



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ANA ANGÉLICA MARTINS COSTA

**Aspectos Funcionais e Biocompatibilidade de Blendas de Poli (epsilon -
Caprolactona) Associada à Hidroxiapatita e Tetraciclina no Modelo de
Falha Óssea na Calvária de Rato**

Itajubá
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ANA ANGÉLICA MARTINS COSTA

**Aspectos Funcionais e Biocompatibilidade de Blendas de Poli (epsilon -
Caprolactona) Associada à Hidroxiapatita e Tetraciclina no Modelo de
Falha Óssea na Calvária de Rato**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de Concentração: Biomateriais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Sachs.

Co-orientador: Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz.

Julho de 2013

Itajubá

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Margareth Ribeiro- CRB_6/1700

C837a

Costa, Ana Angélica Martins

Aspectos funcionais e Biocompatibilidade de Blendas de Poli
(epsilon-Caprolactona) associada à Hidroxiapatita e Tetraciclina
no modelo de falha óssea na calvária de rato / Ana Angélica Mar_
tins Costa. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2013.

106 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Sachs.

Coorientador: Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Poli (ε-caprolactona). 2. Hidroxiapatita. 3. Tetraciclina. 4.
Regeneração óssea. I. Sachs, Daniela, orient. II. Queiroz, Alvaro
A. A. de, coorient. III. Universidade Federal de Itajubá. IV. Títu_
lo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ANA ANGÉLICA MARTINS COSTA

**Aspectos Funcionais e Biocompatibilidade de Blendas de Poli (epsilon -
Caprolactona) Associada à Hidroxiapatita e Tetraciclina no Modelo de
Falha Óssea na Calvária de Rato**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 17
de Julho de 2013, conferindo ao autor o título de
**Mestre em Ciências em Materiais para
Engenharia.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Daniela Sachs (Orientador) - UNIFEI

Prof. Dr. Alvaro A. A. de Queiroz (Co-orientador) - UNIFEI

Prof. Dr. Nilo César do Vale Baracho-FMIIt

Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa-UNIFEI

Itajubá

2013

DEDICATÓRIA

Ao meu bem mais precioso, minha querida filha Mariana Martins Mouroner, que me deu a oportunidade de conhecer a forma mais linda de amar.

Ao meu querido esposo, Aelfclêniton Mouroner, por todo amor, apoio, confiança e incentivo.

Aos meus familiares que me apoiam em todos os momentos de minha vida, especialmente, meus dedicados pais Leomax Batista e Maria Angélica Martins, pelo carinho, afeto, compreensão, torcida e pelas palavras de incentivo em todos os momentos importantes da minha vida.

A Deus, pela presença constante em minha vida, por me guiar para os caminhos do bem, por me confortar a cada momento, me dando força física e espiritual para seguir, refletir e aprender todos os dias.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus orientadores neste estudo, Prof^ª. Dra. Daniela Sachs e Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, por todo ensinamento, compreensão, atenção, dedicação e profissionalismo. Minha eterna admiração e agradecimento.

À Amanda de Carvalho Pereira Moraes, pela contribuição técnica e científica para o desenvolvimento deste trabalho, por sua amizade, convivência, aprendizado e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário de Itajubá - FEPI, pela oportunidade de desenvolvimento conjunto deste trabalho.

Ao Prof. Me. Rodolfo Malagó , Prof. Me. Breno Souza Salgado e Prof. ME. Thiago Pires Anacleto, professores do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitario de Itajubá (FEPI), pela colaboração realizada com os ensaios in vivo.

Ao Felipe Piazza Santiago (aluno de graduação em Medicina Veterinária), pelo auxílio com os experimentos nos animais.

Profª. Olga Zazuco Higa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN-USP), pela contribuição com os experimentos de citotoxicidade.

Ao Laboratório de Análises Clínicas- LABCLIN, pela colaboração com as dosagens bioquímicas do presente estudo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos os companheiros do laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Fraturas decorrentes de patologias que afetam o metabolismo ósseo ou causadas por acidentes automobilísticos têm aumentado expressivamente nos últimos anos. Dessa maneira, o desenvolvimento de terapias que possam acelerar ou otimizar a regeneração óssea são amplamente incentivadas. Como alternativa ao reparo de fraturas destaca-se a utilização de biomateriais. O poli (ϵ -caprolactona) (PCL) tem recebido crescente atenção na medicina regenerativa devido às suas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Neste contexto, foi desenvolvido um biomaterial, na forma de arcabouço poroso obtida por evaporação do solvente utilizando PCL. Este material foi utilizado para confeccionar blendas poliméricas de PCL de alta massa molecular combinada com PCL de baixa massa molecular com o intuito de acelerar o tempo de degradação do biomaterial. Tendo em mente que ossos contêm alta concentração de hidroxiapatita (HA), o ideal é que as matrizes utilizadas para regeneração de falhas ósseas contenham este componente. Portanto, foram adicionados às blendas de PCL, HA e tetraciclina (TCH), visando tornar o material mais semelhante ao material ósseo, e impedir o crescimento bacteriano no local do implante, respectivamente. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os aspectos funcionais e a biocompatibilidade de blenda de PCL associados à hidroxiapatita e tetraciclina em falhas ósseas em calvária de ratos. Nos testes *in vivo* foram utilizados 57 animais, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos e analisados 30 e 60 dias após o implante das blendas na calvária dos animais. Foram confeccionadas falhas de 4 mm de diâmetro na calvária dos ratos, onde as blendas [grupo I - blenda PCL; Grupo II- blenda + 10% HA, Grupo III - blenda + 10% TCH, Grupo IV - blenda + 10% HA+10%TCH, Grupo V - grupo controle] foram implantadas. O grupo controle teve a falha preenchida apenas com coágulo. Os materiais foram caracterizados mecanicamente (TMA) e por microscopia (MEV) e a degradação do material foi avaliada em solução tampão (PBS) a 37°C. Também foram realizados testes microbiológicos e ensaio de dissolução da tetraciclina, *in vitro*, a fim de elucidar se a liberação do fármaco seria adequada para evitar o crescimento bacteriano, assim com determinar o perfil de liberação do fármaco do arcabouço. A liberação do fármaco foi adequada para evitar o crescimento bacteriano, após 24h. A blenda PCL/TCH apresentou um perfil de liberação sustentado em função do tempo e o processo de liberação do antibiótico dos arcabouços ocorreu, predominantemente, pelo mecanismo difusão. Entre os grupos, foi observada uma variação de perda de massa entre 5,1% a 14,2% em três meses de experimento. Os valores dos módulos de elasticidade das blendas PCL/HA e PCL/HA/TCH indicam que estas apresentam propriedades mecânicas ideais para utilização dos processos regenerativos da calvária do rato e não apresentaram citotoxicidade. Análises histológicas demonstraram que os arcabouços são osteocondutores. Para avaliação da formação óssea foram realizadas as dosagens do marcador bioquímico Fosfatase Alcalina (FAL). As avaliações da função renal e hepática dos animais após implantação do biomateriais foram realizadas a partir de ensaios bioquímicos para a dosagem plasmática de alguns marcadores [função hepática (Transaminase Glutâmica Oxalacética TGO/AST e Transaminase Glutâmica Pirúvica TGP/ALT) e renal (Ureia e Creatinina Sérica)]. Dosagens dos níveis séricos, após implantação do arcabouço, indicam que a concentração da FAL não aumentou nos períodos de estudo e que, após 30 dias, não houve alteração da função renal e hepática. Desta forma, nossos resultados indicam que os arcabouços são biocompatíveis e que as blendas de PCL com ou sem associações apresentaram parâmetros funcionais adequados para utilização na regeneração óssea.

Palavras-chaves: Poli (ϵ -caprolactona), Hidroxiapatita, Tetraciclina, Regeneração óssea e Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Fractures of diseases that affect bone metabolism or caused by automobile accidents have increased dramatically in recent years. Thus, the development of therapies that may accelerate or optimize bone regeneration are widely encouraged. As an alternative to these repair fractures includes the use of biomaterials. Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) has received increasing attention in regenerative medicine due to their mechanical properties, biocompatibility and biodegradation. In this context, was developed a biomaterial in the form of porous scaffold obtained by evaporation of the solvent in PCL. This material was used to fabricate polymer blends of high molecular weight PCL combined with low molecular weight PCL in order to accelerate the degradation time of the biomaterial. Bearing in mind that bones contain high concentration of hydroxyapatite (HA), the ideal is that the matrices used for the regeneration of bone defects contain this component. Therefore, were added to the PCL blends, HA and tetracycline (TCH), in order to make the material more similar to the bone material, and prevent bacterial growth at the implant site, respectively. In this context, the present study aimed to evaluate the function and biocompatibility of PCL blend associated with hydroxyapatite and tetracycline in bone defects in rat calvarial. *In vivo* tests 57 animals were used and were randomly divided into five groups and analyzed 30 and 60 days after implantation of the blends in the skull of the animals. Bone defects 4 mm in diameter were created in the rat calvarial, where the blends [Group I - PCL blend, Group II-blend + 10% HA, Group III - blend + 10% TCH, Group IV - blend + 10% HA + 10% TCH Group V - control group] were implemented. The control group was not filled with any material. The materials were characterized mechanically (TMA) and microscopy (SEM) and material degradation was evaluated in buffer solution (PBS) at 37 ° C. Tests were also conducted microbiological and tetracycline dissolution assays *in vitro* in order to elucidate if the drug release would be adequate to prevent bacterial growth, and to determine the scaffold drug release profile. Drug release was adequate to prevent bacterial growth after 24h. The PCL / TCH blend presented a sustained release profile in a time function and the antibiotic release process of scaffolds occurred predominantly by diffusion mechanism. Between groups, was observed a variation of mass loss between 5.1% to 14.2% in three months of the experiment. The values of the elastic moduli of the PCL and PCL/HA /TCH blends show that they present mechanical properties ideal for use of regenerative processes of rat calvarial and showed no cytotoxicity. Histological analysis demonstrated that the scaffolds are osteoconductive. For evaluation of bone formation were performed dosages of biochemical marker Alkaline Phosphatase (ALP). Assessments of renal and liver of animals after implantation of biomaterials were performed from biochemical assays for the measurement of plasma some markers [liver function (glutamic-oxaloacetic transaminase GOT / AST and glutamic-pyruvic transaminase GPT / ALT) and renal (urea and Serum Creatinine)]. Dosages of serum after scaffolds implanted, indicate that the concentration of the FAL did not increase during the study periods and after 30 days, there were no changes in renal and hepatic function. Thus, our results indicate that scaffolds are biocompatible and the PCL blends with or without associations showed functional parameters suitable for use in bone regeneration.

Keywords: Poly (ϵ -caprolactone), Hydroxyapatite, Tetracycline, Bone regeneration e Biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Fórmulas estruturais de ϵ -caprolactona (A), Poli-(ϵ -caprolactona) (B).....	28
Figura. 2.2. Número de publicações usando os termos PCL e engenharia tecidual nos últimos 15 anos. Pesquisa retirada do site Web of Science.....	30
Figura 2.3. Estrutura química do cloridrato de tetraciclina.....	32
Figura 4.1. Acondicionamento dos ratos em gaiola.....	52
Figura 4.2. (A) Tricotomia da região da cabeça (B) Assepsia da região onde será realizado o procedimento cirúrgico.....	53
Figura 4.3. (A) Incisão linear através da pele com descolamento do periósteo. (B) Ostectomia produzidas por uma broca.....	54
Figura 4.4. (A) Blenda de PCL/BPM-PCL colocado na falha óssea do lado esquerdo. (B) Sutura no local da cirurgia.....	54
Figura 5.1. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura das blendas formadas com os polímeros PCL/BPM-PCL.....	61
Figura 5.2. Curva de calibração para o ensaio de liberação da tetraciclina.....	63
Figura 5.3. Quantidade da droga liberada da blenda PCL/TCH depois do teste de dissolução na solução de PBS a 37°C por um período 7 dias.....	65
Figura 5.4. Quantidade da droga liberada da blenda PCL/TCH/HA depois do teste de dissolução na solução de PBS a 37°C por um período.....	66
Figura 5.5. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços do Grupo 3 e 4, formados pela Benda PCL/TCH e PCL/TCH/HA. (A, B, C) pastilha deitada (D) Visualização das camadas. (E) Pastilha deitada (F) Visualização das camadas da pastilha do grupo IV.....	67
Figura 5.6. $\log[Mt/Minf]$ versus $\log(t)$ do conjugado PCL/TCH para interpretação do processo de liberação da TCH.....	69
Figura 5.7. $\log[Mt/Minf]$ versus $\log(t)$ do conjugado PCL/ TCH/ HA para interpretação das primeiras 5h do processo de liberação da TCH.....	70
Figura 5.8. Porcentagem do grau de intumescimento para cada tipo de pastilha, por um período de 48h.....	71
Figura 5.9. Porcentagem da perda de massa das pastilhas por um período de 3 meses em PBS.....	73

Figura 5.10. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo I, pelo método de compressão.....	76
Figura 5.11. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo II, pelo método de compressão.....	76
Figura 5.12. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo III, pelo método de compressão.....	77
Figura 5.13. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo IV, pelo método de compressão.....	77
Figura 5.14. Representação dos halos de inibição específicos para cada cepa bacteriana.....	81
Figura 5.15. Perfil de viabilidade celular em (%) de Blenda de PCL (PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80%, círculo azul), Blenda de PCL + hidroxiapatita (PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80% + 10% Hidroxiapatita, círculo verde) e apenas hidroxiapatita (triângulo vermelho).....	81
Figura 5.16. Grau de incorporação do implante e formação do novo osso após 30 e 60 dias de implantação.....	83
Fig 5.17. Histologia ilustrativa da formação do novo osso após 30 e 60 dias de implantação para o grupo I.....	84
Figura 5.18. Grau de células inflamatórias nos tecidos retirados após 30 e 60 dias de implantação dos arcabouços.....	85
Figura 5.19. Grau de neoangiogênese nos tecidos retirados após 30 e 60 dias de implantação dos arcabouços.....	86
Figura 5.20. Histologia ilustrativa da presença de células inflamatórias e neoangiogênese após 30 e 60 dias de implantação para o grupo II.....	87
Figura 5.21. Níveis séricos da fosfatase alcalina após 30 dias que os animais sofreram o implante.....	88
Figura 5.22. Níveis séricos da ureia e creatinina após 30 dias que os animais sofreram o implante.....	89
Figura 5.23. Níveis séricos do TGP e TGO após 30 dias que os animais sofreram o implante.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Expoente n da Lei das Potências e mecanismos de Liberação de Fármacos de diferentes geometrias (Siepmann e Peppas, 2001; Peppas, 1985).....	37
Tabela 4.1. Grupos de Blendas de PCL.....	44
Tabela 4.2. Especificação dos componentes incorporados em cada grupo de pastilha.....	45
Tabela 4.3. Tipos de discos de antibióticos utilizados para cada tipo de bactérias.....	52
Tabela 4.4. Padronização da posição para implante das pastilhas de cada grupo.....	55
Tabela 4.5. Escala Histológica de classificação do grau de cicatrização. (Adaptado de Athanasiou et al., 2010).....	57
Tabela 5.1. Valores da absorvância para as respectivas concentrações de Tetraciclina para construção da curva de calibração.....	63
Tabela 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana da blenda PCL+TCH, frente a cepas ATCC.....	74
Tabela 5.3. Determinação do módulo de Young para cada grupo de pastilha, pelo método de compressão.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AST: Aspartato Aminotransferase	PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaça
ALT: Alanina Aminotransferase	PGA: ácido poliglicólico
BPM: Baixo Peso Molecular	PLA: ácido polilático
BCP: Fosfato de Cálcio Bifásico Poroso	PHB: ácido polihidroxibutirato
BMP: Proteínas Ósseas Morfogenéticas	PCL: Poli (ϵ -caprolactona)
CEUA: Comitê de Ética de Uso Animal	SLF: Sistema de Liberação de Fármaco
DDS: Drug Delivery System	tRNA: RNA transportador
FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos	TFG: filtração glomerular
FAL: Fosfatase Alcalina	TCA: Ácido Tricarboxílico
FDA: Food and Drug Administration	TCH: Tetraciclina
FEPI: Centro Universitário de Itajubá	TCP: Fosfato Tricálcico
IHQ: Coloração Imuno-Histoquímica	TGO/AST: Transaminase Glutâmica Oxalacética
IGF: Fator De Crescimento de Insulina	TGP/ALT: Transaminase Glutâmica Pirúvica
IPM: Imipenem	VC: Vanomicina
HA: Hidroxiapatita	
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura	
mRNA: RNA mensageiro	

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
2.2 TECIDO ÓSSEO	16
2.2.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA	20
2.2.2 MECANISMO DE REPARO DO TECIDO ÓSSEO	21
2.2.3 DEFEITO NA CALVÁRIA DO RATO	22
2.3 ENGENHARIA DOS TECIDOS	23
2.4 BIOMATERIAIS	23
2.4.1 BIOCERÂMICAS.....	24
2.4.2 HIDROXIAPATITA.....	25
2.4.3 POLÍMEROS	27
2.4.4 POLI (ε-CAPROLACTONA)	28
2.5 TETRACICLINA.....	32
2.6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA EM MATRIZES POLIMÉRICAS: INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO.	34
2.7 BIODEGRADAÇÃO	37
2.8 INTUMESCIMENTO	38
2.9 MARCADORES BIOQUÍMICOS	39
2.9.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO TECIDO ÓSSEO.....	40
2.9.2 MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL.....	41
2.9.3 MARCADORES DA FUNÇÃO HEPÁTICA	42
3.0 OBJETIVO.....	43
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
6.0 CONCLUSÕES.....	92
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	93
REFERÊNCIAS	94

1.0 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui uma adequada capacidade regenerativa quando sofre algum tipo de lesão e, em muitas situações, é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura arquitetônica e as suas propriedades mecânicas. Contudo, esta capacidade regenerativa tem limites e pode falhar em certas condições (PINHEIRO et al., 2004). As lesões do esqueleto, dentre as lesões conhecidas, são um dos tipos mais debilitantes, e podem levar a graves efeitos em longo prazo, sem a intervenção cirúrgica. Essas lesões podem ocorrer através de trauma, patologias ou defeitos de crescimento ou consequência de procedimentos cirúrgicos (BURGE et al., 2007).

Os dados demográficos revelam que, devido ao envelhecimento da população, as complicações associadas com o sistema músculo-esquelético irão aumentar ao longo dos próximos anos (SANDERS et al., 1999). Por isso, é de fundamental importância o desenvolvimento de melhores tecnologias para ajudar a reparação óssea. Diante disto, o campo da engenharia de tecidos apareceu para desenvolver métodos que superem a lacuna existente nos tratamentos clínicos para a perda óssea grave (BLACKWOOD et al., 2012).

A bioengenharia dos tecidos surge como uma alternativa potencial diante da falência de órgãos e tecidos lesionados. A engenharia dos tecidos é uma área de pesquisa multidisciplinar que aplica princípios de engenharia e de ciências biológicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos, criando soluções funcionais para o tratamento de problemas clínicos (BARRILLEAUX et al., 2006; SANTOS, 2007; BLACKWOOD et al., 2012).

Nos últimos 30 anos, um grande número de trabalhos foi realizado sobre o desenvolvimento de arcabouço com biomaterial para a promoção do crescimento do osso e para auxiliar na regeneração de feridas que não cicatrizam espontaneamente (BLACKWOOD et al., 2012)

Os biomateriais utilizados nos implantes, quanto a sua origem, podem ser divididos em: (1) autógenos, onde o tecido a ser enxertado é removido do próprio paciente; (2) aloenxerto, enxerto alógeno ou homólogo, onde o tecido transplantado é removido de um doador humano sem ser o paciente; (3) heterólogo ou xenólogo, no qual o material enxertado é proveniente de outra espécie e (4) aloplástico, onde o material é sinteticamente desenvolvido, sendo divididos na classe dos polímeros e biocerâmicas (GAROFALO, 2007).

Os enxertos autógenos são considerados como “padrão ouro” nas restaurações ósseas por possuírem propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras, preenchendo todas as propriedades biológicas e físico-químicas ideais (TADIC; EPPLE, 2004). Contudo, esse tipo de enxerto, envolve trauma cirúrgico para o paciente, e muitas vezes não podem ser obtido em quantidade suficiente para preencher todo o defeito. Além disso, nem todos os pacientes aceitam se submeter à cirurgia para remoção de material doador da crista ilíaca, tíbia ou no crânio, causando uma ferida secundária e aumentando o risco de infecção (MACEDO et al., 2004).

Diante destas desvantagens, o desenvolvimento de biomateriais sintéticos que apresentem características de biocompatibilidade, previsibilidade de regeneração, que complementem composição orgânica e mineral, e possua ausência de riscos trans-operatórios e/ou sequelas, tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas (BEST et al., 2008).

Dentre os diferentes biomateriais, as biocerâmicas têm sido amplamente estudadas e clinicamente aplicadas nos processos regenerativos, apresentando resultados clínicos promissores. As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque por apresentarem, principalmente, ausência de toxicidade local ou sistêmica e aparente habilidade de se ligar ao tecido hospedeiro (KAWACHI et al., 2000; LEGEROS, 2002)

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) é a mais utilizada para as finalidades clínicas, se destacando, na preparação de matrizes para engenharia de tecido ósseo, devido à sua similaridade com a fase mineral dos ossos e por possuir propriedades biocompatíveis e osteocondutoras. Entretanto, apresenta fragilidade e baixa resistência, característica das cerâmicas (METSGER, 1999; KIM et al., 2004; KAWACHI et al., 2000)

Tendo em vista que a HA, quando implantada no tecido ósseo, está sujeita a tensões mecânicas inerentes à própria dinâmica da região, para que sua utilização seja efetiva nos compartimentos sujeitos a carga, suas propriedades mecânicas devem ser melhoradas (KIM et al., 2004; DA SILVA, 2011). Desse modo, para manter o implante de forma segura, com propriedades físico-químicas adequadas e características desejáveis ao reparo, pode-se fazer uso de vários tipos de biopolímeros, por exemplo, a poli (ϵ -caprolactona) (PCL). Sua compatibilidade com a HA tem sido relatada (KIM et al., 2004; CHUENJITKUNTAWORN et al., 2009; DA SILVA, 2011; DASH; KONKIMALLA, 2012)

O polímero PCL, na área de polímeros reabsorvíveis, tem sido intensamente pesquisado devido à combinação de suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade e por ser biorreabsorvível. Atualmente, o polímero PCL tem se destacado por sua aplicação como arcabouço para o crescimento celular na engenharia de tecido ósseo,

por possuir as propriedades mecânicas fundamentais para servir como um arcabouço em enxertos aloplásticos, onde as propriedades mecânicas devem ser mantidas até que o processo de regeneração do tecido biológico se complete (DA SILVA, 2011; OYANE et al., 2005; SANTOS, 2007).

Estudos têm apresentado o desenvolvimento de compósito constituído por materiais que possuam boas características estruturais e materiais que promovam o crescimento do osso (BLACKWOOD et al., 2012). Desta forma, um compósito formado por uma biocerâmica e um polímero biodegradável pode oferecer características ideais por apresentar tanto a propriedade bioativa da cerâmica como as características de suporte estrutural e propriedade biodegradável do polímero, melhorando a resposta biológica a esses biomateriais.

Dentre os antibióticos mais frequentemente utilizados na engenharia de tecidos para a regeneração óssea destacam-se as tetraciclina, um marcador de mineralização óssea que além das propriedades antimicrobianas, apresentam propriedades farmacológicas adicionais como atividade anticolagenásica, inibição de reabsorção de osso, ação anti-inflamatória e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares (ESPOSITO, 1997; SEYMOUR, 1995; PATARO, 2003).

A limitada circulação sanguínea no tecido ósseo reduz a eficácia terapêutica das drogas administradas no modo convencional. Desta forma, a implantação de fármacos em biomateriais implantáveis que permitam a liberação controlada de fármacos diretamente no tecido danificado, resolve o problema do reduzido efeito terapêutico da administração convencional (OGAWA; PLEPIS, 2002; PUGA et al., 2012).

Diante do exposto, o presente trabalho visou avaliar os aspectos funcionais e a biocompatibilidade da blenda de PCL associados à hidroxiapatita e à tetraciclina no modelo experimental de falha óssea na calvária de ratos. Dessa maneira, foram avaliadas as possíveis alterações renais e hepáticas após implantação dos compósitos de PCL associados ou não à hidroxiapatita e/ou tetraciclina in vivo. Também foi investigada, bioquimicamente, a atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica no período de reparo ósseo com o uso das blendas PCL com ou sem tetraciclina e o compósito PCL/HA com ou sem tetraciclina. Estudos, in vitro, também foram realizados com o intuito de estudar o perfil de liberação da tetraciclina das blendas PCL e PCL/HA em função do tempo, assim como o estudo da biodegradação das blendas de PCL e PCL/HA associados ou não à tetraciclina.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em lesões onde o tecido não consegue se restabelecer sozinho torna-se necessário a implantação de biomateriais que auxiliem os processos regenerativos, dentre os mais utilizados destacam-se as ligas metálicas. A maioria possui a desvantagem de sofrerem corrosão, liberar partículas que podem provocar resposta inflamatória no organismo, apresentarem módulos de elasticidade superior ao do osso, além de serem, muitas vezes, implantes temporários que necessitam de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do implante.

Os avanços da medicina têm levado ao aumento da expectativa de vida da população e, conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice. Dentre os diversos problemas que comprometem a estrutura óssea, a osteoporose e a perda de massa óssea têm sido alvo de um grande número de pesquisas, devido a seus graves efeitos na qualidade de vida das pessoas. Os problemas de estrutura óssea atingem também os jovens, em sua fase mais produtiva, em decorrência de acidentes, destacando-se os automobilísticos e os de trabalho (KAWACHI et al., 2000).

A amplitude destes problemas de saúde junto à população tem levado os pesquisadores a desenvolver biomateriais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados (KAWACHI et al., 2000). Estes têm sido utilizados para o desenvolvimento de equipamentos biomédicos implantáveis, tais como suturas cirúrgicas, sistemas de liberação controlada de drogas, dispositivos ortopédicos e arcabouços na engenharia de tecidos (BARBANTI et al., 2006).

2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo constitui o principal componente do esqueleto e tem como principal função sustentar o corpo, dando-lhe forma. O tecido ósseo destaca-se como maior reservatório de cálcio do corpo humano. Desta forma desempenha um papel imprescindível na homeostase mineral além de proteger órgãos vitais, alojar a medula óssea, formadora das células sanguíneas, proporcionar apoio aos músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis, e constituir um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ROBBINS et al., 2000).

Este tecido é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Sua composição é distribuída em aproximadamente 8% de água e 92% de material sólido, sendo este último dividido em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico (ANDRADE et al., 2007; LEGEROS, 2002).

O material orgânico, ou matriz óssea, é a estrutura de suporte para deposição dos sais inorgânicos, sendo constituído por aproximadamente 90% de proteínas colágenas. As moléculas não colágenas constituem aproximadamente 3 a 5% do material orgânico, e são as responsáveis pela criação de sítios ativos para a biomineralização e para a adesão celular durante os fenômenos de formação e reabsorção óssea (BORD et al., 1996; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005). Dentre as proteínas não colagênicas, podemos encontrar a osteopontina, sialoproteínas, osteonectina e osteocalcina.

A parte inorgânica do osso, que constitui cerca de 65% de seu peso, é composta por bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio. O cálcio e o fósforo existem basicamente sob a forma de cristais de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], sendo considerado o principal sal inorgânico constituinte do osso, mas o fosfato de cálcio também está presente sob a forma amorfa.

As células presentes no tecido ósseo podem ser de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. São encontradas ainda, no tecido ósseo, células mesenquimais provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos capazes de se diferenciar em células osteogênicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LEGEROS, 2002; ROBBINS et al., 2000).

As células mesenquimais, osteoprogenitoras, se diferenciam em osteoblastos capazes de sintetizar a matriz extracelular rica em colágeno e proteínas colagênicas, denominada matriz osteóide. Os osteoblastos são células secretoras de proteínas colágenas e não colágenas, de proteoglicanos da matriz óssea, de metaloproteinases que regulam fatores de crescimento e citocinas reguladoras do desenvolvimento osteoclástico. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras dependem da liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os osteoblastos depositam matriz osteóide que, quando mantida imóvel durante o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura mineralizada (PETERSON et al., 2003). A matriz osteóide é mineralizada por meio da deposição de cristais

de hidroxiapatita (HA) e de outros íons. Os osteoblastos aprisionados nessa matriz após a mineralização tornam-se osteócitos.

