

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia

Departamento de Física e Química – Instituto de Ciências

Dissertação de Mestrado

**SISTEMA HÍBRIDO MACROPOROSO PARA
ENXERTOS ÓSSEOS ALOPLÁSTICOS**

Kleber de Arruda Almeida

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

Co-Orientador: Prof. Dr. Piotr Trzesniak

Agosto de 2003

Kleber de Arruda Almeida

SISTEMA HÍBRIDO MACROPOROSO PARA ENXERTOS ÓSSEOS ALOPLÁSTICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Polímeros e Cerâmicas.

Orientador: Dr. Alvaro A. A. de Queiroz – UNIFEI

Co-orientador: Dr. Piotr Treznsniak – UNIFEI

Itajubá
Universidade Federal de Itajubá
2003

*Aos meus pais, José e Neuza que sempre
me apoiaram em minhas decisões...*

Aos meus irmãos, Guilherme e Ana Carolina, meus amigos...

*Em especial a minha irmã Karina, que foi
fundamental para a realização deste mestrado...*

Agradecimentos

Agradeço a todos que, com seus conhecimentos, incentivos, e críticas colaboraram para a realização deste trabalho. Em especial agradeço:

Ao professor Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz, por sua orientação, e pelo seu comprometimento no meu processo de formação científica.

Ao professor Dr. Piotr Trzesniak, pela co-orientação, participação e amizade.

Ao professor Dr. Sdnei de Brito Alves pela colaboração com o programa de processamento de imagens.

Ao prof. Dr. Demétrio A.W. Soares pela utilização das dependências do Gdisco.

Ao professor Écio José França pela amizade demonstrada.

Aos professores pelo desenvolvimento do meu conhecimento teórico e científico.

Ao meu primo Helinton Luis Inocência Alves pela ajuda com os programas.

Aos colegas, Leandro, Valquíria, Ana Carolina Oliveira Santos, Paula Marques Zaghetto e Tainá Isabela Pereira da Costa Neves, pela ajuda e amizade.

À Dr. Olga Zacuco Higa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, pela realização da microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários da UNIFEI, especialmente a Matilde Benedita Pereira, Marília Sonja Nogueira Ribeiro, e Débora Luiza dos Santos, pela colaboração prestada.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
Preâmbulo	xv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Breve histórico sobre materiais para enxertos</i>	9
1.2. <i>Aspectos gerais do tecido ósseo.....</i>	10
1.3. <i>Aspectos gerais do uso da Hidroxiapatita como enxerto</i>	18
1.4. <i>Uso de polímeros em enxertos</i>	20
2. Objetivos	23
3. Experimental	24
3.1. <i>Síntese do compósito PCL:I₂/HA</i>	24
3.2. <i>Caracterização físico-química do compósito PCL:I₂/HA.....</i>	24
3.2.1. <i>Cromatografia de permeação em gel (GPC) do compósito PCL:I₂/HA</i>	24
3.2.2. <i>Caracterização do polímero PCL:I₂ e do compósito PCL:I₂/HA por microscopia eletrônica de varredura.....</i>	25
3.2.3. <i>Caracterização por ¹H –RMN do polímero PCL:I₂.....</i>	26
3.3. <i>Caracterização bioquímica.....</i>	27
3.3.1. <i>Atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA</i>	27
3.3.2. <i>Ensaio da citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA.....</i>	30
3.3.3. <i>Atividade osteocondutora in vivo do compósito PCL:I₂/HA.....</i>	31
3.3.4. <i>Análise por visão computacional</i>	37
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1. <i>Síntese e caracterização do compósito PCL:I₂/HA</i>	39
4.2. <i>Caracterização bioquímica.....</i>	44
4.2.1. <i>Análise da atividade antimicrobiana do PCL:I₂/HA</i>	44
4.2.2. <i>Análise da citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA</i>	46
4.2.3. <i>Análise histológica da atividade osteocondutora do compósito PCL:I₂/HA.....</i>	47
4.2.4. <i>Análise dos cortes histológicos por visão computacional.....</i>	50

5. Conclusão	56
6. Sugestões para trabalhos futuros	57
7. Referências bibliográficas	59
8. Apêndice.....	64

Lista de figuras

Figura 1 – Número de doadores de órgão e tecido nos EUA ^[1, 2]	1
Figura 2 – Evolução dos gastos anuais com três tipos de materiais para enxerto, nos EUA ^[1,2]	2
Figura 3 – Osso da região anterior do íliaco, para enxerto ^[6]	3
Figura 4 – Osso retirado da sínfise da mandíbula para enxerto autógeno ^[6]	3
Figura 5 – Osso bovino orgânico liofilizado (Baumer-Genius) ^[9]	4
Figura 6 – Material aloplástico (hidroxiapatita) para enxertos ^[10]	5
Figura 7 – Pino de titânio (A) implantado para receber uma prótese dentária, com excelente biocompatibilidade com o osso periférico (B) ^[13]	6
Figura 8 – Mecanismo de polimerização e estrutura química de dois polímeros biodegradáveis utilizados em biomedicina: (a) ácido polilático. (b) polidioxanona ^[14]	7
Figura 9 – Radiografia mostrando uma boa osteointegração entre a prótese de cabeça de fêmur e o osso ^[18]	8
Figura 10 – Esquema da estrutura do osso, mostrando os canais de Volkmann e Havers ^[21]	11
Figura 11 – Micrografia óptica do tecido ósseo em regeneração (20 dias) corado com HE. Aumento de 40x.....	12
Figura 12 – Micrografia óptica de corte histológico do tecido ósseo corado com HE. Aumento de 40x ^[22]	12
Figura 13 – Prostaglandina: (a) Fórmula estrutural; (b) Estrutura química ^[22]	15
Figura 14 – Vitamina D: (a) Fórmula estrutural; (b) Estrutura química ^[23]	15
Figura 15 – Estrutura química de dois principais glicosaminoglicanos.....	16
Figura 16 – Corte esquemático de uma membrana plasmática de célula animal. (1) Glicoproteínas; (2) Proteínas; (3) Fosfolipídios ^[25]	17
Figura 17 – Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita ^[26]	17
Figura 18 – Eficiência de alguns biomateriais em enxertos ósseo ^[28]	18
Figura 19 – (a) Micrografia mostrando a área de contato entre o implante de titânio e o osso, demonstrando áreas com baixo grau de osteointegração. (b) micrografia	

eletrônica mostrando a biocompatibilidade na área de contato entre o implante, coberto com HA, e o osso ^[29]	19
Figura 20 – Polimerização por abertura do anel para obtenção da poli (ϵ -caprolactona) ^[36] ..	22
Figura 21 – Microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 (IPEN/USP) utilizado para a análise do compósito PCL:I ₂ /HA.	26
Figura 22 – Espectrômetro utilizado para caracterização do polímero PCL:I ₂	26
Figura 23 – Fluxograma ilustrando o ensaio da atividade antimicrobiana do compósito PCL:I ₂ /HA. O tamanho do halo indica a bioatividade do compósito..	29
Figura 24 – Sedação do coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) com isoflurano para a cirurgia.....	32
Figura 25 – Fotografia mostrando o local da incisão para exposição da região anterior da tíbia.	33
Figura 26 – Aspecto do preparo da cavidade óssea para recebimento do compósito PCL:I ₂ /HA.....	33
Figura 27 – Cavidade preenchida com o compósito PCL:I ₂ /HA.....	34
Figura 28 – Compósito de PCL:I ₂ /HA (A) e as membranas de quitosanas esterilizadas por raios gama (⁶⁰ Co) (B). Dose utilizada = 25kGy.....	35
Figura 29 – Micrótomo rotatório Sakura [®] modelo Accu-Cut SRM, Tissue-Tek utilizado para segmentar os fragmentos ósseos.	36
Figura 30 – Microscópio óptico com câmera CCD acoplado a um microcomputador Pentium II utilizado neste trabalho.	37
Figura 31 – Conversão do monômero ϵ -CL a PCL:I ₂ . [ϵ -CL/I ₂] = 103:1, T = 298 K, P = 1 atm. A proporção de polímeros PCL:I ₂ /HA no final do processo foi de 1:1.	40
Figura 32 – Espectro ¹ H-RMN do PCL:I ₂ obtido em CDCl ₃ a 298 K.....	40
Figura 33 – Análise por GPC do polímero PCL:I ₂	41
Figura 34 – Micrografia de MEV do polímero PCL:I ₂	41
Figura 35 – Gráfico de distribuição do tamanho de poros no compósito PCL:I ₂ /HA, obtido por meio de visão computacional.....	42
Figura 36 – Micrografia de MEV do compósito PCL:I ₂ /HA.....	43
Figura 37 – Micrografia de MEV da Hidroxiapatita (Intra-Lock).....	43
Figura 38 – Micrografia de MEV da Hidroxiapatita (Intra-Lock). Aumento de 80×.	43

Figura 39 – Atividade antimicrobiana do compósito PCL:I ₂ /HA contra <i>E. coli</i> (A) e <i>A. aureus</i> (B).	45
Figura 40 – Gráfico da atividade do compósito PCL:I ₂ /HA. Polietileno de alta densidade (A), compósito PCL:I ₂ /HA (B), solução de fenol 0,02% (C).	46
Figura 41 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com sangue. Aumento de 40×.	48
Figura 42 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com PCL. Aumento de 40×.	48
Figura 43 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com HA. Aumento de 40×.	49
Figura 44 – Gráfico da atividade do compósito PCL:I ₂ /HA. Polietileno de alta densidade (A), compósito PCL:I ₂ /HA (B), solução de fenol 0,02% (C).	49
Figura 45 – Micrografia óptica correspondente a um corte histológico da área da tibia enxertada com HA preparada para segmentação e posterior determinação da área de reparo ósseo por visão computacional. Na imagem destacam-se: área de reparo ósseo consolidado (A), região sem reparo ósseo (B), e região de tecido conjuntivo não ósseo (C). Aumento de 40×.	53
Figura 46 – Tratamento da imagem por visão computacional. A área escura representa o reparo ósseo e a área clara representa a região onde não ocorreu a formação de tecido ósseo.	53
Figura 47 – Imagem segmentada. Cada segmento marcado corresponde a uma área, que será somada e totalizada como a área total da reparação óssea.	54
Figura 48 – Gráfico da atividade osteocondutora de cada material enxertado após 20 dias. .	54

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais materiais utilizados em enxertos ^[20]	9
Tabela 2 – Aplicações clínicas de alguns materiais sintéticos na biomedicina. ...	10
Tabela 3 – Propriedades e características de alguns polímeros biodegradáveis ^[35] . ..	21
Tabela 4 – Relação de alguns microorganismos e suas principais ocorrências ^[24,42] ..	28

Lista de abreviaturas

FDA – Food and Drug Administration (E.U.A).

HA – Hidroxiapatita.

H.E – Hematoxicilina e Eosina.

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

\overline{M}_n – Peso molecular numérico médio.

\overline{M}_w – Peso molecular ponderal médio.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

PCL – Poli (ϵ -caprolactona).

PDO – Poli (diacetonona).

PGA – Poli (ácido glicólico).

PLA – Poli (ácido lático).

PMMA – Poli (metacrilato de metila).

PTFE – Poli (tetrafluoretileno).

RMN – Ressonância magnética nuclear.

USP – Universidade de São Paulo.

