



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014012616-3 A2

(22) Data do Depósito: 26/05/2014

(43) Data da Publicação: 12/06/2018



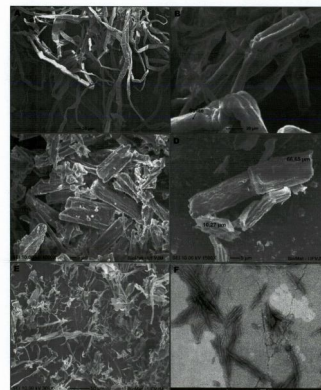
(54) Título: COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO

(51) Int. Cl.: A61K 6/06; A61K 6/08

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG

(72) Inventor(es): MARIA HELENA SANTOS; RAFAEL MENEZES SILVA; FABIANO VARGAS PEREIRA

(57) Resumo: "COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO" A presente invenção descreve a formulação de um novo produto e seus usos, caracterizado por compósitos contendo microfibras e 1 ou nanocristais de celulose (whiskers) dispersas em uma matriz contendo principalmente cimento de ionômero de vidro (CIV). O produto formado é um material biocompatível adequado para utilização nas áreas da saúde e da engenharia de tecidos, principalmente na odontológica como material restaurador. A inclusão de microfibras e 1 ou nanocristais de celulose ao CIV convencional produzem um material de composição inovadora e propriedades semelhantes aos encontrados no mercado, sendo uma alternativa de processo simples e de baixo custo ao uso do CIV de alta viscosidade e reforçados com polímeros. A adição das nanofibrilas e 1 ou nanocristais de celulose ao CIV melhorou significativamente suas propriedades mecânicas como resistência à compressão, à tração diametral e à abrasão maiores, além de apresentar módulo de elasticidade comparável com os materiais disponíveis comercialmente. Essas melhorias no cim(...)



“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”

[01] A presente invenção descreve o processo de preparação, produto e usos de um compósito contendo compósitos de cimento ionomérico modificados com fibras celulósicas, sua caracterização, comportamento mecânico, atividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

[02] Os cimentos de ionômero de vidro tornaram-se disponíveis a partir dos estudos pioneiros de Wilson e Kent (1971) sendo comercializados por volta de 1975. Na Odontologia, o cimento de ionômero de vidro convencional (CIV) é um material em destaque, pois veio agregar propriedades físicas e biológicas favoráveis, que não eram obtidas com outros materiais (Mount G.J., Clinical performance of *glass-ionomers*. *Biomaterials* 1998;19(6):573-9), assim como biocompatibilidade, capacidade de adesão à estrutura dentária e liberação de flúor, cuja presença está relacionada ao potencial de remineralização e à ação antibacteriana (Anusavice K.J.P. *Science of Dental Materials*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003; Craig R.G., Powers J.M. *Materiais Dentários Restauradores*. 13ª Ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2004). No entanto, este cimento ainda apresenta características a serem melhoradas como material restaurador, as quais incluem baixa resistência à abrasão, translucidez reduzida, friabilidade e sensibilidade à técnica (Liporoni P., Paulillo L.A.M.S., Cury J.A.; Dias C.T.S.; Paradella T.C. Surface finishing of resin-modified glass ionomer. *Gen Dent*. 2003;51(6):0363-6771). Uma limitação do CIV convencional está relacionada também com a ação de soluções com baixo pH, que pode deteriorar a superfície da restauração, tornando-os mais susceptíveis à falha clínica (Mohamed-Tahir M.A., Yap A.U. Effects of pH on the surface texture of glass ionomer based / containing restorative materials. *Oper Dent*. 2004;29:586-591; Ribeiro J.C.R., Fontana U.F., Moysés M.R., Reis A.C., Dias S.C., Ribeiro J.G.R. Avaliação da solubilidade e desintegração de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e compômeros em função de proteção superficial. *ROU*. 2006;35(4):247-252). Outra está relacionada com a última fase do processo de presa do material, que é muito lenta e se estende

por até vinte e quatro horas, expondo estes materiais às alterações higroscópicas do meio, sinérese e embebição (Craig e Powers, 2004; Anusavice, 1996).

[03] Os cimentos ionoméricos são amplamente utilizados em medicina, principalmente em otologia, cirurgia reconstrutiva, ortopedia (Zollner W., Rudel C. In: Hunt PC, editor. Glass ionomers: the next generation. Philadelphia International Symposium in Dentistry 1994;57-60), e também como um material estrutural (scaffold) para a formação de tecido ósseo (Meyer U., Szulczewski D.H., Barckhaus R.H., Atkinson M., Jones D.B. Biological evaluation of an ionomeric bone cement by osteoblast cell culture methods. *Biomaterials* 1993;12:917-24; Brook I.M., Hatton P.V. Glass-ionomers: bioactive implant materials. *Biomaterials* 1998;6:565-71).

[04] A capacidade de resistência mecânica é um requisito importante para um material designado para restaurar dentes anteriores e posteriores (Anusavice K.J. P. *Science of dental materials*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003), bem como na utilização protética e ortodôntica (Paradella T.C. Cimentos de ionômero de vidro na odontologia moderna. *ROU*. 2004; 33(4):157-161). Ainda hoje, os cimentos ionoméricos são bastante estudados e diversos materiais com as mais variadas composições foram introduzidos no mercado odontológico, procurando melhorar suas propriedades de resistência (Algera T.J., Kleverlaan C.J., Prah Andersen B., Feilzer A.J. The influence of environmental conditions on the material properties of setting glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006;22(9):852; Zhao J., Xie D. Effect of Nanoparticles on wear resistance and surface hardness of a dental glass-ionomer cement. *J Compos. Mater*. 2009;43(23):2739). Partículas metálicas foram adicionadas à composição do CIV com o objetivo de aumentar sua resistência, gerando os cimentos chamados "Cermets" (Manfio A.P., Ishikiriama A., Pereira J. Cimento de ionômero de vidro: seu potencial como material para inlay. *ROU*. 1994;8(3):163-169), porém com desvantagens estéticas. Em outros cimentos ionoméricos foram adicionados monômeros resinosos para melhorar a estética e a resistência mecânica. Porém, desvantagens como necessidade de técnica incremental, maior contração de polimerização, maior citotoxicidade,

necessidade de fotoativação e maior custo estão presentes nestes cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Mount G.J., Clinical performance of glass-ionomers. *Biomaterials* 1998;19(6):573-9; Xie D., Chung I.D., Wu W., Mays J. Synthesis and evaluation of HEMA-free glass-ionomer cements for dental applications. *Dent Mater.* 2004;20(5):470-478). Surgiram também os cimentos ionoméricos de alta viscosidade, contendo em sua composição maior número de partículas de menor tamanho, para que pudessem ser empregados com sucesso em áreas expostas a grandes esforços mastigatórios (Anusavice K.J. P. Science of dental materials. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003; Vieira I.M., Louro R.L., Atta M.T., Navarro M.F.L., Francisconi P.A.S. O cimento de ionômero de vidro na odontologia. *Saúde Com.* 2006;2(1):75-84).

[05] Um compósito consiste da combinação de dois ou mais materiais ou fases visando à manipulação de propriedades e comportamento (Hench L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1991;74(7):1487-1510; Alexander H. Composites. In: Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press. Chapter 2.8, p.94-105. 1996). Suas propriedades devem ser superiores ou intermediárias àquelas dos constituintes individuais (Anusavice K.J. P. science of dental materials. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003).

[06] Por muitos anos, tenta-se incorporar fibras como agente de reforço nos materiais para aumentar sua resistência.

[07] Nas últimas décadas tem havido um rápido desenvolvimento na elaboração de compósitos reforçados por fibras celulósicas, que possuem muitas características que tornam seu uso vantajoso, como baixo custo, baixa densidade, resistência específica e módulo de elasticidade elevado, além disso, não são abrasivas e nem tóxicas, podem ser facilmente modificadas por agentes químicos, são abundantes e provém de fontes renováveis (Reddy N, Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol England* 2005;23(1):22-27; Jústiz-Smith N.G., Virgo G.J., Buchanan V.E. Potencial of Jamaican banana, coconut coir and bagasse fibres as composite materials. *Mater Charact.* 2008;59:1273-78; Zhang X., Huang J., Chang P.R., Li J., Chen Y., Wang D., Yu J., Chen J. Structure and properties of

polysaccharide nanocrystal-doped supramolecular hydrogels based on cyclodextrin inclusion. *Polymers* 2010;5(19):4398–4407; Vila C., Romero J., Francisco J.L., Garrote G., Parajo J.C. Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. *Bioresour Technol* 2011;102(8):5251) conferindo propriedades interessantes aos mesmos como, melhor resistência mecânica e aumento do módulo de elasticidade. No uso de fibras de origem natural em compósitos a compatibilização entre a fibra e a matriz é de importância fundamental, bem como a incorporação de uma quantidade relativamente alta de fibras e sua capacidade de molhabilidade, aumentando a transferência de carga para as mesmas (Reddy N., Yang Y. Properties and potential applications of natural cellulose fibers from the bark of cotton stalks. *Biotechnol Bioeng* 2009;100(14):3563-9).

[08] A presente invenção apresenta como novidade a inclusão de características da celulose nano e microestruturada no desenvolvimento de materiais para aplicação odontológica, como no ionômero de vidro. Os cimentos de ionômero de vidro são associados a outros tipos de substâncias, como o metronidazol, ciprofloxacina e cefaclor, com características antibacterianas (PI 0402665-9 A2) e difere de outras invenções que tratam de cimentos para aplicação odontológica, como nas patentes PI8900112 A, US5332429A e US5925715A, aprimorando as características dos materiais existentes.

[09] Os nanocristais presentes nas fibrilas de celulose possuem propriedades semelhantes aos nanotubos de carbono, com a vantagem de serem considerados os materiais orgânicos mais abundantes do planeta. Além disso, os nanocristais de celulose são obtidos através de processo simples e de baixo custo, quando comparados aos nanotubos de carbono. Esses nanomateriais apresentam excelente dispersão na matriz, com conseqüente transferência de carga para a mesma, mantendo sua integridade e pureza (Coleman J.N., Khan U., Gun'ko Y.K. Mechanical Reinforcement of Polymers Using Carbon Nanotubes. *Adv Mater* 2006;18:689–706; Ajayan P.M., Tour J.M. Nanotube Composites. *Nature* 2007;447:1066–1068; Beecher J.F. Organic materials:

Wood, trees and nanotechnology. *Nat Nanotechnol* 2007;2(8):466–467; Tsuguyuki Saito, 2007; Vila C., Romero J., Francisco J.L., Garrote G., Parajo J.C. Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. *Bioresour Technol* 2011;102(8):5251).

