentes. O primeiro molde fechado, de aço inoxidável, com dimensão para amostras cilíndricas com diâmetro de 6 mm e altura de 3mm. O segundo molde fechado, de polipropileno, com diâmetro interno igual a 4 mm e altura igual a 60 mm e, por terceiro, molde aberto de teflon, para amostras em forma de prisma com dimensão de 20x20x2 mm³. Após o preenchimento com a mistura, os moldes com material foram inseridos em estufa para a cura a

120°C por 30 minutos e depois retirados e resfriados naturalmente até a temperatura ambiente e desmoldados.

[052] Na Figura 10 observa-se o biomaterial obtido em três formas distintas.

Exemplo 2: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

[053] Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados através de um espectrofotômetro da marca THERMO SCIENTIFIC NICOLET IR100. A cinética de reações foi monitorada por FTIR e considerou-se as medições de comprimento de onda do biomaterial desde a temperatura ambiente de 25°C até 150°C.

[054] Após experimento de cura na temperatura ambiente por 18 dias, foi realizado o monitoramento por FTIR nessas mesmas condições, tanto nos materiais de partida como no biomaterial PVAI-PU/HA. Para as medidas das análises, os materiais foram envolvidos em filme de polietileno (PE) para melhor leitura em porta amostra de papel adaptado ao equipamento. As análises do material foram feitas com a subtração das bandas de PE na região de 4000 a 500 cm⁻¹.

[055] Os espectros na região do infravermelho de PVAI-PU/HA que foram monitorados desde a temperatura ambiente de 25°C até 150°C são apresentados na Figura 1. Nota-se que absorções típicas de movimentos dos íons OH da hidroxiapatita são de difícil visualização logo após o início da mistura (ponto 1) e visíveis nos instantes finais da reação (ponto 2); vibrações dos fosfatos da apatita (ponto 3) são alteradas durante a formação da matriz PU e recuperadas nos instantes finais (ponto 4). Liberação de CO₂ durante a reação é responsável pela formação de poros na estrutura (ponto 5).

[056] A Figura 2 mostra espectros do biomaterial monitorados durante a cinética de formação no FTIR com aquecimento de 15 até 75 minutos, onde são destacados os pontos de modificações dos íons hidroxila

e formação de grupo NH do PU e modificações nos grupos fosfato (PO) da hidroxiapatita.

Exemplo 3: Ensaios Reológicos

[057] A reologia é responsável por obter informações sobre o efeito de vários fatores que influenciam no processamento de materiais poliméricos. Realizou-se estudos reológicos através de ensaios para a obtenção de variáveis como temperatura de processamento para cura à quente e viscosidade, tanto para a reação da mistura PVAI e HDT que formou PVAI-PU como na mistura do biomaterial PVAI-PU/HA.

[058] Os materiais tanto PVAI-PU como PVAI-PU/HA ainda no estado viscoso foram submetidos a ensaios reológicos em reômetro HAAKE, modelo Rheo Stress 6000, de placas paralelas com 35 mm de diâmetro, sensor do tipo PP35, controlador térmico do tipo RS 6000, até 150°C, mesma temperatura adotada em FTIR. Foram verificados o módulo de armazenamento ($G'(\omega)$) e módulo de dissipação ($G''(\omega)$) em função da temperatura bem como a temperatura nos materiais PVAI/HDT e compósito PVAI-PU/HA e temperatura de processamento para cura do material compósito a quente.

[059] As Figuras 3 e 4 mostram as curvas de reologia da formação do PU e do biomaterial PVAI-PU/HA, respectivamente.

[060] A partir da determinação dos pontos de gel da formação de PVAI-PU em 130°C e da formação de PVAI-PU/HA em 115°C, utilizou-se a faixa da temperatura ambiente até 120°C como temperatura de cura do biomaterial PVAI-PU/HA, por 30 minutos nessa última temperatura. Tais condições apresentaram excelente resultado para processamento de cura. A presença dos nanocristais poderá restringir o relaxamento de polioli, levando ao comportamento viscoelástico, (Wik, 2011).

[061] O material curado no reômetro a 115° apresentou coloração branca e não apresentou sinais de degradação, essa morfologia visual foi

determinante para o prosseguimento dos processamentos para obtenção dos bionanocompósitos com as características adequadas.

Exemplo 4: Difração de raios X (DR-X)

[062] As medidas de raios X de PVAI e PVAI+HDT foram realizadas pela técnica de raios X em aparelho PHILIPS-binary (scan) (RD) e goniômetro PW1800, empregando-se o método do pó, com fonte de raios X $K\alpha$ do cobre e varredura no intervalo de 5° a 60° (2θ).

[063] As fases presentes nos biomateriais e HA foram determinadas por Difração de Raios-X, método do pó, (DRX) em amostra total. Utilizou-se um difratômetro de raios-X da marca PHILIPS-binary, com Goniômetro PW 1800, foco normal, e com tubo de raios-X de anodo de cobre. A aquisição de dados dos registros foi obtida através de uma interfase e software, e o tratamento dos dados com o software APD, Automated Powder Diffraction.

[064] Nas Figuras 5 e 6 a intensidade dos picos de HA torna-se mais fraca na presença de PU atestando uma diminuição da cristalinidade de HA no biomaterial PVAI-PU/HA com menor quantidade de HA, situação também encontrada por (Wang, 2009). Os três picos mais intensos de HA tiveram pequeno deslocamento no biomaterial PVAI-PU/HA com proporção de 25% de HA em massa, o que significa que depois de reação de formação de PU pode ter havido mudança na natureza da HA pela reação das hidroxilas de sua estrutura.

[065] O biomaterial PVAI-PU/HA apresenta ainda picos sobrepostos em 2θ próximos de 20° (cristalino) e em 2θ próximo de 40° (amorfo) característico de PVAI semicristalino (ZHANG, 2010) confirmando a remanescência do PVAI em análise por FTIR.

Exemplo 5: Absorção de Água

[066] A absorção de água após imersão foi calculada utilizando a Equação 1 (Asefnejad, 2011; Martinez-Valencia, 2011).

$$Ab (\%) = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100$$

Equação. 1

[067] Onde m_1 é a massa seca antes imersão e m_2 é a massa úmida após a imersão.

[068] Cinco amostras de cada *scaffold* foram pesadas com uma precisão de $\pm 0,0001$ g em uma balança analítica e seus pesos registrados. Após a pesagem as amostras foram imersas em um becker de vidro com 10 ml de água destilada. Após 24 horas as amostras foram removidas da água e, depois a água de superfície foi removida com papel e as amostras foram novamente pesadas. O ensaio foi realizado à temperatura de 22°C.

[069] Os valores de absorção de água encontrados nesta pesquisa 6,3% e 2,2% foram inversamente proporcionais às quantidades de hidroxiapatita, o que mostra que a natureza hidrofílica do biomaterial foi maior com menor proporção de HA.

Exemplo 6: Densidade

[070] O picnômetro foi lavado com álcool, secado na temperatura ambiente e preenchido com água destilada, que foi aferida. A massa de cada amostra do biomaterial foi devidamente medida bem como a massa do picnômetro e a massa conjunta da amostra e picnômetro com a água destilada, por três vezes.

[071] A densidade aparente do biomaterial foi calculada em função da massa do picnômetro com a água, o corpo sólido no vidro de relógio e a massa do picnômetro com o corpo sólido no seu interior. O ensaio foi realizado à temperatura de 22°C.

[072] Os valores para densidade aparente do biomaterial foram de $\rho=1,3$ g/cm³ e $\rho=1,1$ g/cm³ que são diretamente proporcionais às quantidades de hidroxiapatita contida no biomaterial.

Exemplo 7: Porosidade

[073] A porosidade do scaffold foi determinada usando deslocamento de líquidos ou princípio de Arquimedes, método semelhante ao relatado por (Guan, 2005; Liu, 2010) e foram avaliadas cinco amostras

para cada scaffold no laboratório da USP de Lorena com temperatura de 18°C.