Resumo

Há, na medicina e na odontologia, uma crescente necessidade de novos biomateriais que apresentem uma resposta tecidual controlada e confiável, como por exemplo, biomateriais que substituam e/ou estimulem a formação de um novo tecido ósseo e que depois serão reabsorvidos. Uma variedade de enxertos ósseos aloplásticos, sintetizados a partir de polímeros biodegradáveis associados à hidroxiapatita, têm sido objeto de considerável interesse clínico e científico. Os compósitos polímeros/cerâmicas alcançaram uma aceitação em medicina e odontologia nas áreas de reparação óssea e defeitos periodontais com relativas vantagens sobre os enxertos alógenos e aloplásticos entre elas, a de ser uma fonte ilimitada, e de apresentar baixo custo e ausência de reações imunológicas. Em estudos experimentais, a hidroxiapatita tem mostrado excelentes propriedades mineralizadoras e de reparação óssea, mas têm sido encontradas algumas dificuldades quanto a suas aplicações em defeitos periodontais. O uso de polímeros biodegradáveis, tais como os poliésteres alifáticos na obtenção de materiais compósitos injetáveis e homogêneos, tem sido de utilização comum na área médica. A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) tem sido usada em diversas aplicações médicas, mas com poucas aplicações na regeneração de tecido ósseo. O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver e testar novos compostos biologicamente ativos, com potencial uso na reparação óssea, baseados na associação entre a hidroxiapatita (HA) e o PCL:I₂ macroporoso. O monômero ϵ -caprolactona foi polimerizado pela quebra de cadeia na presença da HA usando o iodo como catalisador para formar um poliéster macroporoso PCL:I₂ com uma massa molecular média (M_w) de 32.900 g.mol⁻¹. O compósito PCL:I₂/HA teve a sua estrutura porosa e o tamanho de poro controlado durante a polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -caprolactona. O compósito PCL:I₂/HA foi esterilizado mediante exposição a 25 kGy de raios gama (⁶⁰Co), e implantado para estudar suas propriedades osteocondutivas em tíbias de coelhos. Os dados quantitativos para o estudo da evolução histomorfométrica foram coletados pela observação microscópica de secções coradas com hematoxilina/eosina (HE) de

fragmentos ósseos para posterior análise com auxílio da visão computacional. A citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA *in vitro* foi analisada em função da sobrevivência de células de ovário de hamster chinês (CHO), e a atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA foi estudada contra bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O compósito PCL:I₂/HA testado mostrou melhor atividade antimicrobiana contra a *E. coli* do que contra o *S. aureus*. As novas cerâmicas de HA, recentemente desenvolvidas com o PCL:I₂ macroporoso, melhoraram a reparação do tecido ósseo observada 20 dias após o implante. A análise histológica após a implantação do compósito PCL:I₂/HA mostrou um material osteocondutor que favoreceu o crescimento de células ósseas, sugerindo um compósito potencialmente bioativo.

Palavras-chaves: poli (ϵ -caprolactona), hidroxiapatita hibridizada, osteocondução, compósito biodegradável.

Abstract

In medicine and dentistry, there is an increasing need for new biomaterials that can gain predictable and controlled tissue responses. For instance, biomaterials serving, as bone graft substitutes should initiate new bone formation, after which they should get resorbed and replaced by bone tissue. A variety of synthetic bone grafts from composites based on biodegradable polymers and hydroxyapatite (HA) has been the subject of considerable scientific and clinical interest. The biodegradable polymer/ceramics composites have gained acceptance in dentistry and medicine for repairing bone and periodontal defects with advantages relatively to autografts and allografts such as unlimited supply, low cost and absence of immunogenicity. In experimental studies hydroxyapatite (HA) have shown excellent bone forming and mineralizing properties, but their application into periodontal tissue defects has been difficult. The use of biodegradable polymers such as aliphatic polyesters to obtain homogeneous injectable composite materials has become a common practice in medicine field. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) has been used in several medical applications, but as such they do not enhance the bone tissue regeneration. The main objective of this work was to develop and to test novel biologically active composites based on hydroxyapatite (HA) and macroporous PCL:I₂ with potential for use in bone repair. The monomer ϵ -caprolactone (ϵ -CL) was polymerized in bulk in the presence of HA using I₂ as a catalyst to form a macroporous polyester (PCL) having a weight-average molecular weight (M_w) of 32,900 g.mol⁻¹. The PCL:I₂/HA composite had macropore structure and pore sizes that are closely controlled during the ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone monomer. The PCL:I₂/HA composite was sterilized by gamma rays from a ⁶⁰Co source at 25 kGy and their osteoinductive property was evaluated after implantation in the rabbit tibia. Quantitative data for histomorphometric evaluation was collected with microscopic observation on the stained bone sections and computational vision analysis. The *in vitro* cytotoxicity to CHO cells based on cell viability with Chinese hamster ovary cells (CHO) and antimicrobial activities against

Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* were examined. The tested PCL:I₂/HA composite showed better antimicrobial activity against *E. coli* than against *S. aureus*. The newly developed HA ceramic with macroporous PCL:I₂ improves bone tissue recolonization after 20 days of implantation. The histological analysis after PCL:I₂/HA implantation revealed an osteoinductive material that supported bone cell growth suggesting a potentially bioactive composite.

Keywords: poly (ϵ -caprolactone), hybridized hydroxyapatite, osteoconduction and biodegradable composite.

Preâmbulo

Há cerca de dois anos observamos em nossos laboratórios que o iodo é capaz de promover a polimerização em massa do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL) formando um poliéster de elevado peso molecular, biodegradável e macroporoso. A polimerização por abertura de anel do monômero (ϵ -CL) parece envolver a formação de um complexo de transferência de carga, sendo o sistema modelado utilizando métodos da mecânica quântica.

Observando a estrutura macroporosa do compósito obtido aventou-se a hipótese de sua utilização como um material bioativo para reparo ósseo com atividade antimicrobiana. Sintetizou-se então o compósito poli (ϵ -caprolactona):I₂/HA utilizando o mesmo processo de polimerização em massa do monômero ϵ -CL promovido pelo iodo, agora na presença da biocerâmica hidroxiapatita (HA). Apresenta-se no capítulo 1 uma revisão geral da literatura com relação ao processo de crescimento ósseo, sua estrutura e função. Também são introduzidos neste capítulo os principais materiais biológicos e sintéticos utilizados no processo de osteocondução, e respectivo reparo ósseo.

A metodologia para síntese e caracterização do compósito PCL:I₂/HA é apresentada no capítulo 2. As técnicas bioquímicas para o estudo das atividades citotóxicas e antimicrobianas também são apresentadas neste capítulo. Técnicas de visão computacional são apresentadas como um ferramental quantitativo para análise da propriedade osteocondutora do compósito PCL:I₂/HA. A propriedade osteocondutora do compósito PCL:I₂/HA foi estudada *in vivo*.

No capítulo 3 são apresentadas as propriedades citotóxicas, antimicrobianas e osteocondutoras do compósito PCL:I₂/HA. A caracterização físico-química do compósito foi analisada por técnicas como GPC, ressonância magnética nuclear de prótons (¹H-RMN) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O capítulo 4 apresenta uma discussão a respeito dos resultados gerais obtidos neste trabalho.

O capítulo 6 apresenta as perspectivas futuras com relação às possíveis aplicações dos resultados aqui apresentados.

Adicionamos um apêndice contendo os principais trabalhos publicados e apresentados no decurso deste trabalho.

1. Introdução

A perda óssea ocasional ocorre por diversas causas, como tumores, e fraturas, ou até mesmo pela idade. Na área odontológica, por exemplo, a perda dos elementos dentários ocasiona reabsorção gradativa do alvéolo, que faz parte do tecido de sustentação dos dentes. Essa perda causa transtornos estéticos, funcionais e psicológicos.

Estima-se que mais de 500 mil enxertos ósseos são realizados anualmente nos Estados Unidos, a um custo total de cerca de US\$ 2,5 bilhões. Aproximadamente metade destes procedimentos relaciona-se à fusão da espinha dorsal. Estes números dobram facilmente em escala global e indicam uma falta de doadores de tecidos orgânicos, usados tradicionalmente nestes tipos de reconstrução (Figura 1)^[1,2], o que tem estimulado o crescimento do mercado de fornecedores de materiais para enxertos, como mostra a Figura 2^[2].

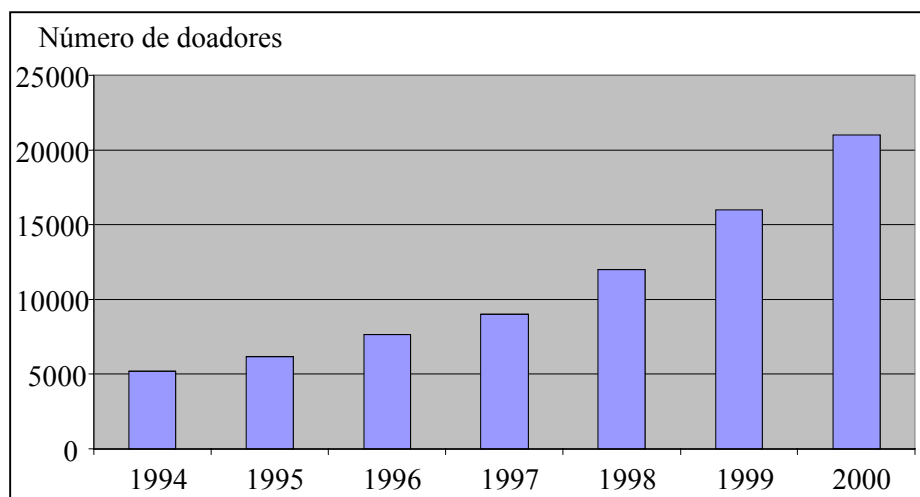


Figura 1 – Número de doadores de órgão e tecido nos EUA^[1,2].

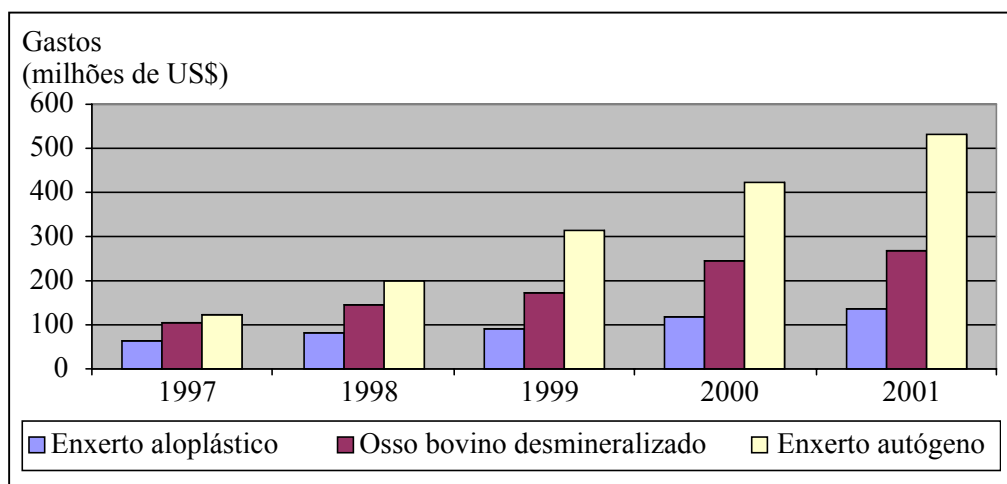


Figura 2 – Evolução dos gastos anuais com três tipos de materiais para enxerto, nos EUA^[1,2].

Os problemas com enxertos, porém, obviamente não se relacionam apenas a questões mercadológicas. Há ainda pelo menos dois aspectos muito importantes a considerar. Primeiro, é fato bem conhecido que as infecções são o principal fator limitante da utilização de materiais sintéticos no organismo biológico. Microorganismos como o *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* e *streptococcus mutans* aderem às superfícies sintéticas, levando ao desenvolvimento de colônias bacterianas. Neste caso, o risco de óbito é grande, uma vez que existe uma real possibilidade de septicemia, ou seja, as bactérias presentes no local onde o material sintético foi depositado podem espalhar-se para o resto do organismo, comprometendo o paciente, cuja saúde já se encontra muitas vezes fragilizada, em decorrência da cirurgia de implante.^[3-5] Segundo, embora o material a ser implantado apresente características antimicrobianas e o iodo seja utilizado como agente antibacteriano, é sabido através da literatura especializada que a utilização de elevadas concentrações deste elemento induz a irritações e processos inflamatórios locais^[4-5]. Assim, é importante que o material desenvolvido não seja citotóxico e consiga ter uma ação contra os microorganismos presente no local do enxerto.



Figura 3 – Osso da região anterior do íliaco, para enxerto^[6].

De forma geral, os enxertos são divididos em quatro grupos a saber: *autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos*^[7].

Os enxertos autógenos (Figura 3) são aqueles onde o material enxertado é retirado de uma área doadora do próprio indivíduo. As regiões doadoras mais usadas são a sínfise da mandíbula (Figura 4), costelas e principalmente a região da crista do osso íliaco^[7-8]. A necessidade de internação, além do risco de infecção, principalmente a hospitalar, tornam este tipo de enxerto contra indicado^[7-8].