Os osteócitos são células encontradas no interior da matriz óssea, ocupam lacunas das quais partem canalículos sendo cada lacuna ocupada por apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O arranjo dos prolongamentos citoplasmáticos permite participar da regulação da homeostasia do cálcio plasmático e perceber a carga mecânica incidida no osso transmitindo essa informação às outras células do tecido (AARDEN; BURGER; NIJWEIDE, 1994; ANDRADE et al., 2007; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; TURNER, 1991).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas, que se originam da fusão de células da linhagem monocitofagocítica dos tecidos hematopoiéticos. São responsáveis pela absorção da matriz extracelular e pela remodelação óssea. Seu mecanismo de ação, na reabsorção da matriz óssea, deve-se à secreção para dentro desse microambiente fechado, de ácidos (H^+), colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZGIL et al., 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

Exceto nas articulações sinoviais, o osso é recoberto, na sua face externa, pelo perióstio, que consiste em uma camada externa de tecido conjuntivo denso que contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos, e de uma camada interna, que contém células osteoprogenitoras (osteogênicas), que se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos desempenhando papel importante no reparo ou na neoformação óssea. As cavidades internas do osso são revestidas por endóstio, um tecido conjuntivo delgado, constituído de uma única camada de células osteoprogenitoras e de osteoblastos (HSIONG, MOONEY, 2006; MIGUEL, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Macroscopicamente o tecido ósseo poder classificado em dois tipos. Quando formado por partes sem cavidades visíveis, chamamos de osso compacto ou cortical, e quando apresentam muitas cavidades intercomunicantes, o osso é esponjoso ou medular. Estes são distintos não apenas na forma estrutural, mas nos aspectos funcionais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROLIM, 2010).

O osso compacto é denso (10% de porosidade), e encontra-se em 80% de todo osso do corpo humano, possui uma matriz colagênica organizada em forma de lamelas concêntricas,

geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Harvers. Os canais centrais contêm vasos sanguíneos e nervos, se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea. Esta intercomunicação são os canais de Volkmann (BLACKWOOD et al, 2012; HING, 2004; MENDONÇA, 2005).

O osso cortical possui maior resistência mecânica permitindo atuar na proteção dos órgãos internos do corpo. Enquanto que, o osso esponjoso, é formado a partir de um grande número de poros (50% -90%) em 3D e corresponde a 20% do osso restante no corpo. Atua nas funções metabólicas, delimita espaços intertrabeculares, a cavidade medular, que abriga a medula óssea, sendo também reservatório de gordura no organismo (BLACKWOOD et al, 2012; SÁNDOR, 2003; SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009).

Nos ossos chatos, que constituem a abóbada craniana, existem duas camadas de osso compacto, as tábuas internas e externas, separadas por osso esponjoso que recebe o nome de díploe (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Na análise microscópica, histologicamente, pode-se observar que o tecido ósseo apresenta duas morfologias distintas, classificando os ossos em dois tipos: osso primário ou osso imaturo e osso secundário ou osso lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz.

Durante o desenvolvimento embrionário e reparação óssea a formação óssea é iniciada pelo osso primário. Constituído por maior proporção de osteócitos, comparando com o tecido secundário, e feixes de fibras colagenosas que se dispõem irregularmente, sem orientação definida, sendo menor o conteúdo de sais minerais (GITIRANA, 2004).

O osso secundário é um osso maduro formado por tecido ósseo organizado em lamelas ósseas concêntricas ou paralelas. Os osteócitos encontram-se espalhados em intervalos regulares entre as lamelas ósseas, e a matriz óssea é mais calcificada. O arranjo das lamelas ósseas permite distribuir as forças que agem sobre o tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; GITIRANA, 2004).

A formação do tecido ósseo se dá ou por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre dentro de uma membrana conjuntiva, ou por um processo de ossificação endocondral que se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é destruído e substituído por tecido ósseo formado a partir de células conjuntivas dos tecidos vizinhos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo, depois de lesado, pode reparar-se retomando sua capacidade funcional sem cicatrizes ou deformidades. A regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico onde a função do tecido lesionado ou perdido e sua estrutura são completamente restauradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O mecanismo de reparo é influenciado pelo suplemento vascular, tensão de oxigênio, estabilidade dos fragmentos ósseos, ativação de fatores de crescimento, diferenciação e proliferação de células osteoprogenitoras (BUCKWALTER; GLIMCHER; COOPER, 1995). A consolidação do reparo no tecido ósseo é condicionada pelo tamanho do sítio lesionado, pois em regiões onde a dimensão do defeito e sua morfologia são extensas e críticas ao reparo, este mecanismo torna-se limitado (CARVALHO, 2010). Desta forma, o menor defeito intra-ósseo que não se regenera espontaneamente por completo é definido como tamanho de defeito crítico (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

O princípio da regeneração óssea define que o processo de cicatrização óssea ocorre pela competição entre células ósseas e do tecido conjuntivo para a colonização e preenchimento de determinada área, representando um dos princípios básicos da engenharia tecidual (BUSER et al., 1993; PECORA et al., 1997).

Para que se inicie o processo de reparação, os macrófagos removem o coágulo sanguíneo e os restos celulares que surgem com a lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas, no momento da fratura. O perióstio e o endóstio próximos à fratura respondem com uma intensa proliferação formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteoblastos começam a produzir o tecido ósseo primário ocorrendo à formação do calo ósseo. Esse osso primário será remodelado e substituído por osso secundário, ao mesmo tempo em que o calo é reabsorvido. No local de reparação podem ser encontradas, ao mesmo tempo, áreas de cartilagem, de ossificação intramembranosa e de ossificação endocondral (ROLIM, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Quando a reparação óssea não é atingida por completo, em 60 % dos casos, pode ocorrer, na região do implante, fraturas agregadas com a magnitude dos processos biológicos (reabsorção osteoclástica), com a ocorrência de microfraturas e perda da densidade óssea mineral tanto no aloenxerto cortical quanto no medular (CANCEDDA, et al., 2007).

Com o passar dos anos, surgiram estudos na busca de métodos auxiliares para realçar a resposta inerente do organismo vivo no que diz respeito ao processo da neoformação óssea.

Desta forma, materiais para preenchimento dos defeitos ósseos passaram a ser empregados para restabelecer a continuidade entre as extremidades ósseas e fornecer estímulos à osteogênese (LEONEL et al., 2003).

2.2.2 MECANISMO DE REPARO DO TECIDO ÓSSEO

Para uma adequada formação óssea é necessário que os biomateriais enxertados permitam que os três fenômenos osteogênicos relacionados ao crescimento ósseo ocorram no sítio do implante. Sendo estes a osteoestimulação, osteoindução e osteocondução (PRECHEUR, 2007).

Osteoestimulação

A osteoestimulação resulta na formação de novo osso, onde as células mesenquimais pluripotentes presentes no defeito são estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos e a se proliferarem. Os osteoblastos maduros formam a matriz óssea, que passa por um processo de remineralização e remodelação formando o novo osso (LIND et al., 2000).

Osteoindução

Promove a formação óssea por estimular a migração de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ativos no sítio de implantação do enxerto, sob a influência de um ou mais agentes indutores, como as BMP (PRECHEUR, 2007; LINDHE et al., 2005). Estes agentes indutores atuam também na angiogênese.

Osteocondução

Neste processo, os enxertos ou o bioimplante funcionam como uma estrutura de suporte para deposição de novo osso oriundo das imediações. Através do arcabouço ocorre o crescimento de capilares e células osteoprogenitoras para o interior de um leito ósseo, de permeio, ou através do mesmo. Simultaneamente, o biomaterial é gradativamente reabsorvido e substituído por um novo tecido. (BAUER & MUSCHLER, 2000; CARVALHO et al., 2004; ROLIM, 2010).

2.2.3 DEFEITO NA CALVÁRIA DO RATO

A calvária é definida como a porção do crânio que se estende da saliência supra-orbital até a região de protuberâncias occipital externa, sendo de origem membranosa (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

A calvária de ratos apresenta um grande amparo na literatura em relação ao seu uso na pesquisa envolvendo substitutos ósseos. Este modelo experimental apresenta benefícios econômicos e técnicos. As principais vantagens da realização de pesquisa com defeitos na calvária do rato estão relacionados à quantidade de espécies que podem ser utilizadas, com baixo custo; a necessidade de um pequeno espaço para manutenção; pouca quantidade de material para realização do estudo piloto e a fácil implantação do biomaterial no defeito (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Podemos considerar ainda, a acessibilidade da região e a ausência de corte da camada muscular, facilitando a cicatrização e recuperação do animal. A incisão nesta região impede a contaminação através da boca e patas e permite que o material implantado não sofra movimentação, por se tratar de um osso imóvel.

Deve ser tomada extrema precaução no momento da realização do defeito ósseo. A dura-máter encontra-se imediatamente abaixo da calvária, sendo extremamente vulnerável a traumatismos com o uso de brocas ou trefinas. Tal meninge é a principal responsável pela irrigação sanguínea do crânio e seu dano pode causar prejuízos ao processo reparador (SCHMITZ E HOLLINGER, 1986; AALAMI, NACAMULI et al., 2004; ASCHERMAN, FOO et al., 2008), comprometendo os resultados experimentais obtidos.

O defeito na calvária de ratos pode ser classificado em dois tipos: críticos (maiores que 6 mm de diâmetro) ou não críticos (menores que 6mm de diâmetro). O defeito crítico está indicado para os casos onde se deseja avaliar a capacidade do biomaterial para promover a indução e/ou condução a uma formação óssea em casos onde não haja fechamento natural do defeito, ou seja, a habilidade do biomaterial para induzir e/ou conduzir uma formação óssea além da capacidade fisiológica do organismo em se regenerar (SANADA, 2007).

Nos defeitos não críticos, temos a certeza do fechamento do defeito criado, e o objetivo experimental é a avaliação da qualidade e quantidade de tecido formado pelo biomaterial, seja pelo seu papel osteoindutor, osteocondutor ou osteogênico, analisando apenas o tipo celular, quantidade e qualidade óssea (SANADA, 2007). Segundo Macedo (2004), a aplicação dos princípios biológicos na avaliação da regeneração guiada do osso tem rendido resultados interessantes em defeitos ósseos menores.

2.3 ENGENHARIA DOS TECIDOS

Nas áreas biomédicas e nas engenharias tem-se alcançado avanços que possibilitam o desenvolvimento de técnicas que minimizem o dano permitindo uma melhoria na qualidade de vida (CARVALHO, 2010).

O principal objetivo da bioengenharia é superar as limitações dos tratamentos convencionais em uso, baseados na cirurgia reconstrutora ou no transplante de órgãos. Sobretudo, sendo capaz de produzir substitutos para órgãos e tecidos que apresente tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

A bioengenharia dos tecidos surge como uma alternativa potencial diante da falência de órgãos e tecidos lesionados. A engenharia dos tecidos é uma área de pesquisa multidisciplinar que aplica princípios de engenharia e de ciências biológicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos, criando soluções funcionais para o tratamento de problemas clínicos (BARRILLEAUX et al., 2006; SANTOS, 2007; BLACKWOOD et al., 2012).

O foco da bioengenharia tecidual tem sido a criação de tecidos para enxerto, capazes de promover ou aumentar a osteogênese no sítio de defeito ósseo. Para isso ela pretende combinar os avanços no campo dos biomateriais, como por exemplo, a utilização de biomateriais em arcabouços (“*scaffolds*”), e da biologia celular, de forma que os enxertos ósseos possam abranger a maioria ou todas as características ideais: serem biocompatíveis, osteoindutivos, osteocondutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo (FRÖHLICH et al., 2008; EL-GHANNAM, 2005).

2.4 BIOMATERIAIS

Os biomateriais podem ser definidos como qualquer substância ou associação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo, parcial ou integralmente, quaisquer tecidos, órgãos ou funções do organismo (VON RECUM; LABERGE, 1995; GIL; FERREIRA, 2006). Como uma alternativa aos enxertos ósseos, nos processos de regeneração do tecido ósseo, a aplicação de biomateriais sintéticos é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 1987).

Segundo Rose et al. (2004), os biomateriais atuam direcionando a forma geral e a estrutura do tecido a ser substituído, promovendo a adesão celular e subsequente crescimento

tecidual admitindo a difusão de células e nutrientes através do seu arcabouço. Estes ainda podem ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que deixam e estimulam a formação óssea (WAN et al., 2006; CHEN et al., 2009). Os biomateriais devem atuar imediatamente após a implantação e ser capaz de remodelar e integrar com o organismo. Eles devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos, proporcionando a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste local (VUNJAKNOVAKOVIC; KAPLAN, 2006; WAN et al., 2006; CHEN et al., 2009). Além disso, eles devem proporcionar uma estrutura adequada, que permita suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

Um biomaterial ideal ainda precisa ser esterilizável, ser disponível em quantidade suficiente, ser osteoindutor e formar arcabouço capaz de fornecer suporte mecânico ao novo osso e impedir o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro da falha (CUTTER; MEHRARA, 2006; AABOE et al, 1995).

As principais vantagens que justificam a utilização dos implantes aloplásticos são a disponibilidade comercial em larga escala, a ausência da necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção do implante, fácil manipulação, reduzido tempo operatório, possibilidade de confecção de peças individualizadas, e ter possibilidade de uma integração física e química com o meio implantado (SILVEIRA, 2005).

Quanto ao tipo, os biomateriais podem ser classificados em: polímeros sintéticos, cerâmicas, metais e macromoléculas naturais que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em meio biológico (ROLIM, 2010).

Recentemente, uma das linhas de pesquisa mais importantes na engenharia de tecido ósseo é o desenvolvimento dos biomateriais em arcabouço (“*scaffolds*”), que consiste num arcabouço tridimensional poroso, com propriedades bioativas e biodegradáveis, que serve de molde para formação do novo tecido (LIU; MA, 2004). Além disso, devem mimetizar os meios químicos e físicos do tecido saudável, para permitir migração, diferenciação e proliferação tecidual e permitir suporte mecânico (OLIVEIRA, 2010). Considerando estes parâmetros, escolhemos este tipo de estrutura para avaliar em nosso estudo.

2.4.1 BIOCERÂMICAS

As cerâmicas podem ser de origem natural ou sintética, e sua utilização como biomateriais vem sendo relatada desde 1894. Dentre algumas vantagens para utilização no reparo das fraturas ósseas, destaca-se: a semelhança estrutural com o osso,

biocompatibilidade, osteocondutividade, e principalmente a ausência de resposta imunológica, por não possuíram proteínas em sua composição. Suas limitações estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, de forma que não pode ser utilizada em regiões de grande esforço mecânico, pois sua natureza porosa aumenta o risco de fraturas (WAN et al., 2006; ABUKAVA et al., 2006, KAWACHI, 2000).

Um dos parâmetros mais importantes para obtenção de um substituto ósseo ideal é a relação entre as velocidades de neoformação óssea e de absorção do biomaterial. As cerâmicas possuem um alto tempo de degradação *in vivo*, permitindo a remodelação óssea no local do implante (OLIVEIRA et al., 2010). As principais cerâmicas utilizadas para reparação e substituição óssea disponíveis comercialmente são a Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o b-Tricálcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), a alumina e a zircônia (OLIVEIRA et al., 2010)

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm se destacado, entre as biocerâmicas, por não apresentarem respostas a corpo estranho ou inflamações, ausência de toxicidade local e sistêmica, e aparente habilidade em associar-se ao tecido hospedeiro (LONG, 2008). Estas características positivas podem ser explicadas pela natureza química desses materiais. Para estes tipos de cerâmicas os íons de cálcio e fosfato não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, acarretando uma favorável resposta tecidual ao tratamento. Dentro de certos limites, a liberação destes íons pode participar como estimuladores da regeneração óssea e da reprecipitação de uma camada de osso neoformado (LEGEROS, 2002).

Os fosfatos de cálcio estão sendo investigados para utilização nos sistemas de liberação de fármacos. Alguns estudos com experimentos em animais mostram que estes sistemas suportados em biocerâmicas são promissores para o controle de infecções ósseas (OGAWA e PLEPIS, 2002).

2.4.2 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. Sua fórmula estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Mas esta razão pode encontrar-se maior com aproximadamente 1,5 em composições estáveis (FULMER et al., 1992; KAWACHI et al., 2000).

Os monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal. Sua estrutura permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade (MA et al., 1995). O cálcio pode ser substituído por metais tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} ,

Co^{2+} , Fe^{2+} , etc., os grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições acarretam um aumento de defeitos estruturais e distorções na rede que provocam alterações de propriedades como solubilidade, reatividade térmica e estabilidade podendo ainda, alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais e a textura superficial da estrutura da hidroxiapatita (MAVROPOULOS, 1999; MARTIN; BROWN, 1997).

A semelhança estrutural da hidroxiapatita sintética com a apatita óssea mineral somada a suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração permite contato e adaptação quando implantada ao tecido ósseo, tornando-a substituta do osso humano em implantes e próteses (TEXEIRA, 2009; EANES, 1980). Também apresentam importante propriedade de osteocondução e são capazes de promover uma interação direta com o tecido ósseo, podendo ser classificado como bioativo (SCHWENGBER, 2009).

Estudos que utilizam arcabouços constituídos por hidroxiapatita para regeneração óssea tem observado que a presença da HA pode facilitar a adsorção específica de proteínas séricas que ajudam a regular a adesão e proliferação das células, a dissolução gradual das partículas HA constituídas por íons de cálcio e fosfato podem ajudar a regular o comportamento das células vizinhas, servem como fonte de fosfato inorgânico para aumentar a mineralização das células óssea e a quantidade de partículas de HA incorporado deve influenciar a deposição de apatita sobre a superfície das células (CHUENJITKUNTAWORN, et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado o potencial osteoindutivo dos materiais cerâmicos a base de fosfato de cálcio (RIPAMONTI, 1996; ZHANG et al., 1991; YANG et al., 2011). Dentre as biocerâmicas que tem demonstrado osteoindução intrínseca, destaca-se, a hidroxiapatita sintética (HA), fosfato de cálcio bifásico poroso (BCP), o fosfato tricálcico (TCP). Yang et al. (2011) desenvolveu um estudo para investigar osteoindução em rato com a utilização de dois tipos de materiais biocerâmica: HA e β -TCP. Para confirmar a neoformação óssea nos locais ectópicos no músculo dos ratos, foram utilizadas a coloração Imuno-histoquímica (IHQ) e a coloração vermelho de Alizarina S (um quelante marcador de fluorescência para o cálcio), onde se observou que HA e β -TCP podem induzir a formação de osso no modelo de ratos.

Entretanto, a HA apresenta fragilidade e baixa resistência, característica das cerâmicas. Segundo Blackwood et al., (2012), estes produtos cerâmicos, encontrados na natureza, se quebram facilmente quando utilizados sozinhos pois lhe faltam robustez estrutural. Tendo em vista que, quando implantada no tecido ósseo, está sujeita a tensões mecânicas inerentes à

própria dinâmica da região, para serem utilizadas efetivamente nos compartimentos sujeitos a carga, suas propriedades mecânicas devem ser melhoradas (KIM et al., 2003). Outro fator limitante para utilização clínica da hidroxiapatita é sua lenta biodegradação. Estudos realizados têm demonstrado que ela começa ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implante. Para alguns tipos de implantes, um biomaterial necessita ser reabsorvível, pois os processos de degradação deverão ser concomitantes com a reposição do osso em formação (KAWACHI et al., 2000).

Desta forma, a relação entre as velocidades de neoformação óssea e de absorção do biomaterial é de grande importância na obtenção do substituto ósseo ideal e alguns fatores que interferem na velocidade de degradação é a porosidade, cristalinidade, tamanho e forma das partículas (SCHWENGBER, 2009).

A HA encontra-se disponível no mercado em forma de blocos ou partículas, densos ou porosos. Estas diversas formas já foram estudadas com relação às suas propriedades, sendo observada que as formas densas demonstraram degradação mais lenta, ao decorrer do tempo. Pequenas variações na geometria e propriedades físico-químicas podem causar também significantes mudanças na resposta biológica. Em um estudo realizado por TAMPIERE et al. (2001), pode-se observar que alterações no tamanho dos poros permitem a hidroxiapatita uma forte adesão ao osso contribuindo para uma interligação mecânica que resulta numa firme fixação do material com o tecido ósseo.

2.4.3 POLÍMEROS

Os polímeros são moléculas grandes caracterizadas pela múltipla repetição de um ou mais tipo de átomos ou grupos de átomos ligados entre si, ao longo de sua cadeia. A grande maioria dos materiais utilizados na área de saúde para a confecção de dispositivos biomédicos são polímeros, dentre os quais: polímeros biodegradáveis e/ou bioreabsorvíveis (PARK e BRONZINO, 2002).

Os polímeros biodegradáveis sofrem ataques por elementos biológicos que agredem sua integridade estrutural acarretando a formação de fragmentos ou subprodutos de degradação que podem ser removidos do sítio de ação, mas não do organismo. Já os polímeros bioreabsorvíveis caracterizam-se pela degradação resultante da redução de tamanho e são reabsorvidos *in vivo* (VERT, LI, et al., 1992; BARBANTI, ZAVAGLIA e DUEK, 2005).

Dentre as vantagens para utilização dos polímeros, destacam-se o fácil controle de síntese, não sofrem degradação mediada por células, e a maioria é biodegradável e

biocompatível. Ressalta-se, ainda, que a frequente utilização dos polímeros, principalmente na reparação dos tecidos, também esta associada a sua adaptabilidade a um grande número de conformações estruturais (variações dos constituintes dos monômeros, em diferentes razões, controle das condições de polimerização e introdução de vários grupos funcionais) e baixa associação à resposta imune (BLACKWOOD et al., 2012; SWETHA et al., 2010). Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL) (ABUKAWA et al., 2006; OH et al., 2006; PRECHEUR, 2007).

A estratégia da engenharia dos tecidos tem emergido com alternativas de tratamento onde a maioria das abordagens envolve a utilização de arcabouços, que forneçam suporte estrutural para o local do defeito durante a reparação. Os polímeros sintéticos e naturais têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de soluções na engenharia dos tecidos para a reparação do osso. A utilização das matrizes sintéticas é vantajosa porque evita os problemas associados a enxertos e permite uma adaptação das propriedades físico-químicas requeridas para uma aplicação particular (BLACKWOOD et al. 2012).

2.4.4 POLI (ϵ -CAPROLACTONA)

A poli (ϵ -caprolactona) é obtida através da polimerização do monômero ϵ -caprolactona por abertura do seu anel cíclico, apresentando fórmula molecular $(C_6H_{10}O_2)_n$ (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

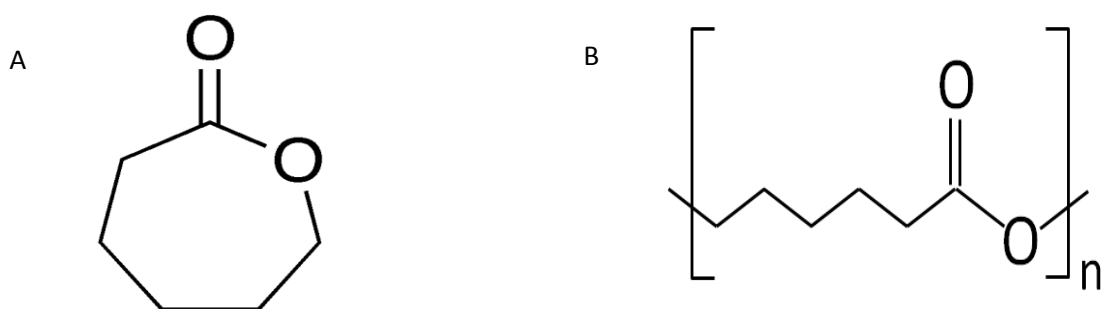


Figura 2.1. Fórmulas estruturais de ϵ -caprolactona (A), Poli-(ϵ -caprolactona) (B).

O PCL é um poliéster alifático com caráter hidrofóbico, resultante da presença de grupos metilênicos não-polares e um único grupo éster relativamente polar em cada unidade que se repete. Tem alta permeabilidade, baixo ponto de fusão (60°C) e estabilidade ao calor

(DE QUEIROZ et al, 2002; DE ALMEIDA & DE QUEIROZ, 2003; DE ARRUDA ALMEIDA et al, 2004).

O PCL dissolve bem em solventes orgânicos comuns (CHUENJITKUNTAWORN et al., 2009). Sendo solúvel também em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano a temperatura ambiente. Tem baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida, acetonitrila e insolúvel em álcool, éter de petróleo e éteretílico (COULEMBIER, DEGE'E, et al., 2006).

A poli (ϵ -caprolactona) é considerada um polímero semicristalino, apresentando cristalinidade entre 40-60%. Este parâmetro é um fator importante na degradação dos poliésteres alifáticos, pois vários estudos relatam que a lenta taxa de degradação *in vivo* do PCL está relacionado com sua cristalinidade, hidrofobicidade e peso molecular (ZHAO, et al., 2008; SAHOO et al, 2010 a; DASH; KONKIMALLA, 2012).

Desde a década passada, a investigação sobre este polímero tem aumentado devido à sua versatilidade, revelando-se promissor para aplicações médicas, como: suturas, vasos sanguíneos artificiais, dispositivos de liberação controlada de fármacos, substitutos ósseos e revestimento de feridas (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; SAHOO et al., 2010b).

As pesquisas com o PCL iniciaram na área de biomateriais juntamente com a área de engenharia dos tecidos entre 1990 e 2000 (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Devido à sua natural biocompatibilidade, biodegradabilidade e gradual reabsorção após implantação, o PCL tem sido extensivamente estudado para liberação controlada de fármacos e engenharia dos tecidos, com aprovação dos EUA e do Food and Drug Administration (FDA), com aplicações em vários tipos de formulações e para indicações craniofaciais (DASH; KONKIMALLA, 2012; PUGA et al., 2012; SAHOO et al., 2010b, CHUENJITKUNTAWORN et al., 2009). Nos últimos 15 anos, e crescente o número de publicações que envolvem o PCL na engenharia dos tecidos (FIGURA 2.2).

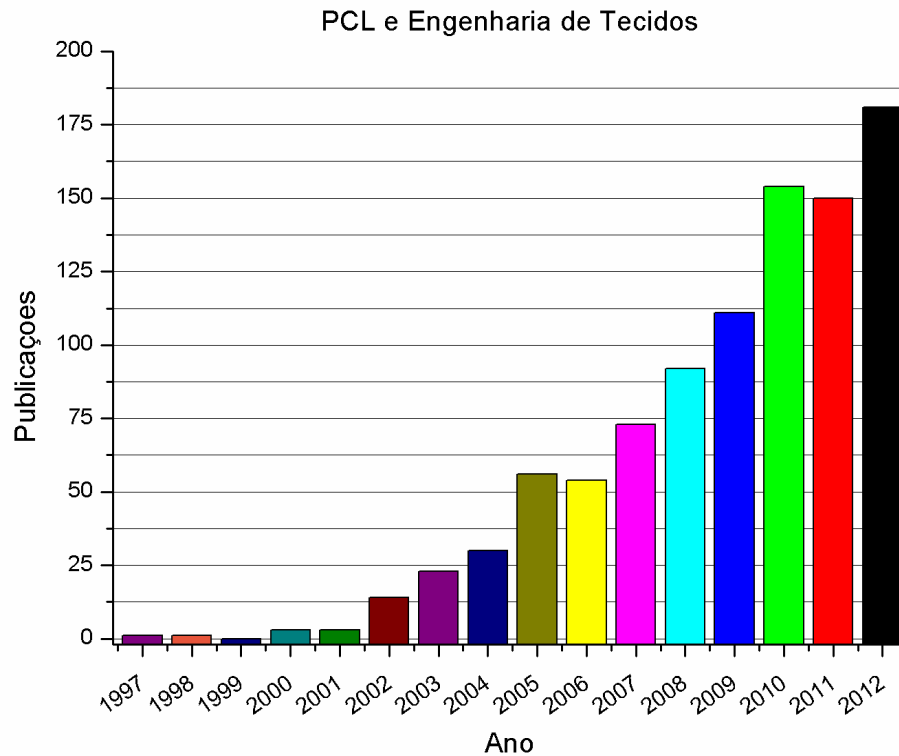


Figura. 2.2 Número de publicações usando os termos PCL e engenharia tecidual nos últimos 15 anos. Pesquisa retirada do site Web of Science

O PCL destaca-se por sua aplicação como matriz para o crescimento celular, por possuir propriedades mecânicas fundamentais que servem como um arcabouço em enxertos aloplásticos, onde as propriedades mecânicas devem ser mantidas até que o processo de regeneração do tecido biológico se complete (OYANE et al., 2005). Este polímero possui flexíveis propriedades mecânicas (módulo de elasticidade, resistência à tração, alongamento) tornando-o adequado para diversas aplicações médicas (DASH; KONKIMALLA, 2012).