[074] Cada amostra do biomaterial com duas proporções distintas de hidroxiapatita foi imersa em um cilindro contendo um volume de 10 ml de etanol V1. A amostra foi mantida em etanol durante 5 minutos para permitir que o etanol preenchesse os poros da amostra. O volume total de etanol e o scaffold com etanol impregnado foi registrado como V2. O scaffold impregnado com etanol foi removido do cilindro e o volume de etanol residual foi registrado como V3. O ensaio foi realizado à temperatura de 18°C. A porosidade “p” do scaffold foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$p = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100\% \quad \textbf{Equação. 2}$$

[075] Os valores de porosidade foram p=21,5% para o material com maior quantidade de hidroxiapatita e 38,2% para o biomaterial com menor proporção de hidroxiapatita.

Exemplo 8: Ensaio mecânico de compressão

[076] Os ensaios mecânicos são realizados segundo orientações normativas, entre elas a ASTM D 695-96 que contém diretrizes do ensaio de compressão. Este método de ensaio determina as propriedades mecânicas de plásticos rígidos, não reforçados e reforçados, incluindo compósitos de alto módulo, quando carregado sob compressão em taxas relativamente baixas de esforço ou carregamento uniforme. São utilizados corpos de prova de forma padrão. Este processo é aplicável a um módulo de compósito até 41.370 MPa (6.000.000 psi) (ASTM D 695-96).

[077] Ensaio de compressão é a aplicação de uma carga compressiva uniaxial em um corpo de prova e cuja resposta desse ensaio é obtida pela deformação linear medida entre a distância das placas que comprimem esse corpo.

[078] A amostra para o teste padrão deve estar na forma de um cilindro reto ou prisma cujo comprimento é o dobro de sua largura principal ou diâmetro (ASTM D 695-96).

[079] Um total de 30 corpos de prova cilíndricos $\varnothing$ 6 mm e 3 mm de altura, segundo a ASTM D695-96 foram ensaiados sob compressão. Os ensaios foram realizados em máquina universal Emic DL500 no laboratório de ensaios mecânicos da FEM- UFPa em 30 corpos de prova distribuídos em 10 de cada um dos materiais como segue, PVAI-PU, PVAI-PU/HA com 25% de HA e PVAI-PU/HA com 33% de HA em massa.

[080] Por se tratar de corpos de prova com pequenas dimensões a aplicação de carga foi interrompida antes da ruptura de aproximadamente 40% da deformação do comprimento original, (Wang, 2009; Liu, 2009; Liu, 2010), para evitar que as placas de compressão tivessem contato, o que poderia comprometer o desempenho da máquina.

[081] A Figura 7 mostra os valores de cada resistência média e desvio padrão da blenda PVAI-PU e dos bionanocompósitos com 25% e 33% de HA sob compressão. Esses valores são resultantes dos ensaios dos bionanocompósito até a deformação de até 40% do comprimento total do corpo de prova. Pode ser visto que o resultado com conteúdo de 33% de HA no compósito com matriz PU torna a resistência à compressão mais elevada.

[082] Apesar do resultado mais elevado com maior proporção da hidroxiapatita, o material selecionado para ensaios biológicos foi o que contém menor proporção de hidroxiapatita, por considerarem-se outras propriedades importantes para um biomaterial como, porosidade, densidade e absorção que foram mais adequadas no bionanocompósito com menor proporção de HA.

Exemplo 9: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

[083] A caracterização das superfícies normais e de fratura tanto dos materiais de partida como dos bionanocompósitos foi obtida em Microscópio Eletrônico de Varredura LEO modelo 1450 VP e Microscópio Eletrônico de Varredura marca ZEISS Modello, EVO MA-15.

[084] A Figura 11 mostra imagem da superfície de PVAI-PU onde se observa principalmente o PU formado e não sendo perceptíveis as

partículas de PVAI. E a Figura 12 mostra imagem da superfície interna do biomaterial conforme foi usado nos ensaios biológicos, onde são observadas micropartículas de PVAI no domínio do bionanocompósito, fase de poliuretano e hidroxiapatita, poros e microporos distribuídos e com tamanhos variados, os quais possuem arquitetura adequada para biomaterial com aplicação em engenharia tecidual.

Exemplo 10: Análise Espectroscópica por Energia Dispersiva (EDS)

[085] A análise por EDS foi realizada tanto nos materiais de partida poli(álcool vinílico), hidroxiapatita como no biomaterial para verificar como as partículas constituintes desses materiais foram quimicamente alteradas. Após a obtenção das imagens dos materiais em MEV, foram selecionadas imagens para análise por EDS. Foram determinados aleatoriamente quatro (4) pontos em cada imagem para análise.

[086] As imagens do biomaterial PVAI-PU/HA, Figura 13, mostra espectros do bionanocompósito analisados por EDS à esquerda e determinação de pontos no material PVAI-PU/HA à direita atestando que a estrutura contém os elementos constituintes dos materiais de partida e a relação Ca/P teve uma variação de 2,3 a 3,1. A distribuição uniforme desses materiais irá influenciar ativamente no equilíbrio iônico entre o fluido biológico e o biomaterial. A Tabela 1 apresenta a concentração dos elementos que compõem o bionanocompósito analisados por EDS.

[087] Tabela 4.7 – Concentração dos elementos obtidos por EDS para o biomaterial PVAI-PU/HA.

Espectro 1		Espectro 2	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	31,432	C	40,129
O	24,927	O	31,814
P	12,767	P	9,487

Ca	30,873	Ca	18,57
Espectro 3		Espectro 4	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	24,428	C	22,071
O	21,738	O	12,868
P	13,019	P	17,877
Ca	40,815	Ca	47,184

Exemplo 11: Espectrofotometria de Fluorescência de Raios X (XRF)

[088] Para análise do biomaterial foi realizado ensaio de espectrofotometria de fluorescência de raios X (XRF), Os elementos do conteúdo do biomaterial PVAI-PU/HA foram determinados em espectrofotômetro da marca Rigaku, modelo Rix 3100.

[089] Os resultados do ensaio de fluorescência mostram que a relação Ca/P da hidroxiapatita é maior que o valor original, isto confirma o excesso de cálcio na estrutura da hidroxiapatita do biomaterial. Os valores das quantidades são mostrados na Tabela 2.

[090] Tabela 2 – Composição média do bioamaterial por fluorescência de raios X.

Composição	Composição Medida	Espectrum	Intensidade (kcps)	Resultados (wt%)	Normalização (wt%)
C	C	C – KA	0.3937	54.16	41.96
O	O	O – KA	0.0409	32.95	25.52
Ca	Ca	Ca – KA	12.7257	9.43	7.30
P	P	P – KA	5.4617	3.44	2.67

Exemplo 12: Calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC)

[091] As análises foram realizadas com uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto em uma atmosfera de nitrogênio na faixa da temperatura ambiente a 600°C em equipamento da marca NETZSCH, modelo STA409C. Foram realizadas análises no biomaterial PVAI-PU/HA com proporções de 25% e 33% de hidroxiapatita.

[092] As curvas TG-DSC apresentadas nas Figuras 8 e 9 fornecem informações sobre a estabilidade térmica dos biomateriais com 25% e 33% de HA, respectivamente.

[093] O primeiro pico endotérmico próximo de 225°C é referente a temperatura de fusão do biomaterial. O segundo pico endotérmico é devido à combustão de material orgânico quando acontece a perda de massa do material. E o terceiro pico corresponde à reação da hidroxiapatita no biomaterial.

[094] Mudanças significativas de início de perda de massa não foram observadas entre as curvas, já que ambas iniciam em aproximadamente 250°C. Esta perda é consequência da decomposição dos biomateriais. Entretanto, observa-se uma perda de 25% para a composição com 25% de HA e de 17% para a composição com 33% de HA. Desta forma é possível afirmar que com o aumento da quantidade de HA, ocorre, ainda que pequeno, um aumento da estabilidade térmica do material.

[095] A partir de aproximadamente 300°C um decaimento intenso ocorre e isto pode estar relacionado com a quebra de segmentos rígidos do biomaterial, produzindo radical livre que atacam os segmentos macios do biomaterial, resultando em processo de quebra de cadeia.