Figura 4 – Osso retirado da sínfise da mandíbula para enxerto autógeno^[6].

Os enxertos denominados *alógenos* são aqueles onde o material enxertado é retirado de um doador da mesma espécie de quem receberá o enxerto. Nesse caso, é muito utilizado o tecido ósseo de cadáveres. Entretanto, as severas restrições que alguns países impõem ao comércio de tecido humano e a necessidade da criação de uma rede de bancos de tecido orgânico, estão entre as maiores dificuldades para este tipo de enxerto. O risco de infecções hospitalares e de moléstias transmissíveis, como a hepatite e a *aids*, também limitam a utilização desta técnica na área clínica^[7-9].

Enxertos *xenógenos* (Figura 5) são aqueles em que o material retirado é de um doador de espécie diferente de quem receberá o material enxertado, como no caso da utilização do osso bovino liofilizado^[7-9]. O preparo da matriz orgânica de osso bovino consiste em obter osso cortical ou medular descalcificado, de animais com entre 12 e 15 meses de idade. Após rigorosa lavagem, para eliminação de sangue, gorduras e de todas e quaisquer impurezas, o osso é cortado até atingir a forma desejada. Inicia-se então, um processo de descalcificação seqüencial, com o objetivo de eliminar todo e qualquer material inorgânico (parte mineral). A seguir a matriz é desidratada pelo processo de *liofilização*, processo este que impede a desnaturação protéica^[7-9].



Figura 5 – Osso bovino orgânico liofilizado (Baumer-Genius)^[9].

A grande vantagem deste tipo de enxerto está no aspecto imunológico, já que a matriz orgânica de osso bovino não induz o aparecimento de células linfocitárias. Em pesquisas recentes, foi observado que este material é totalmente reabsorvido após 90 dias no tecido subcutâneo de ratos, o que embasa sua confiável utilização clínica em pacientes humanos^[11].

Enxertos *aloplásticos* (Figura 6) são aqueles em que a área receptora recebe um material sintético; neste caso, muitos materiais podem ser utilizados, como os polímeros, as cerâmicas e os compósitos. Esses materiais, dependendo de suas características, podem permanecer no local, serem reabsorvidos ou servirem de matriz para a deposição do tecido ósseo. Por isso, os materiais sintéticos precisam apresentar algumas características que permitam sua utilização na medicina^[7].



Figura 6 – Material aloplástico (hidroxiapatita) para enxertos^[10].

Quando um biomaterial é enxertado em um organismo vivo, dois principais aspectos devem ser considerados: A influência do meio fisiológico, que pode alterar a natureza e propriedades do material sintético e o efeito dos produtos resultantes da biodegradação, nos fluídos e tecidos que envolvem o implante.

A biocompatibilidade pode ser definida como um estado de co-existência entre o material e o ambiente fisiológico, de tal forma que ambos não produzam efeitos indesejáveis um sobre o outro^[7-8]. Essa definição é bastante genérica, sendo necessário que a biocompatibilidade seja considerada no contexto da aplicação específica. De uma maneira geral, para qualquer tipo de aplicação, os principais requerimentos que o biomaterial deve satisfazer para um enxerto permanente são os seguintes:

- ser resistente à corrosão ao entrar em contato com os fluídos fisiológicos,
- não liberar resíduos que alterem a composição eletrolítica do tecido ou plasma sanguíneo,
- não modificar a natureza das proteínas do plasma sanguíneo ou conduzir a formação de carcinomas^[7].

Na Figura 7, podemos observar a interação de um material biocompatível, o titânio, com o osso.

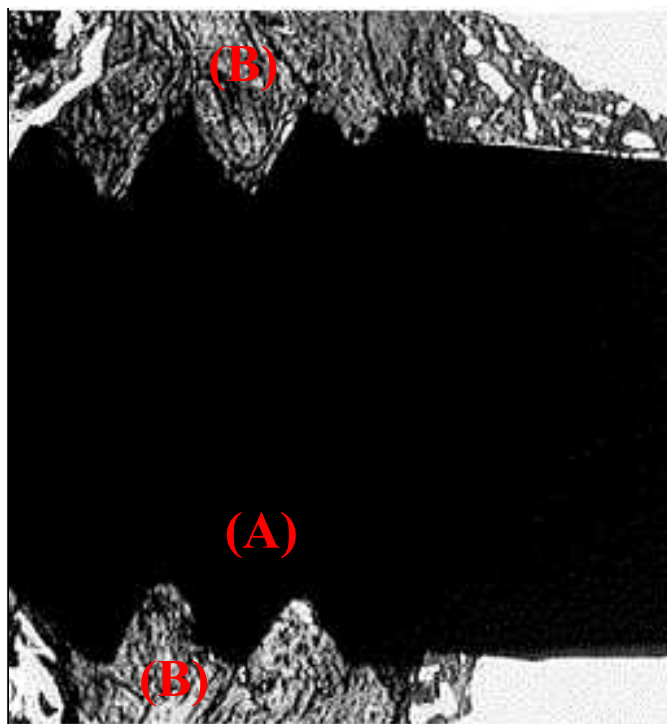


Figura 7 – Pino de titânio (A) implantado para receber uma prótese dentária, com excelente biocompatibilidade com o osso periférico (B)^[13].

Os materiais sintéticos precisam ser bioinertes, ou seja, devem exercer uma função de substituição em relação aos componentes biológicos sem, no entanto, apresentar qualquer atributo terapêutico e sem proporcionar nenhuma troca de energia ou provocar reações químicas. O poli (tetrafluoretileno) (PTFE) é um exemplo de material bioinerte, muito utilizado como membranas para proteção de cavidades óssea que estão em processo de regeneração e no recobrimento de próteses de cabeça de fêmur para diminuição do atrito ^[7-9].

Outra característica importante, seria a *biodegradabilidade* do material. Este termo está frequentemente associado aos materiais com capacidade de serem degradados por células com a ajuda de enzimas. Biomateriais biodegradáveis são de grande interesse para as aplicações em medicina por apresentarem duas importantes vantagens. Primeiramente, eles não provocam reações inflamatórias permanentes, pois embora sejam corpos estranhos enxertados, serão gradualmente absorvidos pelo organismo, de modo a não deixar qualquer traço no local enxertado. Depois, estes biomateriais têm sido desenvolvidos para serem utilizados em *regeneração* de tecidos orgânicos. Entre tantos materiais biodegradáveis, podemos citar alguns utilizados em medicina, como o *ácido polilático*, *ácido poliglicólico* e a *polidiaxanona*^[12]. A Figura 8 ilustra o mecanismo de polimerização e a estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis.

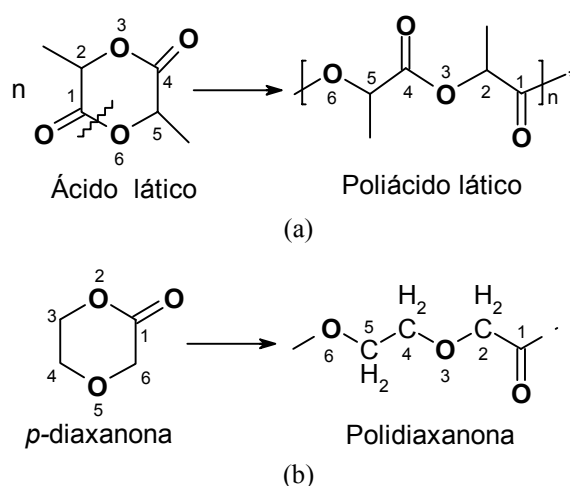


Figura 8 – Mecanismo de polimerização e estrutura química de dois polímeros biodegradáveis utilizados em biomedicina: (a) ácido polilático. (b) polidiaxanona^[14].

A *osteointegração* é outra característica de grande relevância para que um material possa ser utilizado em enxertos. Consiste no contato mecânico entre o material e o tecido ósseo permanentemente livre de infecções e inflamações. Dentre os materiais biointegráveis mais utilizados estão o titânio e a hidroxiapatita^[15]. A Figura 9 ilustra a área de contato entre o tecido ósseo e um implante de titânio demonstrando osteointegração entre o implante e o osso.



Figura 9 – Radiografia mostrando uma boa osteointegração entre a prótese de cabeça de fêmur e o osso^[18].

Materiais *osteogênicos* são materiais orgânicos, utilizados em enxertos ósseos, capazes de estimular a formação óssea a partir dos osteoblastos^[7,16-17].

Materiais *osteocondutores* permitem a aposição de um novo tecido ósseo na superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras^[7,16-17].

A Tabela 1 mostra algumas informações sobre alguns dos materiais mais utilizados em medicina de acordo com a classificação acima.

Tabela 1 – Principais materiais utilizados em enxertos^[20].

<i>Companhia</i>	<i>GenSi orthoBiologics</i>	<i>Interpore cross International</i>	<i>Medtronic sofamor</i>	<i>Zimmer</i>
<i>Nome comercial</i>	OrthoBast™	ProOsteon® 500R	InFuse™	Collagraft™
<i>Composição</i>	copolímero com partículas ósseas e bpms.	hidroxiapatita	colágeno com bpms.	mistura de ha, fosfato tricálcio e colágeno bovino.
<i>Mecanismo de ação</i>	osteocondução; bioreabsorvível; osteoindução limitada.	osteocondução; bioreabsorvível	osteoindução; bioreabsorvível.	osteocondução; osteoindução; bioreabsorvível.
<i>Forma de estudo</i>	estudo em animais e em cultura de células.	estudo em humanos e animais.	estudos em humanos e animais.	estudo em humanos, animais e em cultura de células.
<i>Forma comercial utilizada</i>	pasta injetável.	partículas	esponjas e partículas de diversos tamanhos.	pequenas fitas.
<i>FDA status</i>	não regulamentado	aprovado	Recomendado para aprovação.	Aprovado

1.1. Breve histórico sobre materiais para enxertos

A utilização de materiais sintéticos como enxerto remonta a 1894, ano em que foi relatado uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para o osso. Entretanto, a baixa resistência mecânica e a rápida reabsorção pelo organismo fizeram do $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ um material de pouca utilização^[19].

A década de 70, já no século passado, marcou o início do uso mais intenso de materiais sintéticos com propriedades que possibilitam a sua utilização em enxertos ósseos. A primeira biocerâmica com uso muito difundido na área ortopédica neste período foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). Devido à sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, este material vem sendo utilizado até os dias atuais em próteses ortopédicas que substituam total ou parcialmente ossos que, na sua atividade funcional, sejam submetidos a esforços elevados. Exemplos típicos do emprego da alumina são as próteses para substituição da cabeça do fêmur, que faz a articulação com o ílaco^[19].

O uso de biomateriais em enxertos ósseo tem se estendido desde o emprego isolado de cerâmicas ou metais, até outras formas de utilização como, por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno^[7,19]. Além da alumina densa, outros biomateriais, como o dióxido de titânio (TiO₂), a hidroxiapatita e materiais poliméricos, têm sido utilizados atualmente em enxertos ósseo.

A diversidade dos biomateriais e suas aplicações na área médica são mostradas pela Tabela 2.

Tabela 2 – Aplicações clínicas de alguns materiais sintéticos na biomedicina.

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<i>Polímeros</i>			
Poliétileno			Suturas
PTFE	Elasticidade	Baixa resistência	Cimento
Poliuretano	Baixa densidade	Biodegradabilidade dependente do tempo	Implantes
PMMA			Enxertos
Silicona			
<i>Metais e Ligas</i>			
	Alta força de tensão		
Aço Inoxidável	Alta resistência ao desgaste	Corrosão; Alta densidade;	Fixação ortopédica
Liga de Titânio	Energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade	Implantes
<i>Cerâmicas</i>			
Alumina	Boa biocompatibilidade		Enxertos
Zircônia	Resistência à corrosão	Baixa força de tensão;	Próteses
Porcelana	Alta resistência a compressão	Baixa resistência mecânica	Válvulas
Hidroxiapatita			
<i>Compósitos</i>			
	Boa biocompatibilidade		Válvulas cardíacas
TiO ₂ -PTFE	Resistência a corrosão	Material de fabricação incompatível	Enxertos
HA-Colágeno	Alta força de tensão		Próteses

1.2. Aspectos gerais do tecido ósseo

O tecido ósseo exerce três funções básicas e importantes no organismo, a *sustentação, hematopoiese e homeostasia do cálcio e fósforo*^[7]. Esse tecido se

divide em três componentes importantes, o osso cortical que apresenta vários canais denominado sistemas de Havers, onde encontramos um canal central envolto por lamelas concêntricas de tecido ósseo, compostas por colágeno do tipo I mineralizado. Perpendicularmente aos canais de Havers (Figura 10) encontramos canais de menor calibre denominados canais de Volkmann por onde passam veias e artérias que alimentam os ossos, transportando oxigênio e nutrientes ou coletando o CO_2 e os resíduos metabólicos^[7].