[010] Os biomateriais funcionam em contato íntimo com diferentes tecidos humanos e precisam enquadrar-se na definição de biomateriais. A biocompatibilidade de um material é um parâmetro que deve ser considerado para sua formulação e uso. A Ciência dos Biomateriais tem a necessidade de acompanhar, conhecer e apreciar certas considerações biológicas que estão associadas com o uso e a seleção dos materiais a serem empregados nos tecidos humanos. Suas propriedades mecânicas deixam de ser prioridade se o material causa danos a esses tecidos (Anusavice K.J.P. *Science of dental materials*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003). O presente invento aponta características de biocompatibilidade.

[011] O CIV convencional está envolvido na remineralização da dentina afetada remanescente e no controle da recidiva de cárie, devido à sua natureza anticariogênica e, sendo quimicamente ativado, dispensa o uso de aparelhos especiais como os de fotoativação. Sua adesividade minimiza a microinfiltração na interface dente/restauração e sua biocompatibilidade evita novas lesões ao dente tratado, dispensando o uso de materiais de proteção, a não ser em cavidades consideradas muito profundas, onde é necessário usar o cimento de hidróxido de cálcio como material forrador (Anusavice K.J.P. *Science of dental materials*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003). Com a inclusão de microfibras e de nanocristais de celulose no CIV espera-se que este apresente uma maior resistência mecânica, sem que haja interferência nas suas propriedades positivas.

[012] Órgãos internacionais procuram respostas para a necessidade de se encontrar um método de preservação dos dentes de indivíduos de todas as idades, nas comunidades carentes de países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos. Para tal, foi aprovada e divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a técnica do tratamento restaurador atraumático

(TRA), (*Atraumatic Restorative Treatment - ART*), que preconiza o tratamento das lesões cariosas pela remoção parcial da cárie dentária que consiste na remoção da dentina infectada e na manutenção da dentina afetada, usando apenas instrumentos manuais. Este tipo de tratamento tem como princípio a preservação máxima das estruturas dentárias e usando principalmente, este cimento para restauração dos dentes (Frencken J.E. The ART approach using glass-ionomers in relation to global oral health care. *Dent Mater* 2010;1(1):1-6). O desenvolvimento do CIV modificado por fibras vai ao encontro desta necessidade, e poderá ser empregado como material restaurador definitivo no TRA, técnica simples que, independentemente das condições sócio-econômicas, é indicada para adultos e crianças. Assim, esta intervenção poderá evitar que as lesões de cárie tornem-se cada vez maiores até que os dentes sejam perdidos pela esfoliação natural.

[013] Esta invenção mostra que a adição de fibras celulósicas em tamanho micrométrico no CIV promove melhorias em algumas das propriedades mecânicas, quando comparadas às do material sem adição das mesmas. Entretanto, cargas de nanocristais de celulose são capazes de melhorar as propriedades mecânicas nesse cimento convencional.

[014] Os compósitos apresentaram-se estáveis, com morfologia, estrutura e composição química elementar semelhantes aos seus materiais precursores. Todos os compósitos desenvolvidos mostraram atividade antimicrobiana similar à do cimento convencional.

[015] A inclusão de nanocristais de celulose ao CIV aumentou suas propriedades mecânicas, não interferindo nas suas outras propriedades positivas. A melhoria no cimento ionomérico deverá proporcionar uma maior longevidade clínica das restaurações dentárias realizadas com este material. Além disso, os nanocristais de celulose podem ser adicionados a outros materiais odontológicos que precisam de líquido, no qual haja dispersão dos nanocristais, para sua reação química.

[016] Do ponto de vista biológico, eventuais componentes tóxicos podem causar irritação, degeneração ou mesmo necrose dos tecidos. Os compósitos

desenvolvidos apresentaram ação estimuladora celular e baixa irritabilidade tecidual, mostrando-se biocompatíveis.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017] **Figura 1** – Imagens de MEV das fibras de celulose originais (A e B). As setas indicam a presença de lacuna e estrias na fibra celulósica. Micrografias de MEV das microfibras de celulose (mfC), (C e D) e dos nanocristais de celulose (ncC), (E) e imagem de MET dos ncC (F).

[018] **Figura 2** – Imagens de MEV do pó de cimento de ionômero de vidro (CIV), (A) e dos compósitos CIV – GC (controle), (B), CIVmfC - G2 (C e D), CIVncC - G04 (E e F). As setas indicam a presença de microfibras (C e D) e de nanocristais (F) nos compósitos.

[019] **Figura 3** – X-ray diffraction patterns of GIC (GC) and GICncC 0.4% (G04).

[020] **Figura 4** – Espectros de FTIR das fibras celulósicas originais, mfC, do pó de CIV, dos compósitos CIV (GC) e dos compósitos CIVmfC (G1 a G3), com bandas vibracionais características de seus grupamentos químicos (A). Espectros de FTIR das fibras celulósicas originais, ncC e dos compósitos CIV (GC) e CIVncC (G01 a G05).

[021] **Figura 5** - Imagens de MEV de CIV (GC), (fig. 1A), dos compósitos CIVmfC (G1), (fig. 1B) e CIVncC (G2) (fig. 1C) e seus respectivos espectros de EDS. As setas indicam a presença de microfibras e de nanofibrilas nos compósitos.

[022] **Figura 6** - Espectros de FTIR dos compósitos CIVncC (G3), CIVmfC (G2) e dos seus materiais precursores CIV (GC), mfc e ncC, mostrando as principais bandas de absorção de seus constituintes químicos moleculares.

[023] **Figura 7** - A) Grupo GC aos 07 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (M) (+), outros mononucleares (MN) (+) e fibroblastos (F) (+). B) Grupo G1 aos 07 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (++), outros mononucleares (++), vasos sanguíneos (VS) (++) e fibroblastos (+). C) Grupo G2 aos 07 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (+), outros mononucleares (+), vasos sanguíneos (+) e

fibroblastos (++) . D) Grupo GC aos 30 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (+), vasos sanguíneos (+), fibroblastos (++) e moderada colagenização. E) Grupo G1 aos 30 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (+), fibroblastos (++) e moderada colagenização. F) Grupo G2 aos 30 dias após experimento, exibindo presença de macrófagos (+), vasos sanguíneos (+), fibroblastos (++) e moderada colagenização. G) Grupo GC aos 60 dias após experimento, exibindo presença de inúmeros fibroblastos (++) , escasso vasos sanguíneos (+) e abundante colagenização. H) Grupo G1 aos 60 dias após experimento, exibindo presença de inúmeros fibroblastos (++) e abundante colagenização. I) Grupo G2 aos 60 dias após experimento, exibindo presença de inúmeros fibroblastos (++) e abundante colagenização. HE 400x.

[024] **Figura 8** - A) Grupo GC aos 07 dias após experimento, exibindo espessa cápsula fibrosa (CF) ($62,86 \pm 30,65$) pouco colagenizada (CL). B) Grupo G1 aos 07 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa de média espessura ($50,49 \pm 17,65$) pouco colagenizada. C) Grupo G2 aos 07 dias após experimento, exibindo espessa cápsula fibrosa ($61,83 \pm 23,91$) pouco colagenizada. D) Grupo GC aos 30 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa com média espessura ($56,08 \pm 25,02$) e moderada colagenização. E) Grupo G1 aos 30 dias após experimento, exibindo espessa cápsula fibrosa ($65,76 \pm 59,88$) e moderada colagenização. F) Grupo G2 aos 30 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa com média espessura ($50,52 \pm 17,63$) e moderada colagenização. G) Grupo GC aos 60 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa delgada ($30,15 \pm 4,28$) e abundante colagenização. H) Grupo G1 aos 60 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa delgada ($41,21 \pm 3,98$) e abundante colagenização. I) Grupo G2 aos 60 dias após experimento, exibindo cápsula fibrosa delgada ($26,72 \pm 2,87$) e abundante colagenização. HE 400x.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[025] A obtenção dos compósitos de cimento ionomérico convencional modificados com fibras celulósicas apresentam grande importância na área

biomédica, em especial na odontologia. A matéria tratada pode ser mais bem compreendida através dos seguintes exemplos, não limitantes:

[026] **Exemplo 1 - Obtenção das microfibras de celulose (mfC)**

[027] As fibras de celulose foram obtidas da madeira de eucalipto e individualizadas com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio (Processo Kraft de cozimento), de acordo com (Ferreira C.R., Fantini Junior M., Colodette J., Gomide J.L., Carvalho A.M.M.L. Avaliação tecnológica de clones de eucalipto: parte I - qualidade da madeira para produção de celulose Kraft. *Scientia Forestalis* 2006;70(70):161-170). Em seguida, foram branqueadas por uma sequência dos três estágios, descritos a seguir: deslignificação com oxigênio (O), deslignificação com dióxido de cloro (D) e extração alcalina com peróxido de hidrogênio pressurizado (PO). As fibras foram obtidas com uma alvura final desejada em torno dos 80% ISO, segundo (Ferreira C.R., Fantini Junior M., Colodette J., Gomide J.L., Carvalho A.M.M.L. Avaliação tecnológica de clones de eucalipto: parte II - qualidade da madeira para produção de celulose Kraft. *Scientia Forestalis* 2006;71(71):9-18). O material foi armazenado dentro de invólucros plásticos, à temperatura inferior a 10°C (preferencialmente abaixo de 6°C) para evitar a proliferação fúngica.

[028] Para obtenção das fibras, foram adicionadas água destilada (entre 50 e 500 mL) às fibras celulósicas (entre 0,1 e 10 g, preferencialmente, 2,5 g) e levadas a um misturador (Ultra-turrax T 25, IKA-WERKE, Staufen, Suíça), durante diferentes tempos (entre 30 minutos e 6 horas, preferencialmente 3 h) à velocidades de até 12.000 RPM (preferencialmente 9.500 RPM). Em seguida, a mistura foi secada em estufa (Fanem, São Paulo, Brasil) em temperaturas até 60°C (preferencialmente 37°C), obtendo-se uma lâmina, que foi recortada em pedaços diminutos e mantidos à mesma temperatura até o momento de uso.