Exemplo 13: Ensaios biológicos *in vitro*

[096] Células de ovário de rato chinês (CHO) foram cultivadas em monocamada e mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e suplementadas em células (Roswell Park Memorial Institute) médium RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após a tripinização foram semeadas 3000 células em microplaca de cultura celular de 96 poços. Em

seguida foram adicionadas diluições crescentes do extrato do biomaterial PVAI-PU/HA (50µl/poço, 4 poços/por diluição), após esse procedimento a placa foi equilibrada a 37°C. O volume total em cada poço deve ser de 100µl. Colunas controle de quatro poços são preparadas com o meio sem a colocação das células (branco) e meio, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). Após 72 h, 20µl de uma mistura (20:1) de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)2H tetrazolium) (MTS) a 0,2% e phenazine methosulfate (PMS) a 0,09% em Phosphate buffer saline (PBS) foi adicionada aos poços de testes e deixada em incubação por 2 horas. A incorporação do corante foi medida por meio de um leitor de microplacas a 490nm contra o branco. O índice de citotoxicidade (IC) 50% é estimado pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos a partir do gráfico.

[097] Nos testes realizados através dos controles positivo e negativo pode-se verificar que tanto os componentes poli(álcool vinílico) que em reação com o diisocianato formou o poliuretano e hidroxiapatita como os compósitos obtidos pela mistura não apresentaram toxicidade.

[098] Foi realizada uma Cultura 3D de células embrionária de ratos (mouse embryonic fibroblast cell line - NIH3T3) sobre o biomaterial. As células NIH3T3 foram plaqueadas nas concentrações 5x10⁵ e 10⁶ células por biomaterial. O biomaterial foi mantido em 300µl de meio modificado Dulbecco (modified Dulbecco's Eagle's médium - DMEM) com 10% de soro fetal bovino e também com poli-L-lisina por três dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A análise da proliferação celular foi realizada através do teste de viabilidade celular com - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).

[099] Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos recomendadas para testes de citotoxicidade. As células foram

cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco) a 37°C com 5% de CO₂ na atmosfera.

[0100] Os extratos dos materiais analisados foram obtidos através da incubação destes em placa de cultura de 24 poços na proporção de 0,2g de material por ml de meio DMEM com 10% SFB a 37°C por 48 horas sem agitação. Decorrido o período de incubação o meio foi utilizado no cultivo das células VERO, permitindo desta forma, avaliar a possível liberação de substâncias tóxicas no meio de cultura. O teste de citotoxicidade indireta e extração dos extratos foram feitas de acordo com recomendações internacionais (ISO-10993-5, 1992; ISO-10993, 1997, NBR-ISO10993, 1999; SJOGREN, 2000).

[0101] Para o teste de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium) foi inoculada uma suspensão celular na concentração de 3x10⁶ células/ml em placa de cultura de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e cultivada por 24 horas a 37°C.

[0102] Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura contido na placa foi substituído pelo extrato dos materiais. Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio DMEM com 10% SFB e 10% de Fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno.

[0103] Decorrido o período de cultivo de 24 horas o extrato dos materiais foi retirado e os poços foram lavados com 200µl de solução tampão fosfato salinos (PBS). Após este procedimento foi adicionado 200µl de meio DMEM com 10 mM de tampão Hepes e 50µl MTT Sigma (5µg/ml em PBS) e a placa de cultura foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Decorrido este período o meio com o MTT foi substituído por 200µl de Dimethyl Sulphoxide (DMSO) e a placa foi mantida em agitação por 30 minutos.

[0104] Foi feita leitura da absorbância em leitor de Microplacas em comprimento de onda de 540nm. Foram utilizados como controle de reação,

poços onde não houve o cultivo de células (branco), nos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

[0105] Os resultados dos testes realizados pelo método de MTT demonstram que as células NIH3T3 - fibroblastos de murinos, cultivadas sobre o biomaterial são viáveis já que as células plaqueadas em presença do reagente formaram formazam, que pode ser visualizado devido a coloração azul turquesa observada nas imagens. Observou-se também que a utilização de proteína de adesão é de grande necessidade para a adesão celular. Utilizaram-se também diferentes concentrações de células sobre o biomaterial, mas independente da concentração a adesão foi eficiente.

Exemplo 14: Ensaios biológicos *in vivo*

Ensaio 1

[0106] Quatro ratos Wistar com 1 ano de idade e peso médio de 400 gramas foram mantidos e monitorados em gaiolas individuais, com comida e água *ad libitum* e temperatura controlada. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais.

[0107] Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (85 mg/kg; im) e xilazina (12 mg/kg; im). O pelo foi raspado e foi realizada uma incisão mediana (20 mm) na pele ao longo da sutura sagital. A musculatura e o perióstio foram rebatidos expondo o osso parietal. Dois defeitos ósseos de 5,0 mm foram criados com uma trefina na calvária dos ratos. Os implantes em forma de discos com 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura de PVA-PU/HA esterilizados em óxido de etileno (Dias, 2010), foram inseridos no defeito ósseo à direita e o defeito à esquerda não foi preenchido e foi usado para controle. Após a cirurgia a musculatura e o perióstio foram reposicionados. No pós-operatório foi utilizado analgésico Dipirona (500 mg/ml; vo), para o período subsequente de 24 horas. Todos os animais foram monitorados de perto e receberam ração peletada e água “*ad libitum*”.

[0108] Os animais foram anestesiados e sacrificados após 30 dias de implantação por deslocamento cervical. Os discos de implante foram colhidos e fixados em formalina a 10%, descalcificados (DONG, 2009), desidratados e embebidos em parafina. Cada explante foi então processado para análise histológica em que foram obtidas secções de 5µm que foram coradas com Hematoxilina & Eosina, (Hill, 2007; Dong, 2009; Kim, 2011). A biocompatibilidade do implante PU/PVA foi quantificada pela gravidade da cápsula de fibrose, reação de corpo estranho e processo inflamatório inespecífico. As propriedades de osteocondução foram determinadas pela capacidade de regeneração óssea.

[0109] Em lâmina do implante, Figura 14, observa-se a presença de massas sólidas compactas basófilas, acelulares, espessas, assemelhando-se a tecido ósseo sintético, entremeado por fibrinas, capilares dilatados e congestos, esparsas células gigantes denominadas de osteoclastos.

[0110] Na lâmina do controle, Figura 15, observou-se a presença de osteócitos em destaque o tecido lesionado e precisaria de certo tempo para fechar o que não acontece com a lâmina do implante onde é visível o fechamento do tecido com o bionanocompósito confirmando a biointegração e biocompatibilidade entre o bionanocompósito e o osso receptor. Observa-se também algumas fibroses em ambas as lâminas.

Ensaio 2

[0111] Seis camundongos suíços (30-35g) foram divididos em três grupos de dois animais e mantidos em caixas plásticas em ciclo claro/escuro de 12 horas (Jovanovic, 2010) e temperatura ambiente de (22±1) °C, com água e comida ad libitum. O experimento foi desenvolvido de acordo com o comitê de ética em pesquisa para utilização de animais.

[0112] Os camundongos foram anestesiados com ketamina/xilazina 2:1 diluído em soro fisiológico. Após os pêlos raspados, foi realizada uma incisão de 10 mm na linha média dorsal no animal e o biomaterial PVA-PU/HA em forma de disco esterilizado em autoclave para materiais termolábeis com

ø 4 mm e 1 mm de espessura foi implantado no espaço subcutâneo dorsal dos ratos, (Hill, 2007). Após a cirurgia os tecidos foram reposicionados e suturados. No pós-operatório nenhuma medicação foi utilizada. Todos os animais foram monitorados de perto e receberam ração peletada e água “ad libitum”. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, para a retirada do material implantado 1, 7 e 14 dias após o implante. (Hafeman, 2012).