Estudo realizado para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* das matrizes puras de PCL, associadas com hidroxiapatita (PCL/HA) e com o antibiótico vancomicina (PCL/HA/VC) para obter protótipos implantáveis, demonstrou, a partir dos resultados histológicos, que o compósito PCL/HA facilitou a osteocondução a partir de 30 dias do implante, proporcionando estrutura para deposição do tecido ósseo recém-formado. Esta característica manteve-se ao longo dos períodos de 60 e 90 dias pós-implante. Os dados indicaram o potencial do PCL como biomaterial para a aplicação na engenharia de tecidos, assim como para a obtenção de dispositivos implantáveis, capazes de melhorar a osteointegração (DA SILVA, 2011).

O PCL apresenta atoxicidade natural e compatibilidade com vários tecidos do corpo torna-o um material ideal para ser utilizado na engenharia dos tecidos (DASH;

KONKIMALLA, 2012). Uma pesquisa desenvolvida para determinação da biocompatibilidade de matrizes de PCL/HA *in vitro*, através dos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e hemocompatibilidade e avaliação *in vivo* de toxicidade aguda constatou que as matrizes, em ambos os modelos experimentais, mostraram-se isentas de toxicidade (DA SILVA, 2011).

Embora PCL esteja sendo amplamente utilizada como matriz polimérica, suas aplicações são frequentemente limitadas por vários inconvenientes, incluindo a limitada atividade biorregulatória, hidrofobia e lenta taxa de degradação (SAHOO et al., 2010b). Uma solução para estes problemas é que o PCL possui grande vantagem de formar blendas com outros polímeros permitindo alterações de suas propriedades (Chen et al., 2003) e físico-químicas (Calil et al., 2006), que resultam no aumentando de sua hidrofiliabilidade e sua taxa de degradação.

A poli (ϵ -caprolactona) de peso molecular alto tem apresentado problemas significativos quanto ao processo de reabsorção. Estudos sobre a degradação *in vivo* do PCL relatam que dependendo da massa molecular do dispositivo ou implante, a degradação total ocorre em um período de 1 a 3 anos (SJ e BJ, 1992).

Considerando que, a cinética de degradação é altamente dependente do peso molecular do(s) polímero(s), modulação do peso molecular do PCL oferece algumas vantagens para o desenvolvimento de arcabouços na engenharia tecidual. Recentemente, o grupo de pesquisa da UNIFEI que estuda os polímeros bioativos e biomiméticos desenvolveu procedimentos de síntese do polímero poli (ϵ -caprolactona) de baixo peso molecular (BPM-PCL) cuja cinética de biorreabsorção é muito mais elevada que os PCL's comerciais (De QUEIROZ et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004).

Diante do exposto, resolvemos realizar a produção de blendas de PCL a partir do PCL de elevado peso molecular e o BPM-PCL com o objetivo específico de melhorar sua biodegradabilidade no processo de regeneração óssea.

Segundo Blackwood et al., (2012), os poliésteres, como o PCL, não possuem nenhuma capacidade osteoindutoras para torná-los adequados para a substituição óssea. Atualmente, os materiais mais comumente utilizados para promover a osteoindução são baseados na HA e trifosfato de cálcio, mas estes materiais são bastante quebradiços quando utilizados sozinhos. Diante disto, compósitos, constituídos por uma fase de suporte estrutural e por uma segunda fase que promova a infiltração e diferenciação celular oferecem um potencial para facilitar a cura mais rápida do defeito.

Neste sentido, novos estudos têm sido realizados com objetivo de solucionar as desvantagens das cerâmicas e polímeros, e de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens de ambas, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

Neste contexto, para aliar as propriedades de osteocondutividade e osteoindutividade, bioatividade, reabsorção e suporte estrutural, a hidroxiapatita e a policaprolactona têm sido combinados para a obtenção de compósitos de PCL/HA.

2.5 TETRACICLINA

As tetraciclina que têm como fonte microbiana o *Streptomyces aureofaciens*, são antibióticos de largo espectro que afetam organismos anaeróbicos e facultativos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e micoplasmas, por sua potente atividade bacteriostática. (PATARO et al., 2003).

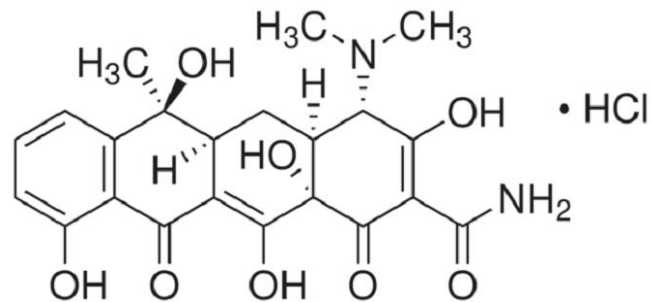


Figura 2.3. Estrutura química do cloridrato de tetraciclina

As tetraciclina atuam pela inibição da síntese proteica, bloqueando a ligação do aminoacil tRNA ao complexo ribossômico mRNA. Esta ligação reversível ocorre principalmente na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis, impedindo a replicação e levando a morte celular (RANG & DALE, 2007).

Tais fármacos também possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, uma vez que reduzem a atividade fagocitária dos leucócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos. Apresentam, ainda, ação anti-colagenase e anti-lipase, favorecendo o reparo do tecido conjuntivo, que é clinicamente traduzido pelo aumento da resistência à sondagem, inibição de reabsorção de osso e uma habilidade para promover a adsorção de fibroblastos e tecido conectivo em superfícies radiculares. Desta forma, a

tetraciclina apresenta propriedades farmacológicas e biológicas favoráveis para a reconstrução óssea (DELAISSÉ et al., 2000; PATARO et al., 2003).

A absorção ocorre por via oral, variando entre 75 e 77% da dose ingerida e, sua distribuição ocorre facilmente pela maioria dos líquidos do organismo, inclusive bile e líquidos sinovial, ascítico e pleural. Apresenta, ainda, tendência a localizar-se nos ossos, fígado, baço, tumores e dentes (MOREJON et al., 2003).

A meia-vida normal da tetraciclina é de 6 a 11 horas, sendo que as concentrações terapêuticas, que consistem nas concentrações entre as geradoras de efeito mínimo eficaz (limite mínimo) e efeito máximo tolerado (efeito tóxico), podem ser alcançadas após 2 a 3 dias. Sua excreção ocorre de forma inalterada e se faz primordialmente pela urina, razão pela qual se recomenda atenção ao estado da função renal do paciente. A eliminação também pode ocorrer por via fecal e pelo leite materno (WANNMACHER, 1999; MOREJON et al., 2003). As tetraciclinas apresentam sensibilidade à luz solar (RANG; DALE, 2007).

Adicionalmente, a tetraciclina pode servir como marcador para microscopia. A tetraciclina se deposita com grande afinidade sobre a matriz óssea recém-formada e por ser fluorescente, possibilita a realização de uma técnica para avaliar a velocidade de formação óssea, um parâmetro importante para o estudo do crescimento ósseo e para diagnóstico de certas doenças neste tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; PAUTKE et al., 2010).

Em um estudo realizado por Köse et al. (2003), detectaram a mineralização produzida por osteoblastos através de imagens produzidas por microscopia confocal. As partes mineralizadas da matriz óssea foram fluorescentemente identificadas pela incubação de uma cultura de osteoblastos por 24 horas em uma solução de 3 mg/ml de tetraciclina (KÖSE et al., 2003).

A união da tetraciclina com o cálcio encontrado no tecido ósseo parece ser reversível, ou seja, ela tem a capacidade de ser liberada lentamente, exercendo sua atividade antimicrobiana (HORBYLON, 2008). Em um estudo realizado por Pataro et al. (2003), onde se avaliou a atividade biológica de compósitos de polímeros biodegradáveis em uma matriz de biocerâmica com adição de tetraciclina foi constatado que a adição de tetraciclina influenciou favoravelmente a resposta biológica dos materiais.

O aprisionamento de fármacos em matrizes biodegradáveis são sistemas comuns de liberação controlada. A dissolução da matriz é afetada por hidrólise ou ação enzimática. Se apenas a biodegradação da matriz dirigir a liberação do fármaco, uma taxa constante de liberação pode ser obtida, de modo que a área superficial do dispositivo mantenha-se constante. Contudo, esse fato dificilmente ocorre. Na realidade, se o fármaco for hidrofílico

pode difundir através da matriz, por apresentar grande força de difusão (WONG; MOONEY, 1997), o que poderia ocorrer com a tetraciclina.

Dentre os antibióticos mais comumente utilizados na engenharia de tecidos ósseos destacam-se as tetraciclinas. De fato, a tetraciclina é uma importante ferramenta para a análise histológica para avaliar a remodelação óssea *in vivo*, pois são os únicos fluorocromos aprovados para aplicação em seres humanos (PAUTKE et al., 2010; PARFITT et al., 2000; ARLOT et al., 2005; TERRA et al., 2007). Diante do exposto, releva-se a importância de se estudar o comportamento de dissolução do fármaco que será incorporado na matriz biodegradável implantada para regeneração do tecido.

2.6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA EM MATRIZES POLIMÉRICAS: INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO.

Segundo Kim et al (2003), os Sistema de Liberação de Fármaco (SLF) ou *Drug Delivery System* (DDS) tem sido desenvolvido para aumentar o crescimento e a regeneração no tratamento de defeito ósseo. A limitada circulação sanguínea neste tecido reduz a eficácia terapêutica do fármaco administradas no modo convencional. A eficiência dos sistemas para terapias antimicrobianas é limitada pela pobre acumulação do fármaco no osso, uma limitada resposta imunológica local, variações na taxa do crescimento bacteriano, formação de biofilme e localização intracelular dos patógenos. Desta forma, a implantação de fármacos em biomaterias implantáveis apresenta a vantagem da liberação da droga diretamente no tecido danificado, em altas concentrações, resolvendo, portanto, o problema do reduzido efeito terapêutico da administração convencional (OGAWA; PLEPIS, 2002; PUGA et al., 2012).

Os SLF ou DDS são definidos como, um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos (SWARBRICK, 2007). Deste modo, a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada e alterações cíclicas na concentração são eliminadas.

Os sistemas de liberação controlada são aqueles nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida. Dentre algumas

vantagens deste tipo de sistema, podemos citar, ainda, a aplicação do agente diretamente no sítio de ação, evitando efeitos colaterais sistêmicos, aumentado à relação eficácia/segurança. Podemos também obter altas concentrações localizadas, e oferecer uma menor frequência de administração, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento (BAKER, 1987; OGAWA; PLEPIS, 2002; PUGA et al., 2012).

A fim de ser eficaz como um DDS, o carregador precisa cumprir os requisitos de segurança, boa eficácia, previsível resposta terapêutica e períodos de liberação controlada e prolongada (DI SILVIO; BONFIELD, 1999; TABATA, 2000).

Vários carregadores têm sido desenvolvidos para a encapsulação de fármacos, tais como os polímeros biodegradáveis e as cerâmicas bioativas, na forma de partículas, membranas e matrizes porosas. Entre as cerâmicas a hidroxiapatita tem aumentado o interesse como um carregador na liberação de fármaco devido à osteocondutividade e biocompatibilidade (KIM et al., 2003). Contudo, matrizes compostas apenas por HA, possuem fracas propriedades mecânicas e sofre rápida degradação enzimática, o que limita o seu uso quando se deseja elevadas propriedades mecânicas.

A utilização deste material em compósitos para os sistemas de liberação controlada torna seu uso como biomaterial mais vantajoso. Para avaliar o perfil de liberação do cloridrato de ciprofloxacino foram preparados compósitos de hidroxiapatita: colágeno em diferentes proporções. O colágeno utilizado foi submetido a um tratamento alcalino (24 e 48h) e a melhor proporção HA: colágeno foi de 10:1(m/m). Os experimentos mostraram uma liberação máxima de 90% do fármaco pela matriz e que esta liberação foi controlada pelos poros da matriz observando que após um pico inicial de liberação foi possível atingir um valor constante após 35h de experimento (OGAWA; PLEPIS, 2002).

Considerando que para os DDS, a estrutura dos arcações precisa ser controlada em termos de porosidade e tamanho de poro, e que os fármacos precisam ser aprisionados eficientemente para serem liberados por períodos de tempo prolongado. Uma forma de aperfeiçoar estes requisitos é através do revestimento do arcação poroso com polímeros plásticos, garantido uma melhor eficiência no aprisionamento de fármacos e nas suas propriedades mecânicas (KIM et al. , 2004).

Os polímeros biodegradáveis e bioreabsorvíveis podem contribuir largamente para estas tecnologias. A incorporação de sistemas de liberação em matrizes compostas por estes tipos de polímeros são vantajosa, pois estes materiais podem preencher as vacâncias, atuando como um “scaffold” que guia o reparo tecidual e não precisa ser removido após liberação total

do fármaco, uma vez que degrade com o progresso do tratamento e a regressão da infecção (PUGA et al. , 2012).

Por sofrer biodegradação no fluido fisiológico e possuir características biocompatíveis, o PCL pode constituir um sistema de liberação controlada, uma vez que, pode liberar um composto bioativo de interesse clínico. O objetivo de um sistema de liberação controlada baseado no PCL é manter a concentração do fármaco entre os níveis terapêuticos e plasmáticos por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (KIM et al. , 2003; LORENZETTI et al., 2006)

Em um estudo realizado para analisar a liberação da tetraciclina em um arcabouço ósseo, composto por hidroxiapatita e poli (ϵ -caprolactona) com variação da concentração da razão HA/PCL, constataram que a taxa de dissolução do antibiótico no arcabouço foi bem controlada com as condições do revestimento, e após um pico máximo de liberação em menos de 2 horas, o fármaco foi liberado de forma sustentada e a taxa de liberação foi altamente dependente da dissolução do revestimento (KIM et al., 2004).

Puga et al. (2012) avaliou a liberação do ciprofloxacino de blendas biocompatíveis e biodegradáveis de PCL-poloxamina, variando os tipos de poloxamina. Foi observado que a liberação do ciprofloxacino foi lenta, onde menos de 5% do fármaco foi liberado depois de 56 dias de estudo. A incorporação de poloxamina acelerou a liberação, e os sistemas compostos pela poloxamina hidrofóbica mostrou uma rápida liberação inicial nas primeiras 48h do experimento apresentando, em seguida, uma taxa de liberação decrescente, sendo notavelmente mais lenta do que as outras matrizes. Os sistemas preparados com mais variedade hidrofílico mostrou uma pequena liberação inicial do ciprofloxacino nas primeiras 24 h, e depois manteve a taxa de liberação praticamente constante (< 50% liberada após 3 meses).

Em sistemas biodegradáveis poliméricos, os polímeros podem ser classificados em matriciais e reservatórios. Nos matriciais o fármaco encontra-se disperso na matriz ou adsorvido em sua superfície e é liberado pelos poros da matriz por difusão, por degradação do polímero ou ambos, a taxa de liberação depende da escolha do polímero. Nos polímeros utilizados como reservatórios, o fármaco encontra-se em uma cavidade central envolta por uma membrana polimérica que controla sua taxa de liberação, para esse sistema existem membranas, cápsulas, monocápsulas, lipossomos e fibras ocas (SANTOS, 2010).

Um modelo simples e semi-empírico que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo foi desenvolvido por Korsmeyer e colaboradores (1983) (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002).

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = at^n \quad (1)$$

Onde α é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de transporte que controla a liberação do fármaco, e M_t , representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo e M_{inf} , é a quantidade total de fármaco incorporado no sistema (PEPPAS, 1985; MANADAS, PINA, VEIGA, 2002)

Quando n assume o valor de 0,5 trata-se de difusão Fickiana, quando n assume o valor entre 0,5 e 1,0 indica transporte anômalo, n igual a 1,0 o mecanismo de transporte de Caso-II e para n superior a 1, caracteriza o transporte Super-Caso-II atribuído a associação dos mecanismos de difusão, erosão, relaxamento das cadeias e intumescimento (LLABOT et al., 2004; MANADAS, PINA, VEIGA, 2002; QUEIROZ, GALLARDO, ROMAHN, 2000; Peppas, 1985). A Tabela 2.1 apresenta um resumo dos mecanismos de liberação de fármacos de diferentes geometrias.

Tabela 2.1. Expoente n da Lei das Potências e mecanismos de Liberação de Fármacos de diferentes geometrias (Siepmann e Peppas, 2001; Peppas, 1985).

Expoente de liberação, n			Mecanismo de Liberação
Filme Fino	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Tranporte Anômalo
1,0	0,89	0,95	Transporte Caso II

2.7 BIODEGRADAÇÃO

Um dos principais requisitos para escolha de um biomaterial sintético que será utilizado no reparo ósseo é a biodegradabilidade (RHEE, 2004). Os implantes que atuam como prótese permanente ou no processo de regeneração celular precisam dar espaço ao novo tecido que será regenerado, desta forma, ele precisa degradar no meio (DA SILVA, 2012).

A biodegradabilidade consiste no fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio a qual foi implantado. O ideal é que o tempo de degradação do material permita a ocorrência do processo de regeneração ou cura

do sítio comprometido e que seu processo de degradação gere produtos atóxicos que sejam facilmente metabolizados e liberados do corpo (OLIVEIRA, 2010).

Outro fator a ser considerado são as propriedades mecânicas da área implantada, estas devem ser mantidas, ou seja, a degradação do material deve ocorrer em um ritmo no qual seja possível que a regeneração óssea possa formar um tecido com as propriedades mecânicas mais próximas do tecido original. Qualquer variação dessas propriedades resultantes da degradação *in vivo* do material deve ser compatível ao processo de restabelecimento do sítio de implantação (OLIVEIRA, 2010; RHEE, 2004).

Atualmente, tem sido relatado que a degradação de poliésteres alifáticos pode ocorrer via três mecanismos: hidrólise química, por agentes biológicos (enzimas) e degradação térmica. A degradação hidrolítica de poliésteres semicristalinos ocorre em dois estágios (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). O primeiro estágio inicia com a difusão de água para dentro do arcação nas regiões amorfas que são menos organizadas e permitem a difusão de água de forma mais fácil. O segundo estágio começa quando a maioria das regiões amorfas está degradada e o ataque hidrolítico procede da borda para o centro dos domínios cristalinos.

A fragmentação interna produz frações com comprimentos dependentes do peso molecular inicial do polímero. A perda de peso, a partir da formulação, inicia quando o comprimento dos fragmentos de PCL produzidos torna-se pequeno o suficiente para ser difundido através da matriz polimérica para o meio. Este processo de perda de massa inicia-se num estágio mais tarde (4-6 meses), da degradação do PCL (DASH; KONKIMALLA, 2012).

O PCL está sujeito à biodegradação devido à susceptibilidade de suas ligações éster alifático à hidrólise. Os produtos gerados são metabolizados através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) ou eliminados diretamente pela secreção renal (MATSUI, 2007).

Tem sido relatado que a biodegradação de formulação polimérica é dependente da natureza da estrutura polimérica, da hidrofobicidade, cristalinidade, tamanho da cadeia, presença ou ausência de enzima e dos parâmetros do produto, tais como, tamanho de partícula, área superficial, porosidade, processo de fabricação e a geometria (DASH; KONKIMALLA, 2012).

2.8 INTUMESCIMENTO

O intumescimento é descrito como o aumento no volume do polímero quando este está imerso em um determinado solvente (MEI et al. ,1995). Os mecanismos de intumescimento de polímeros são dependentes da difusão do solvente penetrante e da estabilidade polimérica

(ANGELIS et al. , 2001). Assim, o intumescimento é dependente do grau de interação entre as moléculas de solvente e do polímero (FLORY; REHNER, 1943).

A capacidade de intumescimento do polímero, ou seja, capacidade de absorver líquido aquoso e intumescer-se é de extrema importância, pois essa característica poderá afetar tanto suas propriedades de adesão como de controle de liberação do fármaco. Esta característica pode ser avaliada através do ensaio do índice de intumescimento (PERIOLI et al., 2004).

A hidratação da matriz pode alterar a taxa de liberação da droga, pois a área superficial da matriz fica maior. Consequentemente, matrizes com diferentes taxas de hidratação podem apresentar diferentes cinéticas de liberação da droga (OGAWA; PLEPIS, 2002).

Os estudos que avaliam a liberação de fármacos dos sistemas controlados, geralmente determinam a quantidade de água absorvida pelo dispositivo. O estudo de intumescimento é um importante parâmetro para prever a difusão da droga a partir da matriz.

No estudo realizado por Ogawa e Plepis (2002) para avaliar a liberação do ciprofloxacino em compósitos Hidroxiapatita: colágeno, pode-se notar que a porcentagem de água absorvida em função do tempo de imersão para o compósito HA: colágeno (com tratamento alcalino de 24h) foi praticamente constante após 60 minutos de imersão, mostrando uma absorção, em média, de 183,2% de água, em relação à sua massa seca. O compósito HA: colágeno (com tratamento alcalino de 48h) apresentou um comportamento similar, sendo capaz de absorver, em média, 178,5% de água, em relação à sua massa, no mesmo intervalo de tempo. O compósito com tratamento alcalino de 24h apresentou uma porcentagem de liberação do fármaco de 90% e com o tratamento alcalino de 48h foi de 80%, podendo ser observado que o compósito que absorveu mais água apresentou maior porcentagem de liberação, o que nos permite correlacionar ambos os parâmetros.

Sahoo et al. (2010) desenvolveu um pesquisa com intuito de sintetizar e caracterizar uma blenda quitosana-policaprolactona (80:20) misturado com argila organofílica para o controle da liberação de doxiciclina. No estudo de intumescimento, a porcentagem de água absorvida variou de 60 a, aproximadamente, 100%. O aumento foi proporcional à carga de doxiciclina adicionada ao compósito de quitosana/ PCL, e comportamento similar foi encontrado na taxa de liberação do fármaco.

2.9 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Para avaliação de biomateriais, os testes em animais são procedimentos inerentes à estimativa da biocompatibilidade, antes que um novo biomaterial possa ser utilizado

clínicamente. Para avaliação da segurança do material, torna-se necessário a verificação de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos e locais. Os sinais clínicos e os testes laboratoriais, de hematologia e bioquímica sérica, podem ser utilizados para avaliação da toxicidade *in vivo* do material implantado e determinação de sua biocompatibilidade (DA SILVA, 2011).

Segundo Danilchenko et al. (2011), a avaliação pré-clínica nas investigações *in vivo* é necessária para descobrir como as mudanças na estrutura e composição do biomaterial investigado afeta o comportamento dos organismos vivos. Considerando que o polímero em estudo é biorreabsorvível, ou seja, são completamente eliminados pelas rotas metabólicas do organismo, torna-se de fundamental importância avaliar as vias de metabolização do organismo, através dos marcadores bioquímicos, diagnosticando qualquer alteração decorrente da presença desses materiais *in vivo*.

Na análise do processo regenerativo do defeito ósseo, os exames laboratoriais, através da análise de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, bem como, do metabolismo dos arcabouços implantados, tem a capacidade de viabilizar diagnósticos precoces das patologias ósseas ou de qualquer alteração metabólica decorrente do uso dos arcabouços implantados. Com intuito de se analisar a atividade óssea, renal e hepática, alguns parâmetros podem ser estudados, como, respectivamente: fosfatase alcalina, ureia, creatinina, transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP).

2.9.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO TECIDO ÓSSEO

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são definidos como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação depende da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da ação dessas células (VIEIRA, 2007). Os marcadores de formação óssea, são representados principalmente pela fosfatase alcalina óssea e pela osteocalcina, e os de reabsorção óssea, são representados basicamente pelos métodos que avaliam a excreção de fragmentos específicos produzidos pela hidrólise do colágeno tipo 1 (piridinolina, deoxipiridinolina, N-telopeptídeo (NTx), C-telopeptídeo (CTx)).

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta. A forma predominante no soro, em adultos normais origina-se, principalmente, do fígado e esqueleto. Apesar da exata função metabólica da enzima ser desconhecida, parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea (MOTTA, 2003).

A fosfatase alcalina conserva um equilíbrio de atividade que é caracterizado pela homeostase óssea. Nos eventos de anormalidades, como doenças osteometabólicas, bem como, durante o reparo de fraturas estas enzimas encontram-se alteradas, caracterizando um desequilíbrio no metabolismo ósseo (SCHWENGBER, 2009).

Durante a formação óssea, a produção da matriz colágena, pelos osteoblastos, precede a mineralização. Neste processo, ocorre a ativação de várias enzimas, dentre as quais a fosfatase alcalina, que é difundida para corrente sanguínea em grande quantidade permitindo a dosagem de sua atividade (STEIN; LIAN, 1993; SCHWENGBER, 2009).

A fase da produção de matriz colágena coincide com a maior produção de fosfatase alcalina (STEIN; LIAN, 1993). Desta forma, esta enzima é considerada bom indicador do índice de formação do osso, podendo ser utilizada como um marcador periférico do metabolismo deste tecido (SEIBEL, 2006).

2.9.2 MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL

Considerando que a excreção dos produtos da metabolização e da biodegradação dos compostos ocorre, principalmente, pelas vias renais, um dos parâmetros fundamentais para se comprovar a eficácia e segurança de determinados agentes e através da avaliação da função renal.

Nos testes de função renal, pode-se levar em consideração a ureia e a creatinina sérica. Estes são marcadores de possível alteração na taxa de filtração glomerular, servindo como parâmetros de evolução, monitoramento do tratamento e progressão da doença renal (DUNCAN et al., 1994).

A ureia é o produto final do metabolismo proteico e sua excreção ocorre pelas vias renais. Quarenta por cento ou mais é reabsorvido pelos túbulos renais, logo, seus níveis sanguíneos constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001)

A depuração plasmática de creatinina endógena também é usada para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), ou seja, avalia a função renal. (BROWN et al., 1990). A creatinina é formada, no músculo, pela remoção irreversível e não enzimática de água do fosfato de creatina, que é originada do metabolismo de aminoácidos. A dosagem da creatinina é mais indicada para avaliação da função renal, pois a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante e não é reabsorvida nos túbulos renais, como a ureia (STEVEN; SCOTT, 2002).

2.9.3 MARCADORES DA FUNÇÃO HEPÁTICA

As enzimas aspartato aminotransferase (AST), também denominada de transaminase glutâmica-oxalacética (TGO) e alanina aminotransferase (ALT), também denominada transaminase glutâmica-pirúvica (TGP) são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A ALT (TGP) é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST (TGO) estão presentes na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é de origem citoplasmática, ou seja, ALT/TGP, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática. Enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT e demonstrando lesões mais profundas (SCHUMANN et al, 2002; MOTTA, 2003).

O TGP/ALT, também pode ser encontrado, em moderadas quantidade, no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética (SCHUMANN et al, 2002). As atividades mais elevadas de AST (TGO) também são encontradas no miocárdio, fígado, músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos (MOTTA, 2003). Segundo Coles (1986), em pequenos animais, o aumento desta enzima é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, por exemplo, isquemia, congestão, necrose, neoplasia, trauma.

3.0 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos funcionais e a biocompatibilidade da blenda de PCL associado à hidroxiapatita ou à tetraciclina no defeito ósseo da calvária de ratos com a finalidade de se acompanhar o processo de regeneração óssea, bem como, otimização da resposta biológica ao implante no tecido ósseo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a degradação e propriedades mecânicas *in vitro* das blendas de PCL e PCL/HA associados ou não à tetraciclina.
- Estudar o perfil de liberação da tetraciclina das blendas PCL e PCL/HA em função do tempo em condições *in vitro*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das blendas PCL associadas à tetraciclina.
- Investigar a citotoxicidade das blendas PCL, PCL/HA e HA *in vitro* através da viabilidade celular.
- Avaliar o grau de cicatrização do tecido ósseo após implantação das blendas por histologia.
- Avaliar bioquimicamente a atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica no período de reparo ósseo com o uso das blendas e associações.
- Avaliar os parâmetros bioquímicos para verificação de possíveis alterações renal e hepática após implantação dos compósitos de PCL associados ou não à hidroxiapatita e/ou tetraciclina *in vivo*.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DO PCL E PRODUÇÃO DAS BLENDEAS DE PCL

PCL de baixo peso molecular (BPM-PCL) foi sintetizado no laboratório de biomateriais pela técnica de polimerização por abertura do anel do monômero de ϵ -caprolactona. A síntese do polímero foi catalisada usando iodo como já foi descrito por De Queiroz et al., 2002. O peso molecular do polímero produzido avaliado por cromatografia de permeação de gel foi de 20.000 g/mol. Para produzir os arcabouços de PCL, inicialmente produzimos blendas misturando diferentes proporções de PCL de baixo peso molecular (BPM-PCL) e PCL de peso molecular mais elevado (PCL) (comprado da Sigma-Aldrich) da seguinte forma, % PCL/BPM-PCL: (0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 80/100 e 100/0). O peso molecular do PCL comercial utilizado era de 65.000 g/mol. Blendas de PCL/BPM-PCL foram preparadas utilizando clorofórmio como solvente, a temperatura ambiente e com agitação constante. Após a solubilização dos polímeros, a solução foi vertida em placas de petri para evaporação do solvente. Em seguida da redução do volume do solvente, as placas foram colocadas em dessecador sob vácuo por 3 dias e foram feitas medidas para caracterização microestrutura das blendas.