[029] **Exemplo 2 - Obtenção dos nanocristais de celulose (ncC)**

[030] Uma celulose de eucalipto, após processo Kraft, contendo α -celulose (96-98%), foi usada no processo de obtenção dos ncC. A hidrólise da polpa de madeira do eucalipto foi realizada com ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) como descrito na literatura (De Rodriguez N.L.G., Thielemans W., Dufresne A. Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate

nanocomposites. *Cellulose* 2006;13: 261–270; De Mesquita J.P., Patricio P.S., Donnici C. Hybrid layer-by-layer assembly based on animal and vegetable structural materials: multilayered films of collagen and cellulose nanowhiskers. *Soft matter* 2011;7: 4405–4413; Brito B.S.L., Pereira F.V., Putaux J.L., Jean B. Preparation, morphology and structure of cellulose nanocrystals from bamboo fibers. *Cellulose* 2012;19:1527-1536), com algumas modificações. Após obtenção de um pó fino, as partículas de celulose foram tratadas com solução de NaOH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e, em seguida, um tratamento de branqueamento foi realizado utilizando solução tampão com ácido acético a 99% e ácido clorídrico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), (1,7% em peso em água). As fibras foram filtradas e enxaguadas com água desionizada, entre cada passo. Uma solução de 64% em peso de ácido sulfúrico foi adicionada às fibras, sob forte agitação mecânica, para preparar a dispersão de nanocristais de celulose da polpa branqueada. O processo de hidrólise foi realizado a 50°C durante cerca de 50 min. Em seguida, a dispersão foi diluída duas vezes e foi lavada três vezes com água desionizada por meio de centrifugação. A diálise contra água desionizada foi realizada até a dispersão atingir pH ~ 6. A dispersão foi ultrasonificada (Sonifier Cole Parmer, Derwood, Maryland, E.U.A.) durante cerca de 5 minutos e, finalmente, filtrada utilizando um filtro com poros de 20 μm . A concentração final da dispersão de nanocristais de celulose (ncC) foi de aproximadamente 1% em peso. Os ncC foram mantidos resfriados.

[031] Exemplo 3 – Desenvolvimento do compósito cimento ionomérico (CIV) modificados com fibras celulósicas.

[032] Diferentes quantidades em massa de mfC podem ser adicionadas ao líquido do CIV, entre 0,001 e 5 % (m/m) em relação ao CIV . Como exemplo podemos destacar o preparo dos compósitos de cimento de ionômero de vidro modificado com mfC (CIVmfC), em três grupos: G1- CIVmfC 0,005 g, G2- CIVmfC 0,010 g e G3- CIVmfC 0,015 g. Um grupo controle, GC- CIV, também foi obtido, não limitante.

[033] No preparo dos compósitos de cimento de ionômero de vidro modificado com ncC, (CIVncC) os nanocristais podem ser adicionadas em diferentes quantidades, entre 0,001 e 5 % (m/m) em relação ao CIV. Como exemplo, é apresentado o estudo de amostras com diferentes concentrações de ncC no total de sua massa, que foram confeccionados obtendo-se os grupos experimentais: G01- CIVncC 1%, G02- CIVncC 0,8%, G03- CIVncC 0,6%, G04- CIVncC 0,4% e G05- CIVncC 0,2%. Os ncC foram adicionados ao líquido do CIV e levados ao sonificador por 2 min para completa homogeneização.

[034] Os compósitos foram preparados respeitando a proporção pó: líquido de 1:1 e manipulados da seguinte forma: colocou-se a quantidade de pó recomendado sobre a placa de vidro ou bloco de papel, dividiu-se o pó em duas metades, gotejou-se o líquido com o frasco na posição perpendicular, aglutinou-se a primeira metade do pó ao líquido por 15 segundos, adicionou-se o pó restante à massa e aglutinou-se por mais 15 segundos, obtendo-se uma massa cremosa, vítrea e úmida (Anusavice K.J.P. Science of dental materials. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003).

[035] **Exemplo 4 – Avaliação da morfologia e composição dos compósitos de cimento ionomérico (CIV) modificados com fibras celulósicas.**

[036] Para avaliação da morfologia e da composição as amostras: fibras (Exemplo 1 e 2) e compósitos (Exemplo 3), foram analisadas da seguinte forma:

[037] Para a análise de Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia de energia de dispersão de raios-X, o pó do CIV foi disperso em solução de 50% de álcool etílico e 50% de água destilada em uma lâmina de vidro e levado à estufa de secagem (FANEM, São Paulo, SP, Brasil). Pequenas quantidades de mfC e ncC foram imersas em água destilada por 30 min, sob leve agitação, e foram tratadas com concentrações crescentes (50, 70, 95 e 100%) de solução de acetona (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

[038] O pó, as fibras, e amostras representativas dos grupos experimentais do CIV e dos compósitos desenvolvidos foram recobertos com uma fina camada

de ouro-paládio. Os materiais preparados foram observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando feixe de elétrons de 10 a 15 kV (CS-3500, Shimadzu, Kyoto, Japão). A análise elementar qualitativa de microrregiões das amostras foi realizada, através de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), (CS3200, Oxford, Oxfordshire, Inglaterra).

[039] Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, uma suspensão de nanocristais de celulose foi obtida a partir de dispersão aquosa (0,01% m/v). As imagens dos nanocristais foram realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) no equipamento FEI Tecnai G2-Spirit (Hillsboro, Oregon, USA). O material foi depositado em uma grade de cobre de 300 mesh coberta com Formvar/Carbono. As amostras foram, subsequentemente, tratadas com acetato de uranila 2% para aumentar o contraste dos nanocristais à microscopia eletrônica de transmissão.

[040] As micrografias de MEV da fibra de celulose do eucalipto original mostraram um aglomerado de fibras longas, de forma cilíndrica (fig. 1A) e aspecto rugoso, com a presença de estrias e lacunas em toda sua extensão (fig. 1B). As mfC apresentaram-se com tamanho heterogêneo e características semelhantes às fibras originais (fig. 1C e 1D). Algumas delas não mantiveram a forma cilíndrica, apresentaram aspecto laminar (fig. 1D). Na micrografia de MEV as ncC mostraram-se em forma de placas de diferentes tamanhos (fig. 1E) e na micrografia de MET apresentou-se como nanocristais individuais, de tamanho uniforme, e alguns agregados (fig. 1F). A partir de várias outras imagens de MET, os valores médios do comprimento e do diâmetro dos nanocristais isolados foram determinados como sendo $145 (\pm 25 \text{ nm})$ e $6 (\pm 1,5 \text{ nm})$, respectivamente, apresentando uma razão de forma aproximada de 24.

[041] Nas micrografias de MEV o pó do CIV mostrou-se constituído de partículas irregulares (fig. 2A). Em amostras representativas dos compósitos (fig. 2) observou-se a morfologia do CIV (GC) com matriz envolvendo partículas de tamanho heterogêneo e a presença de algumas bolhas (fig. 2B). As superfícies de fratura de compósitos CIVmfC com 0,010 g de mfC (G2) mostraram presença de mfc e partículas de vidro na matriz do cimento ionomérico modificado (fig. 2C e 2D). A superfície de CIVncC 0,4% (G04)

mostrou ncC de tamanho uniforme e com distribuição aleatória na matriz gelatinosa (fig. 2E). As ncC mostraram-se interligadas, além de aderidas também às partículas de carga do CIV (fig. 2F).

[042] Os espectros de EDS das mfC e ncC foram similares ao das macrofibras de celulose (fig. 1A), que mostraram picos de alta intensidade de Carbono (C) e Oxigênio (O) correspondentes à constituição da celulose. O espectro de EDS do pó de CIV (fig. 2A) apresentou picos de alta intensidade de Cálcio (Ca), Flúor (F), Alumínio (Al) e Silício (Si). O espectro de CIV mostrou os mesmos picos do espectro do pó correspondentes à sua carga inorgânica, além de picos de C e O da matriz orgânica do cimento. Os espectros de CIVmfC e de CIVncC apresentaram o mesmo padrão do espectro do CIV. Picos de Ouro e de Paládio, provenientes da metalização dos materiais, também podem ser visualizados, entretanto não foram identificados nos espectros.

[043] A análise por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no equipamento Nicolet 6700 (Thermo Electron Scientific Instruments Corp., Madison, WI, USA). Os espectros foram obtidos com 32 varreduras, no intervalo entre 675 à 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e unidades de absorbância (abs) pela técnica da reflectância total atenuada (ATR).

[044] Nos espectros de FTIR da fibra de celulose original (fig. 4) observou-se a presença de bandas de absorção referentes aos grupamentos -OH, em 3409, 3339 e 3276 cm^{-1} ; banda referente a -CH₃ dos grupamentos metílicos em 2896 cm^{-1} ; bandas em 1428 cm^{-1} dos grupamentos metilênicos (-CH₂); bandas em 1370 e 1278 cm^{-1} referentes a C-H; bandas 1337 e 1206 cm^{-1} correspondentes a C-OH; e das bandas 1161, 1065 e 1034 cm^{-1} correspondentes aos grupamentos C-O-C da estrutura sacarídea, atribuída a celulose e hemicelulose. As mfC e ncC apresentaram o mesmo padrão de espectros de FTIR da fibra de celulose original. O espectro de FTIR do pó de CIV mostrou banda intensa dos grupamentos COO-, correspondente à presença de ácido poliacrílico liofilizado no pó. O compósito CIV (GC) mostrou bandas dos grupamentos Si-OH livres em 3650 e 3680 cm^{-1} e Si-OH em 3200 e 3450 cm^{-1} referentes à água absorvida e/ou referentes a ligações de H aos

grupos Si–OH; bandas referentes aos grupamentos C–O em 1637 cm^{-1} ; dos grupamentos COO-(n+) ($n = \text{Al}^{3+}$ e Ca^{2+}) em 1585 cm^{-1} e de COO-Ca⁺ em 1456 e 1410 cm^{-1} ; de Si–OH em 957 a 970 cm^{-1} ; e de Si–O–Si em 800 a 810 cm^{-1} . Nos espectros dos compósitos mfC (G1, G2 e G3) e dos compósitos ncC (G01, G02, G03, G04 e G05) observou-se bandas de absorção características de seus materiais precursores.

[045] Os compósitos apresentaram-se estáveis, com morfologia, estrutura e composição química elementar semelhantes aos seus materiais precursores. Nos compósitos CIVncC observou-se formação de uma trama envolvendo nanocristais, matriz cimentícia e partículas de carga, sendo que a distribuição de ncC na massa de CIV mostrou-se mais homogênea no compósito CIVncC 0,4%.

[046] **Exemplo 5 – Avaliação do desempenho mecânico dos compósitos de cimento ionomérico (CIV) modificados com fibras celulósicas.**

a. Os compósitos podem ser usados em diferentes proporções CIV e de fibras. Considerando os Exemplos 1 a 3, os corpos de prova (cps) foram preparados usando fibras do tipo mfC (grupos: GC; G1; G2; e G3) e do tipo ncC (grupos: G01; G02; G03; G04; e G05) conforme descrito a seguir, não limitante.