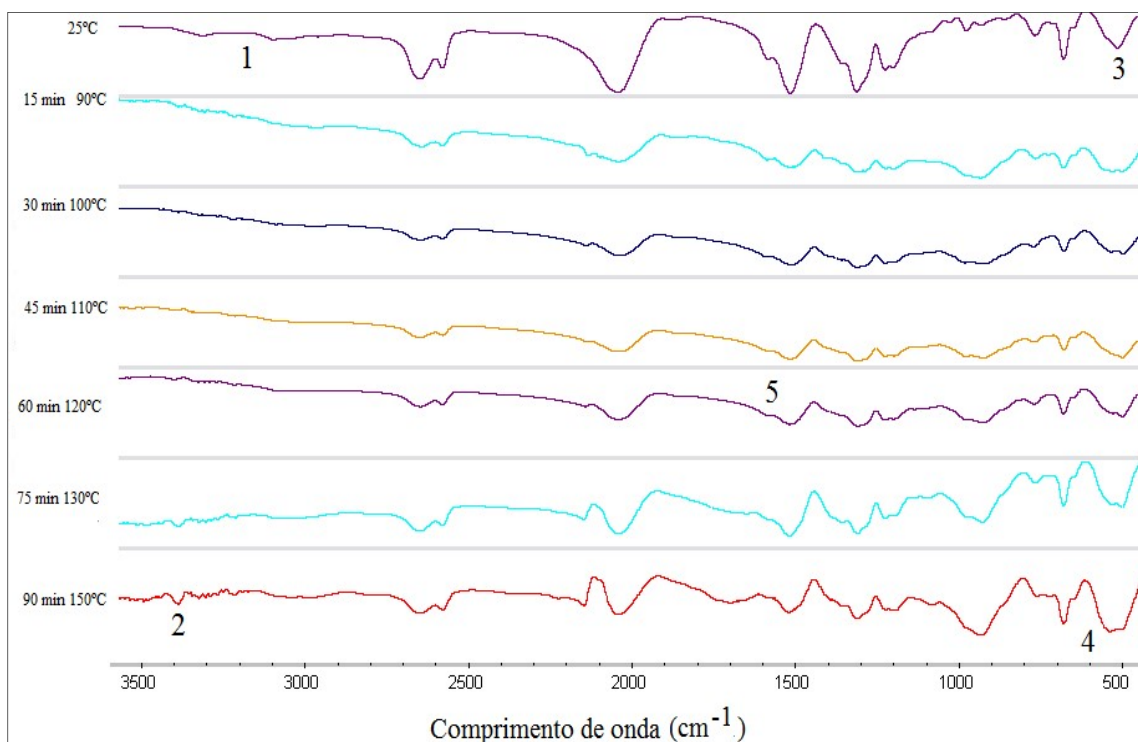
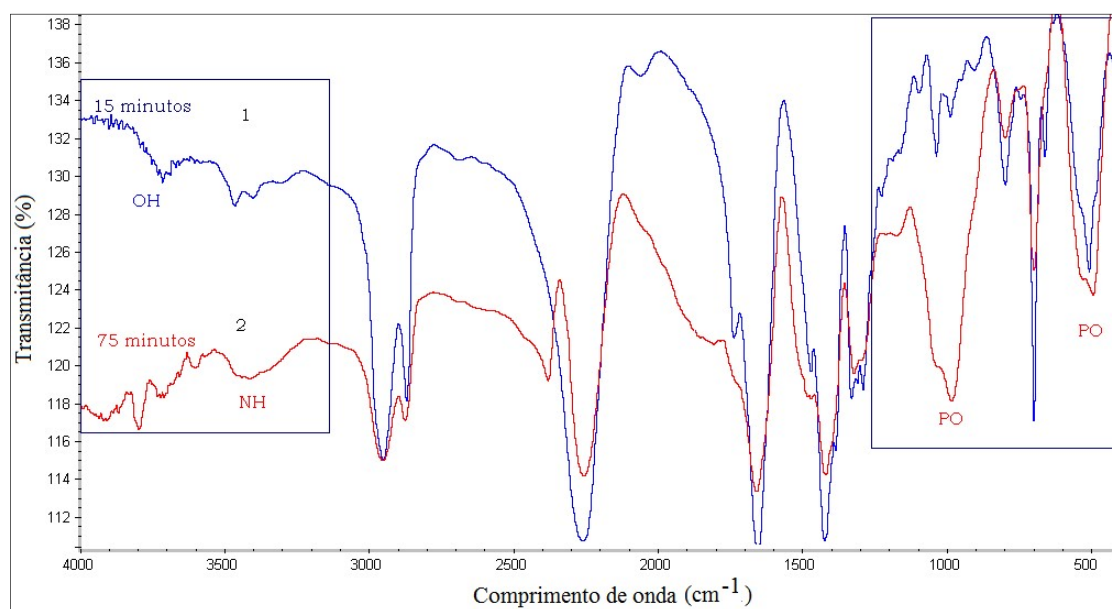
[0113] O biomaterial foi retirado juntamente com o tecido dos camundongos e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio (Khandwekar, 2010), 0,1 M, pH 7.2 por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M e, posteriormente, pós-fiadas em solução contendo: 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio a 0,8% por 1 hora a temperatura ambiente. O material foi lavado e então desidratado em séries crescentes de etanol (50, 70, 90% e 100%) (Kim, 2011; Dias, 2010), durante 20 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca Emitech) usando CO₂. O material foi montado em suporte apropriado (stub) e metalizado com uma película de ouro de aproximadamente 2µm de espessura, usando o aparelho Emitech K550-England. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP.

[0114] Na Figura 16 observa-se imagem do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 14 dias, obtida por microscopia eletrônica de varredura. A- visão geral da interação do biomaterial (BM) com as camadas do tecido subcutâneo; B- detalhe da região destacada em A. Observa-se o contato íntimo da camada fibrosa celular formada em torno do biomaterial (seta) e os prolongamentos do material fibroso que compõe a camada; C- visão geral da interação do biomaterial com as camadas da pele. Observa-se a formação da camada fibrosa em torno de

todo o biomaterial; D- detalhe da região destacada em C. Observa-se o processo de invasão das células no biomaterial.

REIVINDICAÇÕES

1. Bionanocompósito **caracterizado por** compreender poliuretano, poliol poli(álcool vinílico), e 25 a 33%, preferencialmente 25% de massa de hidroxiapatita por massa do bionanocompósito, sendo que o poliuretano é produto da reação de poli-isocianato HDT, trímero do hexametileno diisocianato (HDI) e um poliol poli(álcool vinílico), na proporção de 1:1 a 2:1 em massa.
2. Bionanocompósito, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender componentes opcionais selecionados dentre agentes anti-inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas, hormônios, células-tronco, células da medula óssea, células de cartilagem, células ósseas, células sanguíneas.
3. Bionanocompósito, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar propriedades mecânicas de compressão, variando entre 60 e 111 Mpa, capacidade de absorção de água variando entre 2,2% e 6,3%, densidade aparente variando entre $\rho=1,1 \text{ g/cm}^3$ e $\rho=1,3 \text{ g/cm}^3$ e porosidade variando entre $p=21,5\%$ e $38,2\%$.
4. Uso do bionanocompósito descrito nas reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** ser aplicado no preparo de uma composição para enxerto de buco maxilo facial, reconstituição e preenchimento da calota craniana e preenchimento de falhas ósseas nas diferentes regiões do esqueleto.