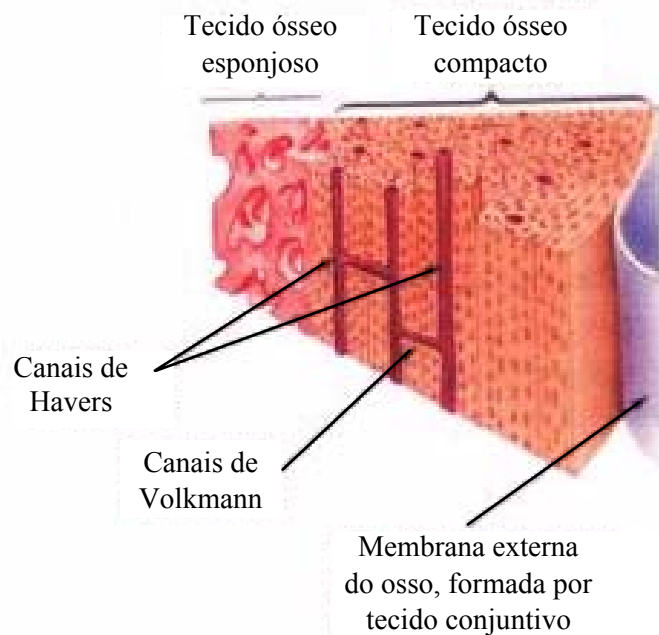


Figura 10 – Esquema da estrutura do osso, mostrando os canais de Volkmann e Havers^[21].

O osso trabecular encontra-se na porção interior, e é constituído por trabéculas (Figuras 11 e 12), que formam um mosaico estrutural exibindo múltiplos osteoplastos, onde se localizam os osteócitos. A medula óssea encontrada no interior do osso trabecular exerce uma função metabólica importante de regulação mineral e pode ser dividida em: medula vermelha, medula amarela e medula branca. A medula vermelha é responsável pela produção de células sanguíneas e osteoprogenitoras, e após uma certa idade, fica confinada no interior dos ossos longos como o fêmur e úmero. A medula amarela aparece no tecido ósseo após a adolescência e é formada pelo tecido adiposo.

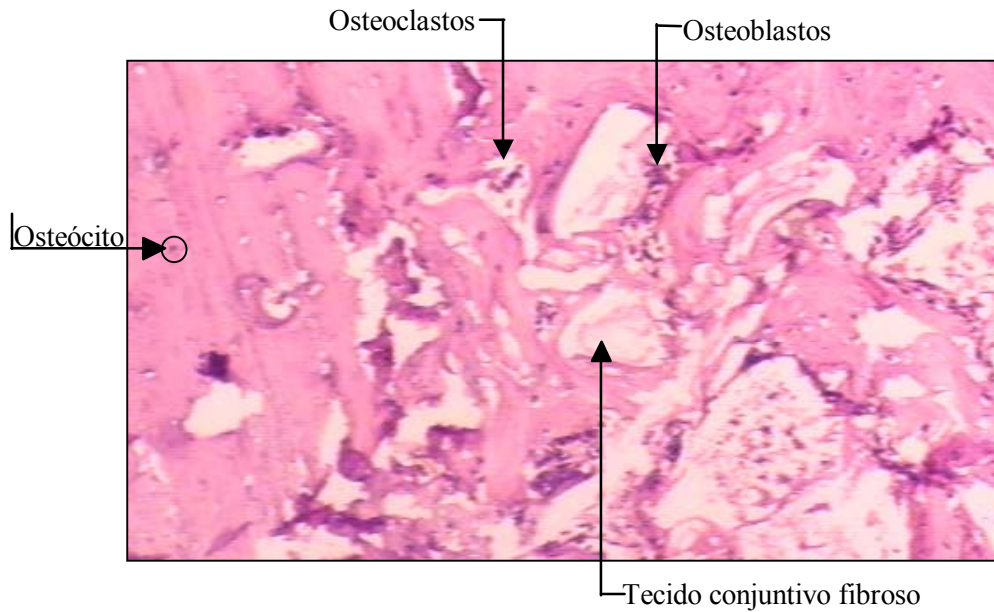


Figura 11 – Micrografia óptica do tecido ósseo em regeneração (20 dias) corado com HE. Aumento de 40x.

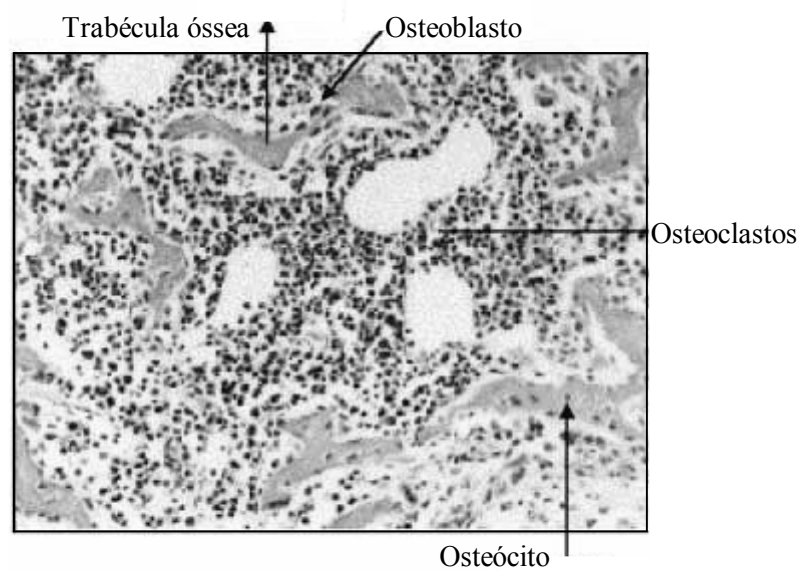


Figura 12 – Micrografia óptica de corte histológico do tecido ósseo corado com HE. Aumento de 40x^[22].

O osso é constituído por duas porções, a orgânica e a inorgânica. A porção orgânica é formada pelas células ósseas e pela matriz orgânica. As células ósseas são as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos

(Figura 11). As células osteoprogenitoras encontradas também na medula óssea e no perióstio dão origem a outras células da linhagem medular.

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz colágena (colágeno e proteoglicanos) e encontram-se no osso adulto nas regiões periféricas e superficiais. São células mononucleadas que apresentam retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi bem desenvolvidos.

Os osteócitos são na realidade os próprios osteoblastos que após a disposição da matriz óssea ficam aprisionados em seu interior. Eles se comunicam entre si, através de prolongamentos citoplasmáticos, formando junções firmes, que os permitem regular o metabolismo do tecido ósseo.

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, e essa reabsorção ocorre quando os lisossomos liberam enzimas para o exterior das células, criando um ambiente próprio onde a parte mineral seria reabsorvida pela ação de enzimas ácidas.

A remodelagem óssea envolve vários elementos, há grupos celulares responsáveis pela reabsorção, formação e mineralização de um determinado osso. Os osteoclastos são células grandes, com muitos núcleos, formadas na medula óssea e que, quando estimuladas, aparecem na superfície do osso. Estas células secretam enzimas proteolíticas e ácidas que reabsorvem a matriz óssea, formando pequenos túneis e liberando para a corrente sanguínea o cálcio^[2,7].

Quando os osteoclastos saem das áreas dissolvidas, aparecem os osteoblastos, cerca de 100 a 150 para cada osteoclasto, para a formação do novo osso. No passo seguinte, temos os osteoblastos imersos na matriz do novo osso e passando a se chamar osteócito. Os osteócitos levam nutrição ao osso e ajudam a remover a matriz óssea^[2,7].

Há vários fatores que participam da remodelação óssea e controlam a relação cálcio e fósforo, entre eles temos a ação da interleucina 6, vitamina D e prostaglandinas^[2,7].

Sabe-se que as prostaglandinas atuam na reabsorção óssea, cujo efeito pode ser explicado pela ação mediadora que as prostaglandinas tem sobre a vitamina D e a interleucina I, um potente mediador químico que estimula a reabsorção óssea^[2,7].

A interleucina I é uma substância enzimática, que é liberada após a formação de processos inflamatórios no osso. A interleucina I atua se ligando aos receptores osteoclásticos, e estimulando esses mesmos osteoclastos na reabsorção óssea.

A vitamina D é sintetizada a partir da irradiação da pele pelo sol. Na pele encontramos um lipóide, o 7 dihidro-colesterol que, irradiado dá origem ao calciferol. O calciferol (Vitamina D) pode ainda ser adquirido na dieta, sendo as fontes mais importantes o óleo de fígado de bacalhau, a manteiga e a gema de ovo.

O calciferol é armazenado no tecido adiposo e quando necessário chega ao fígado, onde recebe uma hidroxilação na posição do carbono 25, transformando-se em 25-hidroxicalciferol (Vitamina D2). Do fígado chega ao rim onde recebe nova hidroxila, agora, na posição do carbono 1. Desta forma, surge a Vitamina D3 ou o 1,25-dihidroxicalciferol. Seu papel na absorção do cálcio se resume na catalização da formação da proteína ligante ao cálcio, que o transporta através da mucosa até as células do tecido ósseo^[2,7].

Os osteoblastos e osteoclastos possuem receptores para a Vitamina D, assim ela atua no osso, estimulando a atividade osteoclástica, que promove a reabsorção óssea.

A Figura 13 mostra a estrutura química da prostaglandina e a Figura 14 à estrutura química da Vitamina D.

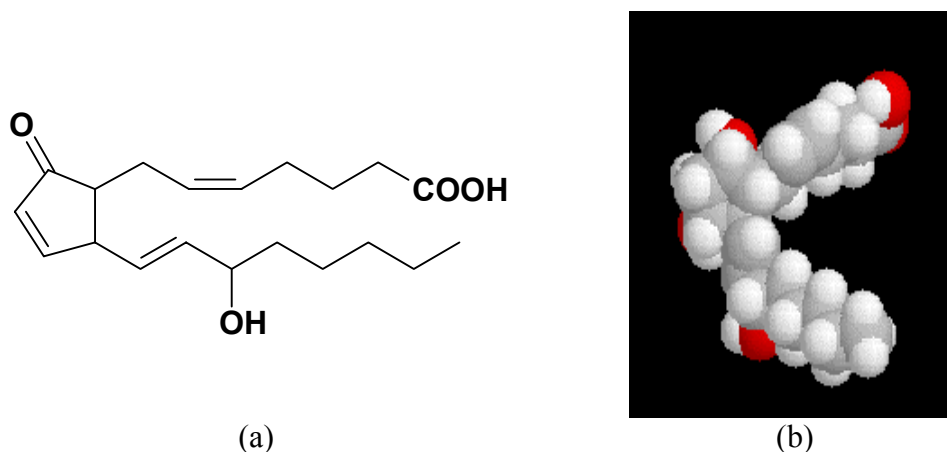


Figura 13 – Prostaglandina: (a) Fórmula estrutural; (b) Estrutura química^[22].