Tabela 4.1. Grupos de Blendas de PCL

Grupos	BPM-PCL %	BPM-PCL (g)	PCL %	PCL (g)
A	100%	2,0000	0	0
B	95%	2,1109	5%	0,1111
C	90%	1,7433	10%	0,1937
D	85%	1,6552	15%	0,2921
E	80%	1,6200	20%	0,4050
F	50%	0,7675	50%	0,7600
G	20%	0,4020	80%	1,6049
H	0	0	100%	2,0180

4.2 CONFECÇÕES DAS PASTILHAS PARA IMPLANTE E ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO

A blenda utilizada no estudo foi obtida a partir da mistura com o PCL de peso molecular mais elevado (PCL) (Sigma-Aldrich) e o PCL de baixo peso molecular (BPM-

PCL) (20.000 g/mol), sintetizado no laboratório de biomateriais da UNIFEI (De Queiroz et al., 2002). Foram preparadas blendas PCL/ BPM-PCL na proporção de 20/80% utilizando clorofórmio como solvente, com agitação constante a temperatura ambiente. Após a solubilização dos polímeros, a solução foi vertida em placa de petri e depois colocada no dessecador à vácuo por três dias, para evaporação do solvente. Para confecção das pastilhas dos outros grupos, foram acrescentados 10% hidroxiapatita (HA) e/ou 10% cloridrato de tetraciclina (TCH).

As pastilhas preparadas para o estudo foram divididas em quatro grupos, que podem ser visualizados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Especificação dos componentes incorporados em cada grupo de pastilha.

Grupos	Componentes
Grupos I	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80%
Grupos II	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL 80% + 10% Hidroxiapatita
Grupos III	PCL-- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80% + 10% Cloridrato de Tetraciclina
Grupos IV	PCL- Sigma-Aldrich / 20% BPM-PCL /80% + 10% Hidroxiapatita + 10% Cloridrato de Tetraciclina

Para os estudos *in vivo* foram confeccionadas, por compressão, pastilhas de 4 mm de diâmetro, com auxílio de um molde e uma prensa hidráulica. Adicionou-se 10 mg de cada blenda no molde e foram exercidas pressões de aproximadamente 400 MPa (massa de 0,56 toneladas) por 1 min.

Para a utilização *in vivo*, as pastilhas, dos quatro grupos de blendas, foram esterilizadas utilizando radiação gama na dose de 25 KGy e taxa de 1,45 KGy/h.

Para o estudo *in vitro* as pastilhas foram confeccionadas com 9 mm de diâmetro e 0,9 mm de espessura, pelo método de compressão, utilizando um molde e uma prensa hidráulica. Adicionou-se no molde aproximadamente 70 mg de cada blenda e foram exercidas pressões de 370 MPa (massa de 2,8 toneladas) por 3 mim.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia de superfície e a microestrutura das amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se microscópio Shimadzu SS550, com tensão de operação em 10-30 keV. As blendas foram recobertas com ouro utilizando o metalizador Sputer Ion Coater (IC-50 Shimadzu) com corrente de 8 mA durante 120-180 s sob vácuo.

4.4 ESTUDO *IN VITRO* DOS PERFIS DE LIBERAÇÃO DE TETRACICLINA DAS BLENDA

Foram utilizados dois grupos de pastilhas, para comparação do comportamento de liberação, o grupo 3 (TCH incorporada a uma blenda de PCl), e o grupo 4 (TCH associada a blenda PCL/HA). Tendo conhecimento que o pH e a temperatura, podem interferir na liberação local dos fármacos e, com o objetivo de simular tais parâmetros no organismo humano, as blendas foram imersos em solução Tampão Fosfato Salino (PBS), com pH=7,4, para se assemelhar ao pH do sangue (pH=7,35), à temperatura constante de 37 °C.

O PBS foi preparada a partir da solução concentrada, composta por 80g de cloreto de sódio (NaCl), 2 g Cloreto de Potássio (KCl), 14,4g de hidrogeno fosfato bisódio (Na₂HPO₄) e 2,4 g dihidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄) em quantidade de água Tipo 1 necessária para se obter um volume final de 1000 ml da solução. Diluiu-se 100 ml da solução PBS concentrada em 800 ml de água Tipo 1, ajustou-se o pH para 7.4 e completou o volume para 1000 ml.

As pastilhas foram introduzidas em tubos de ensaio contendo 5 ml da solução tampão e colocados em estufa a 37 °C durante todo o período experimental (7 dias). As amostras foram coletadas com auxílio de pipetas automáticas inicialmente a cada 1 hora e após o segundo dia a cada 4 horas. Foram retirados 100 µl da solução com tetraciclina e, posteriormente, diluídos em 4900 µl de PBS para medir o valor da absorbância. Após o cálculo da concentração de TCH o calor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição. A absorbância do fármaco foi determinada por espectroscopia UV-visível (Cary 50) usando uma cubeta retangular de 1 cm e comprimento de onda de 276 nm. O volume retirado das soluções foi repostado, a fim de manter os volumes dos tubos constantes, evitando possíveis saturações. Todo ensaio foi realizado em triplicata, sem agitação, com tubos fechados e ao abrigo da luz.

Para deonstração dos resultados foram utilizadas as médias dos resultados para cada grupo de pastilha.

4.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA TETRACICLINA EM SOLUÇÃO PBS

Para se determinar a quantidade de tetraciclina liberada na solução PBS, utilizou-se o espectrofotômetro UV-visível (Cary 50). Para realização das medidas uma amostra da solução é colocada no caminho óptico do aparelho e um feixe de luz ultravioleta e/ou visível, em determinado comprimento de onda (ou uma faixa de comprimentos de ondas), atravessa a solução. O espectrofotômetro determina, então, o quanto de luz foi absorvida pela amostra, ou seja, a absorbância desta.

Como a correlação entre a absorbância e a concentração das soluções de tetraciclina não era conhecida inicialmente, foi necessário determiná-la a partir da construção de uma curva de calibração. Para tanto, foi preparada uma solução com concentração conhecida, na qual foram dissolvidos 0,15 g de tetraciclina em pó em 100 ml de água destilada. Esta foi diluída em diversas concentrações e levadas ao espectrofotômetro com o objetivo de medir suas absorbâncias dentro da validade da lei de Lambert-Beer.

A partir das concentrações das soluções e suas respectivas absorbância tornou possível à construção de uma reta: $y = b + ax$, onde y é a absorbância medida, x a concentração da solução a ser quantificada e a e b os coeficientes angular e linear da reta, respectivamente. Tal reta é conhecida como curva de calibração e a partir desta foi possível quantificar a tetraciclina liberadas no PBS.

4.6 INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento foi medido pela técnica de imersão, segundo procedimento descrito por SAHOO et al. (2010). Foram utilizadas as pastilhas de 9 mm de diâmetro de todos os tipos de grupo. Para o estudo da absorção do solvente, as amostras foram pré-condicionadas a 45°C por 24h e em seguida pesadas em balança analítica, para se determinar o peso das pastilhas secas. Logo após, as amostras foram submersas em 5 ml de PBS a 25°C por 24h. Após períodos de tempo determinado as amostra foram removidas do meio, secas, rapidamente, com papel toalha, para retirar a água superficial, e pesada. O procedimento foi repetido até se obter o peso constante, e após cada pesagem às pastilhas foram colocadas no

mesmo becker com a solução. Os cálculos da porcentagem de intumescimento foram obtidos a partir da equação 2.

$$\% \text{ intumescimento: } \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde, W_1 , peso do compósito depois de inchado, e W_2 , peso do compósito seco.

4.7 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

Foram utilizadas as pastilhas de 9 mm de diâmetro de todos os tipos de grupo. As amostras foram inicialmente pesadas, em balança analítica, em seguida, imersas em tubo de ensaio contendo 5 ml do PBS (pH 7,4) e colocadas em estufa a 37 ° C por um período de 90 dias. Em períodos de tempo pré-determinado 8, 15, 30, 45, 60, 90 dias, as amostras foram retiradas da solução e colocadas num dessecador a vácuo por um período de 24h. As amostras secas foram pesadas para se determinar a taxa de biodegradação. Em seguida, foram colocadas em 5 ml de tampão fresco, permanecendo na estufa até o próximo período de pesagem. Todo procedimento foi realizado em triplicata ao abrigo da luz. E a porcentagem da perda de massa foi calculada conforme a equação 3.

$$\% \text{ perda de massa: } \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

Onde, M_i , é a massa inicial, e M_f , é a massa final.

4.8 CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA

Para a caracterização mecânica utilizou-se o método de compressão, onde as pastilhas foram inseridas no equipamento Metter TMA 40[®]. A cada meio minuto foi aplicada uma carga específica crescente à temperatura de 37°C. A primeira carga foi de 0,05 N, seguida por uma carga de 0,1 N e posteriormente 0,2 N. A espessura inicial (L_0) foi registrada para cada pastilha. Após aplicação de cada carga foi gerada uma deformação. A partir dos dados coletados no ensaio e considerando que a área da seção transversal da ponta de prova é de 0,142657mm², foram calculados o módulo de Young (E) para os diferentes grupos de pastilha, com base na equação 4.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L_0}} \quad (4)$$

Onde, a tensão (σ) é determinada pela força, F , dividida pela área da seção transversal da amostra (A). A deformação (ε) foi obtida pela divisão do alongamento (ΔL) da amostra pelo comprimento inicial, L_0 .

4.9 VIABILIDADE CELULAR

Muitos métodos *in vitro*, são utilizados para avaliar a citotoxicidade de biomateriais, utilizando culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em submeter o biomaterial, direta ou indiretamente, ao contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares como a lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular e outros efeitos causados pelo biomaterial e/ou seus extratos (CORY, 1991; ROGERO et al., 2003). O material comprovadamente citotóxico causa morte celular e o número de células afetadas indica a concentração e potência da substância analisada capazes de matar as células.

O estudo da viabilidade celular após incubação do meio de cultura celular com a blenda produzida com PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80%, PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80% + 10% Hidroxiapatita ou apenas com Hidroxiapatita foi realizado segundo a norma ISO 10.993-5 utilizando-se controle negativo, que não causa resposta citotóxica, sendo utilizado nesse trabalho o polietileno de peso molecular elevado.

O parâmetro mais utilizado para avaliação da toxicidade é a viabilidade celular que utiliza corantes vitais. No presente trabalho, a viabilidade celular após a exposição da linhagem celular as blendas supracitadas, foi mensurada pela incubação com corante vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio) e reagente acoplador de elétrons (PMS - metassulfato de fenazina) na razão 20:1, e incubado por 2 horas. Após o período de incubação, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas. A indução da toxicidade pela amostra avaliada é medida em uma faixa de concentrações específica do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS é considerada tóxica.

4.10 PREPARO DA LINHAGEM CELULAR PARA CULTURA

Nesse trabalho, foram utilizadas células de Ovário de Hamster Chinês (CHO, ATCC) de origem fibroblástica realizada em meio de cultura $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ glicose suplementado com 200 nM metotrexato, $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ de insulina e 10% soro fetal bovino. A cultura celular foi feita em atmosfera de 95% ar e 5% de CO_2 . A temperatura da cultura celular foi mantida em $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para o descongelamento das células foi reservado, dentro da capela de fluxo laminar, 5 mL do meio de cultura apropriado. O *vial* de cultura celular foi retirado do armazenamento em nitrogênio líquido e em seguida adicionado 1 mL do meio de cultura para homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm. Após este procedimento, o meio de cultura foi aspirado e substituído por um novo meio, foi colocado em estufa a 37°C para cultivo e manutenção da cultura celular, em atmosfera com 5% de CO_2 . O passo seguinte ao descongelamento celular é a tripsinização, necessária para a suspensão das células para realização dos ensaios, uma vez que as células estão aderidas as placas. Para tanto, as células em confluência foram lavadas com solução fisiológica e 0,5 % de tripsina. Após 5 minutos de incubação com tripsina, foi adicionado o mesmo volume de meio de cultura com soro fetal bovino e depois 15 mL, com posterior centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Após troca de meio, as células foram homogeneizadas e a quantidade adequada de células foi semeada em novo frasco de cultura celular.

Para a obtenção de uma suspensão celular com $1,2 \times 10^5$ células por mL de meio de cultura, quantidade adequada para o ensaio, foi utilizada a contagem de células em câmara de Neubauer. Os extratos testados (PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80%, PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80% + 10% Hidroxiapatita e apenas Hidroxiapatita) foram preparados a partir de corpos de prova que foram colocados em meio de cultura para obter os extratos de 100% (não diluído), e 50%, 25%, 12,5% e 6,25% sucessivamente. Após este procedimento todas as amostras foram pipetadas ($50 \text{ }\mu\text{L/poço}$) em placa de cultura com 96 poços e mantidas na estufa até a preparação das suspensões celulares. As células foram removidas da garrafa de cultura com tripsina e centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer.

Foram preparadas suspensões celulares em seu meio de cultura, com soro fetal bovino, e essas foram distribuídas ($50 \text{ }\mu\text{L}$) sobre as placas de cultura contendo as amostras. O volume total de cada poço foi de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Uma coluna controle de três poços foi preparada com meio sem células (branco) e apenas meio de cultura, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). As microplacas foram incubadas em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com atmosfera úmida

sob 5 % de CO₂ por 72 horas. Após este período, 20 µL de uma mistura (20:1) de 0,2 % de MTS e 0,09 % PMS em PBS foram adicionadas a todos os poços, retornando as microplacas para a estufa. Procedeu-se em seguida à leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

4.11 TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

As pastilhas utilizadas para avaliar a inibição do crescimento bacteriano foi a pastilha de 4 mm composta pela blenda PCL/tetraciclina (Grupo 3) e a blenda PCL (Grupo 1) como controle negativo. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de difusão do disco em meio sólido (de *Bauer e kirby*). As bactérias *S. aureus* (ATCC-0023), *E. coli* (ATCC-0022), *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis* (ATCC-0128), *E coli* (ATCC-0039) e *P. aeruginosa* foram inoculadas em meio tioglicolato por 24h a 37°C, em seguida replicada no meio biolacim por 24h a 37°C. Após a incubação, uma amostra de cada cultura foi diluída em solução salina (NaCl 0.9%) até atingir turvação correspondente a escala de 0,5 MCFarland, para obter uma densidade de células bacterianas em torno de 10⁸ CFU/ml. Uma alíquota desta suspensão foi semeada na placa de Muller-Hinton, distribuída de forma homogênea. Em cada placa foi colocada os dois tipos de pastilhas, padronizadas para o estudo, e mais um disco de antibiótico, escolhido de acordo com o tipo de bactérias, que foi utilizado para servir com comparação na interpretação dos resultados. A escolha dos antibióticos foi realizada considerando eficácia comprovada e desempenho aceitável em testes *in vitro*. Desta forma, foi padronizado que para as bactéria Gram-positivas seria utilizado os discos com antibiótico vancomicina (VC) e para as Gram-negativas foi utilizado os discos com Imipenem (IPM). Todas as placas foram incubadas a 37° C por 24h. Após a incubação foi observado o crescimento bacteriano e a presença do halo de inibição. O diâmetro dos halos foram medidos, com uma régua, para identificar a sensibilidade das bactéria frente a tetraciclina incorporada nas pastilhas. A Tabela 4.3 identifica os tipos de bactérias e os respectivos antibióticos utilizados para avaliação da inibição.

Tabela 4.3. Tipos de discos de antibióticos utilizados para cada tipo de bactérias.

Bactérias	Antibiótico
<i>S. aureus</i> (ATCC-0023)	Vancomicina (VC)
<i>S. epidermidis</i> (ATCC-0128)	Vancomicina (VC)
<i>P. mirabilis</i>	Imipenem (IPM)
<i>K. pneumoniae</i>	Imipenem (IPM)
<i>E. coli</i> (ATCC-0022)	Imipenem (IPM)
<i>E. coli</i> (ATCC-0039)	Imipenem (IPM)
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem(IPM)

4.12 CIRURGIA E IMPLANTE DOS ARCABOUÇOS NA CALVÁRIA DE RATOS

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos após o parecer de aprovação do comitê de ética de uso animal (CEUA) da FEPI (Centro Universitário de Itajubá) (n°140A/2012).

Os animais utilizados nesta pesquisa constituiu-se de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, classe Mammalia, ordem Roedentia, da linhagem Wistar, machos, adultos, pesando entre 250 e 350g, criados no Biotério da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá - FEPI. Os experimentos com os animais foram realizados em ambiente asséptico. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso a água e ração (Figura 4.1).



Figura 4.1. Acondicionamento dos ratos em gaiola

Os 57 ratos foram distribuídos em cinco grupos de estudo. Um grupo controle, que não sofreu nenhum tipo de procedimento cirúrgico, composto por 16 ratos. Os outros quatro grupos foram divididos de acordo com o tipo de pastilha que seria implantada, cada um composto por seis animais, para os determinados períodos (30 e 60 dias).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no centro cirúrgico do Hospital Veterinário da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (33 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina 6 mg/Kg, pela administração intraperitoneal (i.p.). Em seguida, foi realizada tricotomia da região da cabeça, compreendida entre os pavilhões auriculares externos, seguida da assepsia com PVPI, incluindo a pelagem ao redor (Figura 4.2).

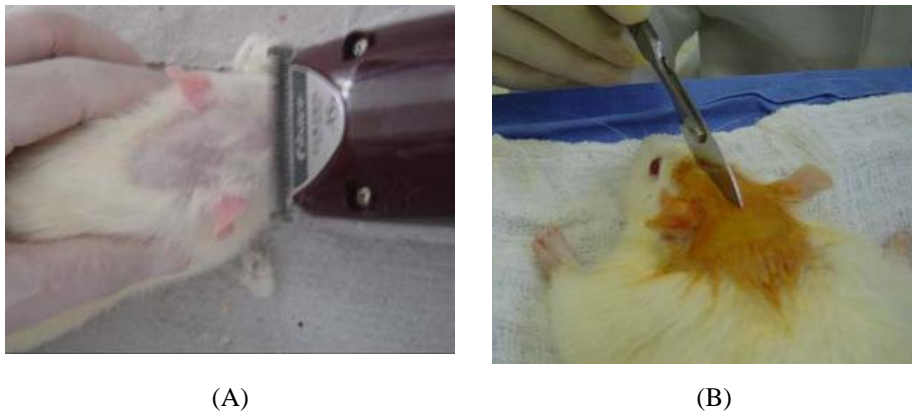


Figura 4.2. (A) Tricotomia da região da cabeça (B) Assepsia da região onde será realizado o procedimento cirúrgico.

Posteriormente, foi colocado sob o corpo do animal, um campo cirúrgico estéril, prevenindo eventuais contaminações. Antes de ser realizada a incisão na pele do rato no local da cirurgia aplicou-se, subcutaneamente, com auxílio de uma seringa de 1 mL, Epinefrina e lidocaína na proporção de 1:9, respectivamente. O uso de vasoconstrictor teve como objetivo reduzir sangramento e facilitar o processo cirúrgico.

A incisão foi realizada na pele da região do osso frontal até o osso occipital de forma linear, com lâmina de bisturi (3,3 cm de extensão). Após este procedimento, com o auxílio do próprio bisturi os tecidos moles da cabeça foram afastados, permitindo a visualização do periósteo que foi incisado e descolado juntamente com os outros tecidos, expondo a face externa da calota craniana (Figura 4.3). Com auxílio de uma seringa foi feita irrigação da região com soro fisiológico a 0,9%, secando-se posteriormente com gaze estéril.

Os locais de confecção das cavidades foram previamente demarcados com o auxílio de um carimbo circular de 4 mm de diâmetro, não envolvendo a sutura sagital mediana. A osteotomia foi realizada com o auxílio de motor elétrico e broca esférica n.º8 em baixa

rotação (com 2 mm de diâmetro), sob irrigação abundante de solução fisiológica. A ostectomia criou um defeito ósseo circular de 4 mm de diâmetro (Figura 4.3).



(A)



(B)

Figura 4.3. (A) Incisão linear através da pele com descolamento do periósteo. (B) Ostectomia produzidas por uma broca.

Foram confeccionada duas cavidades, uma no lado esquerdo e outra no lado direito da sutura sagital mediana, nos ossos parietais. As pastilhas confeccionadas com os polímeros foram colocadas sempre na incisão do lado esquerdo e a incisão do lado direito foi preenchida apenas com coágulo sanguíneo servindo como controle de comparação (Figura 4.4). Foi realizada uma sutura contínua simples para pele com o fio poliamida (mononylon) (Figura 4.4).



(A)



(B)

Figura 4.4. (A) Blenda de PCL/BPM-PCL colocado na falha óssea do lado esquerdo. (B) Sutura no local da cirurgia.

Após o procedimento cirúrgico foram aplicados o analgésico Tramadol 2,5 mg/kg e antibiótico Enrofloxacino 5mg/kg. Os animais foram colocados em ambiente aquecido, no período pós-anestésico, com intuito de manter a temperatura corpórea, evitando hipotermia corporal. A inserção dos arcabouços em forma de pastilhas foi realizada nas seguintes posições, de acordo com a Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Padronização da posição para implante das pastilhas de cada grupo.

Grupos	Cavidade Anterior Esquerda	Cavidade Posterior Direita
Grupos I	PCL - Sigma-Aldrich /20% PCL- BMP/80%	Controle positivo da falha óssea
Grupos II	PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL- BMP/80% + 10% Hidroxiapatita	Controle positivo da falha óssea
Grupos III	PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL- BMP/80% + 10% Cloridrato de Tetraciclina	Controle positivo da falha óssea
Grupos IV	PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL- BMP/80% + + 10% Hidroxiapatita + 10% Cloridrato de Tetraciclina	Controle positivo da falha óssea

4.13 RETIRADA DO TECIDO E SANGUE APÓS IMPLANTE

Para retirada dos tecidos e sangue, os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com o período de permanência do implante do arcabouço nos animais. Nos tempos pré-determinados (30 e 60 dias) os animais foram anestesiados (Cloridrato de Ketamina- 33 mg/Kg e Cloridrato de Xilazina- 6 mg/Kg), pela administração intraperitoneal e eutanasiados por punção intracardíaca com a retirada de sangue. Foi retirado a calvária do rato na porção do tecido ósseo que possuía o local do implante com o biomaterial e o controle com os tecidos ósseos adjacentes.

4.14 PREPARAÇÃO DAS CALVÁRIAS PARA ANÁLISE

Depois de retirada, as amostras ósseas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e desmineralizadas em ácido fórmico 22% a temperatura ambiente. A solução foi trocada, em média, a cada três dias e o ponto de desmineralização

utilizado foi o grau de resistência a instrumentos perfuro-cortante. Uma vez descalcificadas, as amostras foram lavadas em água por 24 h e colocadas em álcool 70%. As amostras foram cortadas com navalha, preservando apenas o local da cirurgia, colocadas no cassete em posições padronizadas e mantidas no álcool 70%. As peças foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para a realização de cortes seriados (7 µm de espessura). Em seguida foram submetidos à coloração pela técnica de hematoxilina e eosina e, após a coloração, os cortes histológicos foram avaliados em microscópio óptico.

4.15 ESCALA HISTOLÓGICA DE CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE CICATRIZAÇÃO.

As amostras foram avaliadas de acordo com escala histológica de classificação do grau de regeneração óssea para determinar o progresso da vascularização à resposta inflamatória, bem como, o grau de incorporação do implante ao osso e a remodelação óssea conforme a Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Escala Histológica de classificação do grau de cicatrização. (Adaptado de Athanasiou et al., 2010)

Incorporação do implante e formação de osso novo	
Material do implante presente sem incorporação e sem formação de novo osso	0
Implante presente, algumas incorporações do implante no novo osso com pequena quantidade de osso novo.	1
Implante presente, algumas incorporações do implante com novo osso com moderada quantidade de osso novo	2
Implante presente, algumas incorporações do implante com novo osso de maneira contínua ao osso do hospedeiro com início de remodelação óssea no novo osso.	3
Redução do implante (em comparação com grau 3), com boa incorporação com implante e ampla quantidade de osso novo	4
Menor quantidade do implante, mas ainda visível (em comparação com o grau 4) com boa incorporação do implante ao osso novo e o osso do hospedeiro com ampla formação de osso novo	5
Difícil diferenciar o implante do osso novo, excelente incorporação e remodelação avançada do novo osso com implante e o osso do hospedeiro.	6
Células inflamatórias	
Sem a presença de células de inflamatórias	2
Poucas células inflamatórias	1
Células inflamatórias presentes	0
Neoangiogênese	
Sem a presença de dois canais vasculares	2
Ainda consta a presença de canais vasculares	1
Aumentar do número de canais vasculares	0

4.16 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para avaliar a função renal e hepática dos animais de experimentação que receberam o implante de biomateriais, foram realizados ensaios bioquímicos para a dosagem plasmática de alguns marcadores de função hepática [(Transaminase Glutâmica Oxalacética TGO/AST e Transaminase Glutâmica Piruvica TGP/ALT)] e renal [(Uréia e Creatinina sérica)]. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e foram centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos para a obtenção do soro (1 mL/rato) que foi armazenado em tubos fechados em congelador (-4°C), para as posteriores dosagens laboratoriais. As medidas bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas de Itajubá (LABCLIN).

A) Dosagem de Uréia

A Uréia foi dosada através do método urease. Reagentes utilizados: Tampão de uso, oxidante de uso, urease tamponada, padrão de Uréia 70 mg/dL. Foram usados 3 tubos de ensaio. No primeiro, identificado como BRANCO, foi adicionado 1,0 mL de urease tamponada, no segundo, identificado como TESTE, foi adicionado 0,01 mL da amostra a ser testada e 1,0 mL de urease tamponada, e por fim no terceiro tudo, identificado como PADRÃO, foi adicionado 0,01 mL de padrão e 1,0 mL de urease tamponada. Após a homogeneização as preparações foram levadas à estufa durante 5 minutos. Passado esse tempo foram adicionados a cada tubo 1,0 mL de oxidante de uso, após nova homogeneização os tubos foram levados à estufa por mais 5 minutos. Após este período foi realizada a leitura com o comprimento de onda de 600 nm do teste e do padrão zerando o espectrofotômetro com o BRANCO. Os valores em mg/dL de uréia foram encontrados dividindo o valor da absorbância encontrada para o teste pela absorbância do padrão, e multiplicando essa razão pelo valor da concentração do padrão, nesse caso 70 mg/dL. Essa reação é linear até valores de 300 mg/dL, caso a leitura seja maior, é necessário diluir a amostra e depois multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

B) Creatinina Sérica

A creatinina sérica foi dosada através do método fotolorimétrico, baseado na reação da creatinina com a solução de picrato em meio alcalino. Reagentes utilizados: ácido pícrico, solução tampão, padrão de creatinina 4,0 mg/dL, acidificante. A curva padrão foi obtida a partir de três diferentes concentrações de creatinina (1,0, 2,0 e 4,0 mg/dL). A curva padrão foi

realizada em todos os ensaios para a determinação do fator de correção, o que permitirá a transformação das leituras de absorbância para concentrações em mg/dL para cada ensaio. Em cada ensaio foram preparados 5 tubos de ensaio. No primeiro identificado como BRANCO foram adicionados 2,0 mL de tampão, 0,25 mL de água e 0,5 mL de ácido pícrico. No segundo tudo identificado como PADRÃO 1,0 foram adicionados 2,0 mL de tampão, 0,250 mL da solução de creatinina a 1,0 mg/dL e 0,5 mL de ácido pícrico. No terceiro tubo identificado como PADRÃO 2,0 foram adicionados 2,0 mL de tampão, 0,250 mL da solução de creatinina a 2,0 mg/dL e 0,5 mL de ácido pícrico. No quarto tubo identificado como PADRÃO 4,0 foram adicionados 2,0 mL de tampão, 0,250 mL do padrão 4,0 mg/dL de creatinina e 0,5 mL de ácido pícrico. No quinto tubo identificado com TESTE foram adicionados 2,0 mL de tampão, 0,250 mL da amostra e 0,5 mL de ácido pícrico. Após essa preparação os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas em 510 nm, acertando o zero do espectrofotômetro com o branco do ensaio. Essa primeira leitura de absorbância correspondeu à absorbância total e foi denominada A1. Após a leitura do branco, padrões e amostras, foram adicionados aos tubos 100 µL do acidificante, a fim de se detectar a presença de interferentes. Após 5 minutos foi realizada uma nova leitura da absorbância em 510 nm, acertando o zero do espectrofotômetro com o branco do ensaio. Essa segunda leitura correspondeu à A2. A determinação da creatinina sérica em mg/dL foi dada pela subtração da A1 pela A2. O resultado foi multiplicado pelo fator obtido da curva de calibração.

C) Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO/AST) e Transaminase Glutâmica Piruvica (TGP/ALT)

As transaminases (TGO e TGP) foram dosadas através do método colorimétrico (Reitman-Frankel). O método de Reitman-Frankel para a dosagem das transaminases não obedece a Lei de Lambert-Beer, isto é, as Unidades RF de TGO/mL não são diretamente proporcionais à atividade enzimática. Portanto, não é possível usar o método do fator para cálculo das unidades, sendo obrigatória a preparação da curva de calibração.

Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO/AST)

Reagentes utilizados: padrão de TGO, TGO – substrato, reagente de cor, solução estoque de NaOH. Para a realização do teste, identificou-se um tubo onde foi colocado 0,250 mL de TGO – Substrato que foi incubado em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Decorrido o

tempo, adicionou-se 0,100 mL do soro, realizando uma mistura e colocando-o novamente em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 0,250 mL do reagente de cor, misturando toda a amostra e deixando por 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, 2,5 mL de NaOH de uso foi colocado no tubo. Realizou-se a homogeneização, esperando 5 minutos à temperatura ambiente. A partir daí, foram feitas as leituras fotométricas em 505 nm, acertando o zero com água destilada. O valor da TGO foi obtido plotando o valor de absorbância encontrado para o teste, na curva padrão previamente encontrada.

Transaminase Glutâmica Piruvica (TGP/ALT)

Reagentes utilizados: padrão de TGP, TGP – substrato, reagente de cor, solução estoque de NaOH. Para a realização do teste, identificou-se um tubo no qual foi colocado 0,250 mL de TGP - Substrato que foi incubado em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Nesse tubo, foi adicionado 0,050 mL do soro, realizando uma mistura e colocando novamente em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,250 mL do reagente de cor, misturando toda a amostra e deixando por 20 minutos à temperatura ambiente. Por fim, 2,5 mL de NaOH de uso foi colocado no tubo. Realizou-se a homogeneização, esperando 5 minutos à temperatura ambiente. A partir daí, foram feitas as leituras fotométricas em 505 nm, acertando o zero com água destilada. O valor da TGP foi obtido plotando o valor de absorbância encontrado para o teste, na curva padrão previamente encontrada.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

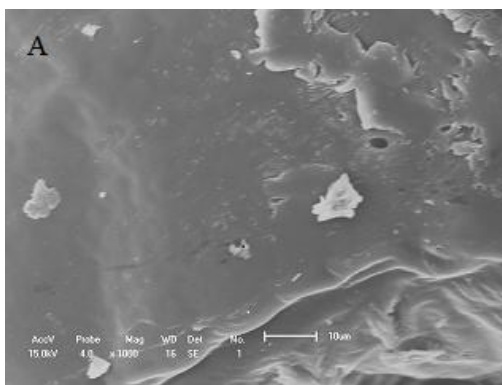
Para análise dos resultados bioquímicos, intumescimento e degradação, foi utilizada a técnica estatística de Análise de Variância (ANOVA) de uma via quando avaliarmos somente uma variável e onde se tem mais de uma variável foi utilizada ANOVA fatorial. As diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism version 4.0. Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata e os *in vivo* foram realizados com seis animais para cada grupo.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

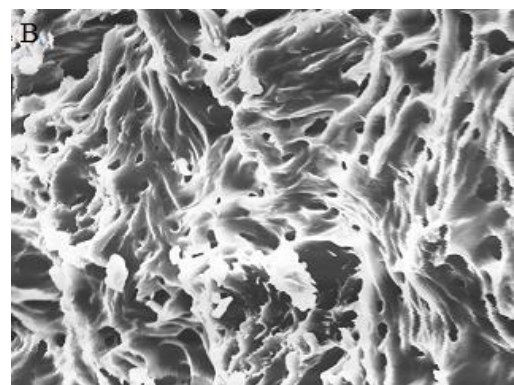
5.1 ESCOLHA DA BLENDAS PARA A PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS PARA OS TESTES *IN VIVO* E *IN VITRO*.

As blendas produzidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para a avaliação da existência de poros nas amostras. As blendas com maiores quantidades de poros são PCL/BPM-PCL 20/80 e 50/50, entretanto não foram encontrados poros nos filmes de polímeros 100% PCL e 100% BPM-PCL (Fig.5.1).

Qualquer material considerado ideal para utilizado como substituto ósseo deve atender alguns requisitos como, por exemplo, ter uma porosidade que permita a osteocondução (DELLOYE et al., 2003). Neste contexto, os arcabouços utilizados para regeneração tecidual são desenvolvidos de forma a possuir muitos poros que permitam a adesão de células, o crescimento celular, formação de tecidos e difusão de nutrientes e metabólitos. Sendo a porosidade importante na engenharia tecidual e avaliando os resultados encontrados com a microscopia eletrônica de varredura podemos concluir que as blendas PCL/BPM-PCL 20/80 e 50/50 são as que apresentam maior quantidade de poros e são as escolhidas para realizar estudo de regeneração óssea *in vivo* em ratos. Para otimizar o desenvolvimento do presente projeto, apenas a blenda PCL/BPM-PCL 20/80 foi selecionada para a produção dos arcabouços para os estudos *in vivo* e *in vitro*.



%PCL/BPM-PCL 0/100 (aumento 1000x)



%PCL/BPM-PCL 5/95 (aumento 1000x)

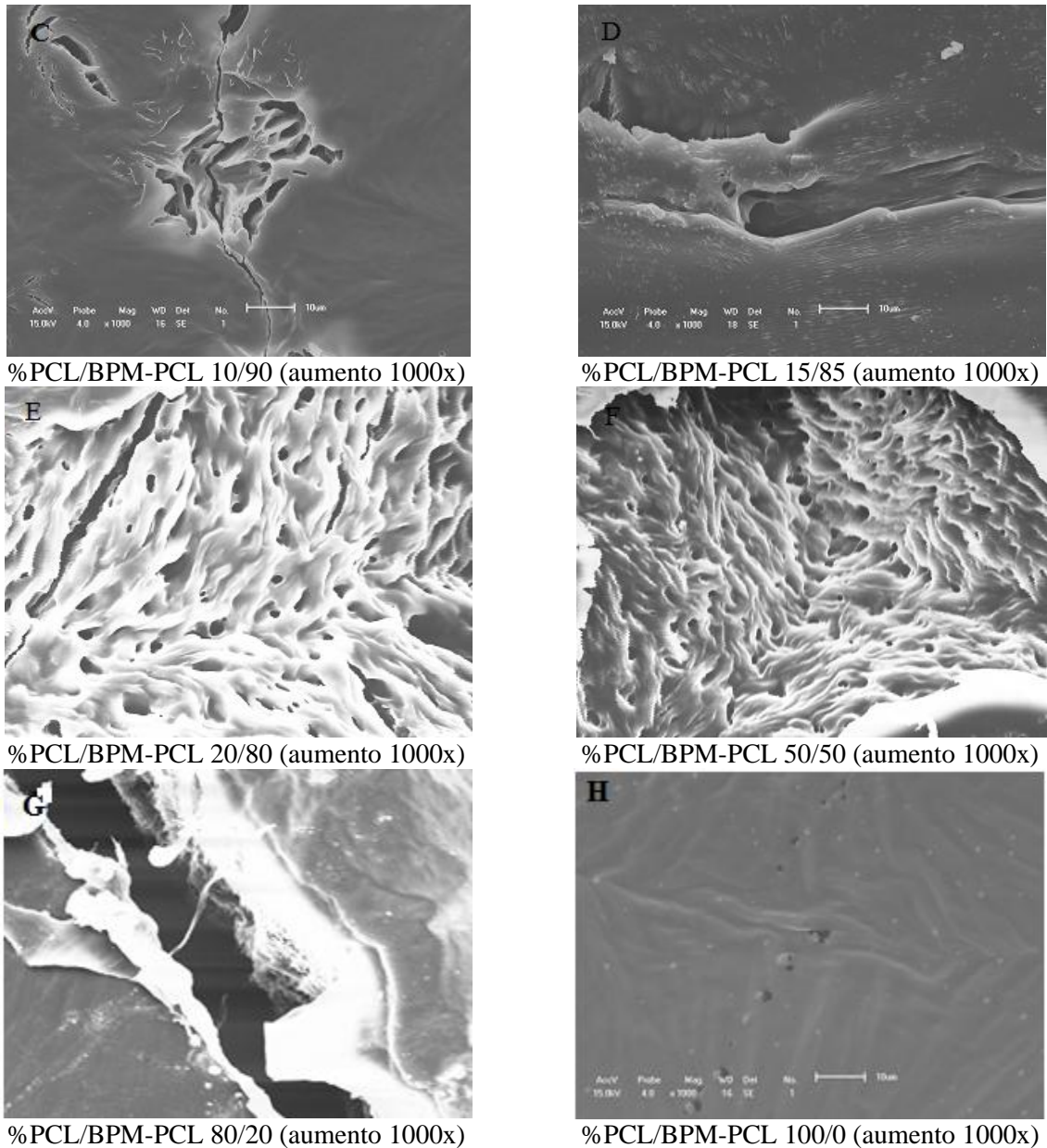


Figura 5.1. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura das blendas formadas com os polímeros PCL/BPM-PCL

5.2 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA TETRACICLINA DOS ARCABOUÇOS

Com a finalidade de se estudar a dissolução da tetraciclina em PBS elaborou-se a curva de calibração da tetraciclina, obtendo os dados da Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores da absorvância para as respectivas concentrações de tetraciclina para construção da curva de calibração.

Concentração (g/L)	Absorvância (276 nm)
0,0056	0,1648
0,0075	0,2443
0,0125	0,3424
0,015	0,4803
0,0225	0,7074
0,03	0,9606

A partir dos dados da Tabela 5.1, obteve-se a curva de calibração que pode ser visualizada no gráfico mostrado na Figura 5.2.

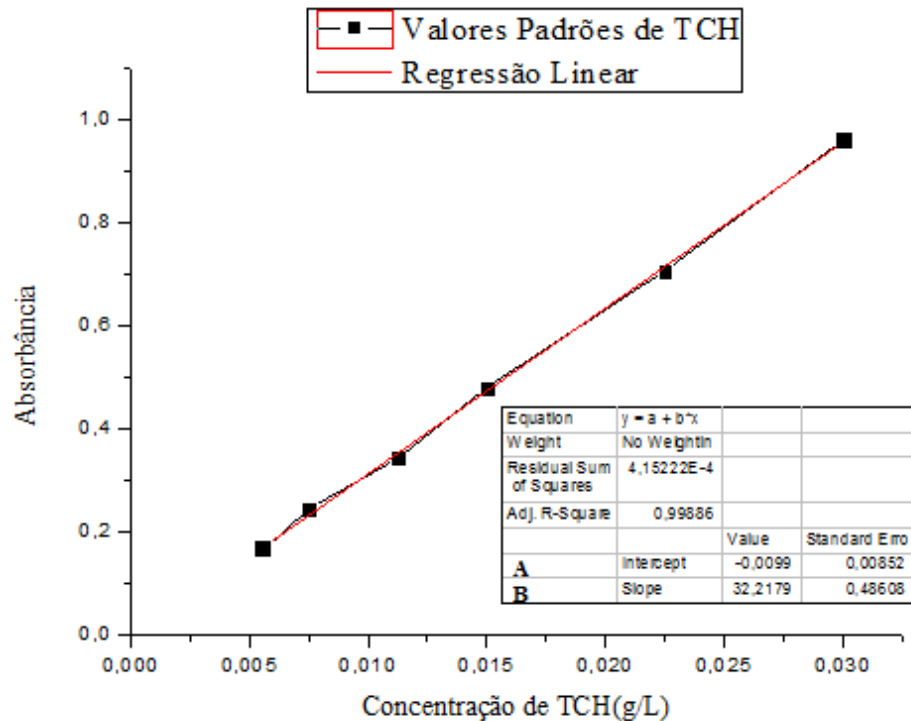


Figura 5.2. Curva de calibração para o ensaio de liberação da tetraciclina.

A partir dos valores padrões de TCH foi realizada a regressão linear, obtendo-se a equação a seguir:

$$A = 32,2179C - 0,0099 \quad (5)$$

Onde, A, representa a absorvância e C, representa a concentração da tetraciclina na pastilha.

As medidas de C foram calculadas usando a absorvância obtida, para cada período, no espectrofotômetro ultravioleta/visível no comprimento de onda de 276 nm. Depois de encontrado o valor de C este foi multiplicado pelo fator de diluição usado no momento da leitura no espectrofotômetro, pelo fator de correção, devido à reposição do tampão no tubo de ensaio onde estavam as pastilhas, e pelo volume da solução com o objetivo de se encontrar a massa de tetraciclina liberada em cada tempo de medida.

A partir dos resultados obtidos, plotamos uma curva de tendência do perfil de liberação da tetraciclina, para as blendas PCL/TCH e PCL/ HA/TCH, que estão representadas nas Figuras 5.3 e 5.4. A curva da Figura 5.3 segue a forma expressa pela Equação 6.

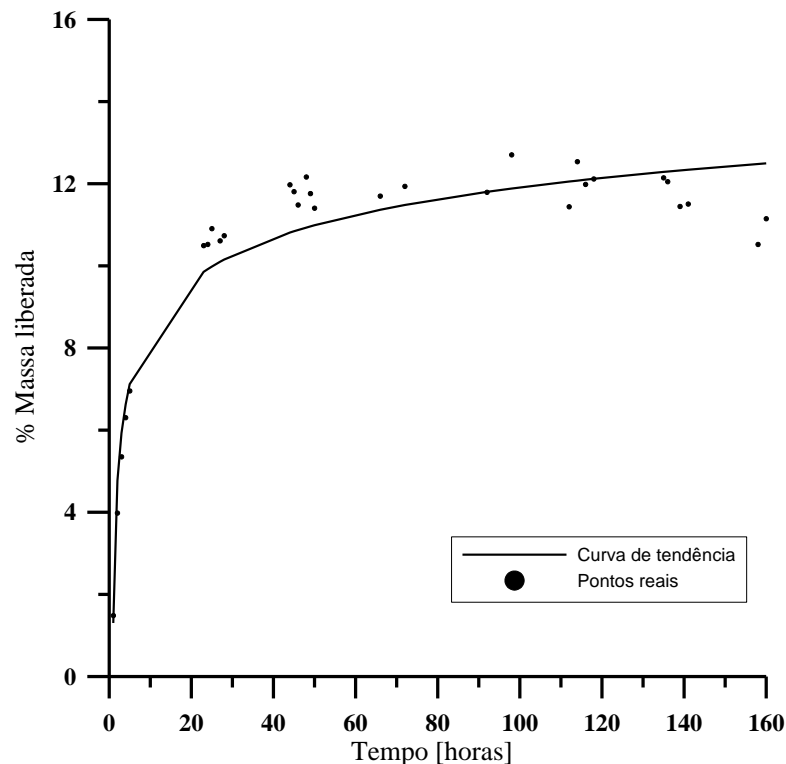


Figura 5.3. Quantidade da droga liberada da blenda PCL/TCH depois do teste de dissolução na solução de PBS a 37°C por um período 7 dias.

$$y = 1.702939654 + 30.42941214 \ln x \quad (r^2 = 0.92) \quad (6)$$

A curva da Figura 5.3 com sua respectiva equação (6) foi fornecida pelo software TableCurveTM. Para a blenda do PCL/TCH, podemos observar que a liberação do fármaco foi muito mais rápida, especialmente num curto período de tempo, onde pode-se observar que em um período de 5h cerca de 7% do fármaco foi liberado atingindo uma liberação máxima em 48h onde, aproximadamente, 12% do fármaco foi liberado. Esta liberação imediata (“burst effect”) pode ser devido à liberação do fármaco livre remanescente na superfície sem o aprisionamento eficiente dentro da camada de revestimento ou por alterações na estrutura do sistema com consequente liberação imediata da TCH. Após este período inicial de rápida liberação, observa-se a liberação mais lenta (KIM et al., 2004; LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Esta maior distribuição próxima à superfície pode estar relacionada com a oposição das polaridades (PUGA et al., 2012), do PCL (hidrofóbico) e tetraciclina (hidrofílica).

A rápida taxa de liberação pode ser benéfica, pois garante uma concentração do antibiótico, mais elevada, logo após a implantação da matriz, onde o risco de infecção é maior. Resultados semelhantes, de rápida liberação inicial, também têm sido relatados em outros estudos que avaliam liberação controlada de antibióticos em matrizes compostas por PCL/HA e em compósitos de hidroxiapatita: colágeno (KIM *et al.*, 2004; OGAWA; PLEPIS, 2002). Após o pico inicial, a droga foi liberada de forma mais sustentada em função do tempo. Para se desenvolver um sistema de liberação de fármacos apropriado, é importante que a droga seja eficientemente aprisionada, no arcabouço, para serem liberadas por um período prolongado. Desta forma, pode-se observar que a blenda de PCL/TCH, após o pico inicial, conseguiu manter a liberação de forma mais constante por um período de até 160 horas.

A curva de tendência do perfil de liberação da tetraciclina, para as blendas PCL/HA/TCH, esta representada na Figura 5.4, segue a forma expressa pela Equação 7.

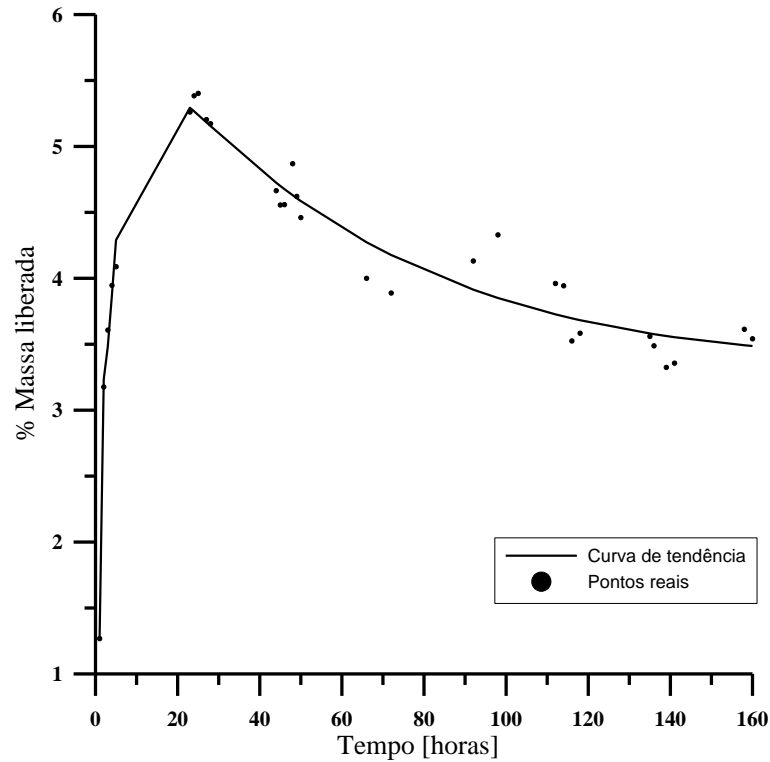


Figura 5.4. Quantidade da droga liberada da blenda PCL/TCH/HA depois do teste de dissolução na solução de PBS a 37°C por um período 7 dias.

$$y=8.588123796 + 0.014597210x - 0.28404827 (\ln x)^2 + -19.2704601/x + 32.43204364e^{-x}$$

$$(r^2=0.96) \quad (7)$$

A curva da Figura 5.4 e sua respectiva equação (7) foi fornecida pelo software TableCurve™.

O teste de dissolução da TCH utilizando como matriz o compósito PCL/HA, demonstrado na Figura 5.4, mostrou um comportamento de liberação distinto, onde pode-se observar que a quantidade de antibiótico liberada foi inferior e a liberação inicial foi rápida nas primeiras horas do experimento, mas em concentração menor, quando comparada com a blenda PCL/TCH, liberando cerca de 4% nas primeiras horas. O pico máximo de liberação aconteceu por volta de 24h de imersão, onde a porcentagem de tetraciclina liberada foi cerca de 5%.

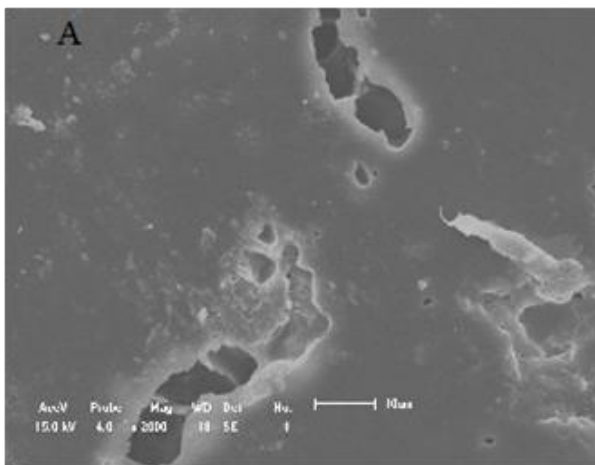
Diante disto, podemos constatar que a incorporação da hidroxiapatita na blenda pode ter provocado uma maior interação entre a matriz e o antibiótico, diminuindo a taxa de liberação. Sugere-se ainda, que a introdução da HA, possa ter preenchido alguns defeitos existentes na estrutura, ou até mesmo, reforçado a conjugação entre os poros, diminuindo a

porosidade do arcabouço 3D dificultando a liberação da TCH. Após o pico inicial, a liberação de tetraciclina foi diminuindo com o tempo, não atingindo uma liberação constante.

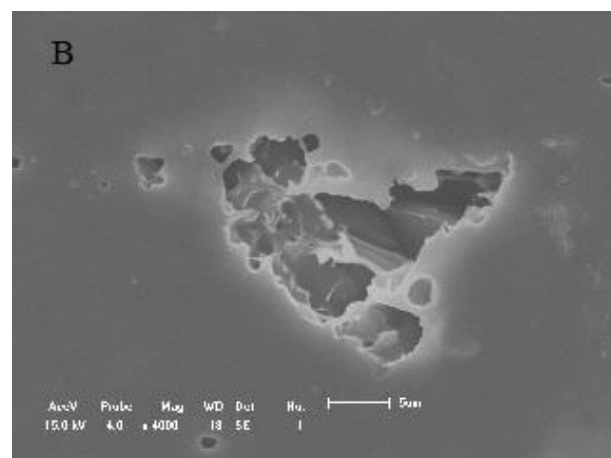
Com o intuito de correlacionar os perfis de liberação da TCH com a estrutura das pastilhas, estas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, antes do ensaio de liberação, para avaliar a microestrutura e a morfologia de superfície dos arcabouços (Figura 5.5).

As pastilhas do grupo PCL/ TCH apresentaram maior quantidade de poros em sua estrutura, quando comparado com as pastilhas do grupo PCL /HA/ TCH, onde foi observado um pequeno número de poros. Os arcabouços do grupo PCL/ TCH/ HA apresentaram apenas camadas e algumas manchas que indicam a presença da hidroxiapatita na estrutura (Figura 5.5). Desta forma, a presença de poros, nas pastilhas do grupo PCL/ TCH, pode estar relacionada à maior liberação do fármaco do arcabouço e a sua adequação como um sistema de liberação controlada, pois a porosidade é um importante parâmetro para a elaboração desses tipos de sistemas.

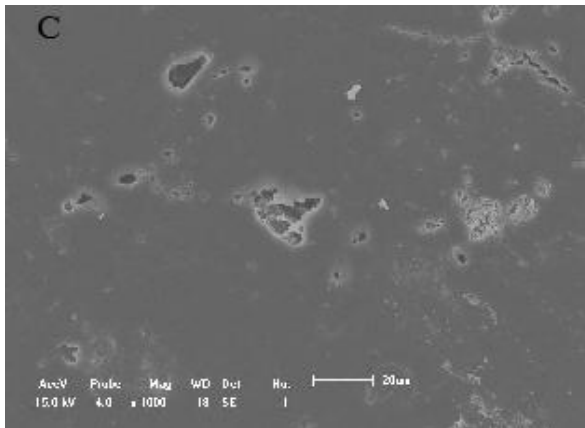
A porosidade presente nas amostras pode ainda auxiliar no processo de regeneração, pois indica caminhos de acesso para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetra pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução (Delloye et al., 2003). O preenchimento dos poros pelo tecido ósseo neoformado pode promover um forte entrelaçamento osso-implante, conferindo um aumento da resistência mecânica do implante. A fração de poros pequenos observada nas micrografias pode interferir de maneira positiva na dinâmica de adsorção celular e resposta celular osteogênica, pois contribui para o efeito de rugosidade superficial.



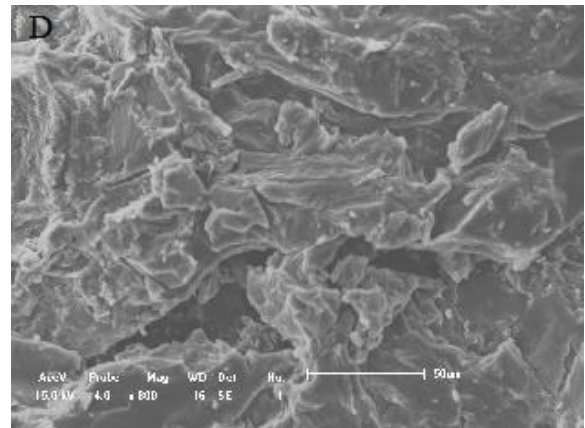
Blenda PCL/ TCH (aumento 1K)



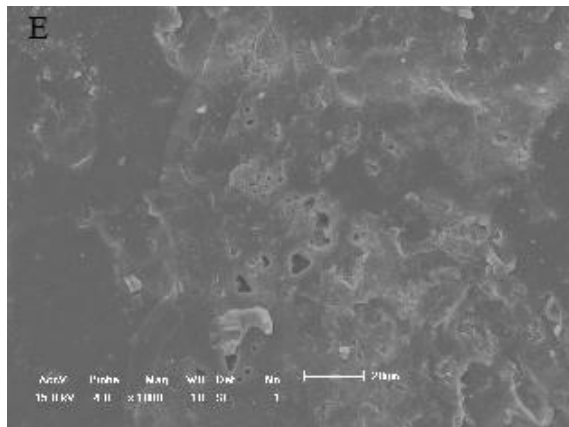
Blenda PCL/ TCH (aumento 2K)



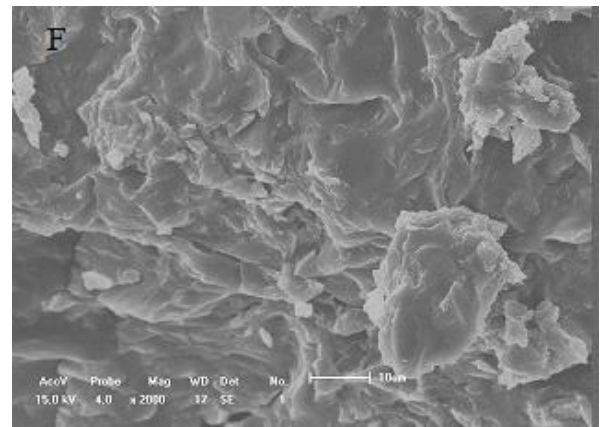
Blenda PCL/ TCH (aumento 500x)



Blenda PCL/ TCH (aumento 400x)



Blenda PCL/ TCH/ HA (aumento 500x)



Blenda PCL/ TCH/ HA (aumento 1K)

Figura 5.5. Micrografias da microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços do Grupo III e IV, formados pela Benda PCL/TCH e PCL/TCH/HA. (A, B, C) pastilha deitada (D) Visualização das camadas. (E) Pastilha deitada (F) Visualização das camadas da pastilha do grupo 4.

Nas matrizes hidrofóbicas o controle da liberação das substâncias ativas ocorre essencialmente por mecanismos de difusão através dos poros ou por erosão, prevalecendo um ou outro mecanismo de acordo com as propriedades do fármaco e do excipiente utilizado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A análise do mecanismo de transporte que controla a liberação de fármaco das matrizes poliméricas é de suma importância para o desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos, possibilitando modulações para um controle mais eficaz de liberação.

A partir da equação semi-empírica observada abaixo, podemos encontrar o expoente de liberação(n) que caracteriza o mecanismo:

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = at^n \quad (1)$$

Linearizando a equação 1, temos que:

$$\text{Log} \frac{M_t}{M_{inf}} = \log a + n \log t \quad (8)$$

O gráfico $\text{Log} \frac{M_t}{M_{inf}}$ versus $\log t$ para o conjugado PCL/ TCH e PCL/ TCH/ HA pode ser visualizado nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente.