**Figura 1****Figura 2**

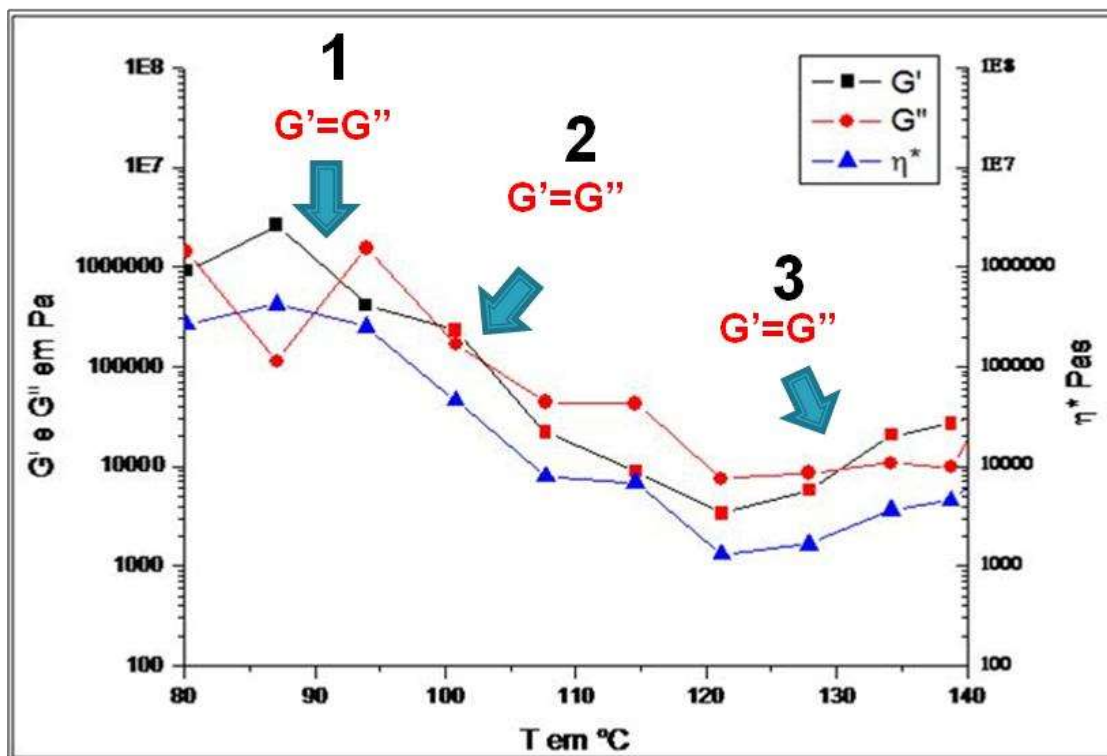


Figura 3

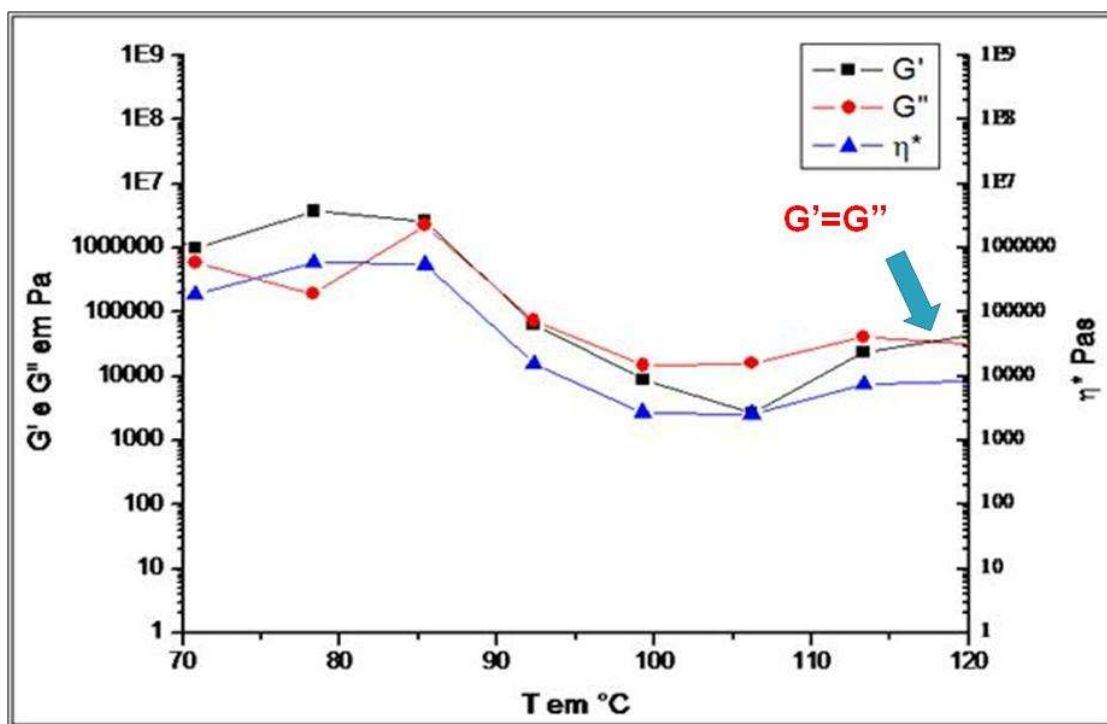


Figura 4

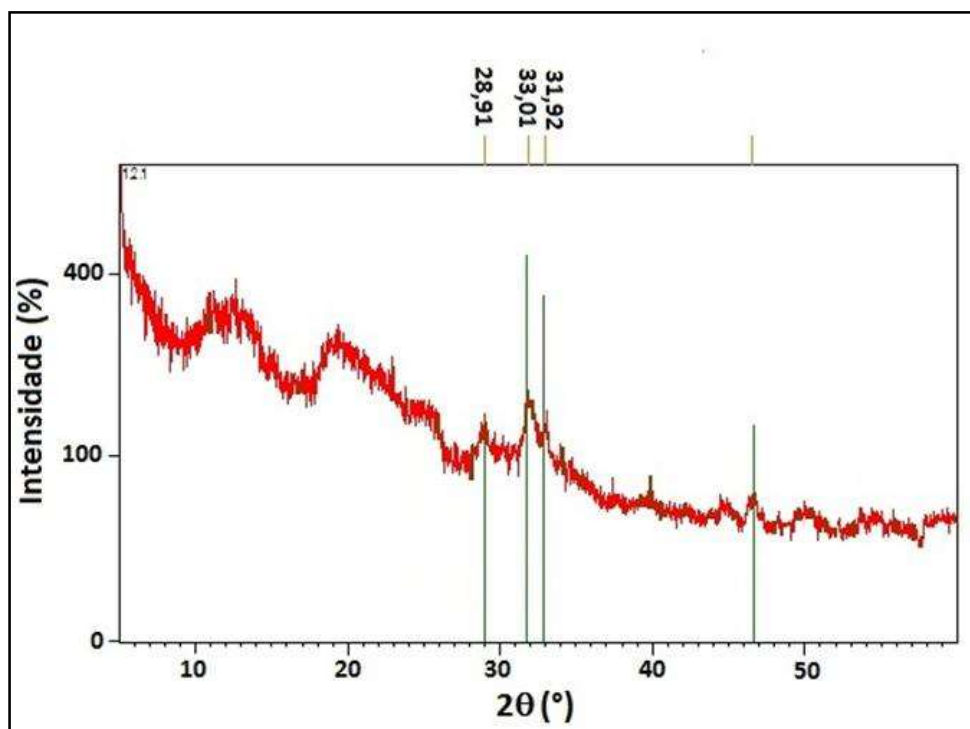


Figura 5