[047] Os compósitos foram preparados respeitando a proporção pó:líquido de 1:1 e manipulados da seguinte forma: coloca-se a quantidade de pó recomendado sobre a placa de vidro ou bloco de papel, divide-se o pó em duas metades, goteje o líquido com o frasco na posição perpendicular, aglutina-se a primeira metade do pó ao líquido e manipula-se por 15 segundos, adiciona-se o pó restante a massa e manipula-se por mais 15 segundos obtendo-se uma massa cremosa, vítrea e úmida (Anusavice K.J.P. Science of dental materials. St. Louis: Saunders Elsevier, 2003). Os cps foram armazenados em água destilada à temperatura de 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

[048] Para a análise da resistência à compressão, tração diametral e módulo de elasticidade Vinte cps de cada um dos grupos foram confeccionados em uma matriz de Teflon com 4 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento, apoiada

sobre uma placa de vidro. Para a confecção dos cps do GC o CIV foi manipulado e inserido no interior da matriz sob pressão, através de uma seringa específica (Centrix, DFL Ind., São Paulo, SP, Brasil). No preparo dos cps dos outros grupos o cimento foi inserido com uma espátula de inserção e compactado com o auxílio de um condensador de amálgama. Após o preenchimento total da matriz, uma tira de poliéster foi pressionada sobre ela com um peso de 500 g, até atingir seu tempo de presa, a fim de se obter adequado escoamento e lisura superficial.

[049] Após 24 horas de armazenamento em água destilada, à temperatura de 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), cps (n=10) de cada grupo foram submetidos ao teste de resistência à compressão em uma máquina de ensaio universal (EZ-L Test, Shimadzu, Kyoto, Japão) com célula de carga de 200 kgf na velocidade de 1 mm.min⁻¹ e com seu longo eixo na posição vertical, até que ocorresse a fratura. Para o teste de resistência à tração diametral, cps (n=10) de cada grupo foram submetidos à mesma célula de carga, porém com velocidade de 0,5 mm.min⁻¹ e com seu longo eixo na posição horizontal. O módulo de elasticidade apresentado pelos cps também foi obtido durante o ensaio de compressão e de tração diametral. Os resultados obtidos foram transformados em MPa e estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias, desvios-padrão e significância estatística de resultados dos testes de resistência à compressão, módulo de elasticidade à compressão, resistência à tração diametral e módulo de elasticidade à tração para os grupos de corpos de prova dos compósitos CIV (GC), CIVmfC (G1 a G3) e CIVncC (G01 a G05).

Compósito	Grupo	Resistência à compressão (MPa)			Módulo de Elasticidade à compressão (MPa)			Resistência à tração diametral (MPa)			Módulo de Elasticidade à tração (MPa)	
		Média (DP)	p*	Post-Hoc**	Média (DP)	p*	Post-Hoc**	Média (DP)	p*	Post-Hoc**	Média (DP)	p*
CIV CIVmfC	GC	49,15 (46,00)			512,61 (205,61)		A	28,27 (14,27)			1437,92 (268,52)	
	G1	60,42 (11,49)	0,173		825,77 (410,25)	0,029	AB	36,03 (9,04)	0,493		1598,79 (152,15)	0,319
	G2	59,91 (19,57)			830,04 (420,87)		AB	28,12 (10,77)			1638,93 (64,31)	
	G3	64,93 (24,90)			1084,36 (491,60)		B	28,84 (12,48)			1596,77 (259,41)	
CIV CIVncC	GC	49,15 (46,00)		A	512,61 (205,61)		A	28,27 (14,27)		A	1437,92 (268,52)	
	G01	53,68 (24,90)		A	1268,94 (89,93)		B	39,55 (9,73)		AB	2009,92 (268,51)	
	G02	61,81 (14,32)		A	1142,46 (305,54)		B	37,57 (9,82)		AB	1894,15 (169,89)	
	G03	74,30 (18,86)	<0,001	A	1370,34 (223,19)	<0,001	B	28,86 (9,73)	0,006	A	1879,47 (197,95)	0,067
	G04	103,22 (26,42)		B	1337,75 (215,32)		B	43,16 (14,39)		AB	1783,64 (475,05)	
G05	57,57 (17,46)		A	1321,03 (532,81)		B	48,52 (15,98)		B	1994,13 (532,81)		

*Teste ANOVA (p<0,050).

**Teste de Tukey. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significante (p<0,050), em relação aos compósitos.

[050] Para avaliação da microdureza superficial os cps (n=10), com 5mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, de todos os grupos experimentais foram embutidos em tubo de policloreto de vinila clorado (CPVC), (AMANCO, São Paulo, SP, Brasil) e preenchidas com resina poliéster (Resina Cristal, Casa da Resina, Belo Horizonte, MG, Brasil). Cada grupo foi identificado com corantes para resina. As superfícies dos cps foram polidos em lixadeira e politriz metalográfica (Modelo PLFDV, Fortel, São Paulo, SP, Brasil), utilizando uma sequência de lixas de granulação 320, 400 e 600. Cada corpo de prova (cp) foi submetido a cinco impressões em sua superfície com 0,2 mm de distância entre cada indentação, através de uma ponta de diamante piramidal (Vickers), com uma carga de 300 gf por 15 s. O resultado final foi a média das cinco leituras realizadas, calculadas em número de dureza Vickers (VHN), Tabela 2.

[051] Para avaliação da resistência ao desgaste, os cps de 4x8 mm (n=10) de todos os grupos foram confeccionados, como anteriormente, e armazenados em água destilada por 14 dias, à temperatura de 37°C (± 1°C). Após secagem por 12 h à temperatura ambiente, os cps foram pesados em balança analítica e foram montados em dispositivo apropriado com capacidade para seis cps sobre

lixa de granulação 800 na lixadeira e politriz metalográfica. Os cps foram submetidos a um ciclo do ensaio de desgaste por abrasão, utilizando carga de 100 g à velocidade de 100 rpm, durante 30 min, sob irrigação constante com água. A lixa utilizada foi substituída por uma nova a cada grupo de cinco cps. Depois do desgaste, os cps foram lavados em água destilada durante 3 min, sob agitação lenta, e secados por 12 h. Os cps foram pesados novamente, a fim de avaliar a quantidade de estrutura perdida por meio da ação mecânica, Tabela 2.

Tabela 2 – Médias, desvios-padrão e significância estatística de resultados dos testes de microdureza e resistência ao desgaste para os grupos de corpos de prova dos compósitos CIV (GC), CIVmfC (G1 a G3) e CIVncC (G01 a G05).

Compósito	Grupo	Microdureza Vickers (VHN)			Resistência ao desgaste		
		Média (DP)	p^*	Pos-Hoc**	Perda de massa (%) Média (DP)	p^*	Post-Hoc**
CIVmfC	GC	42,92 (6,22)		AB	10,95 (4,51)		
	G1	50,80 (5,30)	0,001	A	13,10 (9,51)	0,968	
	G2	50,16 (10,66)		A	11,77 (18,04)		
	G3	37,38 (7,23)		B	13,36 (5,11)		
CIV	GC	42,92 (6,22)		A	10,95 (4,51)		
CIVncC	G01	25,44 (8,51)	<0,001	B	19,04 (17,91)	0,017	A
	G02	26,10 (6,09)		B	7,77 (2,87)		AB
	G03	23,82 (5,96)		B	9,05 (8,27)		AB
	G04	23,61 (8,38)		B	3,87 (1,83)		B
	G05	47,56 (14,62)		A	6,54 (3,09)		AB

*Teste ANOVA ($p < 0,050$).

**Teste de Tukey. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significante ($p < 0,050$), em relação aos compósitos.

[052] Houve diferença estatisticamente significativa de GC em relação a G1, G2 e G3 para o módulo de elasticidade durante o teste de resistência à compressão ($p=0,029$) e para o teste de microdureza ($p=0,001$). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa para o módulo de elasticidade à compressão entre GC e G3 ($p=0,016$), (Tabela 1), e para o teste de microdureza entre G1 e G3 ($p=0,002$) e entre G2 e G3 ($p=0,003$), Tabela 2.

[053] Houve diferença estatisticamente significativa de GC em relação a G01, G02, G03, G04 e G05 para os testes de resistência à compressão ($p < 0,001$) e seu módulo de elasticidade ($p < 0,001$), resistência à tração diametral ($p = 0,006$), microdureza ($p < 0,001$) e resistência ao desgaste ($p = 0,017$). O teste *post-hoc* de Tukey para o teste de resistência à compressão mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre GC e G04, G01 e G04, G02 e G04, G03 e G04, e G04 e G05. Quanto à resistência à tração diametral houve diferença estatisticamente significativa entre GC e G05 ($p = 0,013$) e G03 e G05 ($p = 0,017$). Para o módulo de elasticidade durante o teste de resistência à compressão, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre GC e todos os outros grupos (Tabela 1). O teste *post-hoc* de Tukey para o teste de microdureza mostrou diferença estatisticamente significativa entre GC e todos os outros grupos: GC e G01 ($p = 0,001$), GC e G02 ($p = 0,001$), GC e G03 ($p < 0,001$), GC e G04 ($p < 0,001$) e GC e G05 ($p < 0,001$). Houve diferença estatisticamente significativa para a resistência ao desgaste entre G01 e G04 ($p = 0,009$), Tabela 2.

[054] Pelo exposto, temos que: (i) A adição de microfibras celulósicas no CIV apresentou um material com propriedades mecânicas semelhantes ao material comercial, porém com diferente composição; (ii) A adição de nanocristais de celulose na concentração de 0,4% no CIV (G04) apresentou melhora significativa na resistência à compressão e melhor desempenho frente às propriedades de resistência à tração diametral e ao desgaste; assim como a adição de nanocristais de celulose na concentração de 0,2% no CIV (G05) apresentou ganhos em relação na resistência à tração diametral.

[055] **Exemplo 6 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos compósitos.**

[056] Os materiais: CIV, CIVmfC e CIVncC foram avaliados *in vitro* quanto à sua atividade antimicrobiana, utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (ATCC 25175), *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (ATCC 292012) e uma levedura padrão, a *Candida albicans* (*C. albicans*) (ATCC 10231), em



duplicata. Os meios de cultura foram: *Muller Hinton Agar* para o *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; *Tryptic Soy Agar* para *S. mutans* e *E. faecalis* e *Sabouraud Dextrose Agar* para *C. albicans*.