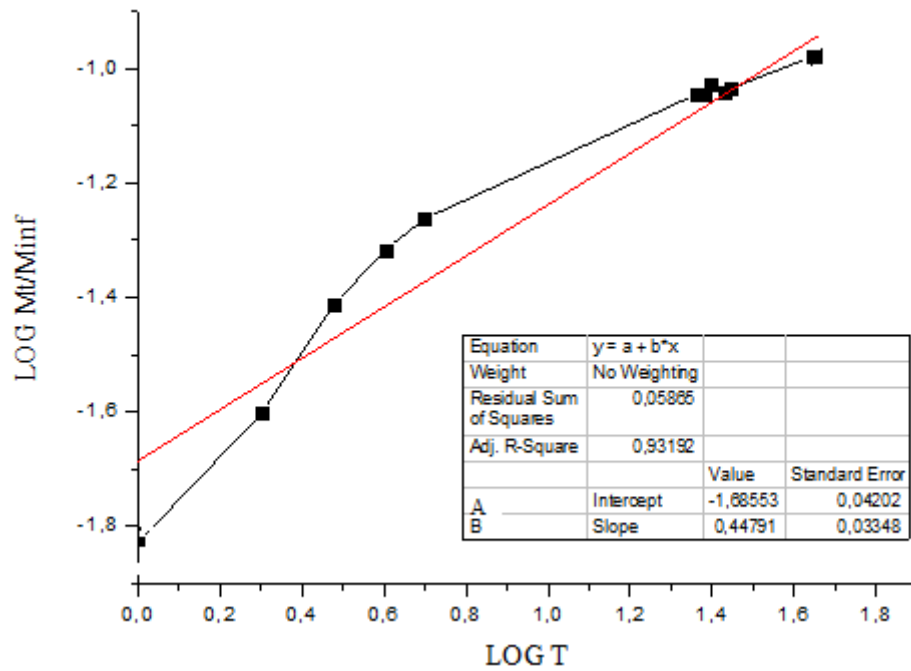


Figura 5.6. $\text{Log}[M_t/M_{inf}]$ versus $\log(t)$ do conjugado PCL/ TCH para interpretação do processo de liberação da TCH.

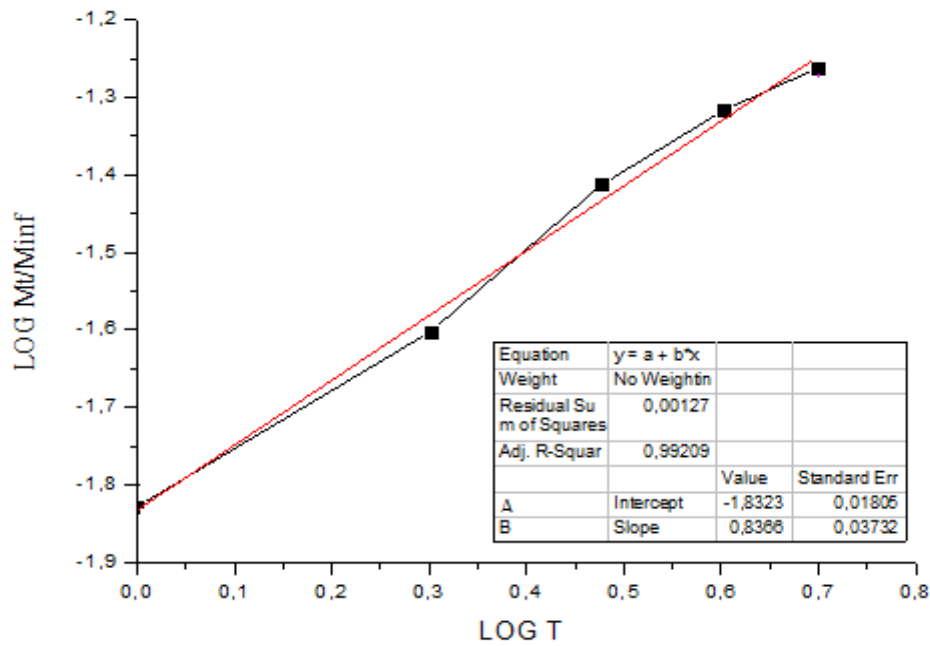


Figura 5.7. $\log[Mt/Minf]$ versus $\log(t)$ do conjugado TCH/ PCL/ HA para interpretação das primeiras 5h do processo de liberação da TCH.

Através da regressão linear da Figura 5.6 e 5.7, e os comparando com a equação 4 observa-se que o expoente de liberação n para os blendas PCL/ TCH e PCL/ TCH são de 0,45 e 0,84 respectivamente. Desta forma, observamos que o mecanismo de transporte para o conjugado PCL/ TCH é do tipo fickiano, ou seja, uma difusão Fickiana clássica (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A Figura 5.6 mostra a cinética de liberação do antibiótico do compósito (PCL/ HA), onde pode ser observada que a quantidade de TCH liberada obedeceu ao modelo da cinética de liberação apenas nas primeiras 5h de experimento, apresentando o expoente de liberação n igual a 0,84. Este dado determina um transporte anômalo, que é caracterizado pela combinação dos mecanismos de difusão e de transporte de Caso II. No mecanismo de transporte do Caso II, trata-se de uma liberação de ordem zero, que é governada pelo fenômeno de intumescimento do polímero, onde ocorre o relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). A erosão se refere ao fenômeno físico de dissolução e difusão das frações de menor peso molecular da matriz polimérica no meio (SUN et al., 2006).

Li et al. (2010), fabricaram implantes cilíndricos de policaprolactona para liberação de Praziquantel. Os autores utilizaram os modelos de Higuchi, Ordem Zero e Peppas para avaliar

o mecanismo de liberação. Todos os implantes obtiveram valor de n próximo de 0,45, indicando mecanismo de difusão Fickiana.

Considerando que o grau de intumescimento, representado na Figura 5.8, das pastilhas em estudo foi mínimo, podemos considerar que o processo de liberação do antibiótico ocorreu predominantemente pelo mecanismo difusão. Este dado confirma o encontrado na literatura, pois, de acordo com Pezzini et al. (2007) para os sistemas hidrofóbicos o processo de liberação do fármaco é predominantemente por difusão.

5.3 ÍNDICE DE INTUMESCIMENTO

A Figura 5.8 determina o grau de intumescimento das pastilhas, na solução PBS, por um período de 48h, onde se observou a máxima absorção do solvente.

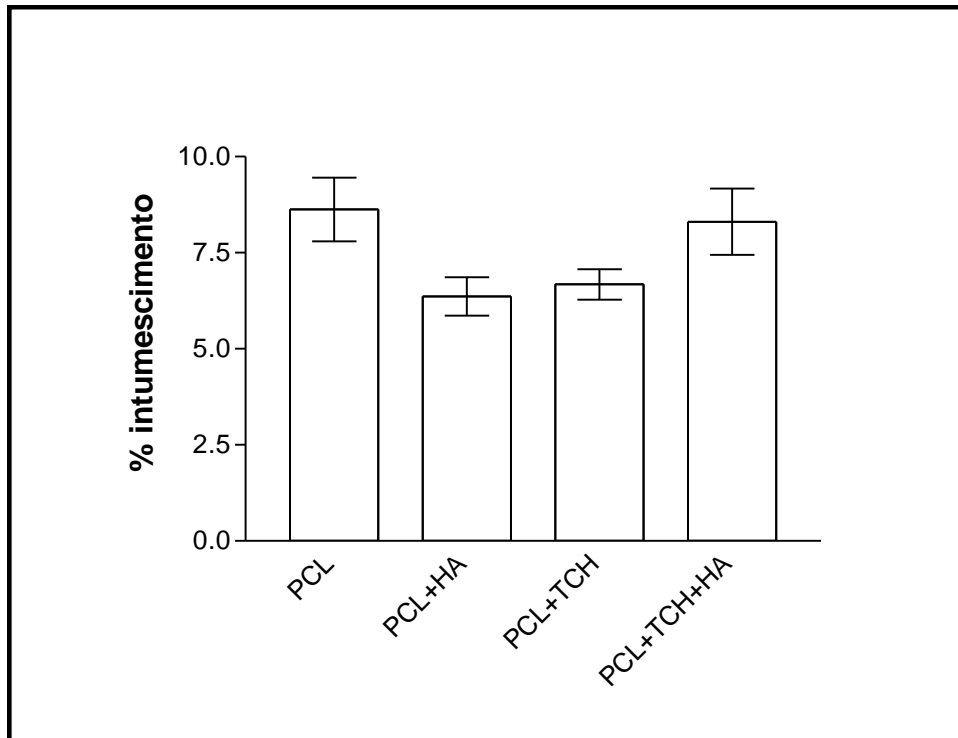


Figura 5.8. Porcentagem do grau de intumescimento para cada tipo de pastilha, por um período de 48h.

Como podem ser observado na Figura 5.8, as pastilhas apresentaram pouca absorção do solvente, não apresentando diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos. Considerando que a habilidade do material para absorver água é uma medida indireta de sua hidrofiliicidade, podemos relacionar os dados encontrados com a predominância do componente hidrofóbico

PCL e/ou a forma da compressão na qual as pastilhas foram confeccionadas. Não houve diferença entre as blendas com relação à quantidade de solvente absorvido ($p > 0,05$).

Resultados de baixa absorção para blendas de PCL também foi encontrado em um estudo realizado por Gorna e Gogolewski (2002) que avaliou a degradação *in vitro* de poliuretanos alifáticos baseado em poli (ϵ -caprolactona) e poli (óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno) com várias hidrofílicidades. Foi demonstrado que os filmes poliméricos mais hidrofóbicos apresentaram um índice de intumescimento 1,2 - 1,6%, com um valor máximo de 3,9% conforme aumentou a hidrofílicidade do material.

Também foi realizado o ensaio de intumescimento com imersão das pastilhas em água destilada e o perfil encontrado foi semelhante para o representado na Figura 5.8 quando foi utilizado PBS para o ensaio.

5.4 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

A degradação *in vitro* causada pela perda de massa das amostras pode ser visualizada na Figura 5.9. A taxa global de perda de massa foi baixa. Entre os grupos, podemos observar uma variação de 5,1% a 14,2% em três meses de experimento. A maior perda de massa foi apresentada pelas blendas que possuíam tetraciclina incorporada em sua estrutura. Considerando que a tetraciclina é hidrofílica podemos relacionar esta maior perda de massa à sua dissolução no meio. No primeiro mês, foi observada uma perda de massa mais acentuada, que pode ser relacionada à rápida dissolução da tetraciclina, seguindo uma perda mais gradual. A porcentagem da massa perdida está totalmente relacionada à quantidade de tetraciclina incorporada no arcabouço, onde apenas 10% da massa total da pastilha são referentes à tetraciclina. Desta forma, podemos observar que os resultados encontrados para a perda de massa dos arcabouços corroboram com o ensaio de liberação da TCH.

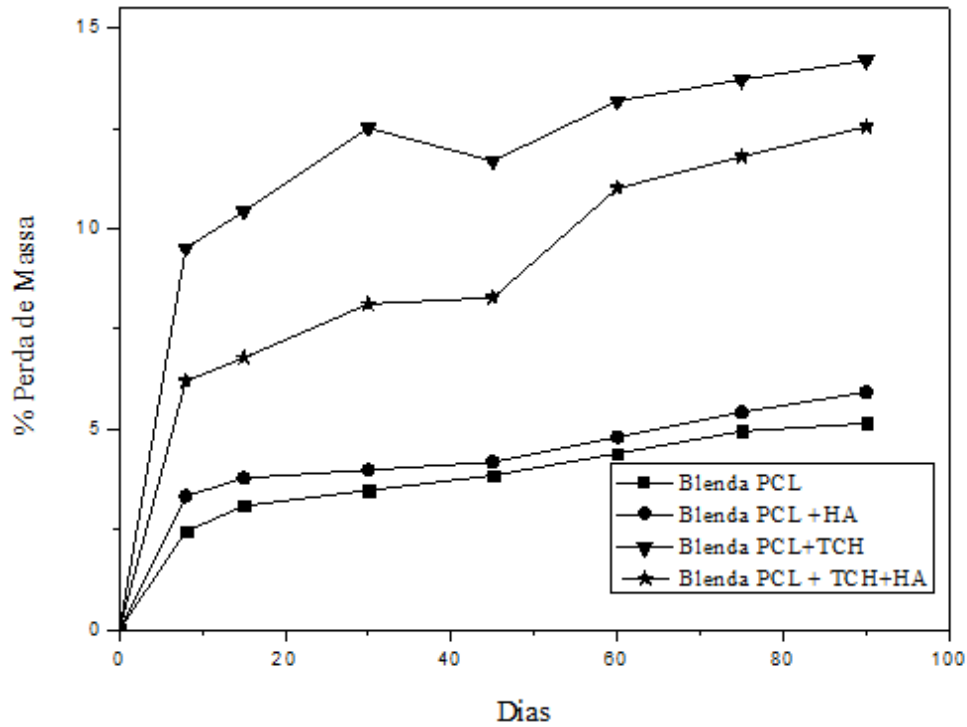


Figura 5.9. Porcentagem da perda de massa das pastilhas por um período de 3 meses em PBS.

As blendas sem tetraciclina apresentaram um valor máximo de 5,9% de perda de massa. Este dado corresponde à prevalência do PCL na blenda. O PCL é conhecido por se degradar muito lentamente em condições fisiológicas, o que é demonstrado por várias pesquisas. Em um estudo realizado para avaliar a degradação *in vitro* de poliuretanos alifáticos foi observado que a perda de massa, após 48 semanas, para os materiais, a base de poli (ϵ -caprolactona) com ou sem poli (óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno) com vários hidrofiliidades, não excedeu 2% (GORNA; GOGOLEWSKI, 2002). A degradação do arcabouço de PCL *in vitro* foi avaliada durante seis meses em solução de PBS apresentando perda de massa gradual de 0,72% (LAM et al., 2008). Após 110 semanas, em meio aquoso simulando os fluidos corporais, a absorção de água, perda de peso e formação de monômero manteve-se em níveis muito baixos (HUANG et al., 2006).

Kim et al. (2204) avaliou as variações de peso dos arcabouços de PCL/ HA, em diferentes concentrações, depois de dissolvido em solução de PBS a 37° C por períodos de 7 dias e observou que as amostras contendo maior quantidade de HA dissolveu mais rapidamente, ou seja, tiveram maior perda de massa.

5.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Para observar as propriedades mecânicas dos arcabouços foram determinados os módulos de Young para cada pastilha, onde uma carga compressiva foi aplicada em cada amostra. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Determinação do módulo de Young para cada grupo de pastilha, pelo método de compressão.

Propriedades Mecânicas	Força (N)	Tensão (MPa)	Deformação	Módulo de Young (MPa)	Média
					Módulo de Young (MPa)
Grupo I	-0,05	0,4	-0,00060	-585,9900	650,1243
	-0,1	0,7	-0,00099	-704,4217	
	-0,2	1,4	-0,00159	-659,9612	
Grupo II	-0,05	0,4	-0,00059	-595,6785	699,8769
	-0,1	0,7	-0,00089	-790,9283	
	-0,2	1,4	-0,00147	-713,0239	
Grupo III	-0,05	0,4	-0,00039	-897,4608	1116,8340
	-0,1	0,7	-0,00053	-1314,7290	
	-0,2	1,4	-0,00092	-1138,3122	
Grupo IV	-0,05	0,4	-0,00043	-810,5933	1169,5415
	-0,1	0,7	-0,00046	-1520,9351	
	-0,2	1,4	-0,00089	-1177,0961	

Os materiais a serem implantados devem possuir resistência mecânica similar ao tecido no qual será implantado o que permite que este material alcance o grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade necessários ao desempenho adequado a sua função, que se baseia em uma osteointegração adequada decorrente de processos bem sucedidos de implantologia e enxertia (GUEDES; SILVA et al., 2008). Com base nas características do tecido duro do osso, uma série de polímeros sintéticos e biodegradáveis têm sido utilizados como materiais para a fabricação de arcabouços devido ao fato desses polímeros possuírem características mecânicas fortes, com resistência a tração e módulo variando de 16 a 50 MPa e de 400 a 3000 MPa, respectivamente (ENGLEBERG; KOHN, 1991).

Desta forma, percebe-se a importância de se analisar a rigidez dos arcabouços a serem utilizados no reparo das fraturas ósseas. Uma forma de determinar este parâmetro é através da determinação do módulo de elasticidade ou Young do material a ser utilizado.

A importância do estudo do módulo de Young é que ele está diretamente relacionado com a rigidez do polímero, ou seja, quanto maior for o valor do módulo maior será a rigidez do polímero (TAVARES, 2011). Sua determinação é realizada através da curva tensão-deformação obtida em ensaios de tração ou compressão.

Para as pastilhas do grupo III e IV encontramos valores de módulo de Young de 1116,8340 (MPa) e 1169,5415 (MPa), respectivamente. No estudo realizado por Sanada (2007) foi avaliada as propriedades mecânicas do osso cortical da calvária de ratos com ensaio de microtração com valor de módulos de Young igual a $1377,792 \pm 208,3316$ MPa para o grupo mineralizado. Podemos observar que o módulo de elasticidade das pastilhas do grupo 3 foi bem próximo do valor encontrado para o osso cortical da calvária, e o valor para o grupo 4 está dentro da faixa de variação permitida. Com bases nestes resultados, e considerando que quanto mais próximo for o módulo de Young do biomaterial a ser implantado com o da área a ser enxerta, melhores são as chances desse material ser utilizado como arcabouço no processo de regeneração, podemos sugerir que estas pastilhas possuem propriedades mecânicas ideais para serem utilizadas para esta finalidade.

A partir da análise por microscopia eletrônica de varredura foi constatado que as pastilhas do grupo IV, quando comparadas ao grupo III, apresentaram pouquíssimos poros em sua estrutura. Segundo Kim, et al. (2004) o fechamento dos poros pode alterar as propriedades mecânicas e em seu estudo foi observado que a redução dos poros nos arcabouços de PCL/HA aumentou tanto a módulo de elasticidade quanto a resistência dos materiais. Desta forma, o aumento do módulo de elasticidade do grupo IV pode estar relacionado com a ausência dos poros na pastilha com a introdução da hidroxiapatita no arcabouço.

A seguir, pode ser visualizado os gráficos tensão x deformação para os quatro grupos de pastilhas, apresentados da Figura 5.10 a 5.13. Para as pastilhas do grupo I, II e III podemos observar que à medida que se aumentou a carga houve um aumento proporcional da deformação. Para as pastilhas do grupo IV não houve diferença significativa da deformação entre a aplicação das cargas de 0,05 e 0,1, sendo observado um aumento da deformação apenas com a aplicação da terceira carga (0,2N).

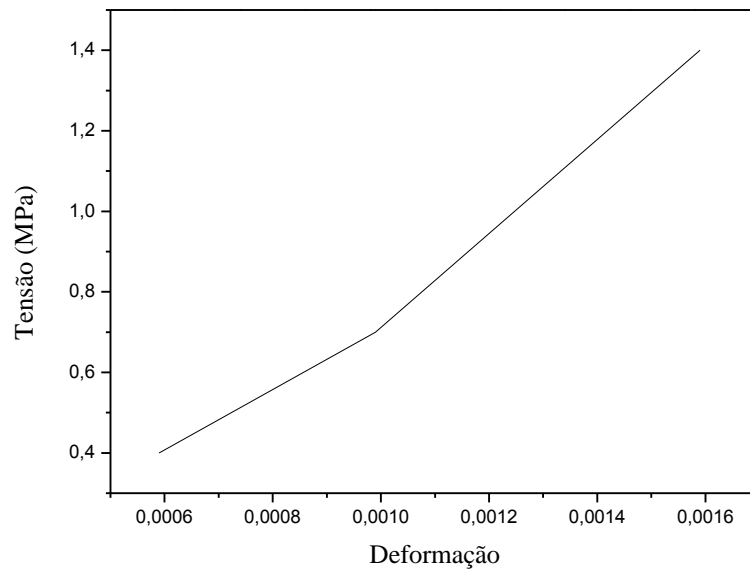


Figura 5.10. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo I, pelo método de compressão.

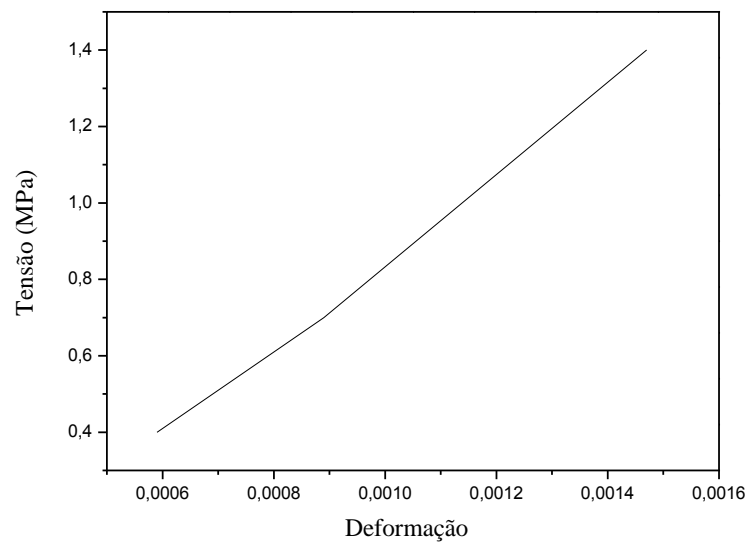


Figura 5.11. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo II, pelo método de compressão.

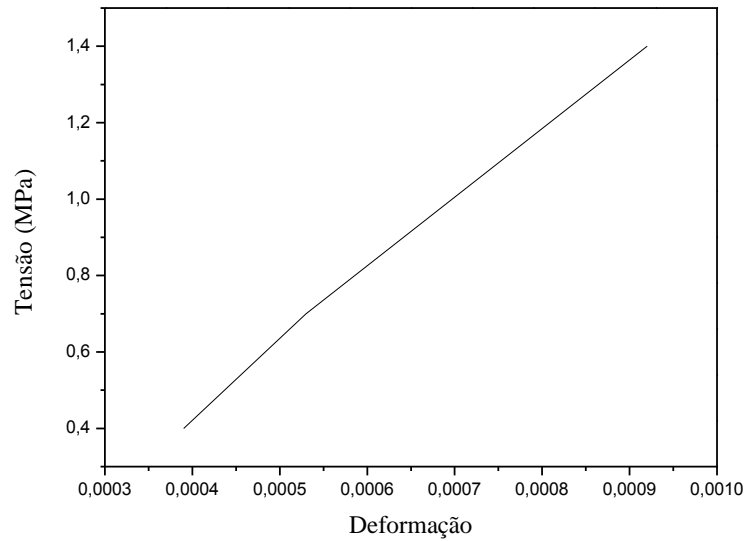


Figura 5.12. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo III, pelo método de compressão.

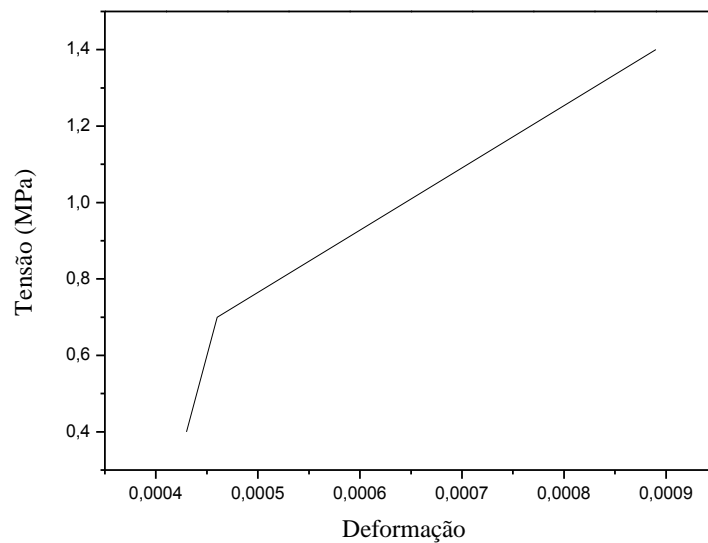


Figura 5.13. Determinação do módulo de Young para as pastilhas do grupo IV, pelo método de compressão.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA TETRACICLINA INCORPORADA NA BLENDAS DE PCL NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO.

Com o aumento do uso de biomateriais implantáveis, aumentaram também, os casos de infecção relacionada a estes dispositivos. A infecção de dispositivos implantáveis necessita comumente, a remoção e substituição a fim de evitar o desenvolvimento de complicações

severas e até mesmo letais, aumentando, para o paciente o desconforto, o custo e a mortalidade (Basso, 2009). A incorporação de antimicrobianos nos arcabouços utilizados para regeneração óssea podem amenizar estes tipos de problemas.

Os resultados referentes à sensibilidade das cepas bacterianas frente à ação da tetraciclina, incorporada no arcabouço, e aos discos de antibióticos podem ser visualizados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana da blenda PCL/TCH, frente a cepas ATCC.

BACTÉRIAS	TAMANHO DO HALO (mm)				
	Blenda PCL/TCH		Antibióticos (VC/IMP)		Blenda PCL
	P1	P2	P1	P2	Controle
<i>S. aureus</i> (ATCC-0023)	26	29	19 (VC)	16 (VC)	0
<i>S. epidermidis</i> (ATCC-0128)	11	11	24 (VC)	25 (VC)	0
<i>P. mirabilis</i>	14	14	28	28	0
<i>K. pneumoniae</i>	25	25	25	25	0
<i>E. coli</i> (ATCC-0039)	29	x	28	30	0
<i>P. aeruginosa</i>	15	15	25	25	0

Observa-se, na Tabela 5.3, que tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas demonstraram sensibilidade à tetraciclina, sendo as mais sensíveis, as *E. coli* (ATCC-0022) e *S. Aureus* (ATCC-0023). Estas apresentaram halos de inibição de crescimento com diâmetros de 28 e 34 mm para *E. coli* e 26 e 29 mm para *S. aureus*.

A *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apresentaram-se como sensível e intermediário, respectivamente, apresentando halos de inibição de 25 mm e 15 mm, respectivamente. Destaca-se por apresentar resistência, o *P. mirabilis* e *S. epidermidis* (ATCC-0128) com halos de 14 mm e 11 mm, respectivamente.

Dentre as bactérias analisadas no estudo, as que estão mais envolvidas com a colonização do osso causando a osteomielite, que consiste na infecção do osso, são a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* (Basso, 2009). Com excessão da *Staphylococcus epidermidis*, que apresenta resistência à

tetraciclina relatada na literatura, todas as demais bactérias apresentam sensibilidade frente à TCH incorporada na pastilha.

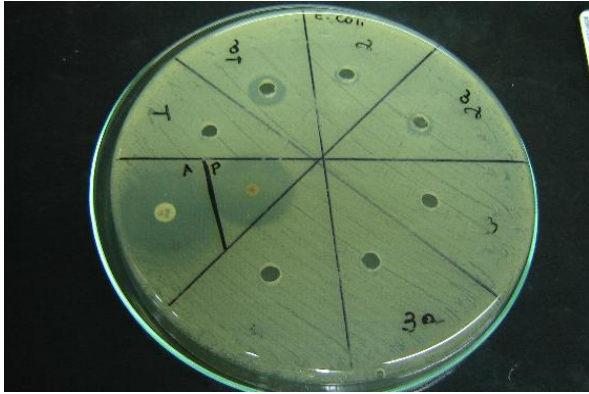
A resistência do *P. mirabilis* a tetraciclina já tem sido relatada na literatura. Em um estudo realizado para avaliar a frequência e a resistência dos principais uropatógenos em pacientes não hospitalizados revelou, a partir da análise do perfil de resistência, que, apesar de menos prevalente, as amostras de *P. mirabilis* (5,51%) demonstraram perfil mais amplo de resistência. Esses microrganismos apresentaram prevalência de resistência > 20%, a cinco dos 15 antimicrobianos avaliados rotineiramente, ampicilina, cefalotina, sulfametoxazol + trimetoprima, tetraciclina e nitrofurantoína. O *P. mirabilis* apresentou uma taxa de prevalência de resistência para a tetraciclina de 95,6% (n=69) (BRAOIOS et al., 2009).

Considerando os resultados acima, podemos estimar que a matriz polimérica permitiu a liberação do antibiótico em uma concentração eficaz para a inibição do crescimento bacteriano. Taxas de liberação muito baixas ou muito lentas poderiam não surtir o efeito terapêutico desejado, Ademais, as baixas taxas de concentração podem provocar resistência das bactérias ao antibiótico incorporado na matriz.