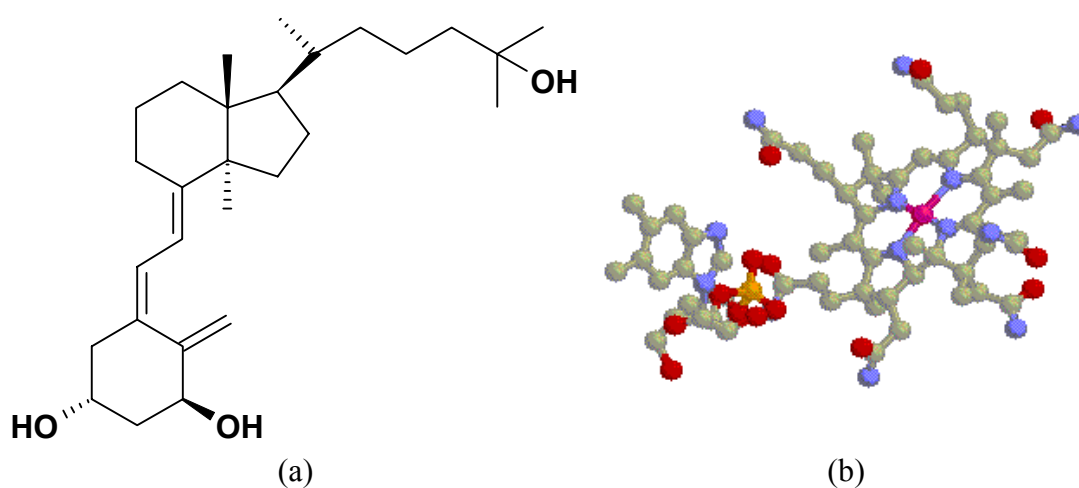


Figura 14 – Vitamina D: (a) Fórmula estrutural; (b) Estrutura química^[23].

A matriz orgânica corresponde à cerca de 25% m/m do tecido ósseo, e seu componente principal é o colágeno, que representa por volta de 90% m/m dessa matriz, a porção orgânica restante é formada por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas e fosfolipídeos^[7].

Os glicosaminoglicanos são mucopolissacarídeos ácidos dos ossos, formados por grandes cadeias de polissacarídeos sendo a unidade repetitiva formada por ácido urônico e hexosamina acetilada, que pode ou não estar sulfatada.

Por sua riqueza em grupos ácidos os glicosaminoglicanos estão carregados negativamente e tendem a atrair cátions como o Ca^{++} . Por isso, os glicosaminoglicanos estão relacionados à mineralização óssea, visto que eles atraem para o tecido ósseo íons de Ca^{++} que são depositados na matriz orgânica. A Figura 15 ilustra a estrutura química dos principais glicosaminoglicanos [7].

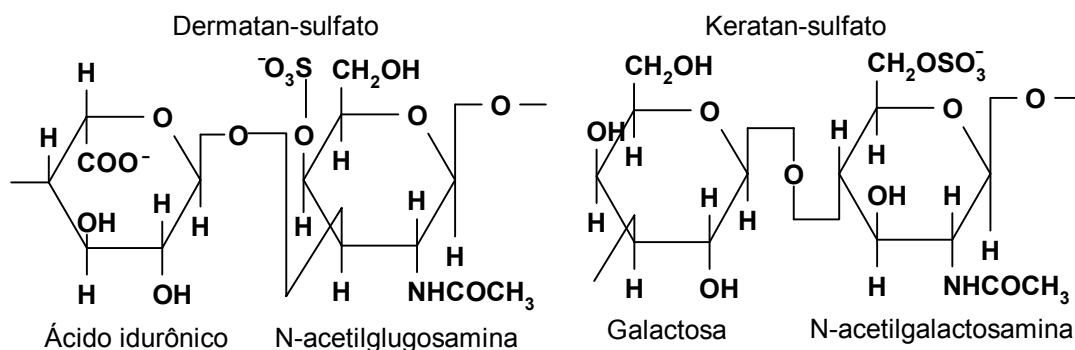


Figura 15 – Estrutura química de dois principais glicosaminoglicanos.

A substância entre as células do tecido conjuntivo ósseo contém polissacarídeos característicos, antigamente chamado de mucopolissacarídeos, atualmente conhecidos como proteoglicanos. São polímeros lineares, com unidades repetitivas de dissacarídeos compostos por derivados da hexose.

As glicoproteínas são compostos formados pela associação de uma proteína a um grupo de carboidrato. As glicoproteínas formam uma matriz extracelular que se caracteriza pela capacidade de interagir com os componentes extracelular e as células conjuntivas. [7,24]

Fosfolipídios são uma classe de lipídios polares compostos de uma parte de fosfato, uma ou mais moléculas de ácidos graxos e vários grupos químicos esterificados ao fosfato. Fosfatidilserina, fosfatidilinositol e cardiolipina são exemplos típicos. A maioria dos fosfolipídios é formada no fígado. Os fosfolipídios funcionam principalmente como elementos de suporte para a membrana plasmática [7,24].

A Figura 16 ilustra uma membrana plasmática, onde podemos observar os fosfolípidios e as glicoproteínas.

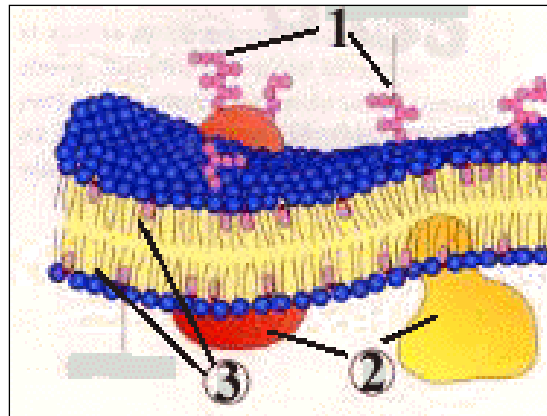


Figura 16 – Corte esquemático de uma membrana plasmática de célula animal. (1) Glicoproteínas; (2) Proteínas; (3) Fosfolípidios^[25].

Os componentes inorgânicos da matriz óssea são principalmente o cálcio e o fósforo que estão organizados em uma estrutura cristalina, a hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH}_2)]$ (Figura 17) que constitui cerca de 50% do peso total da matriz óssea. A deposição de hidroxiapatita se faz ao longo das fibras de colágeno em sítios especiais. Outros íons como o sódio, potássio, flúor, estrôncio, magnésio, citrato e o carbonato, também estão presentes, em menores proporções, nos cristais de hidroxiapatita^[25]. A associação da hidroxiapatita com fibras do colágeno é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo^[1,27].

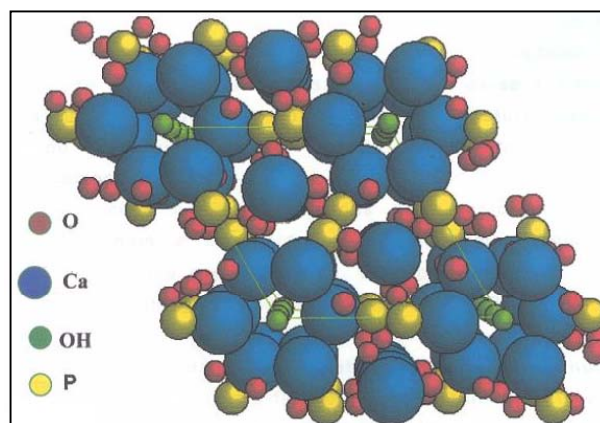


Figura 17 – Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita^[26].

1.3. Aspectos gerais do uso da Hidroxiapatita como enxerto

Atualmente a hidroxiapatita, tem merecido um lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por apresentar ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e boa biocompatibilidade com o tecido ósseo. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química da hidroxiapatita, que por ser formada basicamente por íons de cálcio e fosfatos, participa ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e o material enxertado^[1,27-28].

Entretanto a utilização HA em enxertos ósseo tem apresentado algumas dificuldades quando utilizada como material osteocondutor. Sua deposição na cavidade a ser reparada pode retardar a reparação óssea, pois, além de diminuir o espaço, a HA funciona como uma barreira para o crescimento celular, dificultando a penetração de células osteoprogenitoras na cavidade óssea^[1,27-28].

A Figura 18 mostra um quadro comparativo entre vários materiais utilizados em enxertos, enfatizando que apesar de suas características biocompatíveis, a HA quando utilizada sozinha em implantes, não apresenta bons resultados na reparação óssea^[1,27-28].

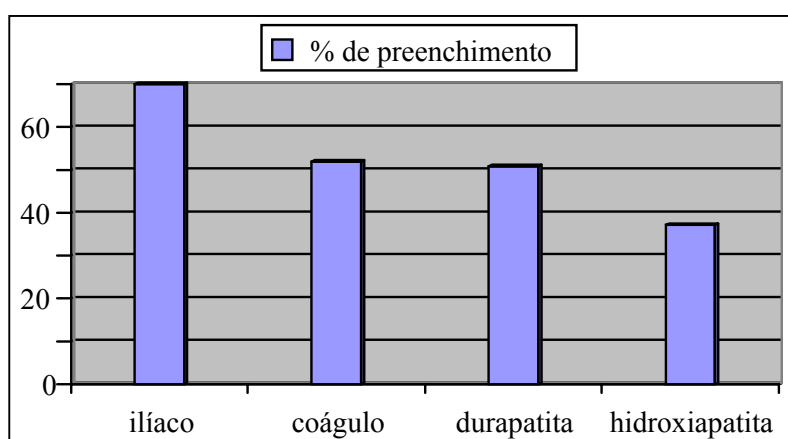


Figura 18 – Eficiência de alguns biomateriais em enxertos ósseo^[28].

Estudos histológicos tem demonstrado uma pequena tendência a formar uma camada de tecido mole encapsulando a hidroxiapatita^[7]. Outros investigadores sugerem que existe uma união perfeita entre o osso e a HA, sem interposição do tecido mole. Estes dados contraditórios indicam a dificuldade de se estabelecer um padrão no que diz respeito à forma com que o tecido ósseo reage quando entra em contato partículas de HA^[7,15].

Após a instalação da HA na cavidade óssea, existem três possíveis respostas que podem ocorrer nos tecidos do hospedeiro. Primeiro, um processo inflamatório agudo ou crônico que pode resultar na perda precoce do enxerto. Segundo, uma encapsulação por tecido conjuntivo fibroso, resultando em falha da osteointegração entre a HA e o tecido ósseo. Terceiro, a resposta mais positiva, a formação de um tecido ósseo vivo em torno dos cristais de HA, de forma previsível e duradoura, estabelecendo um contato mecânico que resulta na osteointegração entre a HA e o tecido periférico ósseo. Cabe ressaltar que a área de contato entre o osso e o implante é de fundamental importância para o processo de reparação do tecido ósseo. Assim, estudos apontam na literatura especializada que uma maior osteointegração é observada quando o material implantado é recoberto com hidroxiapatita^[51-32]. A Figura 19 ilustra a influência da HA na osteointegração entre o implante de titânio e o osso.

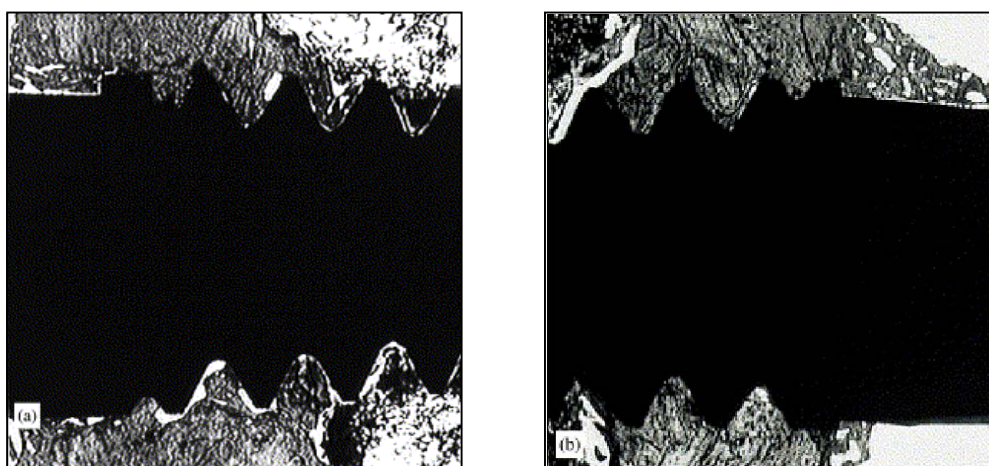


Figura 19 – (a) Micrografia mostrando a área de contato entre o implante de titânio e o osso, demonstrando áreas com baixo grau de osteointegração. (b) micrografia eletrônica mostrando a biocompatibilidade na área de contato entre o implante, coberto com HA, e o osso^[29].