[057] O controle-positivo (com atividade antimicrobiana) foi a solução de clorexidina 0,12% e o controle-negativo (sem atividade antimicrobiana) a solução de cloreto de sódio 0,85%. Os cps foram colocados sobre a camada base e cobertos com a camada *seed*, enquanto que 20 µl das soluções foram aplicados nos poços confeccionados com auxílio de canudos. As placas foram pré-incubadas à temperatura ambiente (25 °C) por 2 h para permitir a difusão dos materiais e soluções no meio de cultura e, logo depois, foram incubadas a 37 °C (±1°C) por 24 h em aerobiose (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) ou microaerofilia (*S. mutans* e *E. faecalis*). Decorrido o período de incubação os halos de inibição dos crescimentos microbianos foram mensurados e expressos em milímetros, e submetidos às análises estatísticas.

[058] Zonas de inibição não foram observadas nos compósitos CIVmfC e CIVncC frente a todos os microrganismos utilizados na atividade antimicrobiana. Os compósitos desenvolvidos mostraram o mesmo comportamento do CIV, não apresentando halo de inibição frente aos microrganismos analisados. Já a Clorexidina (controle positivo) apresentou halo de inibição frente a *Staphylococcus aureus* (14 mm), *Streptococcus mutans* (16,5 mm), *Enterococcus faecalis* (14 mm), *Escherichia coli* (15,5 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (6 mm) e *Candida albicans* (6 mm).

[059] Todos os compósitos desenvolvidos mostraram atividade antimicrobiana similar à do CIV, não apresentando halo de inibição frente aos microrganismos analisados. Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos compósitos do estudo demonstraram que os materiais testados – G1-CIVmfC e G2- CIVncC obtiveram resposta semelhante ao do GC-CIV, pois apresentaram ação estimuladora celular e baixa irritabilidade tecidual, indicando que os materiais avaliados podem ser usados como biomaterial.

[060] **Exemplo 7 – Teste de biocompatibilidade – Implante subcutâneo**

[061] A avaliação da biocompatibilidade é importante uma vez que demonstra a capacidade de aplicação dos materiais em tecidos vivos, o estudo ocorreu nos materiais descritos nos Exemplos 1, 2 e 3.

[062] Este estudo foi realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) assentindo para com os conceitos éticos do uso de animais em laboratório para todos os níveis do experimento.

[063] Quinze ratos jovens foram utilizados (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman), com idade de três a quatro meses de idade e peso médio de 141,15 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais (33x40x16 cm), higienizadas, colocadas em ambiente arejado e iluminado naturalmente, recebendo água *ad libitum* e alimentação constituída de ração comercial balanceada (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Para o procedimento, os animais foram anestesiados com 1 ml (mg/Kg de peso vivo do animal) de Cetamina (Clortamina – cloridrato de cetamina, injetável IM/IV – 50 mg/ml – Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), administrada por via intraperitoneal.

[064] Cada animal recebeu três corpos de prova na região dorsal, sendo um de cada material a ter sua biocompatibilidade avaliada. O corpo de prova do GC foi colocado na região superior esquerda, o do G1 na região superior direita e o do G2 na região inferior central. Após a implantação e sutura, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e acompanhados até que se recuperassem da anestesia. Os mesmos foram observados diariamente para verificação do comportamento com a finalidade de evitar ocorrências que pudessem comprometer o experimento durante todos os períodos de observação.

[065] Após 7, 30 e 60 dias os ratos foram sacrificados por overdose anestésica e os corpos de prova retirados para análise histopatológica. Desse modo, havia 5 animais para cada período de estudo, totalizando 15 amostras no final dos períodos avaliados. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 48 horas. Em seguida, os espécimes foram desidratados e embebidos em parafina. Secções seriadas de 6 µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina para análise

morfológica e morfométrica. As análises foram realizadas em um microscópio óptico (Zeiss – PrimoStar, Oberkochen, Alemanha) acoplado com sistema de captura de imagem (Axio com ERc5s, Jena, Alemanha) e o programa AxioVision LE 4.8.2.0 (Oberkochen, Alemanha) para Windows, sendo a área total de análise do campo 55896 μm^2 .

[066] A análise morfológica foi realizada pela observação do tecido conjuntivo de dois campos superiores e dois campos inferiores da cápsula fibrosa considerando os seguintes eventos histopatológicos: infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e células mononucleares), capacidade de celularidade (fibroblastos e vasos sanguíneos) e atividade dos macrófagos (macrófagos e células gigantes inflamatórias) (Silva R.A., Assed S., Nelson-Filho P., Silva L.A., Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Brazilian Dental Journal* 2009;20: 99-106). Para quantificar a presença ou ausência desses eventos foram utilizados os seguintes escores: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada e (+++) intensa. De acordo com a presença ou ausência das células do infiltrado inflamatório acima especificadas, o processo inflamatório foi considerado agudo ou crônico seguindo os mesmos escores. A espessura da cápsula fibrosa (μm) foi medida em quatro regiões distintas usando o software AxioVision (Oberkochen, Alemanha).

[067] Os dados obtidos para todos os eventos histopatológicos avaliados em cada período de estudo são apresentados na tabela 3. Pode-se observar que células polimorfonucleares e gigantes multinucleadas estiveram ausentes nos três períodos de avaliação para os três grupos avaliados. No período de avaliação de 7 dias, observou-se presença moderada de células mononucleares, vasos sanguíneos e macrófagos somente para o G1, considerando-se ausente a inflamação aguda e moderada a inflamação crônica. Nos grupos CG e G2 a inflamação aguda estava ausente e a crônica mostrou-se de forma leve (fig. 3 e 4). Os fibroblastos apresentaram moderada presença para o grupo G2, ao passo que para os GC e G1 eles mostraram leve presença (tabela 3). Entretanto, no período de 30 e 60 dias, encontrou-se um mesmo padrão de eventos histopatológicos para os três grupos avaliados,

também, estando ausente a inflamação aguda. A inflamação crônica presente foi do tipo leve ou ausente (fig. 3 e 4).

[068] Na análise de 7 dias, o teste Friedman revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos para contagem de polimorfonucleares ($p=1,000$), mononucleares ($p=0,067$), vasos sanguíneos ($p=0,225$) e células gigantes ($p=1,000$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se avaliou fibroblastos ($p=0,022$) e macrófagos ($p=0,019$). Nas análises pós-testes observou-se diferença entre GC e G1 para macrófagos ($p=0,022$). Quando se comparou GC e G2 observou-se diferença estatisticamente significativa para macrófagos ($p=0,008$) e mononucleares ($p=0,033$). Para G1 e G2 houve diferença estatisticamente significativa no *post-hoc* para fibroblastos ($p=0,010$).

[069] Nas análises dos períodos de 30 e 60 dias, o teste Kruskal Wallis não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para todos os eventos histopatológicos analisados (tabela 3).

Tabela 3 - Frequência dos eventos histopatológicos observados em cada grupo nos diferentes períodos de estudo.

Eventos Histopatológicos	7 dias			30 dias			60 dias		
	GC	G1	G2	GC	G1	G2	GC	G1	G2
Polimorfonucleares	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mononucleares	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Fibroblastos	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Vasos sanguíneos	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Macrófagos	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Células gigantes inflamatórias	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Escores: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada e (+++) intensa.

[070] Quanto à espessura da cápsula fibrosa formada em torno do corpo de prova, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os períodos de tempo avaliados em 7 e 30 dias. Já para a avaliação de 60 dias,

houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2 ($p=0,025$) (tabela 4).

Tabela 4 - Médias, desvios-padrão e significância estatística dos resultados para espessura de cápsula em cada grupo nos diferentes períodos de estudo.

Grupos	Espessura Cápsula (μm)						Post-hoc**
	Média (DP) – 7 dias	p^*	Média (DP) – 30 dias	p^*	Média (DP) – 60 dias	p^*	
GC	62,86 (30,65)		56,08 (25,02)		30,15 (4,28)		AB
G1	50,49 (17,65)	0,229	65,76 (59,88)	0,522	41,21 (3,98)	0,024	A
G2	61,83 (23,91)		50,52 (17,63)		26,72 (2,87)		B

*Teste de Friedman ($p<0,050$).

**Teste de Wilcoxon. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

[071] A análise de correlação foi realizada para os três grupos do estudo considerando-se todos os períodos de tempo e eventos histopatológicos pesquisados, além da espessura de cápsula. Os resultados das análises mostraram que no período de 7 dias os grupos GC e G1 apresentaram correlação positiva entre as células mononucleares e macrófagos, enquanto o G2, apresentou correlação positiva entre mononucleares e macrófagos e ainda entre fibroblastos e macrófagos (tabela 5). No período de 30 dias, os grupos GC e G2 apresentaram correlação positiva entre as células mononucleares e macrófagos e o G1 entre mononucleares e macrófagos, mononucleares e espessura da cápsula e entre macrófagos e espessura da cápsula (tabela 6). Já no período de 60 dias, observou-se uma maior correlação entre os eventos histopatológicos e entre estes e a espessura da cápsula para todos os grupos do estudo (tabela 7).



Tabela 5 - Associação entre os eventos histopatológicos e espessura de cápsula no período de 7 dias.

Grupos	Eventos	Polimorfo-nucleares	Mono-nucleares	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Macrófagos	Células gigantes	Espessura cápsula	
GC	Polimorfonucleares	r	A	a	a	a	a	a	
		p							
	Mononucleares	r		1,00	-0,42	0,145	0,761*	a	-0,072
		p		--	0,860	0,543	<0,001		0,763
	Fibroblastos	r			1,00	0,035	0,151	a	0,177
		p			--	0,885	0,526		0,455
	Vasos sanguíneos	r				1,00	0,201	a	0,021
		p				--	0,397		0,930
	Macrófagos	r					1,00	a	0,018
		p					--		0,939
	Células gigantes	r					a	a	
		p							
	Espessura cápsula	r						1,00	
		p						--	
G1	Polimorfonucleares	r	a	A	a	a	a	a	
		p							
	Mononucleares	r		1,00	0,356	0,346	0,921*	a	-0,050
		p		--	0,124	0,135	<0,001		0,833
	Fibroblastos	r			1,00	0,351	0,411	a	-0,242
		p			--	0,130	0,072		0,304
	Vasos sanguíneos	r				1,00	0,419	a	0,034
		p				--	0,066		0,886
	Macrófagos	r					1,00	a	-0,215
		p					--		0,363
	Células gigantes	r					a	a	
		p							
	Espessura cápsula	r						1,00	
		p						--	
G2	Polimorfonucleares	r	a	A	a	a	a	a	
		p							
	Mononucleares	r		1,00	0,353	-0,125	0,898*	a	0,283
		p		--	0,127	0,599	<0,001		0,241
	Fibroblastos	r			1,00	-0,320	0,511*	a	0,105
		p			--	0,169	0,021		0,670
	Vasos sanguíneos	r				1,00	-0,216	a	-0,440
		p				--	0,360		0,060
	Macrófagos	r					1,00	a	0,327
		p					--		0,172
	Células gigantes	r					a	a	
		p							
	Espessura cápsula	r						1,00	
		p						--	

r. valor de correlação

p. valor de significância estatística

a. dados não computados porque a variável não foi contabilizada

*. Existe correlação

Tabela 6 - Associação entre os eventos histopatológicos e espessura de cápsula no período de 30 dias.