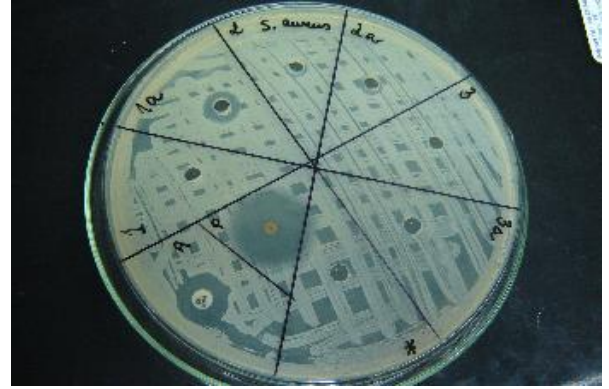
Segundo Dash e Konkimalla (2012), o PCL tem sido amplamente utilizado como carregador de antibiótico para acelerar o crescimento do tecido, a cicatrização ou para prevenir infecções. Sua compatibilidade com uma grande variedade de fármacos permite a distribuição uniforme do fármaco na formulação de matriz e sua lenta degradação facilita a liberação da droga por vários meses.

Puga et al. (2012) estudou a eficácia antimicrobiana da matriz PCL-poloxamina com ciprofloxacino através de um teste microbiológico contra *S. aureus*, a fim de elucidar se a taxa de liberação do fármaco seria adequado para evitar o crescimento bacteriano. Foi constatada uma eficiente erradicação dos microrganismos no meio de cultura após 24 e 48h.

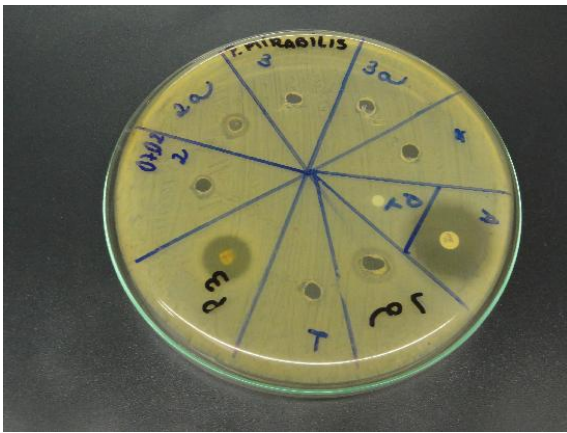
Podemos também observar no estudo, que as bactérias Gram-positivas apresentaram-se sensíveis à vancomicina exibindo halos com diâmetros maiores que 12 mm. E que comportamento similar foi apresentado pelas bactérias Gram-negativas, frente ao imipenem. A representação dos halos de inibição específicos para cada cepa bacteriana, utilizada no estudo, pode ser visualizada na Figura 5.14.



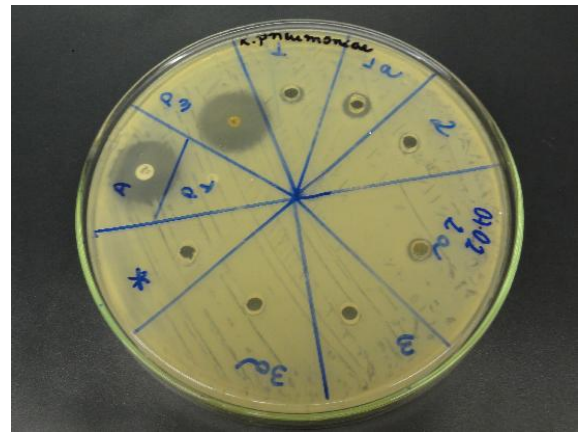
E. coli



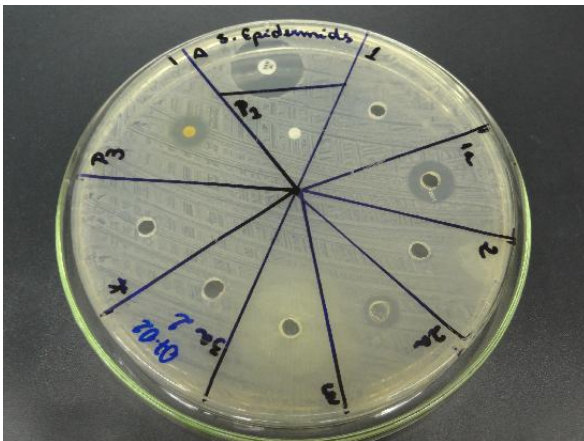
S. aureus



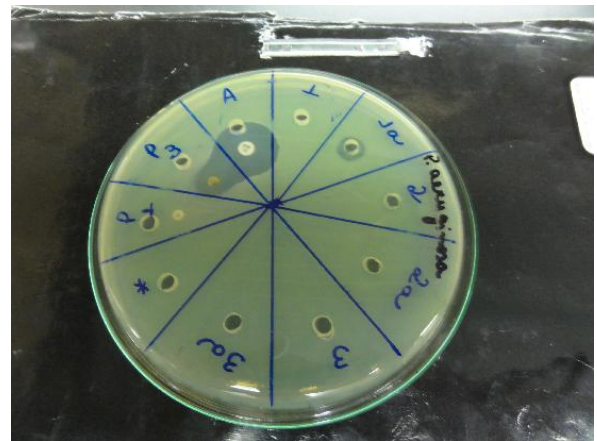
P. mirabilis



K. pneumoniae



S. epidermidis



P. aeruginosa

Figura 5.14. Representação dos halos de inibição específicos para cada cepa bacteriana.

5.7 CITOTOXICIDADE: VIABILIDADE CELULAR

A estimativa da citotoxicidade é parte inicial da avaliação da biocompatibilidade do biomaterial. O ensaio indica a biocompatibilidade através de contato direto do material em estudo, ou de seu extrato, em uma cultura celular de mamíferos. Com a ocorrência do efeito citotóxico, as membranas celulares são lesadas e a viabilidade celular é reduzida. Para avaliação de uma possível resposta toxicológica da blenda PCL, da hidroxiapatita e de sua associação, foram realizados os ensaios de citotoxicidade, que pode ser observado na Figura 5.15.

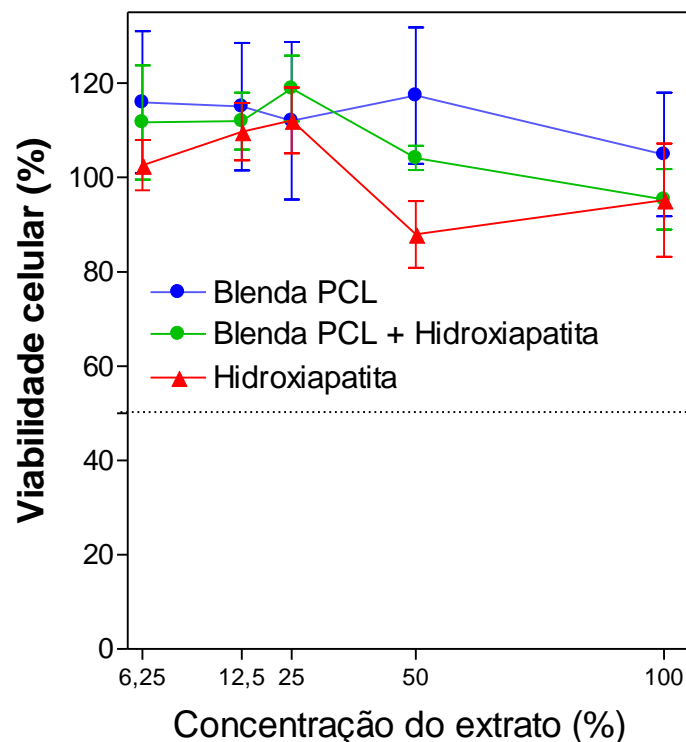


Figura 5.15. Perfil de viabilidade celular em (%) de Blenda de PCL (PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80%, círculo azul), Blenda de PCL + hidroxiapatita (PCL- Sigma-Aldrich / 20% PCL-BMP/80% + 10% Hidroxiapatita, círculo verde) e apenas hidroxiapatita (triângulo vermelho).

Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras apresentam um comportamento não-citotóxico, representando uma indicação inicial de que os arcabouços são adequados e em conformidade com a biocompatibilidade esperada para o PCL e hidroxiapatita, descrita na literatura (Fig. 5.15). E que os solventes utilizados para preparação dos arcabouços não interferiram na citotoxicidade dos materiais. As blendas associadas à tetraciclina não foram introduzidas no ensaio por se tratar de um fármaco já bastante utilizado

na terapêutica. Ademais, são os únicos fluorocromos aprovados para aplicação em seres vivos (PAUTKE et al., 2010).

Na engenharia dos tecidos para que as células tenham tempo suficiente de se proliferar e se diferenciar é necessário que se evite danos celulares ocasionados pelos compostos citotóxicos e imunotóxicos. O sucesso de reparação depende da presença de sinais regulatórios apropriados que promovam um ambiente adequado ao restabelecimento da função celular – migração proliferação e diferenciação celular – e consequente na regeneração tecidual (DA SILVA, 2011).

5.8 GRAU DE CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO APÓS IMPLANTAÇÃO

A avaliação da biocompatibilidade *in vivo* dos biomateriais implantáveis requer uma compreensão da resposta inflamatória e da cicatrização após sua implantação. Para a avaliação das amostras foi utilizada uma escala de classificação histológica (Tabela 4.5) que determina o grau de incorporação do enxerto no osso, a formação do novo osso e a resposta celular inflamatória. O gráfico que demonstra o grau de incorporação do implante e formação de osso novo está demonstrado na Figura 5.16.

Pode ser observado, a partir da análise histológica de 30 dias após cirurgia, que para os tecidos analisados com implantação das pastilhas dos grupos I (G₁), II (G₂) e IV (G₄) os implantes estavam presentes com algumas incorporações do tecido ósseo recém-formado, que se apresentou de maneira contínua ao osso do hospedeiro podendo também ser observado o início da remodelação óssea neste novo osso. Para o grupo III (G₃) observou-se apenas moderada quantidade de novo osso formado com algumas incorporações deste, no implante presente.

Após 60 dias, o grupo II e IV progrediu, podendo ser observado uma menor quantidade do implante no tecido em cicatrização, e uma melhor visibilidade da incorporação do implante ao osso novo e ao osso do hospedeiro com ampla formação de osso.

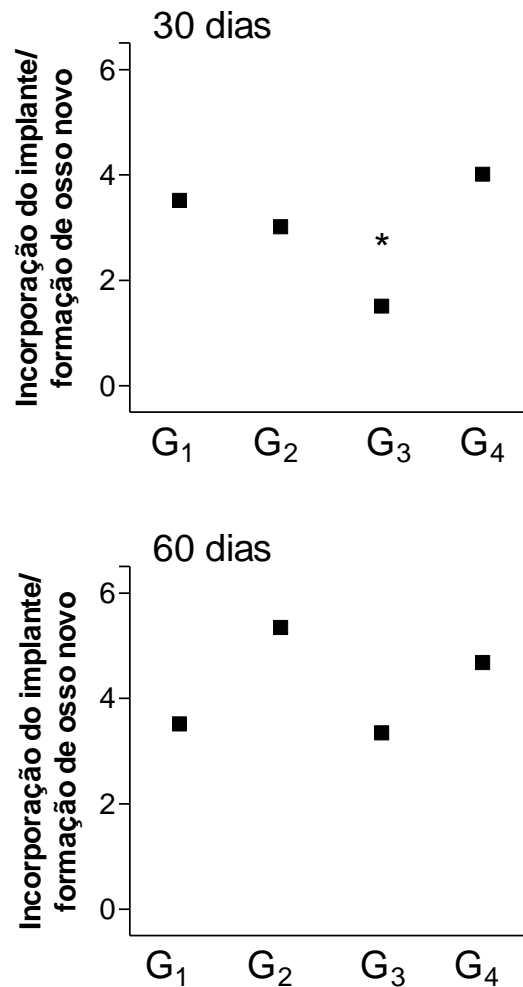


Figura 5.16. Grau de incorporação do implante e formação do novo osso após 30 e 60 dias de implantação.

(*) $p < 0,05$

Estes resultados indicam que a incorporação da hidroxiapatita no arcabouço favoreceu a formação do novo tecido ósseo, bem como, a melhor incorporação deste tecido dentro do arcabouço implantado. Para este mesmo período, o tecido incorporado com a pastilha do grupo I manteve suas características, quando comparado com a avaliação de 30 dias. Além disso, nos tecidos adjacentes às pastilhas do grupo III pode-se notar uma progressão do processo de regeneração, comparando 30 e 60 dias após a cirurgia, com a presença do implante incorporado com o novo osso de maneira contínua ao osso do hospedeiro podendo ser observado o início da remodelação óssea no tecido recém-formado. Os resultados indicam que tanto a blenda PCL como o composto PCL/ HA são favoráveis a osteocondução, nos períodos analisados no estudo, proporcionando estrutura para deposição do tecido ósseo recém-formado.

Chuenjitkuntaworn et al. (2010) realizou um estudo onde foram implantados arcabouços com PCL puro, com compósito PCL/HA para caracterizar a resposta biológica das células ósseas primárias no processo de regeneração. Os resultados mostraram que o implante com o PCL sozinho apresentou-se intacto, diferentemente do nosso estudo, com alguma formação de novo osso e vascularização dentro do implante. Sendo mais evidente a formações do novo osso para o compósito PCL/HA, onde foi observado formação de osteóides ao longo da borda da área do osso neoformado.

Na Figura 5.17 pode ser visualizada a histologia ilustrativa da formação do novo osso após 30 e 60 dias de implantação para o grupo I. Após 30 dias de implantação (Fig. 5.17 A), pode ser observado o osso em fase final de reparo, onde os osteoblastos já se tornaram osteócitos e vasos sanguíneos (lado direito). Para o período de 60 dias observa-se o osso em fase final de reparo, osteoblastos já se tornaram osteócitos e vasos sanguíneos (lado esquerdo).

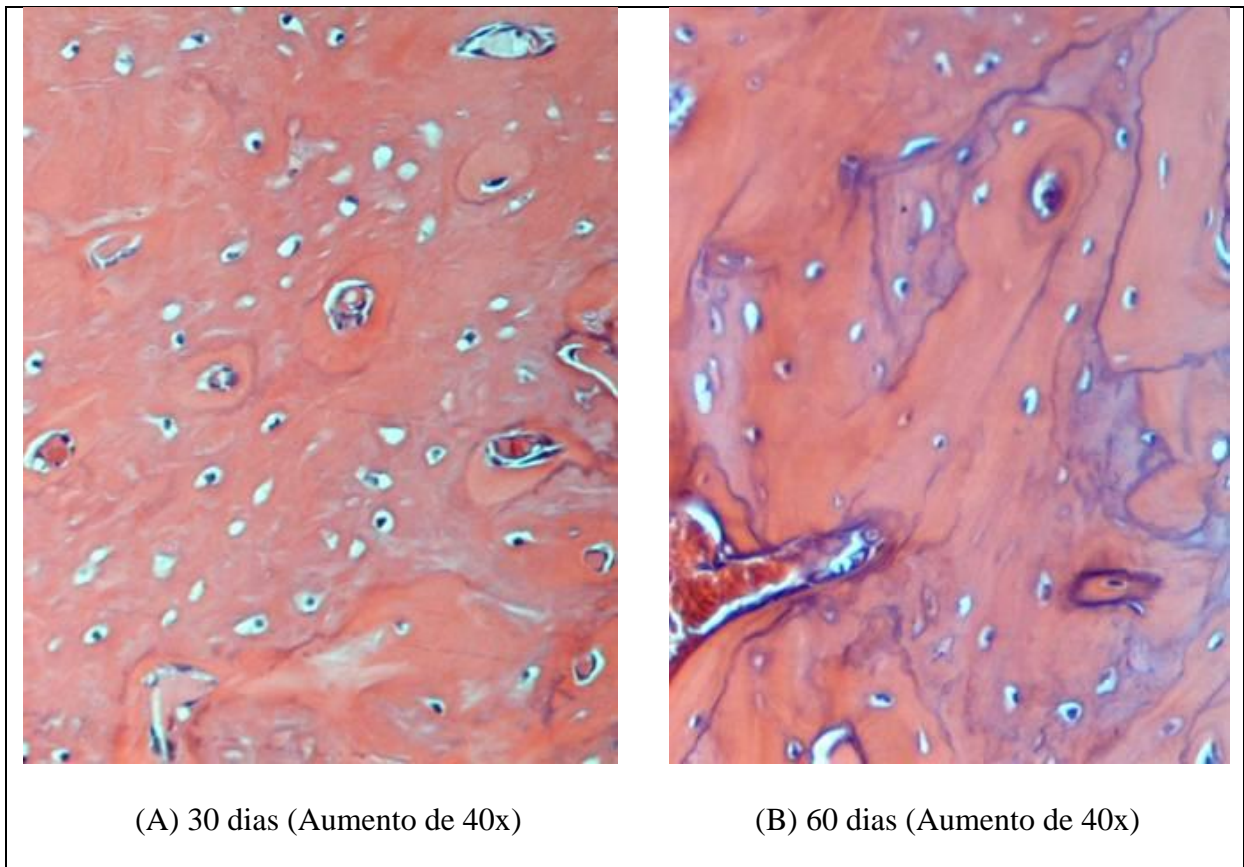


Fig 5.17. Histologia ilustrativa da formação do novo osso após 30 e 60 dias de implantação para o grupo I.

A partir da análise histologia do tecido retirado após 30 e 60 dias de implantação dos biomateriais podemos avaliar a resposta inflamatória ao implante, que pode ser visualizado na Figura 5.18.

Considerando que a presença da reação inflamatória pode influenciar no processo de reparação óssea e conseqüentemente na biocompatibilidade do material é de extrema importância se utilizar testes *in vivo* para avaliação do comportamento *in situ* do biomaterial a ser utilizado. Após 30 dias de implantação os resultados demonstraram a presença de células inflamatória para todos os grupos analisados. Entretanto, pode-se observar que após 60 dias houve uma tendência para diminuição destas células em todos os grupos.

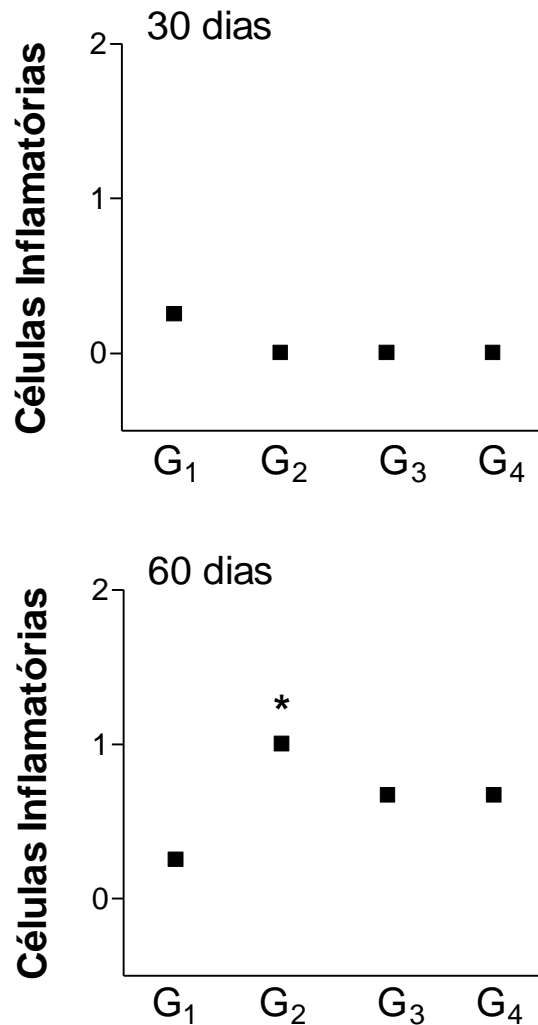


Figura 5.18. Grau de células inflamatórias nos tecidos retirados após 30 e 60 dias de implantação dos arcabouços. (*) $p < 0,05$

Os vasos sanguíneos desempenham um papel-chave na formação de osso novo, pois transportam fatores de crescimento, ósseo e citocinas para a área de remodelação óssea (MURPHY et al., 2004). Por conseguinte, pode ser observada grande vascularização nas áreas adjacentes ao implante dos arcabouços após um mês de implantação (Fig, 5.19). No entanto, o número de vasos sanguíneos foi reduzido após 60 dias da cirurgia, o que indica uma diminuição do processo de remodelação óssea.

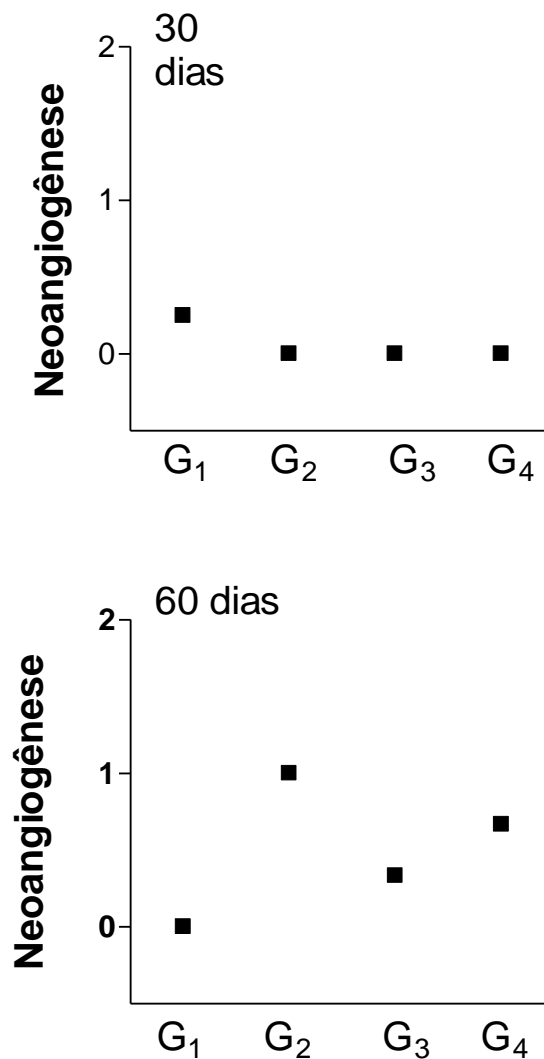


Figura 5.19. Grau de neoangiogênese nos tecidos retirados após 30 e 60 dias de implantação dos arcabouços.

Na Figura 5.20 pode ser visualizada a histologia ilustrativa da presença de células inflamatórias e neoangiogênese após 30 e 60 dias de implantação para o grupo II. Após 30 dias de implantação, pode ser visualizado, no osso neoformado, neoangiogênese e a presença de infiltrado inflamatório acentuado. Com 60 dias de implantação o osso neoformado

presenta-se em fase final de reparo, onde os osteoblastos já se tornaram osteócitos e ainda é possível observar vasos no interior.

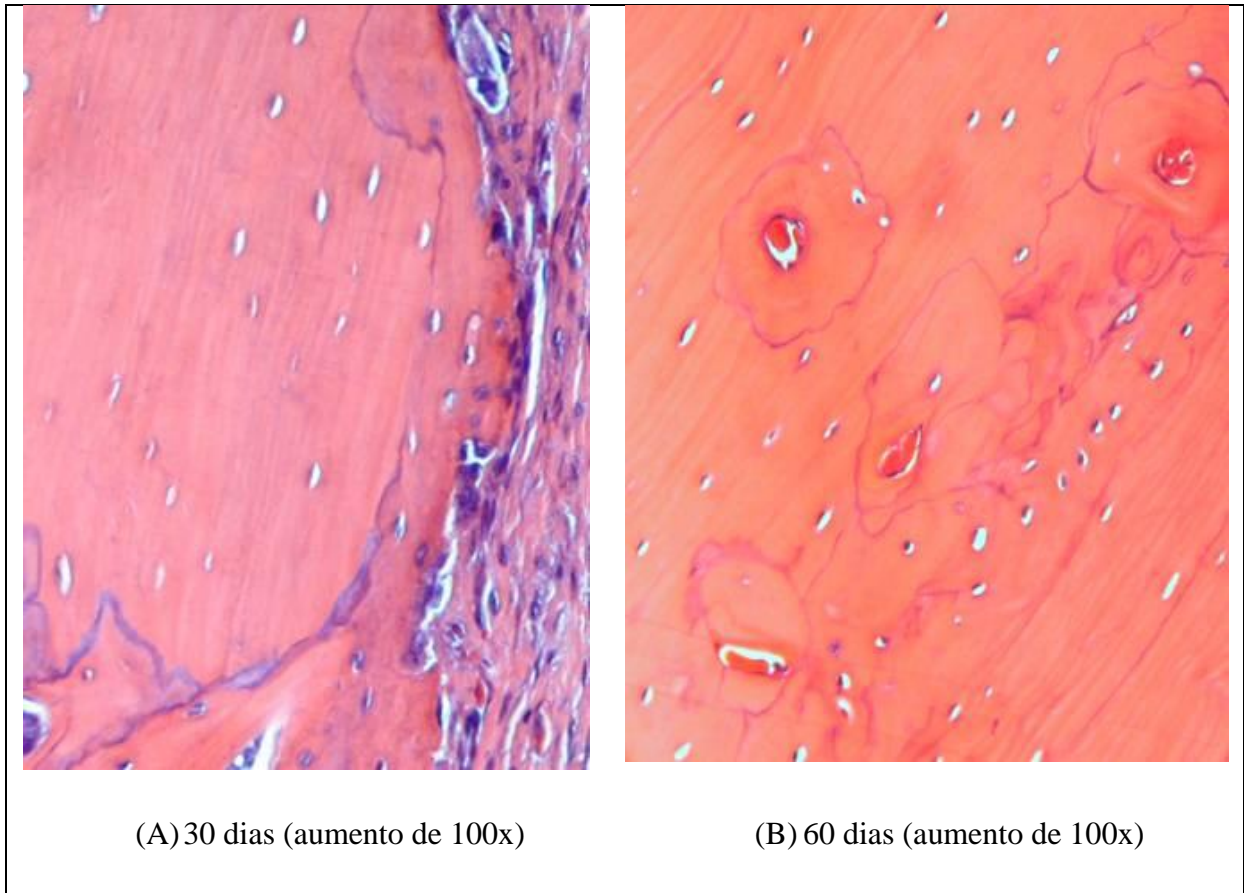


Figura 5.20. Histologia ilustrativa da presença de células inflamatórias e neoangiogênese após 30 e 60 dias de implantação para o grupo II.

5.9. RESULTADOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Considerando que a biocompatibilidade indica a habilidade do material para realizar sua atividade com apropriada resposta do hospedeiro, em uma aplicação específica, possíveis desvios do número de células e das taxas dos componentes não celulares do sangue, são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostase após a realização de procedimentos experimentais que avaliam a biocompatibilidade de materiais implantados no organismo. Segundo Vieira (2007), os marcadores bioquímicos podem servir como sinalizadores do sucesso ou insucesso de uma determinada terapia.

Alguns estudos que avaliam a regeneração óssea a partir do uso de biomateriais utilizam a dosagem da fosfatase alcalina para quantificar a neoformação do tecido, pois tal proteína é considerada um bom marcador para atividade osteoblástica, podendo avaliar fatores

que possam estimular o processo de reparo ósseo em suas diferentes etapas (YAN et al., 1998; CHUNG et al., 2007).

Dentre aos marcadores séricos de formação óssea, os níveis de fosfatase alcalina são mais estáveis e reprodutíveis (VIERA, 2007). Diante disto, mensurações da sua atividade enzimática podem caracterizar fases do reparo ósseo de defeitos experimentais.

A avaliação da fosfatase alcalina (FAL), para cada grupo de estudo, no período de 30 dias após implantação, pode ser visualizada na Figura 5.21.

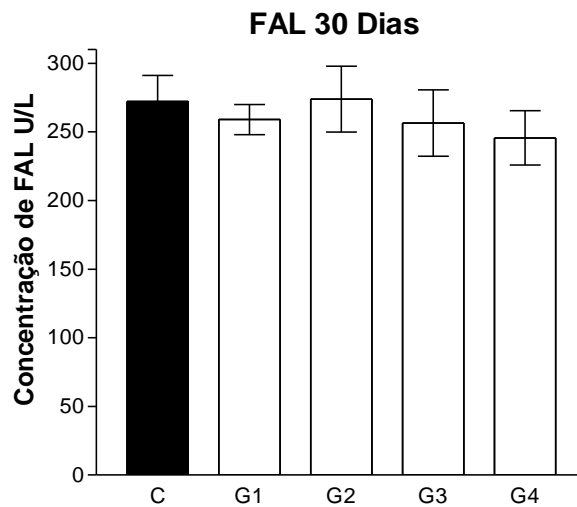


Figura 5.21. Níveis séricos da fosfatase alcalina após 30 dias da cirurgia para inserção do implante na calvária dos ratos.