1.4. Uso de polímeros em enxertos

Com o objetivo de melhorar as propriedades da cerâmica de HA quanto à sua utilização em processos de reparação óssea, vários trabalhos têm ressaltado a obtenção de compósitos formados por polímeros biodegradáveis.

A utilização de compósitos polimérico-cerâmicos como material para implantes ortopédicos e enxertos tem sido objeto de intensa pesquisa e desenvolvimento. A presença do polímero pode ser importante, já que à sua biodegradabilidade, faz com que inúmeros espaços sejam criados à medida que ele vai sendo absorvido pelo organismo, permitindo assim que na área enxertada ocorra a formação de vários condutos que poderão ser colonizados por células formando uma rede nutritora na região de crescimento ósseo. Desta maneira facilita-se a penetração das células osteoprogenitoras no local, induzindo o crescimento de um novo tecido ósseo.

Dentre tantas propriedades já citadas, é de muita importância que o material enxertado seja histocompatível, pois o mesmo ao entrar em contato com o tecido biológico não poderá induzir reações indesejáveis tais como: infecções, reações inflamatórias e rejeição do material que foi enxertado.

Vários polímeros biodegradáveis têm sido desenvolvidos nas últimas três décadas para utilização em biomedicina, só nos EUA foram investidos cerca de 300 milhões de dólares no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis em 1998^[53]. Estes polímeros quando enxertados, precisam manter suas propriedades mecânicas até que ele seja absorvido e eliminado totalmente pelo corpo.

O principal mecanismo de biodegradação dos polímeros é a hidrólise química simples e ocorre em duas fases. Primeiramente, a água existente nos fluídos orgânicos e no meio extracelular é absorvida pelas cadeias poliméricas implantadas. Esta água absorvida irá atacar preferencialmente as ligações químicas da fase amorfa do polímero, convertendo as longas cadeias poliméricas

em cadeias menores. Nesta primeira etapa há uma redução do peso molecular sem, no entanto, haver perda das propriedades físicas do polímero, desde que as matrizes das cadeias poliméricas sejam mantidas ainda juntas pelas regiões cristalinas. A redução do peso molecular é logo seguida pela perda das propriedades físicas, pois a água absorvida pela cadeia polimérica inicia a quebra das cadeias poliméricas menores. Na Segunda fase, os fragmentos poliméricos restantes são atacados e metabolizados por enzimas, resultando em uma rápida perda de massa do polímero. Em seguida as moléculas resultantes da biodegradação polimérica são eliminadas pelo organismo^[33-34].

Alguns fatores podem acelerar a biodegradação polimérica, são eles: A cadeia principal do polímero ser mais hidrolítica e mais reativa, assim como as extremidades da cadeia polimérica. Cadeias poliméricas menos cristalinas, maior porosidade e tamanho menor do polímero^[33-34].

A Tabela 3 mostra os principais polímeros biodegradáveis e suas características e aplicações.

Tabela 3 – Propriedades e características de alguns polímeros biodegradáveis^[35].

Polímeros	Características	Tempo de biodegradabilidade	Utilização
Poliácido glicólico (PGA)	Poliéster linear de cadeia alifática.	6 a 12 meses	Sutura, dispositivo para angioplastia.
Polidioxanona (PDO)	Poliéster-éster polimerizado pela abertura do anel.	6 a 12 meses	Sutura
Poliácido láctico (PLA)	Polímero de cadeia cíclica que apresenta dois isômeros, o <i>lpla</i> e o <i>dlpla</i> .	Mais que 24 meses	Sutura e membranas para regeneração guiada.
Poliácido láctico co-glicólico	90% ácido glicólico 10% ácido láctico (<i>Ethicon</i> [®]).	3 a 4 meses	Sutura e recobrimento de placas e parafusos em fixação ortopédica.

A poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster com características hidrofóbicas devido à presença de cinco grupos metileno não-polares e um único grupo polar éster em cada unidade repetitiva. A PCL tem sido objeto de intensa pesquisa e desenvolvimento, como por exemplo, polímero reabsorvível para uso em implantes ortopédicos e enxertos ósseos devido as suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, bem como a manutenção de suas propriedades mecânicas mesmo depois de um certo tempo implantado. Outras aplicações do PCL citadas pela literatura são, fios de sutura e sistema de liberação controlada de drogas^[36-38].

A Figura 20 ilustra o mecanismo de polimerização e a estrutura química do polímero PCL.

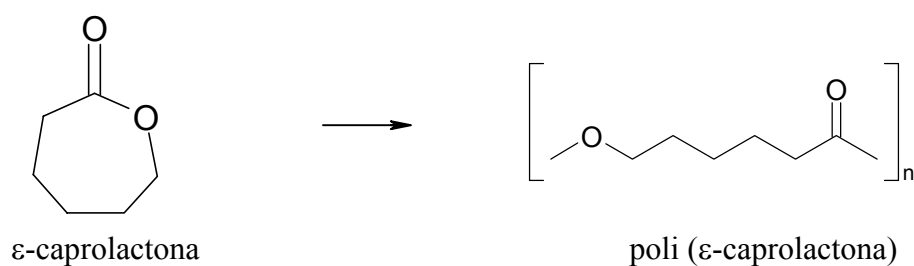


Figura 20 – Polimerização por abertura do anel para obtenção da poli (ϵ -caprolactona)^[36].

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo investigar:

- O processo de reparo ósseo induzido pelo compósito bioativo PCL:I₂/HA.
- A atividade citotóxica do compósito PCL:I₂/HA.
- As propriedades antimicrobianas do compósito PCL:I₂/HA.

3. Experimental

3.1. Síntese do compósito PCL:I₂/HA

O monômero ϵ -caprolactona (Aldrich/Sigma) foi utilizado como recebido. A cerâmica hidroxiapatita (HA) fornecida pela empresa Intra-Lock, possuía grau de pureza apropriado para utilização em medicina.

O compósito PCL:I₂/HA foi obtido após polimerização por abertura de anel via complexo de transferência de carga do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL) conforme descrito em trabalhos anteriores. Uma suspensão de ϵ -CL/HA foi obtida de forma a obter-se uma proporção de polímero/cerâmica 1:1. O reator de polimerização foi purgado com N₂ gasoso de forma a atingir-se uma atmosfera inerte, sendo em seguida adicionado o I₂ como iniciador do processo de polimerização. Após o processo de polimerização, o compósito PCL:I₂/HA foi precipitado pela adição de etanol em excesso. O polímero resultante foi lavado várias vezes com solução aquosa de tiosulfato de sódio 5% (m/v), água destilada, e seco sob vácuo à temperatura ambiente (25°C) utilizando-se o CaCl₂ como agente dessecante.^[36,38-39]

3.2. Caracterização físico-química do compósito PCL:I₂/HA

O polímero PCL:I₂ foi caracterizado por ressonância magnética nuclear de prótons (¹H-NMR) e cromatografia de permeação em gel (GPC).

3.2.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC) do compósito PCL:I₂/HA

O peso molecular do polímero poli (ϵ -caprolactona) foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC). Na análise por GPC, o solvente THF foi utilizado como eluente (fluxo 1,0 mL.min⁻¹, pressão 550 psi). A curva de

calibração foi determinada com polietileno glicol (PEG) de pesos moleculares 194, 960, 4.250, 18.600, 64.700 e 450.000 g.mol⁻¹, respectivamente^[36,38-39].

O sistema analítico consistiu de um cromatógrafo HPLC-510 da Waters equipado com detector 2414 (índice de refração). Foram utilizadas colunas de Plgel acopladas em série (10⁴ Å + 10³ Å + 10² Å, tamanho de partícula = 5 µm). O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. A aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados com software SW da Waters Breeze 3.3. A empresa Petroquímica União/SP gentilmente realizou as análises por GPC^[36,38-39].

Os pesos moleculares numérico (\overline{Mn}) e ponderal (\overline{Mw}) médios foram calculados por:

$$\overline{Mn} = \frac{\sum hi}{\sum \left[\frac{h.i}{hi/s(M.p/si)^t} \right]} \quad \text{e} \quad \overline{Mw} = \frac{E \sum hi.s.(M.p/s)_i^t}{\sum hi}$$

O termo (M.p/s)_i representa o peso molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por h_i e i, respectivamente. Os termos s e t são constantes experimentais, características do equipamento utilizado^[36,38-39].

3.2.2. Caracterização do polímero PCL:I₂ e do compósito PCL:I₂/HA por microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura do compósito PCL:I₂/HA foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em um suporte metálico e após deposição de ouro foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Phillips modelo XL 30 (IPEN/USP). A Figura 21 mostra o MEV utilizado neste trabalho^[36,38-39].



Figura 21 – Microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 (IPEN/USP) utilizado para a análise do compósito PCL:I₂/HA.

3.2.3. Caracterização por ¹H –RMN do polímero PCL:I₂

Para a análise de ressonância magnética nuclear de prótons ¹H-RMN, o polímero PCL:I₂ foi dissolvido em clorofórmio deuterado e os deslocamentos químicos correspondentes em partes por milhão (ppm) foram medidos utilizando-se como padrão interno o tetrametilsilano^[36,38-39]. Os espectros ¹H-RMN foram obtidos num espectrômetro Varian UNITY-400 como representado na Figura 22.



Figura 22 – Espectrômetro utilizado para caracterização do polímero PCL:I₂.

3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1. Atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA

É fato bem conhecido que a infecção é um dos principais fatores limitante no que concerne a utilização de materiais sintéticos no organismo biológico. Microorganismos como o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* aderem sobre as superfícies sintéticas dos materiais enxertados, levando ao desenvolvimento de colônias bacterianas. Neste caso, o risco de óbito é grande, uma vez que pode ocorrer septicemia, ou seja, um grupo de bactérias presente no local onde o material sintético foi introduzido, se espalha para o resto do organismo comprometendo o paciente com saúde, muitas vezes já fragilizada devido à cirurgia de implante^[3-5,38-42].

Vários compostos bioativos foram introduzidos na prática clínica para a prevenção da infecção, sendo o iodo utilizado há mais de 150 anos para prevenir infecções e tratar feridas. Sua rápida ação bactericida e o seu amplo espectro de ação possuem eficácia comprovada pela literatura contra a maioria das bactérias, fungos, vírus e protozoários. O iodo parece atuar por interação direta com a membrana plasmática, quebrando as ligações das proteínas e das moléculas de DNA, causando a morte do microorganismo^[3-5,38-42].

Uma vez que o compósito PCL:I₂/HA foi produzido através da reação por abertura de anel do monômero ϵ -CL iniciado pelo iodo, o potencial antimicrobiano do compósito PCL:I₂/HA, deve ser analisado. Para tanto, foi coletada a secreção salivar de um paciente para seleção dos microorganismos de interesse neste estudo, a saber: *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*^[38-42].

O *Escherichia coli*, uma bactéria gram negativa, existe normalmente na flora intestinal humana, ela penetra no aparelho digestivo ou no aparelho respiratório juntamente com a alimentação ou água contaminadas, ou ainda, envolvidas com as poeiras do ar.^[35-36]

O *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram positiva frequentemente encontrada em ambientes cirúrgicos, é responsável por várias formas de infecção hospitalar, sendo muitas vezes detectadas nos mais variados tipos de implantes^[38-42]. A Tabela 4 mostra os principais microorganismos encontrados em cirurgias de implantes.

Tabela 4 – Relação de alguns microorganismos e suas principais ocorrências^[24,42].

Microorganismos	Características	Principais ocorrências
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	Cirurgia ortopédica e infecções hospitalares
<i>P. gingivalis</i>	Gram +	Implantes orais
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Cirurgias do trato gastrointestinal.
<i>S. dermis</i>	Gram +	Cirurgias ortopédicas
<i>Candida albicans</i>	Fungos	Cirurgias de implantes em geral e próteses.