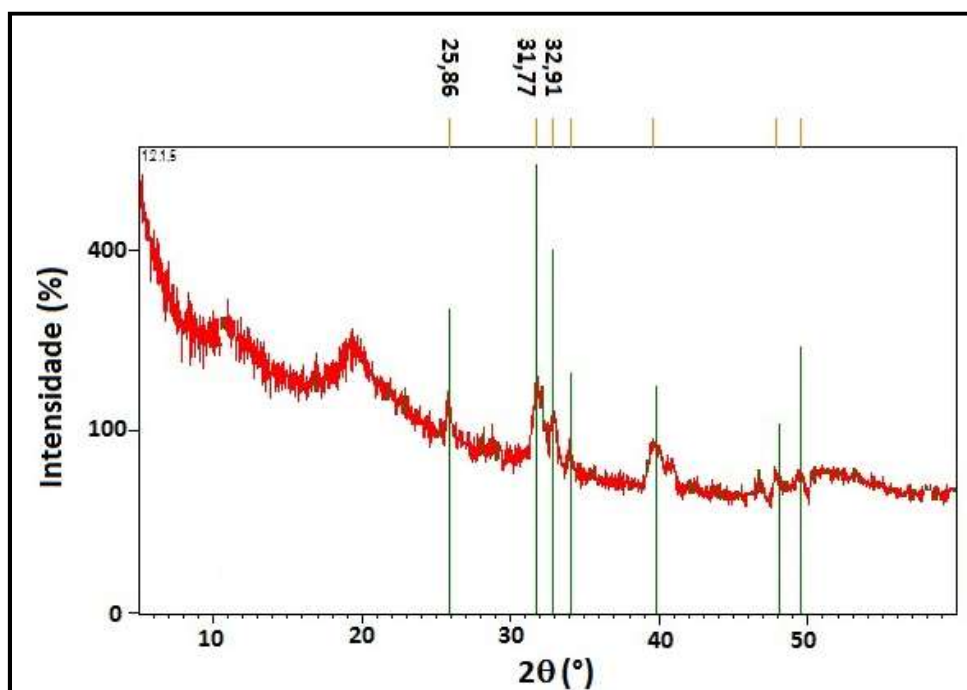


Figura 6

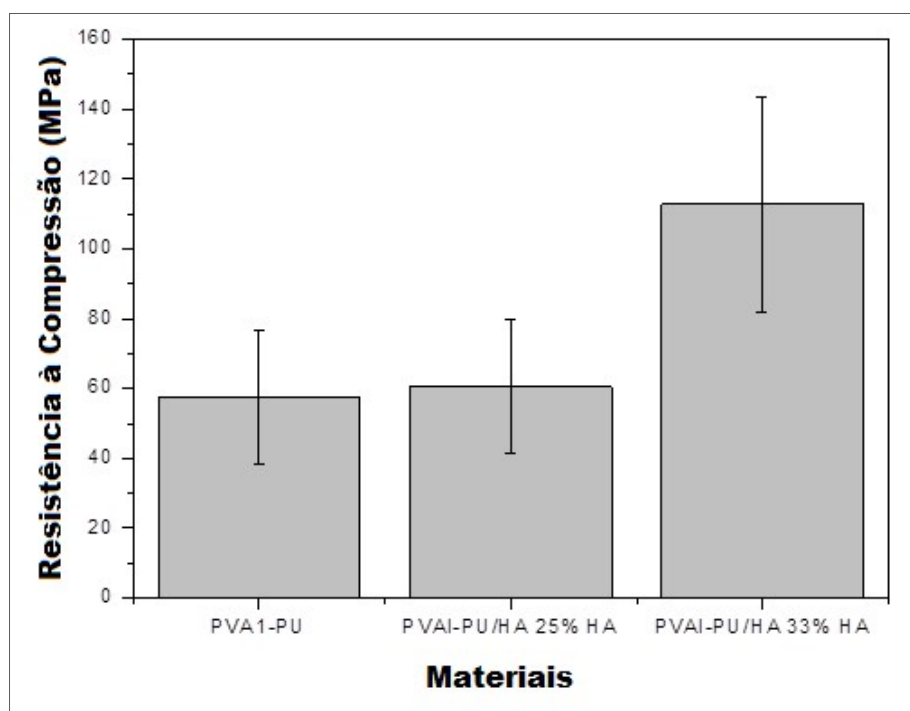


Figura 7

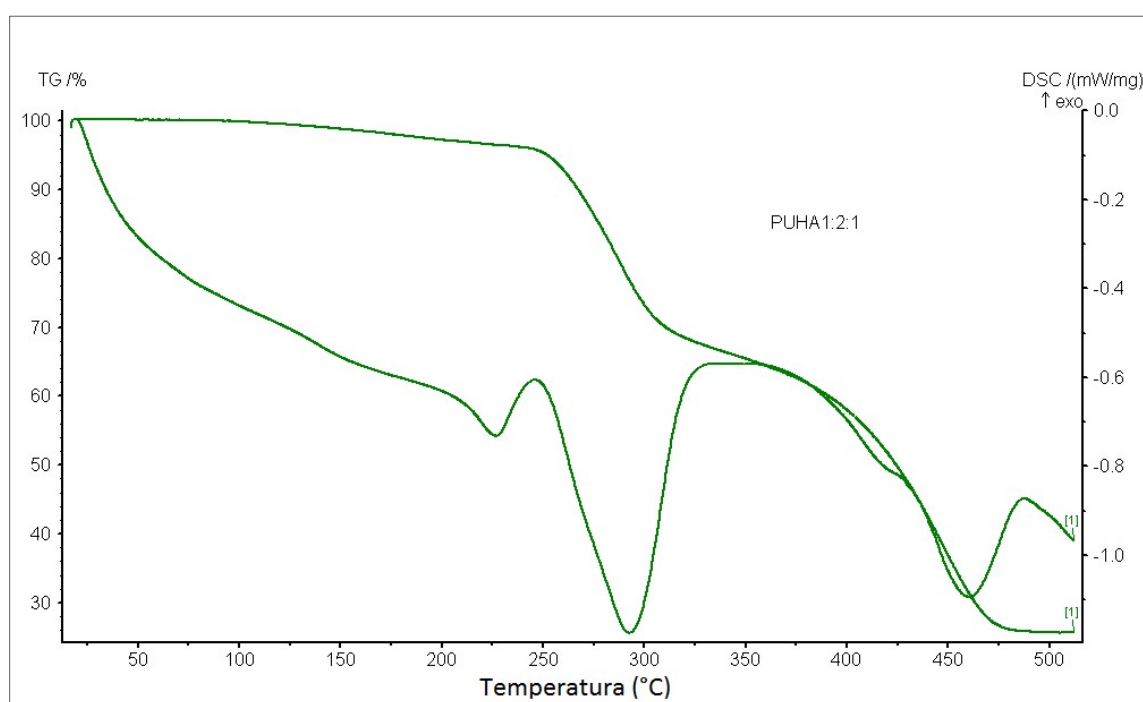
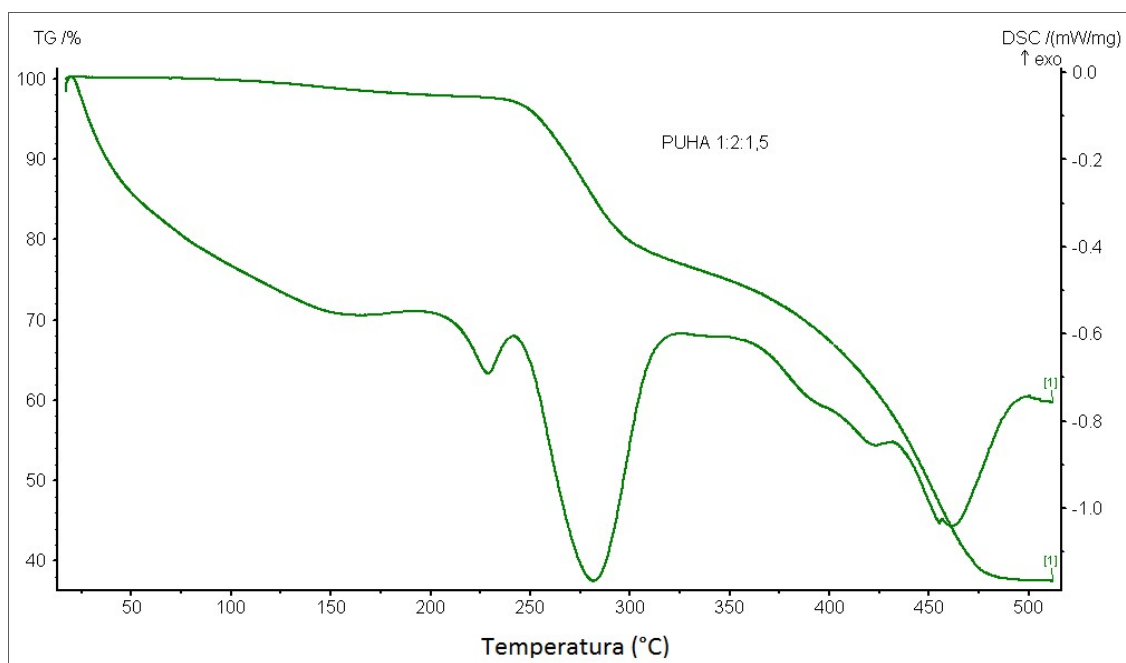