Grupos	Eventos		Polimorfo-nucleares	Mono-nucleares	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Macrófagos	Células gigantes	Espessura cápsula
GC	Polimorfonucleares	r	a	A	a	a	a	a	a
		p							
	Mononucleares	r		1,00	-0,077	0,518	0,931*	a	0,116
		p		--	0,747	0,019	<0,001		0,626
	Fibroblastos	r			1,00	-0,258	-0,070	a	0,128
		p			--	0,272	0,770		0,590
	Vasos sanguíneos	r				1,00	0,439	a	-0,087
		p				--	0,053		0,714
	Macrófagos	r					1,00	a	0,077
		p					--		0,706
	Células gigantes	r						a	a
		p							
	Espessura cápsula	r							1,00
		p							--
G1	Polimorfonucleares	r	a	A	a	a	a	a	a
		p							
	Mononucleares	r		1,00	0,274	-0,087	0,957*	a	0,791*
		p		--	0,243	0,714	<0,001		<0,001
	Fibroblastos	r			1,00	-0,281	0,155	a	0,199
		p			--	0,230	0,515		0,401
	Vasos sanguíneos	r				1,00	0,000	a	-0,267
		p				--	1,000		0,256
	Macrófagos	r					1,00	a	0,818*
		p					--		<0,001
	Células gigantes	r						a	a
		p							
	Espessura cápsula	r							1,00
		p							--
G2	Polimorfonucleares	r	a	A	a	a	a	a	a
		p							
	Mononucleares	r		1,00	0,324	0,066	1,000*	a	0,013
		p		--	0,163	0,783	<0,001		0,956
	Fibroblastos	r			1,00	-0,019	0,324	a	-0,011
		p			--	0,938	0,163		0,962
	Vasos sanguíneos	r				1,00	0,066	a	-0,424
		p				--	0,783		0,062
	Macrófagos	r					1,00	a	0,013
		p					--		0,956
	Células gigantes	r						a	a
		p							
	Espessura cápsula	r							1,00
		p							--

r. valor de correlação

p. valor de significância estatística

a. dados não computados porque a variável não foi contabilizada

*. Existe correlação

Tabela 7 - Associação entre os eventos histopatológicos e espessura de cápsula no período de 60 dias.

Grupos	Eventos	Polimorfo-nucleares	Mono-nucleares	Fibroblastos	Vasos sanguíneos	Macrófagos	Células gigantes	Espessura cápsula
GC	Polimorfonucleares	r p	a	A	a	a	a	a
	Mononucleares	r p	1,00	0,999*	0,994*	0,994*	a	-0,534*
	Fibroblastos	r p	--	<0,001	<0,001	<0,001	a	0,033
	Vasos sanguíneos	r p	1,00	1,00	0,988*	0,988*	a	-0,496
	Macrófagos	r p	--	--	<0,001	<0,001	a	-0,051
	Células gigantes	r p	1,00	1,00	1,000*	1,000*	a	-0,617*
	Espessura cápsula	r p	--	--	--	--	a	0,011
		r p	1,00	1,00	1,00	1,00	a	-0,617*
		r p	--	--	--	--	a	0,011
G1	Polimorfonucleares	r p	a	A	a	a	a	a
	Mononucleares	r p	1,00	0,099*	0,093*	0,097*	a	-0,860*
	Fibroblastos	r p	--	<0,001	<0,001	<0,001	a	<0,001
	Vasos sanguíneos	r p	1,00	1,00	0,974*	0,992*	a	-0,876*
	Macrófagos	r p	--	--	<0,001	<0,001	a	<0,001
	Células gigantes	r p	1,00	1,00	1,00	0,992*	a	-0,833*
	Espessura cápsula	r p	--	--	--	<0,001	a	<0,001
		r p	1,00	1,00	1,00	1,00	a	-0,860*
		r p	--	--	--	--	a	<0,001
G2	Polimorfonucleares	r p	a	A	a	a	a	a
	Mononucleares	r p	1,00	0,973*	0,995*	1,000*	a	-0,810*
	Fibroblastos	r p	--	<0,001	<0,001	<0,001	a	<0,001
	Vasos sanguíneos	r p	1,00	1,00	0,972*	0,973*	a	-0,880*
	Macrófagos	r p	--	--	<0,001	<0,001	a	<0,001
	Células gigantes	r p	1,00	1,00	1,00	0,995*	a	-0,825*
	Espessura cápsula	r p	--	--	--	<0,001	a	<0,001
		r p	1,00	1,00	1,00	1,00	a	-0,810*
		r p	--	--	--	--	a	<0,001

r. valor de correlação

p. valor de significância estatística

a. dados não computados porque a variável não foi contabilizada

*. Existe correlação

[072] Os resultados do Teste de biocompatibilidade por implante subcutâneo indicam que todos os materiais se mostraram biocompatíveis e, naqueles em que houve uma redução mais significativa da cápsula fibrosa, houve uma ação estimuladora da função celular, beneficiando mais ainda o processo de cicatrização tecidual. Desta forma é demonstrado que os materiais testados – G1-CIVmfC e G2-CIVncC obtiveram resposta semelhante ao do GC-CIV, pois apresentaram ação estimuladora celular e baixa irritabilidade tecidual, indicando assim que os mesmos são biocompatíveis.

REIVINDICAÇÕES

1. **“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”**, caracterizados pela composição de compósitos de matriz de flúor alumínio silicato e ácido poliacrílico (ionômero de vidro) e inserção de microfibras e nanocristais de celulose (whiskers) com propriedades mecânicas aumentadas.
2. **“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”**, de acordo com a reivindicação 1 caracterizados por serem usados como biomateriais nas áreas da saúde: odontológica, farmacêutica e biomédica, bem como na área da engenharia de tecidos; principalmente como cimento restaurador dentário, não limitante.
3. **“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”**, de acordo com a reivindicação 1 e 2 caracterizados pelos compósitos possuírem composição, em massa de mfC, compreendida entre 0,001 e 5% (m/m), preferencialmente entre 0,005 e 0,015% (m/m) em relação ao CIV; e composição em massa de ncC entre 0,001 e 5% (m/m), preferencialmente entre 0,2 e 1% (m/m) em relação ao CIV, não limitante.
4. **“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”**, de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizados pela produção de cimentos constituídos de matriz ionomérica e mfC e de matriz ionomérica e ncC, obtidos por quaisquer métodos que envolvam a mistura do CIV com fibras celulósicas, preferencialmente a manipulação Processamento.
5. **“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”**, de acordo com a reivindicação 1 a 4 caracterizados por serem materiais biocompatíveis com ação estimuladora celular e baixa irritabilidade

tecidual. Sendo assim, os nanocristais de celulose podem ser adicionados como agente de carga e reforço em a outros materiais, a exemplo dos gessos e de cimentos odontológicos, como o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), não limitante.