Para o ensaio da atividade antimicrobiana, foi coletada com um cotonete uma amostra de secreção salivar de um paciente homem adulto, 27 anos, 70kg, e semeada em agar sangue e incubado por 24h e 35°C para o crescimento das colônias bacterianas (*Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*). A suspensão bacteriana na escala 0,5 de Mac Farland foi posteriormente semeada em agar Mueller-Hinton, e novamente incubada por 24h a 35°C, para o devido crescimento das colônias bacterianas. A escala de Mac Farland é uma solução padrão de sulfato de bário (0,5% m/v) que quando comparada com a turbidez de um tubo de ensaio onde foi semeada uma espécie bacteriana determina o grau de crescimento bacteriano^[38].

Placas de petri foram semeadas com o microorganismo a ser ensaiado e após solidificação foram acrescidos 20 mg do compósito PCL/HA sobre as colônias bacterianas, já evidenciadas anteriormente. As placas foram incubadas em estufa à 35°C por 24h, e em seguida os diâmetros da zona de inibição formada em torno das culturas de bactérias foram medidos. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas para análise estatística dos dados. A Figura 23 ilustra a técnica para o ensaio da atividade antimicrobiana utilizada neste trabalho.

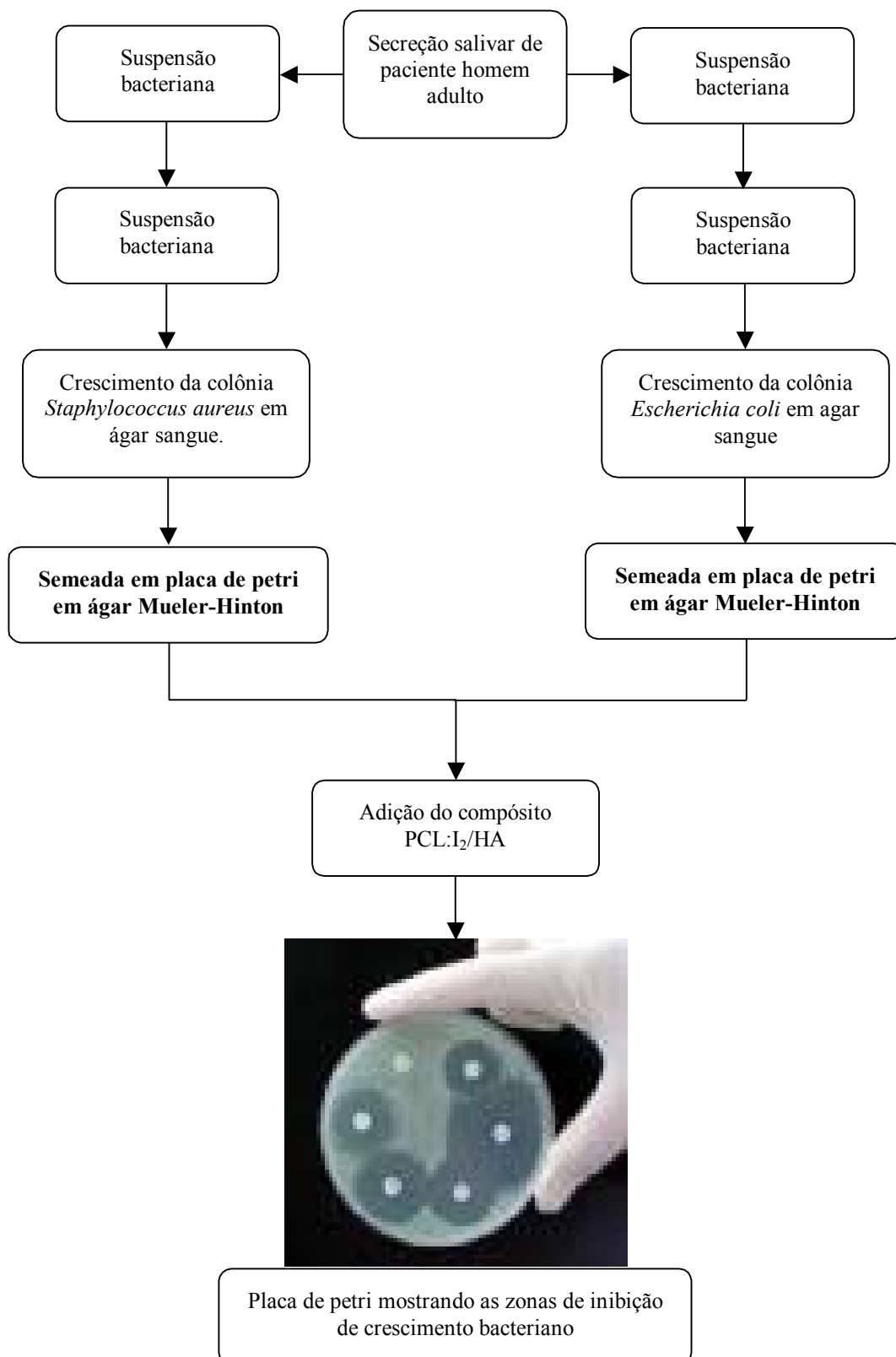


Figura 23 – Fluxograma ilustrando o ensaio da atividade antimicrobiana do composto PCL:I₂/HA. O tamanho do halo indica a bioatividade do composto.

3.3.2. Ensaio da citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA

Embora o iodo seja utilizado como um anti-séptico poderoso, é fato bem conhecido na literatura que elevadas concentrações deste elemento induz à irritação local e a processos inflamatórios seguido de morte celular^[3-5,40-41].

Considerando a possível ação tóxica do iodo no organismo humano, decorrente do uso do compósito PCL:I₂/HA em enxertos por períodos prolongados, torna-se importante analisar a citotoxicidade do compósito, uma vez que é necessário assegurar-se que o material enxertado não poderá causar irritações nem processos inflamatórios no tecido biológico, ou seja, deverá possuir características de biocompatibilidade^[3-5,40-41].

O ensaio da citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA foi realizado em colaboração com o laboratório de biologia molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares–IPEN/USP. As células utilizadas foram de ovário de hamster chinês, ATCC CHO k₁ (American Type Culture Collection) usando o metil tetrazólio (MTT) de acordo com as normas ISSO.^[36,38-39,43]

Extratos do compósito PCL:I₂/HA diluídos em série (50%, 25%, 12,5%, e 6,25%) foram adicionados ao meio de cultura de células CHO. Estas células foram cultivadas em meio MME-FCS, em frascos plásticos à 37⁰C em atmosfera de CO₂ (5% v/v). Após o crescimento celular o meio de cultura foi removido e lavado com solução salina de fosfato de magnésio e cálcio (PBS-CMF, pH = 7,4), e tratado com solução 0,25% (m/m) de tripsina para remoção das células do meio de cultura das paredes do frasco. Após o tratamento com tripsina, as células foram transferidas para um frasco plástico onde foi centrifugada e lavada duas vezes com solução PBS-CMF. As células foram recolocadas em solução MME-FCS sendo diluídas a uma concentração de 1x10² células/mL. No momento do ensaio, um volume de 2,0 mL desta suspensão celular contendo 1x10² células/mL foi distribuída em placas de petri de 15mm x 60mm e incubado por cerca de 5h para que a adesão celular. O meio de cultura foi removido e substituído por 5,0 mL de

MEM-FCS fresco, nas placas de controle, e pelo extrato puro (100%) e sucessivamente pelos extratos diluídos [(50%, 25%, 12,5% e 6,25%)v/v], nas placas de cultura com as células aderidas. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. Após a incubação das placas de cultura por sete dias a 37⁰ C em atmosfera de CO₂ 5% (v/v).^[36,38-39,43]

O meio de cultura foi removido das placas e fixado com solução salina de formalina (10% v/v de formaldeído). Em seguida as colônias foram coradas com solução de Giemsa 4% (v/v). Os números de colônias identificados em cada uma das placas de cultura foram contados e comparados com o número de colônias formadas na placa controle com linhagem celular CHO. Solução de fenol (0,02% m/m) e extratos de HDPE (60g em 60 mL de solução MEM-FCS) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente.^[36,38-39,43]

3.3.3. Atividade osteocondutora in vivo do compósito PCL:I₂/HA

O ensaio biológico da atividade osteocondutora foi realizado *in vivo* de acordo com as normas internacionais de utilização de animais em pesquisa (NIH/EUA e a PL-1153A/95 - Projeto de lei sobre a utilização de animais em atividades de ensino, pesquisa experimentação). Segue descritas abaixo algumas das principais citações desta norma:

- No art. 14 do PL 3.964/97, são fixadas normas para a condução apropriada de experimentos como, por exemplo; a obrigação de sedação, analgesia ou anestesia nos experimentos que possam causar dor ou angústia e eutanásia. É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares, bem como a proibição da reutilização de um mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal da pesquisa. O processo experimental cirúrgico deve ser acompanhado por um profissional de nível superior da área biomédica^[44-45].
- É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou relaxantes musculares em substituição às substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.^[44-45]

- Se, durante o experimento, o animal apresentar sinais de dor ou sofrimento intensos a despeito de anestesia ou analgesia, a dor deve ser imediatamente aliviada e, se isso não for possível, o animal deve ser sacrificado por métodos adequados.^[44-45]

Os animais não sacrificados devem receber os cuidados adequados ao seu estado de saúde sob a responsabilidade de um veterinário ou outra pessoa competente. É vedada a reutilização de um animal já utilizado num experimento que lhe tenha causado sofrimento ou dores violentas ou permanentes, independentemente da recorrência à anestesia ou analgesia.

Neste trabalho, foram utilizados sete coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, adultos, pesando entre 1,5 e 2,3 kg proveniente do biotério do IPEN/USP^[38].

Os animais foram tranquilizados administrando-lhes cloridrato de ketamina, (Ketalar® /Park Davis) com xilazina, (Rompun®/Bayer do Brasil), (3,0 mL, 2g/100mL), para inserção do tubo respiratório, em seguida foi administrado o isoflurano, obtendo-se assim a sedação dos animais, conforme visto na Figura 24.



Figura 24 – Sedação do coelho (*Oryctolagus cuniculus*) com isoflurano para a cirurgia.

Após a anestesia e preparado o campo cirúrgico (Figura 25); foi efetuada a tricotomia das regiões anterior direita das superfícies total das tíbias com lâmina de barbear, seguido de assepsia com povidone (Asta-Med[®]). Foram incisados com lâmina de bisturi números 15, a pele e a fascia muscular em seu sentido longitudinal, com aproximadamente 3,0 cm de extensão, para expor a superfície anterior do osso.



Figura 25 – Fotografia mostrando o local da incisão para exposição da região anterior da tíbia.

Em seguida outra incisão foi praticada sobre o periósteo para permitir seu descolamento, sendo afastado no sentido posterior, obtendo-se assim, excelente área de trabalho (Figura 26).

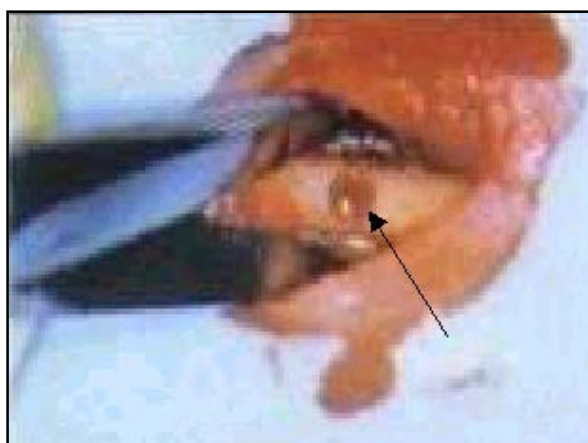


Figura 26 – Aspecto do preparo da cavidade óssea para recebimento do composto PCL:I₂/HA.

Duas pinças foram colocadas para a manutenção e proteção das estruturas moles, uma em cada extremidade óssea. Realizando-se as cavidades na tíbia, com o auxílio de uma broca de fissura número 701 com turbina de alta rotação. Estas cavidades foram preparadas nas superfícies anteriores da tíbia direita, com aproximadamente 3 mm de extensão longitudinal, e 2 mm de extensão transversal; somente às expensas da cortical óssea anterior e espaço medular das tíbias, sem qualquer envolvimento cortical medial. Assim, tornou-se possível a inclusão dos materiais implantares (PCL:I₂/HA, HA, PCL e Sangue), sem exceder o volume da cavidade (Figura 27).