Figura 8

**Figura 9**

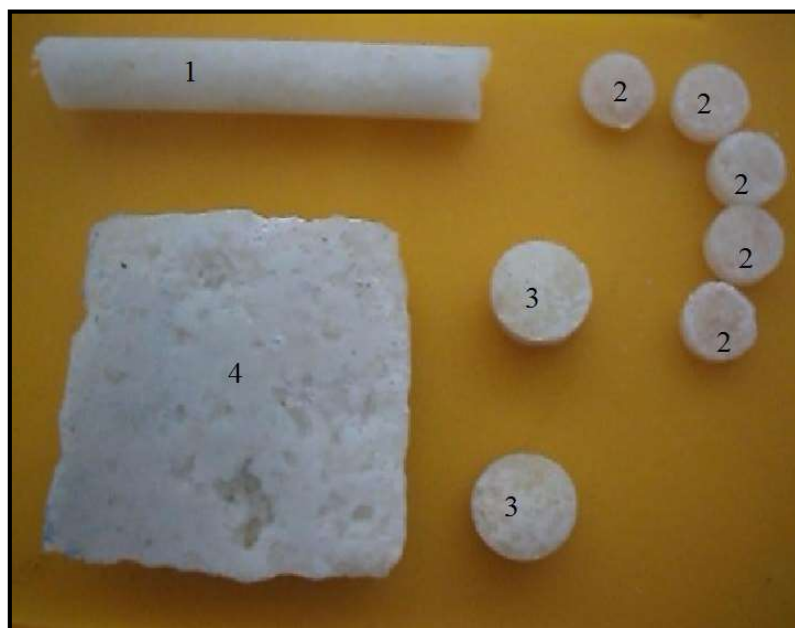


Figura 10

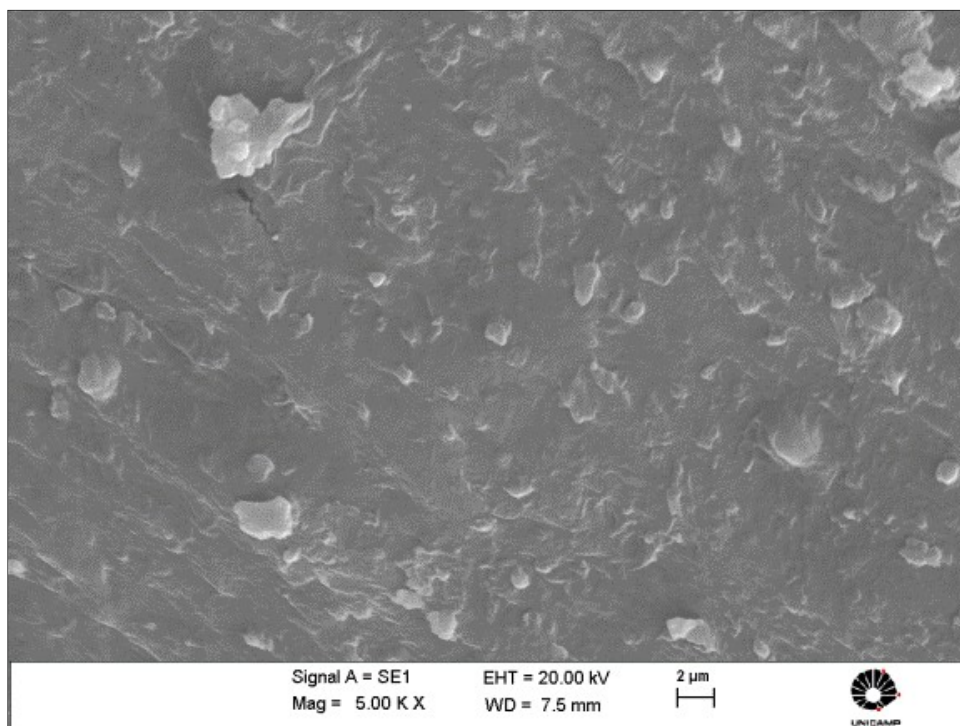


Figura 11

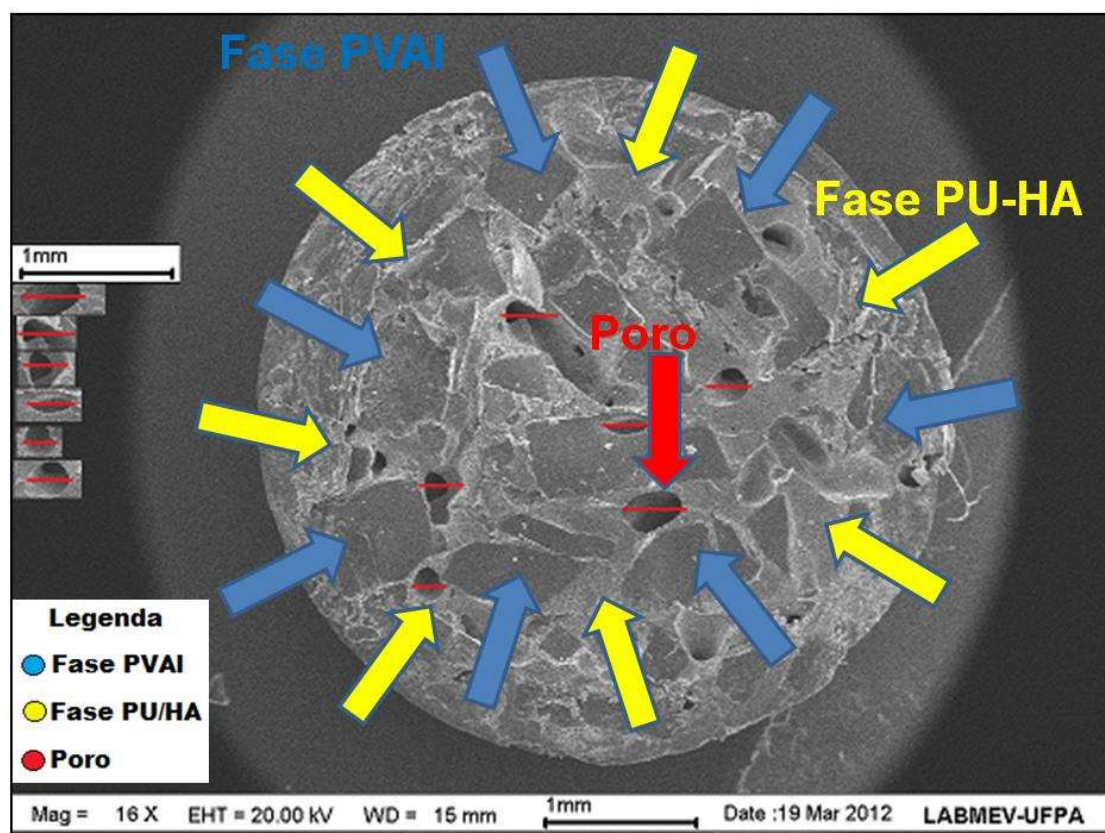


Figura 12