Figura 1

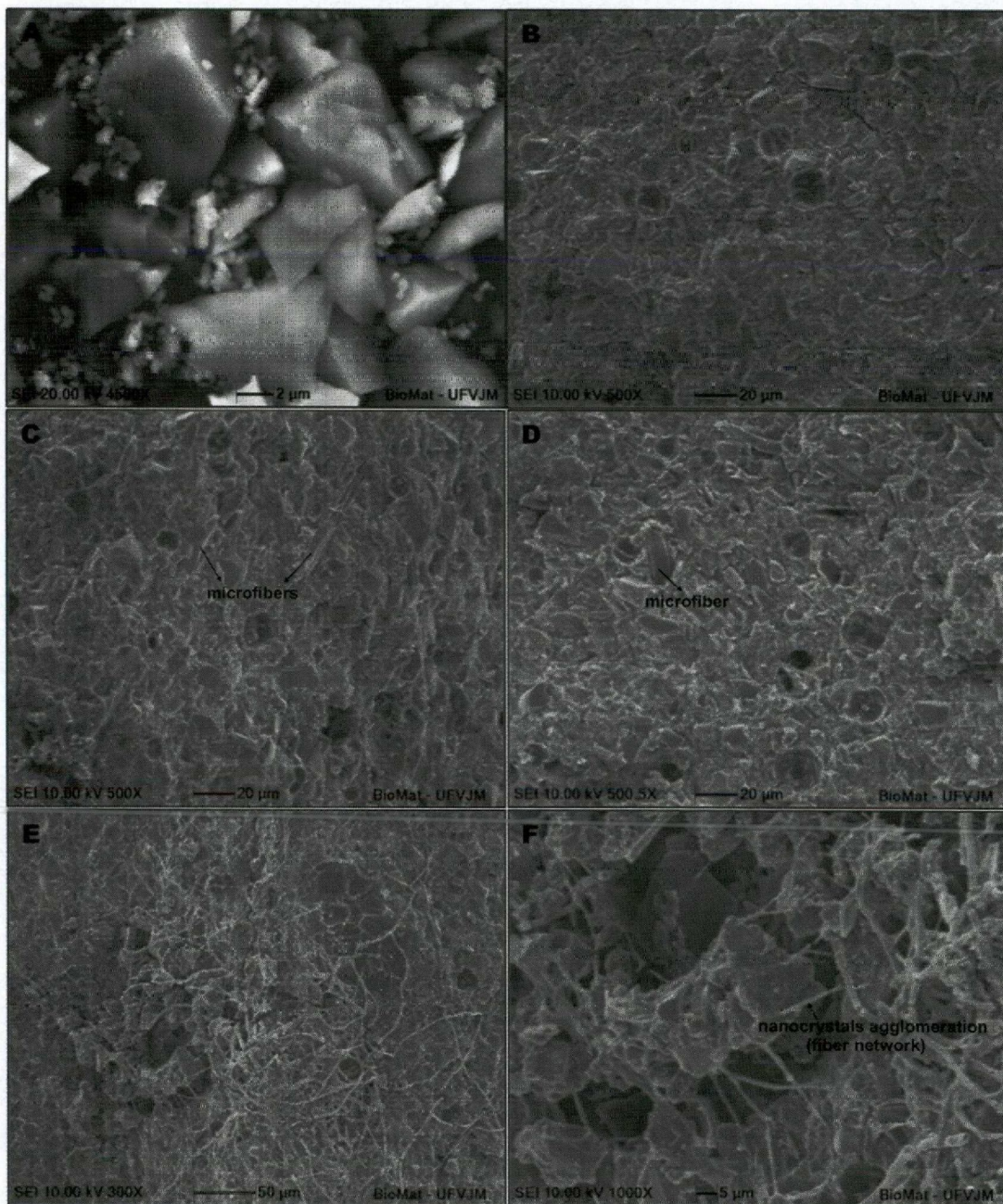


Figura 2

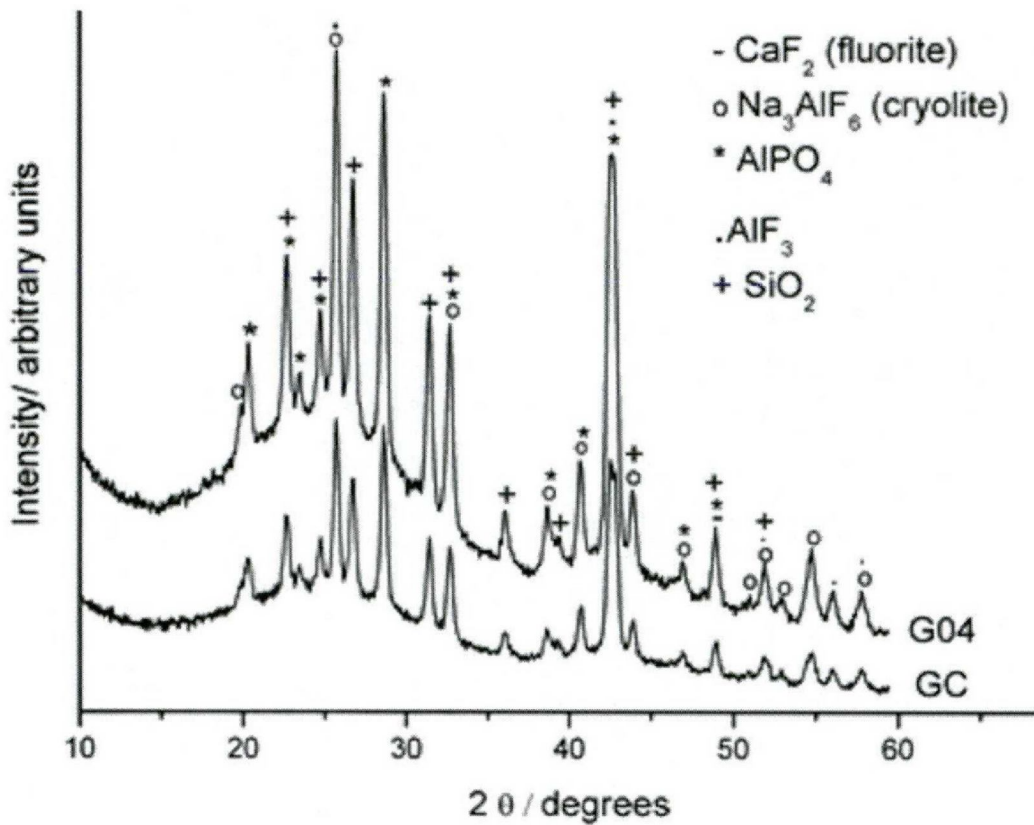
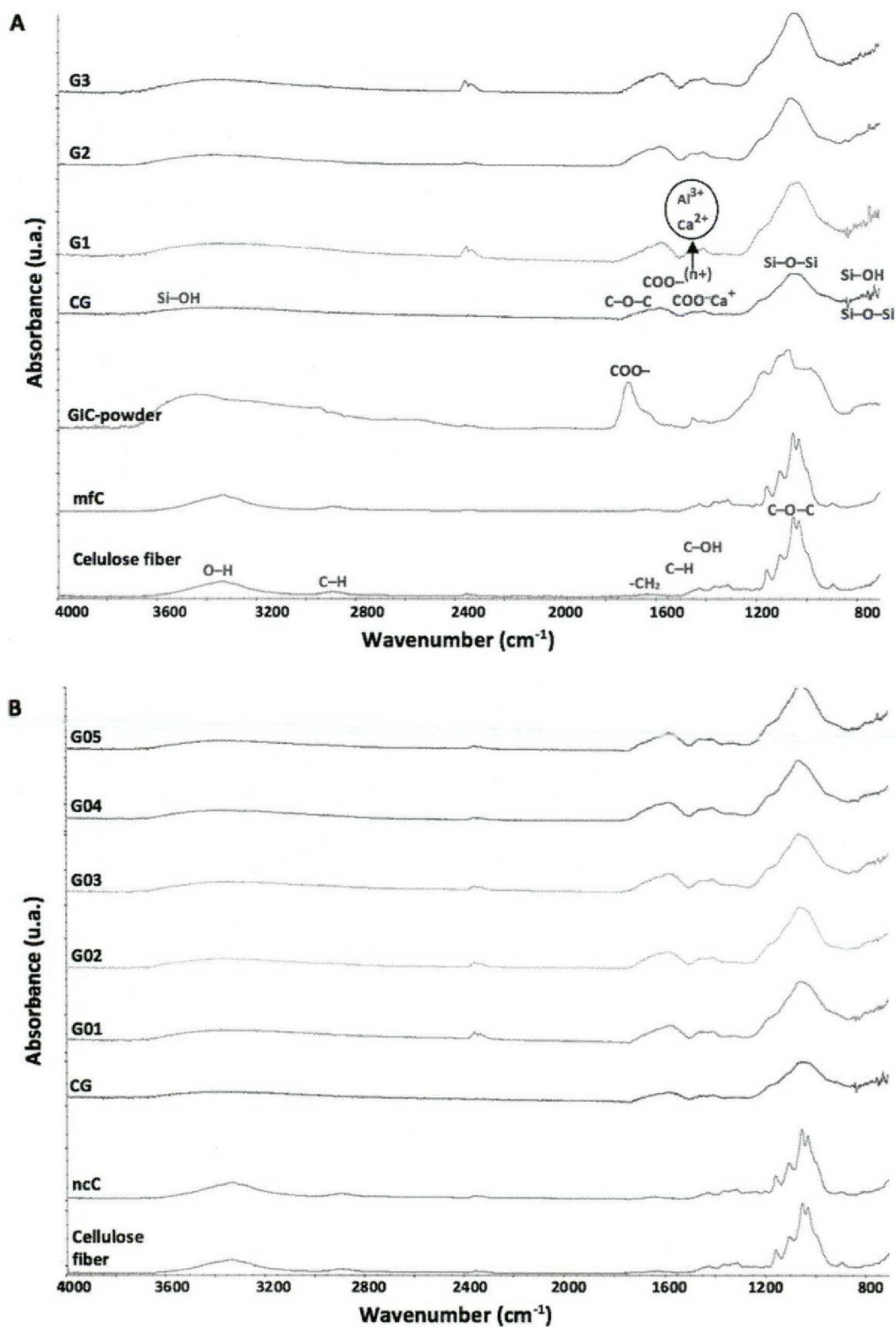