Os resultados preliminares da análise da atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica (Figura 5.21) após 30 dias da cirurgia para inserção do implante na calvária dos ratos, não demonstrou, em todos os grupos, diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado com o grupo controle. Sugerido, dessa forma, que a criação do defeito ósseo não provocou uma maior expressividade da enzima, após 30 dias de implantação. Diferentemente do resultado encontrado por Schwengber (2009) que ao avaliar o reparo ósseo após enxerto ósseo autógeno e implante de hidroxiapatita em calvária de ratos, observou que a atividade sistêmica da enzima fosfatase alcalina foi mais expressiva em 30 dias pós-operatórios.

Danilchenko et al. (2011) avaliou os níveis da fosfatase alcalina no sangue de ratos, após implantação do composto hidroxiapatita/quitosana no tibia dos animais, constatando que não houve alterações dos níveis da fosfatase alcalina, nos períodos de 10, 15 e 24 dias, quando comparados com o grupo controle.

A atividade da fosfatase alcalina é utilizada para quantificar a neoformação óssea, uma vez que tal proteína é considerada um bom marcador para atividade osteoblástica (YAN, et

al., 1998; CHUNG, *et al.*, 2007), que consiste no início da formação da matriz óssea. A partir das análises histológicas pode ser observado que os osteoblastos se tornaram osteócitos, o que caracteriza fase final do reparo onde os níveis da fosfatase alcalina encontram-se normalizados.

Também se avaliou a função renal dos animais a partir das dosagens da ureia e creatinina. Ambas foram realizadas no período de 30 dias, para cada grupo de estudo, após implantação dos respectivos arcabouços. A avaliação da ureia e creatinina, para o período de estudo pode ser visualizada nas Figuras 5.22.

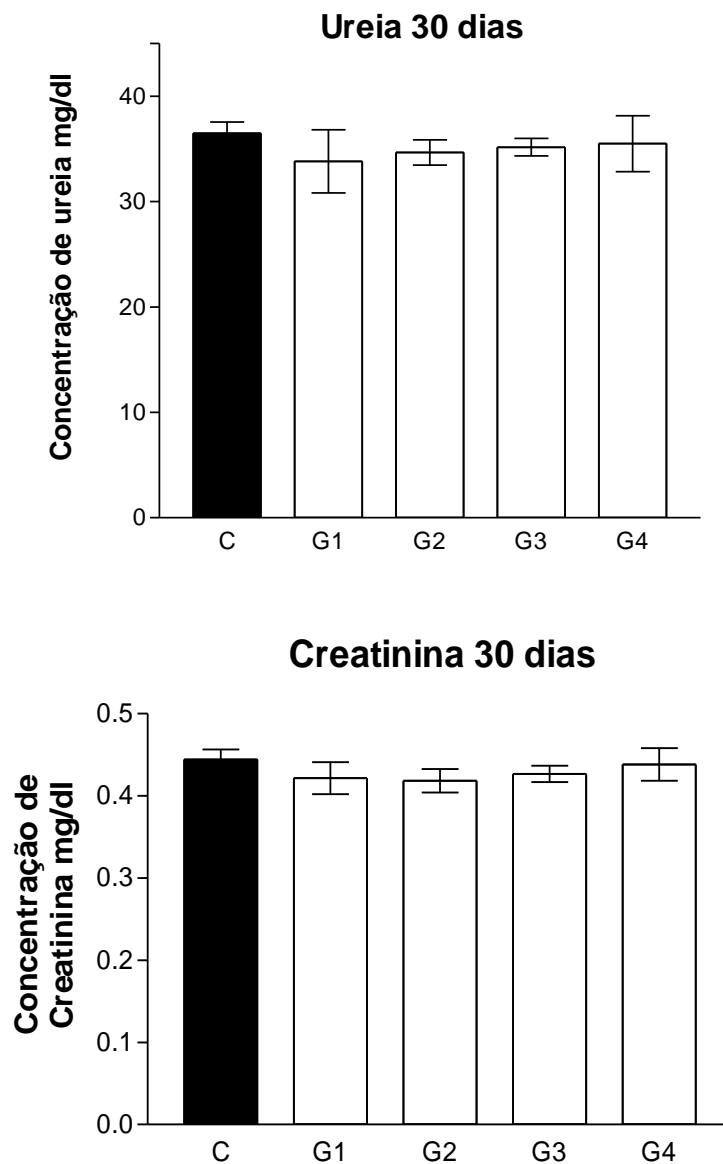


Figura 5.22. Níveis séricos da ureia e creatinina após 30 dias que os animais sofreram o implante.

Após 30 dias de implantação não foi observada nenhuma alteração de ambos os parâmetros, para todos os grupos analisados, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado com o grupo controle (Figura 5.22). Os níveis normais de ureia e creatinina indicam que os implantes colocados nos animais não alteram a função renal após 30 dias de cirurgia.

Considerando que a elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado no diagnóstico das hepatopatias agudas. A avaliação da função hepática após cirurgia para implantação das blendas PCL e associações com HA e/ou TCH foi realizada a partir das dosagens do TGP e TGO. Segundo Porto et al. (2011), estes indicadores são sensíveis ao dano hepático em diferentes tipos de anormalidades.

As concentrações do TGP e TGO, para o período de análise, podem ser visualizadas na Figura 5.23.

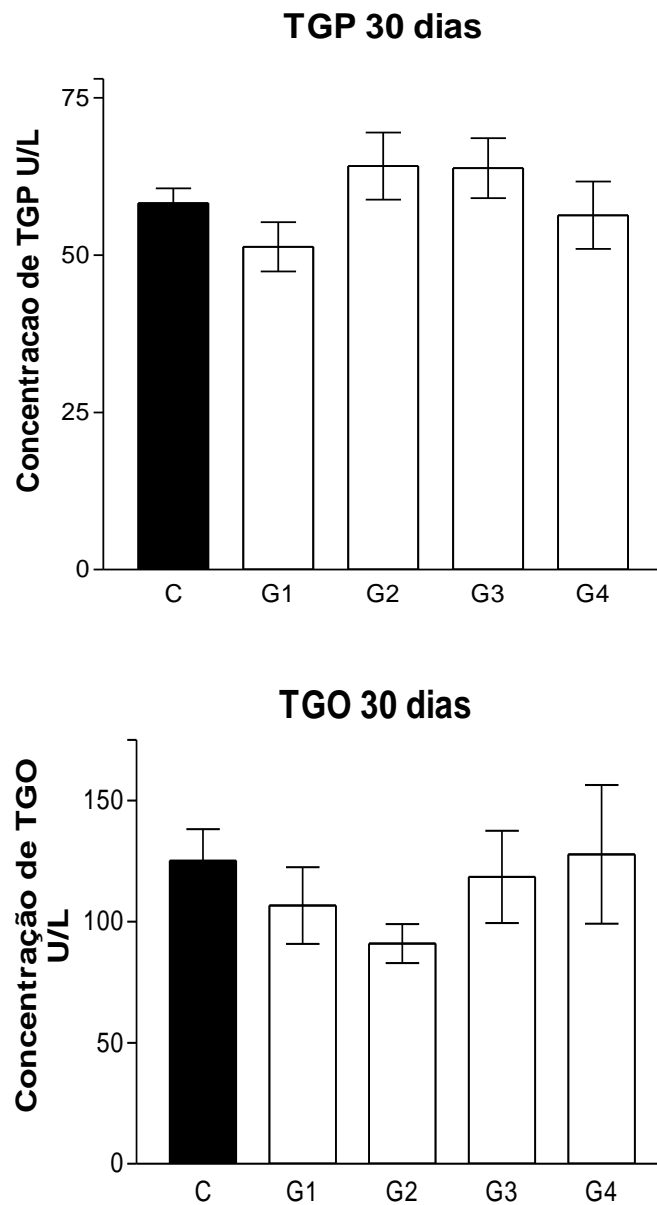


Figura 5.23. Níveis séricos do TGP e TGO após 30 dias que os animais sofreram o implante.

Após 30 dias do procedimento cirúrgico, não foi observada alterações dos níveis séricos de TGO e TGP pra nenhum dos grupos, quando comparados com o grupo controle (Fig 5.23). Desta forma, podemos concluir que após 30 dias de implantação não houve alteração da função hepática após implantação dos arcabouços.

6.0 CONCLUSÕES

- A taxa de liberação do fármaco da blenda polimérica foi capaz de evitar o crescimento bacteriano, constatado uma eficiente erradicação dos microrganismos no meio de cultura após 24h. Evitar possíveis processos infecciosos neste período.
- A blenda PCL/ TCH demonstrou, após um pico inicial, um perfil de liberação sustentado em função do tempo. Favorável para utilização em sistemas de liberação controlados de fármacos.
- Nas blendas com HA observa-se redução da liberação do fármaco.
- A partir do ajuste dos dados da fase sustentada de liberação foi possível se determinar o tipo de transporte (n) para cada tipo de matriz polimérica, PCL/ TCH e PCL/ TCH/ HA. Correlacionando esses dados com o índice intumescimento podemos considerar que o processo de liberação do antibiótico ocorreu predominantemente pelo mecanismo difusão.
- As blendas apresentaram baixas taxas globais de perda de massa.
- As blendas de PCL, a hidroxiapatita e sua associação não são citotóxicas.
- Os valores dos módulos de elasticidade do grupo III e IV indicam que estes apresentam propriedades mecânicas favoráveis para utilização nos processos regenerativos da calvária do rato.
- Não houve alteração renal e hepática, após a utilização dos arcabouços, confirmando a sua biocompatibilidade.
- Desta forma tanto a blenda PCL como o compósito PCL/ HA permitem a osteocondução. A introdução da Hidroxiapatita favoreceu ao processo de regeneração.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a concentração inibitória mínima de crescimento bacteriano para a tetraciclina incorporada nas blendas.
- Realizar ensaios de degradação enzimática e em soluções alcalinas a fim de se conhecer melhor a taxa de degradação.
- Realizar análises físico-químicas das pastilhas em períodos de tempo determinados durante o processo de degradação.
- Avaliar os períodos de 7 e 15 dias após implantação dos arcabouços na calvária do rato para verificar possível ocorrência de processo inflamatório inicial e realizar a dosagem da fosfatase alcalina sérica.
- Avaliar a fluorescência emitida pela tetraciclina nos tecidos ósseos implantados.
- Realizar estudo de biodegradabilidade das pastilhas de PCL/BPM-PCL 20/80% em implantes subcutâneos em ratos, avaliando a perda de massa e alteração de cristalinidade do arcabouço. Avaliaremos também a biocompatibilidade destes implantes verificando histologicamente a presença ou não de células inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- AABOE, M.; PINHOLT, E.M; HJØRTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.5, p.312-8, oct.1995.
- AALAMI, O. O. et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. **Plast Reconstr Surg**, v.114, n.3, p.713-20, set. 2004.
- AARDEN, E.M; BURGER, E.H; NIJWEIDE, P.J. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*, New York, v.55, n.3, p.287-299, jul. 1994.
- ABUKAWA, H. et al. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, p.205-216, 2006.
- ANDRADE, A.D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Rev Implant News**, São Paulo, v.4, n.6, p.659-662, 2007.
- ASCHERMAN, J. A. et al. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. **J Craniofac Surg**, v.19, n.4, p.1131-5, jul. 2008.
- ATHANASIOU, V. T. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: An experimental study in rabbits. **Med Sci Monit**, 16(1): BR24-31, 2010.
- BASSO, A. C. **Aderência Bacteriana: Estudo *in vitro* de Superfície de Aço Inoxidável e Liga de Titânio-Alumínio-Vanádio de Uso Ortopédico**. 2009. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. **Wiley-Interscience Publication**, New York, 1987.
- BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Degradação Acelerada de Suportes de Poli (ϵ -Caprolactona) e Poli (D, L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 16, n° 2, p. 141-148, 2006.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C. & DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15, p.13-21, 2005.

BARRILLEAUX B; PHINNEY D.G; PROCKOP D.J; O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. **Tissue Eng**, v.12, n.11, p.3007-19, 2006.

BAUER T; MUSCHLER G.F. Bone Graft Materials. **In: Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 371, p.10-27, 2000.

BEST, S.M.et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **J Eur Ceramic Society**, v.28, p.1319–1327, 2008.

BLACKWOOD K A , BOCK N, TIM R, DARGAVILLE T.R, WOODRUFF M. A. Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering. **International Journal of Polymer Science**, v.2012, p.1-25, 2012.

BORD, S. et al. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast in vivo. **Bone**, Nova York, v.19, n.1, p.35-40, julho, 1996.

BRAOIOS, A. et al. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 6, p. 449-456, 2009.

BROWN, S.A., GROVES, C., BARSANTI, J.A. et al. Determination of excretion of inulin, creatinine, sodium sulfanilate, and phenolsulfonphthalein to asses renal function in goats. **Am. J. Vet. Res**, v.51, n. 4p.581-586, 1990.

BUCKWALTER, J.A.; GLIMCHER, M.J.; COOPER, R.R. Bone Biology Part I: Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. **J Bone & Joint Surg**, n.77A, p.1256–75, 1995.

BURGE, R., B. Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005–2025. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.22, n. 3, p. 465-475, 2007.

BUSER D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical produce in the maxilla. **Int J Period Restor Dent**, v.13, p. 29-45, 1993.

CALIL, M. R.; Gaboard, F.; Guedes, C. G. F.; Rosa, D. S. Polymer Testing 25 597–604 (2006).

CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice (Review). **Biomaterials**, n.28, p.4240–4250, 2007.

CARVALHO P.S.P.; BASSI APF; VIOLIN LA. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant news**, v.1, n.3, p.255-259, 2004.

CHEN, C.C. et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v.24, p. 1167–1173, 2003.

CHEN, K-Y. et al. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.

CHUENJITKUNTAWORN, B; INRUNG, W; DAMRONGSRI, D; MEKAAPIRUK, K; SUPAPHOL, P; PAVASANT, P. Polycaprolactone/Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2010.

CHUNG, Y. I., *et al.* Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. **J Control Release**, v.121, n.1-2, Aug 16, p.91-9, 2007.

COLES, EH. *Veterinary Clinical Pathology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986.

COULEMBIER, O. et al. Controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly (b-malic acid) derivatives. **Progress in Polymer Science**, 311, 723–747, 2006.

CUTTER, C. S.; MEHRARA, B. J. Bone Grafts and Substitutes. **J Long-Term Effects of Med Implants**, v.16, n.3, p.249–260, 2006.

DA SILVA, F. M. **Desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos implantáveis biocompatíveis baseados no polímero Poli (ϵ -caprolactona)**, 2011, 143p. Tese (Doutorado). IPEN Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DANILCHENKO, S.N. et al. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method. **J of Biomedical Materials Research a**, v. 96A, ISSUE 4, 2011.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **J of Controlled Release**, v.158, p.15–33, 2012.

DE ALMEIDA, K.A. DE QUEIROZ, A.A.A. Key **Engin.Mat.**, v.16, p.589-592, 2004.

- DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN J.S. Macroporous poly (epsilon-caprolactone) with antimicrobial activity obtained by iodine polymerization. **J. Biomed. Mat. Res.Part A**, v.68^a, n.3, p.473-78, 2003.
- DE ANGELIS, C. D.; SEGRE, A.; CRESCENZI, V. **Polymer Preparation**, 42, 45, 2001.
- DE CARVALHO, A. C. A. **Reparo Ósseo de Defeito Crítico em Calvária de Rato com Microesferas de Hidroxiapatita e Selante de Fibrina**, 2010,120p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
- DE QUEIROZ, A. A. A. et al. Ring-Opening Polymerization of epsilon-Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.40, n. 8, p. 714-722, 2002.
- DE QUEIROZ, A. A. A.; GALLARDO, A.; ROMAHN, J. S. Vinylpyrrolidone–N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: synthesis, physical–chemical properties and proteic interactions. **Biomaterials**, v. 21, Issue 16, p. 1631–1643, August 2000.
- DELAISSÉ J.M. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clin Chim Acta**, v. 291, p.223-34, 2000.
- DELLOYE C, Cnockaert N, Cornu O: Bone substitutes in 2003: an overview. **Acta Orthop Belg**, v. 69, p.1–8, 2003.
- DI SILVIO L; BONFIELD W. Biodegradable drug delivery system for the treatment of bone infection and repair. **J Mater Sci: Mater Med**, v.10, p.653–8, 1999.
- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Liver In: **Veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 3. ed. IOWA: State University, p.130-151, 1994.
- EANES, E. D. **Program Crystal Growth Characteristics**. vol. 3, p. 3-15, 1980.
- EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices**, v.2, n.1, p.87-101, 2005.
- ESPOSITO, E. et al. Biodegradable microparticles for sustained delivery of tetracycline to the periodontal pocket: formulatory and drug release studies. **J. Microencapsulation**, v. 14, n. 2, p. 175-187, 1997.
- FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.11, n.1, p.E47-51, jan. 2006.

- FLORY P.J., REHNER J.J. **J. Chem. Phys**, p.11:521, 1943.
- FRÖHLICH, M. et al. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v.3, n.4, p.254-264, 2008.
- FULMER, M. T; MARTIN, R. I; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near- physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.
- GAROFALO G. S. Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. **Minerva Stomatol**, v.56, p.373-92, 2007.
- GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química**, v.100, p.72-74, 2006.
- GITIRANA, L. de B. **Histologia: conceitos básicos dos tecidos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
- GUEDES E S. C.C., et al. Tissue response around silicon nitride implants in rabbits. **J Biomed Mater Res A**. v. 84(2), pp. 337-43. 2008.
- HADJIDAKIS, D.J; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1092, p.385-396, dec. 2006.
- HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?. **Phil Trans R Soc Lond A**, v.362, p. 2821–2850, 2004.
- HORBYLON, B. Z. **Estudo *in vitro* da cinética de desorção de doxiciclina e tetraciclina impregnadas a membranas de colágeno utilizadas como dispositivos de liberação medicamentosa local**, 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- HSIONG, S.X.; MOONEY, D.J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol**, v.41, p.109-22, 2006.
- HUANG, M. H.; LI S.; HUTMACHER D.W.; COUDANE J.; VERT M. Degradation characteristics of Poly (ϵ -caprolactone)-Based Copolymers and Blends. **J Appl Polym Sci**, v.102, p.1681–7, 2006.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- KATCHBURIAN, E. ; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2^oed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.
- KAWACHI, E.Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim Nova*, São Paulo, v.23, n.1, p.518-522, 2000.
- KIM, H. et al. Hidroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**. p.1279-1287, 2004.
- KÖSE, G.T. et al. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4999-5007, dec., 2003.
- LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.395, p.81-98, feb., 2002.
- LEONEL E.C. F et al. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea: estudo em ratos. **Cienc Odontol Bras.**, v. 6, p.19-25, 2003.
- LI, C.; CHENG, L.; ZHANG, Y.; GUO, S.; WU, W. Effects of implant diameter, drug loading and end-capping on praziquantel release from PCL implants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 386, p. 23–29, 2010.
- LIND, M. et al. Stimulating Bone Healing. *Critical Reviews TM . Phys Rehabil Med*, v.12, p.313-43, 2000.
- LINDHE J, KARRING T, LANG NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**, 4. ed., São Paulo, Guanabara Koogan, 2005.
- LIU, X.; MA, P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Ann. Biomed. Eng.**, v.32, n.3, p.477-486, 2004.
- LLABOT, J.M.; MANZO, R.H.; ALLEMANDI, D.A. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. Elsevier, *International Journal of Pharmaceutics*, n. 276, p. 59-66, 2004.
- LONG, P.H. Medical Devices in Orthopedic Applications. **Toxicologic Pathology**, v.36, p.85-91, 2008.
- LORENZETTI, S.G. et al. Estudo das Propriedades Biocompatíveis do Bioconjugado de Poli (ϵ -Caprolactona) Crotoxina. **Cbecimat**, 2006.

MACEDO N. L.; MATUDA F. S., MACEDO, M. B., DE GONZALEZ L. G. S . Bone Defect Regeneration with Bioactive Glass Implantation in Rats. **J Appl Oral Sci**, v.12, n.2, p.137-43, 2004.

MANADAS, R.; PINA, M. E. ; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, out./dez., 2002.

MARTIN, R.I; BROWN, P.W. Aqueous formation of hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v.35, n.3, p.299-308, jun. 1997.

MATSUI, M. Correlações entre Estrutura Química, Super-Estrutura Macromolecular e Morfologia das Blendas e Redes Poliméricas á Base de Quitina e Poliuretano. Tese Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como Removedora de Chumbo**, 1999. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MEI, L. H. I; LEITE R. C; FELISBERTI M. I. Hidrogéis de poli (álcool vinílico): caracterização do grau de intumescimento e de reticulação para aplicação em liberação controlada de drogas, III Congresso Brasileiro de Polímeros, 269-272, 1995.

MENDONÇA, T. A. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)**, 2005, 110 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

METSGER, D. S.; RIEGER, M. R.; FOREMAN, D. W. *J. Mater.Sci. - Mater. Med.* 10, p.9-17, 1999.

MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato** [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MOREJON MG, SALUP RD, CUE MB. Actualización en tetraciclinas. **Rev Cubana Farm**, v.37,n.3, p.1, 2003.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações: Disponível em: <http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20-%20Enzimas.pdf>. Fevereiro, 2013.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.

MURPHY WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ: Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res*, 83: 204–10, 2004.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Compos Sci Technol**, v.65, n.15-16, p.2385-2406, dec. 2005.

OGAWA, C. A., PLEPIS, A. M. G. Liberação *In vitro* de Cloridrato de Ciprofloxacino em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 12, n° 2, p. 115-122, 2002.

OH, S. et al. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. **Am. J. Biochem. & Biotechnol.**, v.2, n.2, p.49-56, 2006.

OLIVEIRA, L. S. A. F, et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **R. Ci. méd. biol.**, v.9(Supl.1), p.37-44, 2010.

OYANE, A. et al. Simple surface modification of poly (ε-caprolactone) to induce its apatite-forming ability. **J. of Biomedical Materials Research Part A**, v.75 (A), n.1, p. 138-145, 2005.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D.. **Biomaterials: Principles and Applications**. Nova Iorque: CRC Press, 2002.

PATARO A.L, et al. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials*, v. 24, p.1075-1080, 2003.

PAUTKE C., et al. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat.*, 217(1):76-82, jul., 2010.

PECORA G.; ANDREANA S.; MARGONE J.E.; COVANI U.; SOTTOSANTI J.S. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Edod**, v. 84, p.424-9, 1997.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helvetic*, v.60, p. 110-111, 1985.

PERIOLI, L. et al. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v.95, n.3, p.521-33, mar., 2004.

PETERSON, L.J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

PINHEIRO, A.L. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, Riberão Preto, v.14, n.3, p.177-181, 2004.

PORTO, N.A. et al. Evaluation of liver function in wistarfemale lewis ahead of alcohol intake associated with ligatureinduced periodontitis. **Braz J Periodontol** , 21(4):76-79, 2011.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dent. Clin. N. Am.**, v.51, p.729-746, 2007.

PUGA, A. M. et al. Hot melt poly- ϵ -caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin. **Acta Biomaterialia**, v.8, p.1507–1518, 2012.

RANG, H. P., DALE, M. M. **Farmacologia**.Elsevier. 6^aed., Rio de Janeiro, 2007.

RHEE, S.H.; CHOI, J.Y.; JIM, H.M. Preparation of a bioactive and degradable poly (ϵ -caprolactone) silica hybrid through a sol-gel method.**Biomaterials**, 23:4915-4921, 2002.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials**, 17(1):31-35, 1996.

ROBBINS, S. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora

ROLIM, A.E.H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**, 2010, 91p. Dissertação. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

ROSE, F.R. et al. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, Guild ford, v.25, n.24, p.5507-5514, nov., 2004.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **Eur. Cell Mater.**, v.5, p.29-40, 2003.

SAHOO S.; SASMAL, A.; NANDA, R.; PHANI, A. R.; NAYAK, P. L. Synthesis of chitosan–polycaprolactone blend for control delivery of ofloxacin drug. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.106–113, 2010.a

SAHOO S.; SASMAL, A.; NAYAK, P.; SAHOO, D. Synthesis and Characterization of Chitosan- Polycaprolactone Blended with Organoclay for Control Release of Doxycycline. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p.3167–3175, 2010.b

SANADA, J. T. **Avaliação da resistência e módulo de elasticidade de osso mineralizado e desmineralizado pelos testes de microtração**, 2007. Dissertação. Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Bauru, 2007.

SANDERS, K.M., G.C. *et al.* Health burden of hip and other fractures in Australia beyond 2000 - Projections based on the Geelong Osteoporosis Study. **Medical Journal of Australia**, 170(10): p. 467-470, 1999.

SÁNDOR, G. K. B. **The minimization of morbidity in cranio-maxillofacial osseous reconstruction. Bone graft harvesting and coral-derived granules as a bone graft substitute**, 2003, 100 p. Dissertation. Institute of Dentistry; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Oulu, Oulu (Finland), 2003.

SANTOS, A. R. J. Bioresorbable polymers for tissue engineering. **InTech**, p. 225-246, Março, 2010. ISSN 978-953-307-079-7.

SANTOS, A. R. J. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, nº 4, p. 308-317, 2007.

SCHMITZ, J. P. E J. O. HOLLINGER. The critical size defect as an experimental model for cranio mandibulo facial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n.205, p.299-308, Apr.1986.

SCHOSSLER, D. et al. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofeno durante o trans e pós-operatório. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, p. 46-51, 2001.

SCHUMANN G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jul; 40(7): 725-33. Erratum in: *Clin Chem Lab Med*. 48(5): 615-621, may., 2010.

SCHWENGBER, CD M. M. B. **Reparo Ósseo após Enxerto Ósseo Autógeno e Implante de Hidroxiapatita Absorvível Granulada sob Influência de Campo Magnético Estático: Estudo Experimental em Calvária de Ratos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SEIBEL, J. M. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50, n.4, p.603-620. 2006.

SEYMOUR, R.A; HEASMAN; P.A. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, p. 22-35, 1995.

SIEPMANN, J.e PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVEIRA, R. L. **Análise Microscópica do Processo de Reparo Ósseo Frente ao Vidro Bioativo e Barreira de Sulfato de Cálcio em Calotas Cranianas de Ratos.**2005. 168f. Dissertação. Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SJ, H.; BJ, T. Biodegradable polymers. *Advances in pharmaceutical science*, London, 6, 101–64, 1992.

SOLTAN, M; SMILER, D; CHOI, J.H. Bone Marrow: Orchestrated Cells, Cytokines, and Growth Factors for Bone Regeneration. **Implant Dent**, v.18, p.132–141, 2009.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocrin Rev**, v. 14, p. 424-42, 1993.

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary Sistem. **In:Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.

SUN, H.; MEI, L.; SONG, C.; CUI, X.; WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, 27 1735–1740, 2006.

SWARBRICK, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*. Informa health care, England, 2007.

TABATA Y. Necessity of drug delivery systems to tissue engineering. In: Park KD, editor. *Biomaterials and drug delivery toward the new millennium*. **Seoul: Han Rim Won Publisher**; p. 531–4, 2000.

TADIC D, EPPLE M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphatebased bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, 25:987-94, 2004.

TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO S.; DELCOGLIANO A.; FRANZESE S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, 22:1365-1370, 2001.

TAVARES, V. A. C. D. B. **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos**. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2011.

TEIXEIRA, L.J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2009.

TURNER, C.H. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. **Bone**, Nova York, v.12, n.3, p.203-207, 1991.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Of Materials Science: Materials In Med**, 3, 432-446, 1992.

VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 2, p. 75-82, abril 2007.

VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **J. Appl. Biomater.**, v.6, p.137-144, 1995.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Tissue Engineering: The Next Generation. **Tissue Eng.**, v.12, n.12, p.3261-3263, 2006.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANNMACHER L. **Tetraciclinas**. IN: Wannmacher L, erreira MBC, editors. Farmacologia clínica para dentistas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 199, p.197-9, 1999.

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. Elsevier: New York, 1987.

WONG, W.H.; MOONEY, D.J. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: ATALA, A; MOONEY, D.; VACANTI, Birkhäuser, cap. 4, p. 51-82, 1997.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p.1217-1256, Oct. 2010.

YAN, Q. C., N. TOMITA, *et al.* Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. *Med Eng Phys*, v.20, n.6, Sep, p.397-402. 1998.

YANG, Rui-na , *et al.* Osteoinduction by Ca-P biomaterials implanted into the muscles of mice. *J Zhejiang Univ-Sci B. Biomed & Biotechnol*, 12(7):582-590, 2011.

ZHANG, X.D.; YUAN, H.; DE GROOT, K. Calcium Phosphate Biomaterials with Intrinsic Osteoinductivity. **The 6th World Biomaterials Congress**. Kamuela, Hawaii, USA, p.1-13, 2000.

ZHAO, Q. *et al.* Biodegradation behavior of polycaprolactone/rice husk eco-composites in simulated soil medium. **Polymer Degradation and Stability**, 93, 1571–1576, 2008.