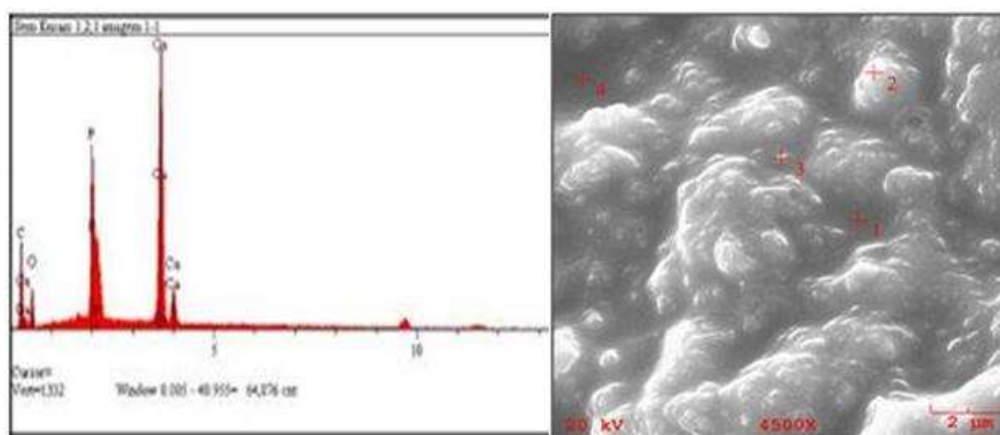


Figura 13

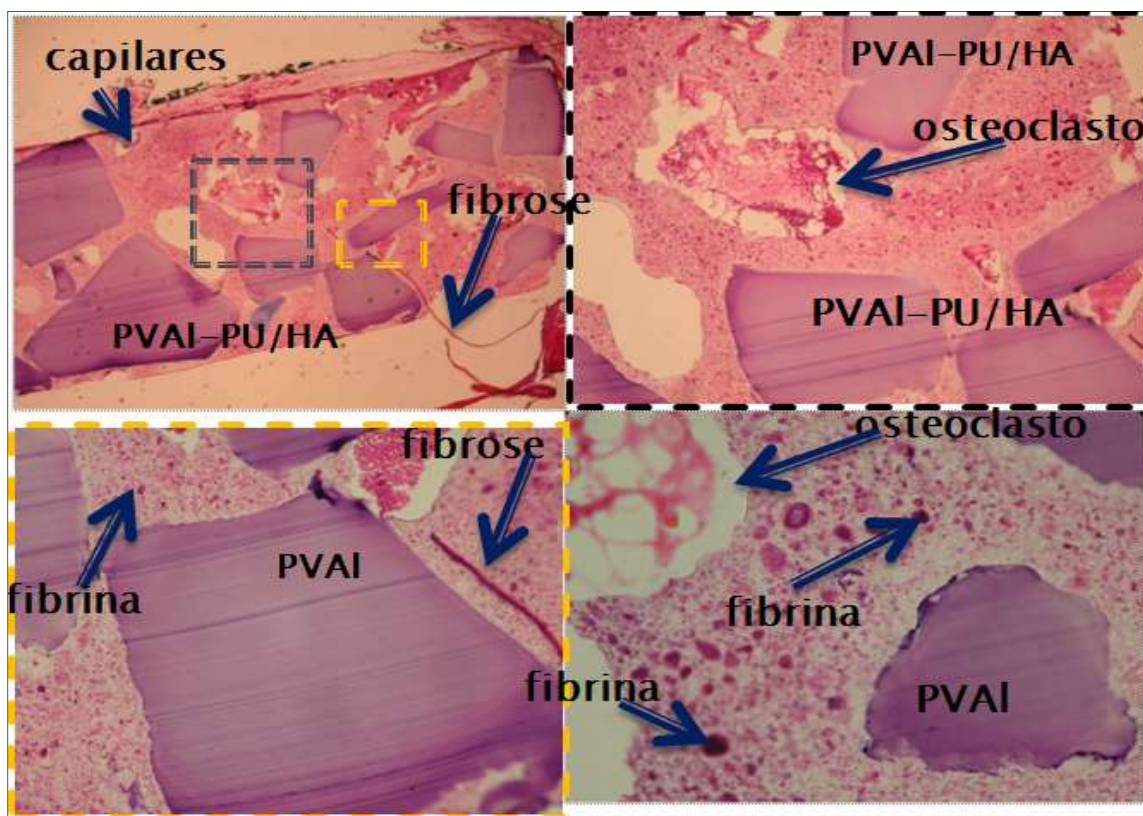


Figura 14

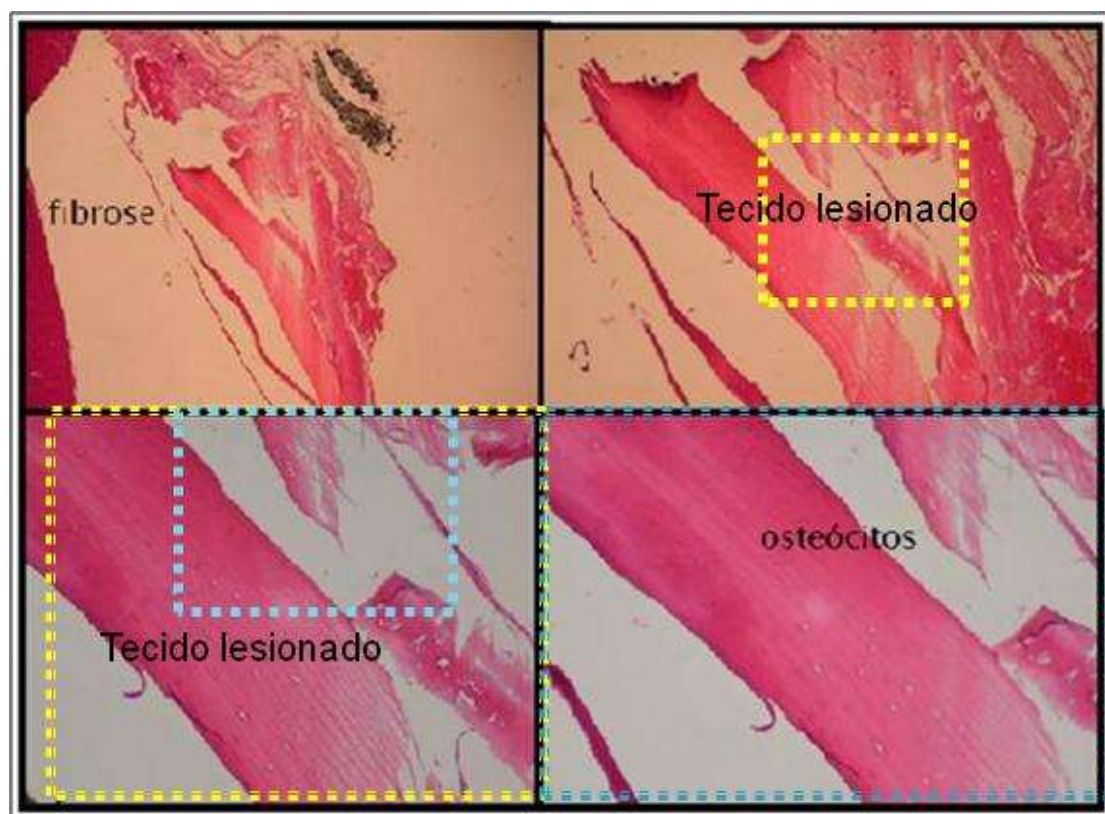


Figura 15

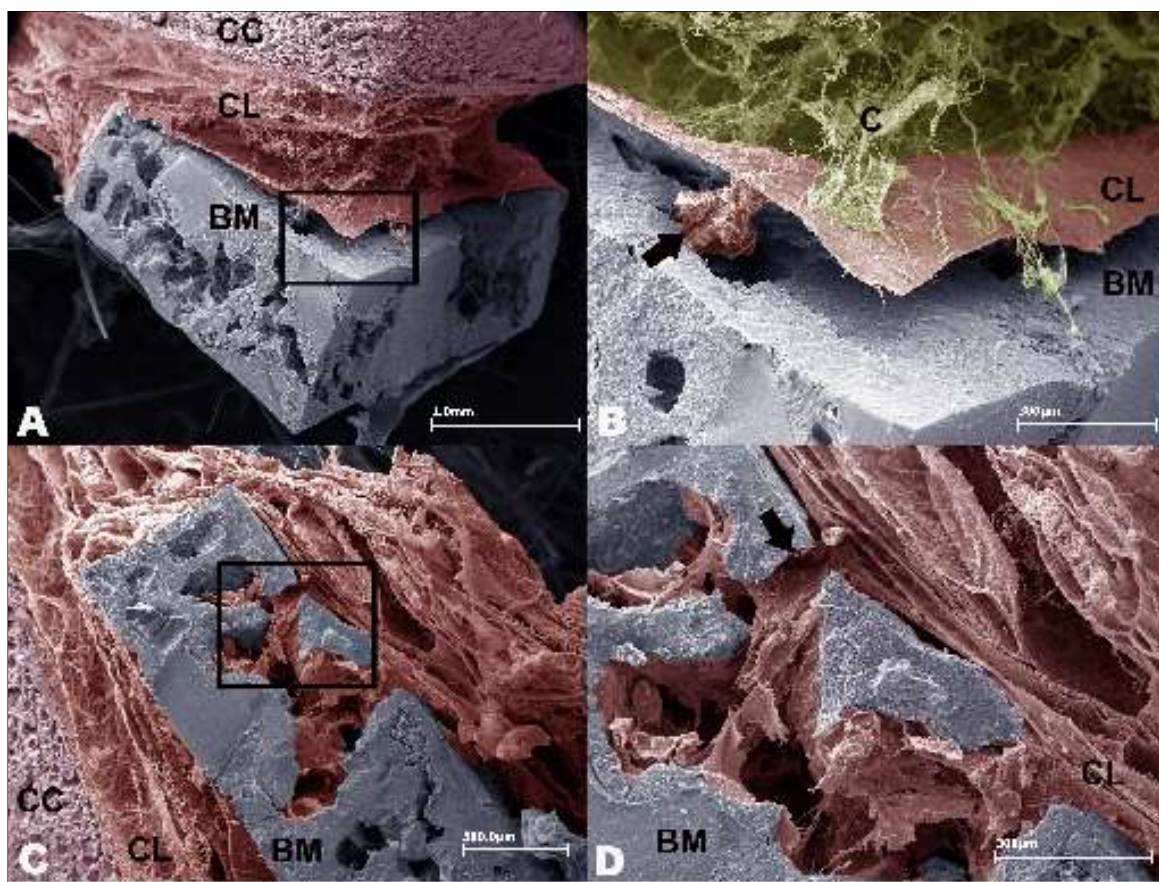


Figura 16