Figura 3



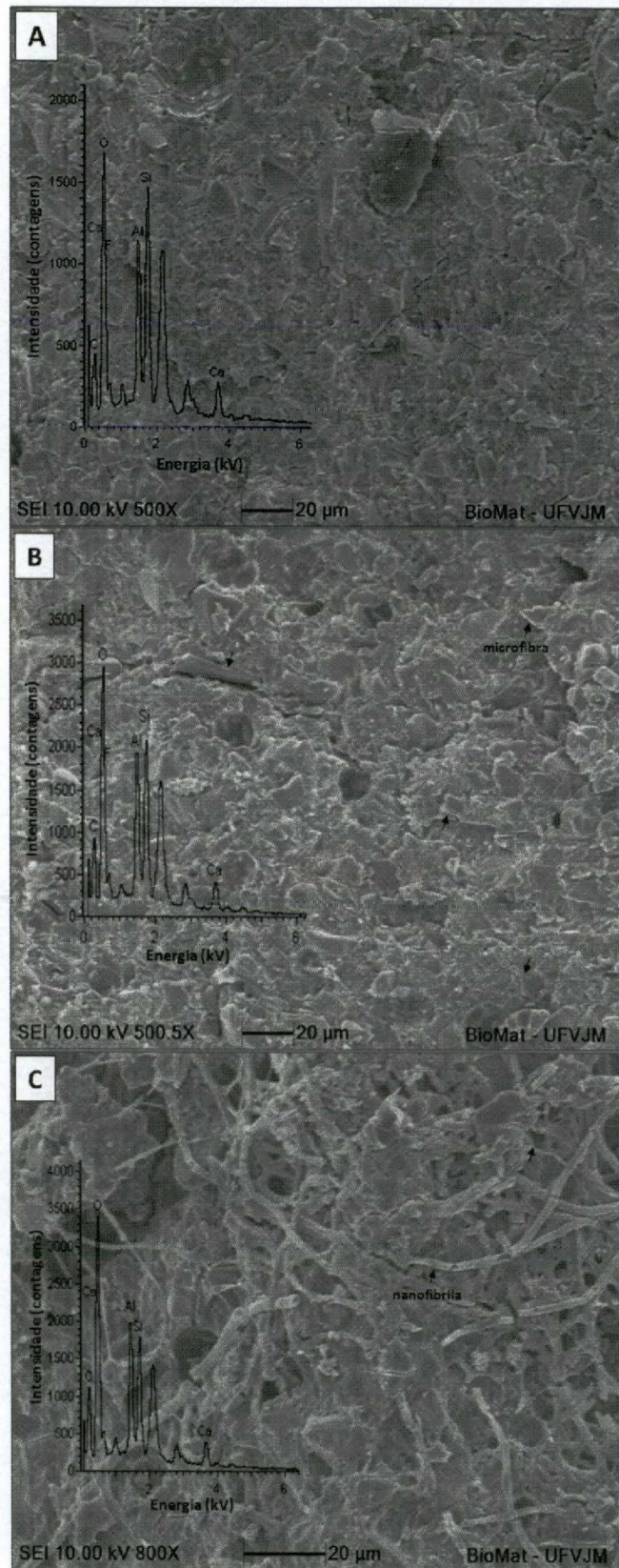


Figura 5

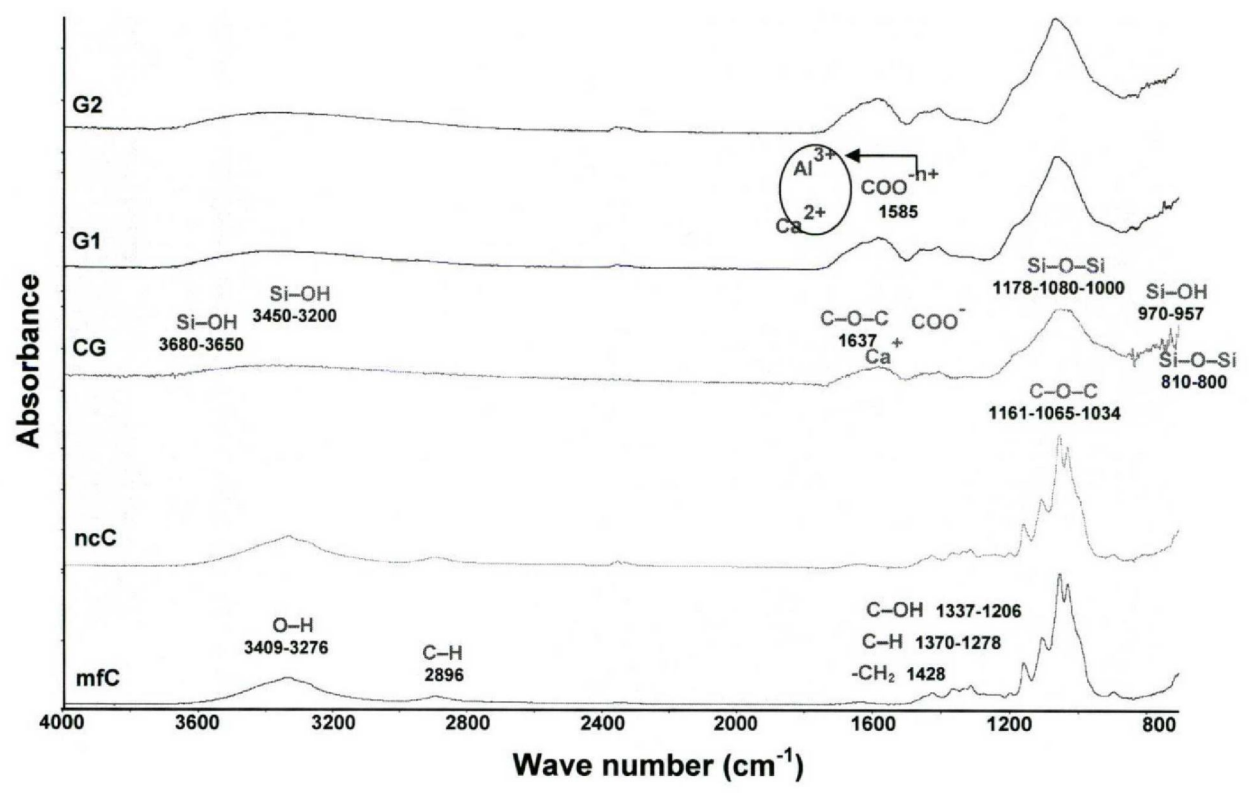


Figura 6

44

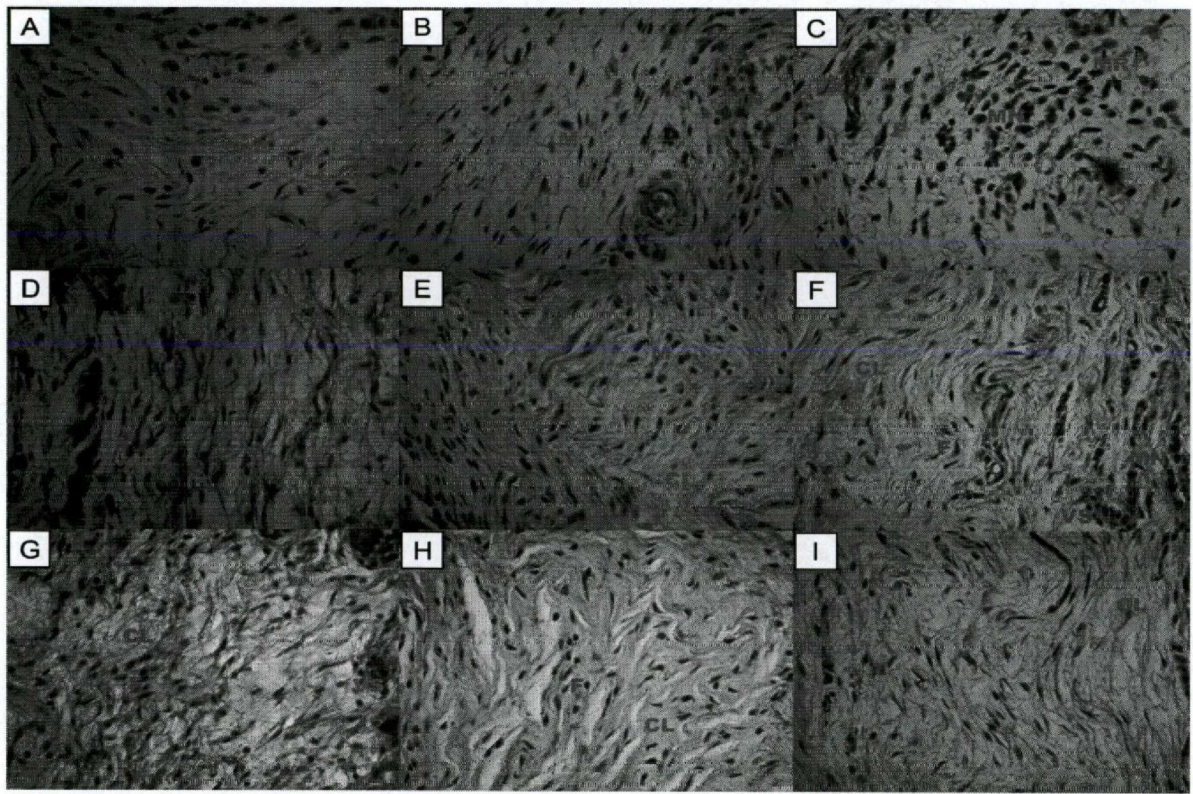


Figura 7

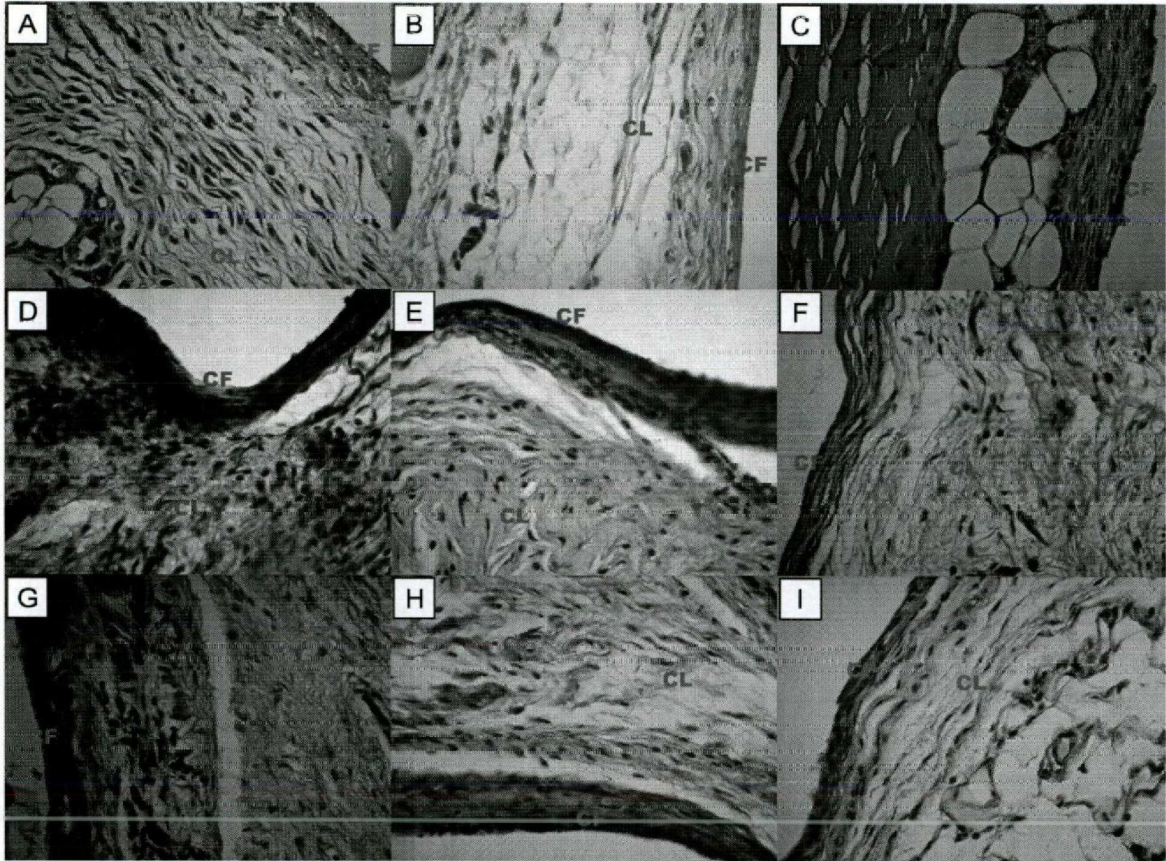


Figura 8

RESUMO

“COMPÓSITOS DE CIMENTO IONOMÉRICO MODIFICADOS COM FIBRAS CELULÓSICAS: PRODUTO, PROCESSO E USO”

A presente invenção descreve a formulação de um novo produto e seus usos, caracterizado por compósitos contendo microfibras e / ou nanocristais de celulose (whiskers) dispersas em uma matriz contendo principalmente cimento de ionômero de vidro (CIV). O produto formado é um material biocompatível adequado para utilização nas áreas da saúde e da engenharia de tecidos, principalmente na odontológica como material restaurador. A inclusão de microfibras e / ou nanocristais de celulose ao CIV convencional produzem um material de composição inovadora e propriedades semelhantes aos encontrados no mercado, sendo uma alternativa de processo simples e de baixo custo ao uso do CIV de alta viscosidade e reforçados com polímeros. A adição das nanofibrilas e / ou nanocristais de celulose ao CIV melhorou significativamente suas propriedades mecânicas como resistência à compressão, à tração diametral e à abrasão maiores, além de apresentar módulo de elasticidade comparável com os materiais disponíveis comercialmente. Essas melhorias no cimento ionomérico são capazes de proporcionar maior longevidade clínica das restaurações dentárias realizadas com esse material. Do ponto de vista biológico, eventuais componentes tóxicos podem causar irritação, degeneração ou mesmo necrose dos tecidos. Os compósitos desenvolvidos apresentaram ação estimuladora celular e baixa irritabilidade tecidual, mostrando-se biocompatíveis.