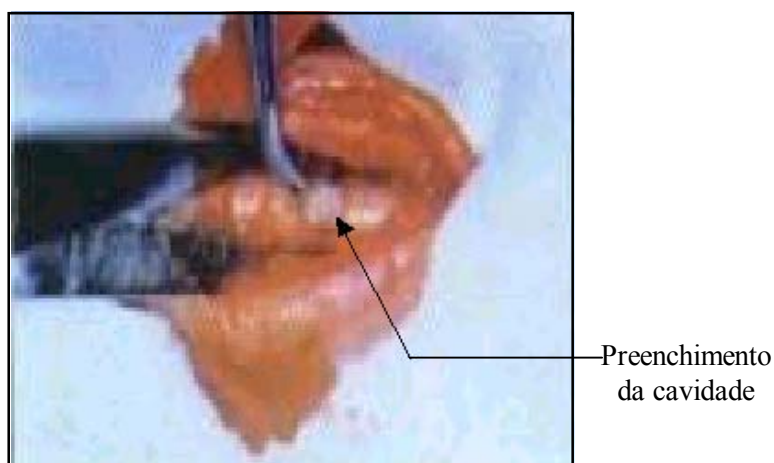


Figura 27 – Cavidade preenchida com o composto PCL:I₂/HA.

Na tíbia direita de um dos animais não foi implantado nenhum material sendo ela preenchida apenas com sangue. O sangue foi utilizado para efeitos de comparação da porcentagem de reparação óssea, já que, sendo um material orgânico e do próprio animal, as respostas citotóxicas, inflamatória e de rejeição não são evidenciadas, fazendo dele um material ideal para enxertos no que diz respeito às características acima citadas. Os outros animais foram divididos em três grupos:

1. No primeiro grupo o material enxertado foi a HA.
2. No segundo grupo o material implantado foi o copolímero PCL puro.
3. No terceiro grupo foi implantado o composto PCL:I₂/HA.

A Figura 28 mostra o compósito PCL:I₂/HA esterilizado junto com a membrana de quitosana usada como barreira física. A utilização de membranas biológicas impede que as células do tecido epitelial penetrem no defeito ósseo, permitindo que as células osteoblásticas tenham a prioridade de se conduzirem para a área. Estas membranas criam um meio propício para melhorar a regeneração funcional através do potencial biológico natural que inclui fatores como a prevenção da inflamação conseqüente à presença bacteriana, a estabilidade mecânica do coágulo, a criação e manutenção do espaço pôr ele preenchido além do isolamento dos tecidos indesejáveis do local de regeneração. Todos os materiais utilizados foram esterilizados com raios gamas (R γ) proveniente de ⁶⁰Co^[38].



Figura 28 – Compósito de PCL:I₂/HA (A) e as membranas de quitosanas esterilizadas por raios gama (⁶⁰Co) (B). Dose utilizada = 25kGy.

Logo após os materiais serem implantados, foi estimulado o sangramento, para que o sangue local se misture com o material enxertado, fornecendo para o defeito ósseo as células osteoprogenitoras, aumentando a atividade osteoindutora no defeito ósseo. Uma membrana de quitosana foi colocada sobre a cavidade óssea para impedir que células do tecido epitelial invaginem para dentro do defeito ósseo. Os tecidos moles foram reposicionados e em seguida foi feita a sutura em um só plano com pontos simples interrompidos com fio de seda preta 4-0

(Ethicon/Jhonson & Jhonson). Terminadas as suturas os coelhos foram colocados em gaiolas individuais, sendo feito à manutenção após o procedimento cirúrgico por 40 minutos até a recuperação total da consciência pelos animais. Após um período de 20 dias os coelhos foram sacrificados com overdose de pentobarbitol sódio (Nembutal[®]/Abbot Laboratories).

Após uma incisão para exposição, a tíbia foi fragmentada com uma serra cirúrgica, cada fragmento foi analisado exibiam numa das faces ósseas junto à parte compacta um ponto discretamente elevado com menos de 1mm de diâmetro e foram acondicionados em recipientes contendo solução de formol 10% (v/v, pH = 7.4). Posteriormente cada fragmento foi desidratado com álcool etílico e descalcificado em solução de ácido fórmico (5% m/m). As amostras de tecido ósseo foram seccionadas e embutidas em parafina, sendo realizados cortes transversais (5 µm) ao longo do eixo longitudinal das tíbias enxertadas utilizando-se um micrótomo (Sakura[®]) (Figura 29). As amostras foram coradas com hematoxilina/eosina (HE) e em seguida, analisadas por microscopia óptica. A análise histológica foi efetuada com auxílio de um anátomo-patologista, professor da Faculdade de Medicina de Itajubá, e em seguida digitalizada para análise por visão computacional.



Figura 29 – Micrótomo rotatório Sakura[®] modelo Accu-Cut SRM, Tissue-Tek utilizado para segmentar os fragmentos ósseos.

3.3.4. Análise por visão computacional

O uso da visão computacional é de suma importância para quantificar o grau de reparação óssea, uma vez que essa mesma reparação ocorre fisiologicamente de maneira semelhante, independentemente do material para enxerto utilizado.

Para a formação de imagens foi utilizada uma câmera de vídeo CCD (Charge Coupled Device), que possui respostas rápidas e com maior grau de resolução das imagens. A câmera de CCD é constituída basicamente por lentes e uma matriz de elementos semicondutores fotossensíveis. Através das lentes, a luz é focalizada na matriz de elementos fotossensíveis, que convertem a luminosidade proporcionalmente ao sinal elétrico gerado. Esta câmera de vídeo é acoplada a um microscópio óptico Olympus modelo BHT-12 (Figura 30) para aquisição das imagens. O tecido ósseo em regeneração foi fixado em lâmina de vidro e corado com (H.E)^[46]. O processamento das imagens foi realizado em um computador pentium II.

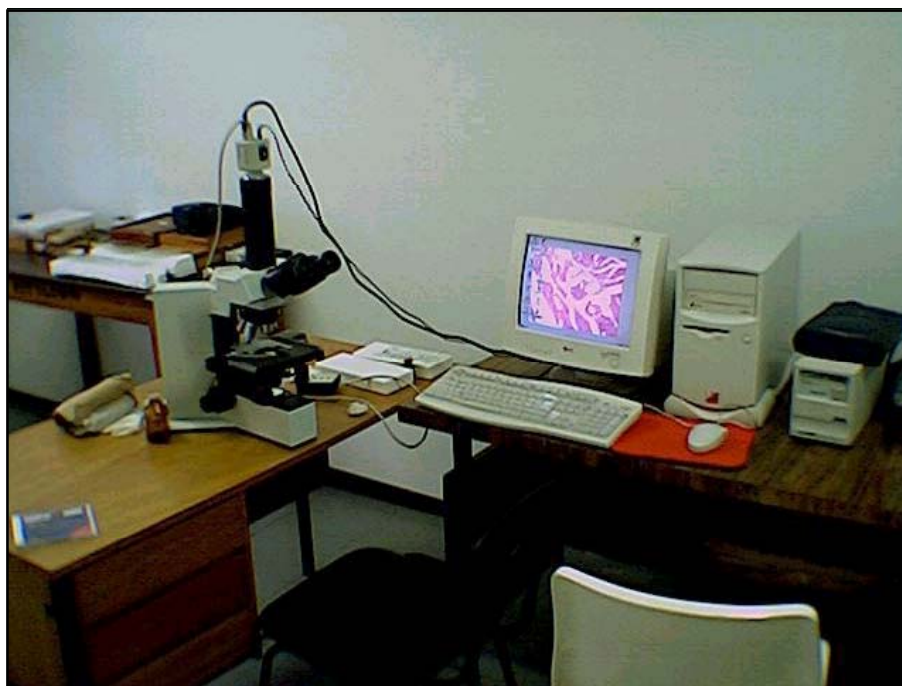


Figura 30 – Microscópio óptico com câmera CCD acoplado a um microcomputador Pentium II utilizado neste trabalho.

As imagens digitalizadas são representadas através de uma função discreta bidimensional $f(x,y)$, onde x e y são duas coordenadas espaciais. O valor de $f(x,y)$ no ponto (x,y) é diretamente proporcional à intensidade luminosa neste ponto. Para que este sinal possa ser manipulado através de um computador, é necessário que o mesmo seja digitalizado no modo espacial e em amplitude, através de um processo denominada amostragem e quantização. A digitalização em coordenadas espaciais é denominada amostragem, e a digitalização em amplitude é referenciada como quantização em intensidade ou quantização em níveis de cinza. Esta digitalização resulta em imagens em níveis de cinza, possuindo intensidades que variam entre 0 e 255. A imagem digital pode então ser representada através da equação 1, como uma matriz de n linhas por m colunas, onde cada amostra é também quantizada em intensidades. A imagem digital $f(x,y)$ possui então duas variáveis discretas x e y , onde $x = 0,1,2,3,\dots,n-1$ e $y = 0,1,2,3,\dots,m-1$. Cada elemento neste arranjo é denominado elemento de imagem ou pixel. A câmera CCD utilizada neste trabalho possui uma área de visão de 512×512 pixels^[46-48].

$$f(x,y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,m-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,m-1) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ f(n-1,0) & f(n-1,1) & \dots & f(n-1,m-1) \end{bmatrix}$$

4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese e caracterização do compósito PCL:I₂/HA

O polímero poli (ϵ -caprolactona) é um poliéster alifático com aprovação no FDA utilizado em diversas aplicações clínicas tanto ortopédicas quanto em liberação controlada de fármacos^[44-46].

Recentemente observou-se em nossos laboratórios que o iodo promove a polimerização do monômero ϵ -caprolactona por abertura de anel à temperatura ambiente (25°C) produzindo um poliéster de alto peso molecular e de boa biodegradabilidade^[47].

A polimerização em massa induzida pelo iodo provoca uma inversão de fase no meio reacional produzindo um complexo de transferência de carga. Como consequência do processo de inversão de fase a formação de estruturas com elevado grau de porosidade e um complexo de iodo tipo iodoform pode ser obtido.

A Figura 31 mostra o percentual de conversão do monômero ϵ -CL em função do tempo em uma polimerização por abertura de anel promovida pelo iodo. O percentual de conversão foi determinado gravimetricamente. Observa-se neste caso que elevados níveis de conversão do monômero a polímero são atingidos aumentando-se a razão molar ϵ -CL/I₂. A dependência da concentração de iodo na polimerização do monômero ϵ -CL parece consistente com o mecanismo radicalar de propagação de radicais.

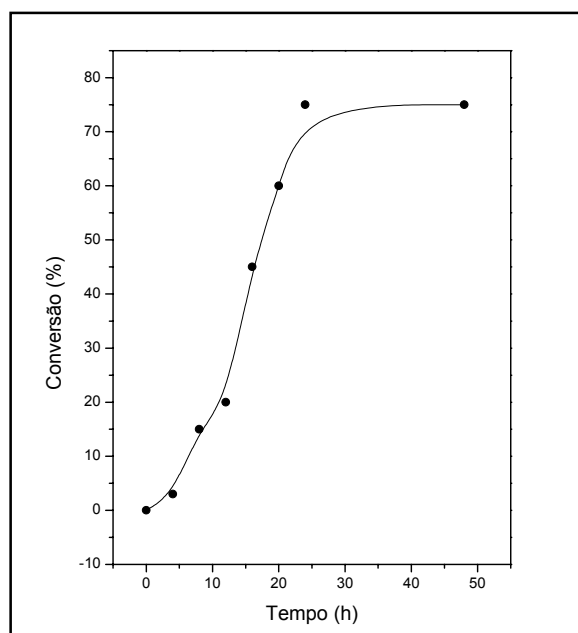


Figura 31 – Conversão do monômero ϵ -CL a PCL:I₂. [ε-CL/I₂] = 103:1, T = 298 K, P = 1 atm. A proporção de polímeros PCL:I₂/HA no final do processo foi de 1:1.

O espectro ¹H-RMN do PCL:I₂ obtido é apresentado na Figura 32. Os picos correspondentes aos deslocamentos químicos do PCL:I₂ estão em boa concordância com nossos resultados anteriores^[48].

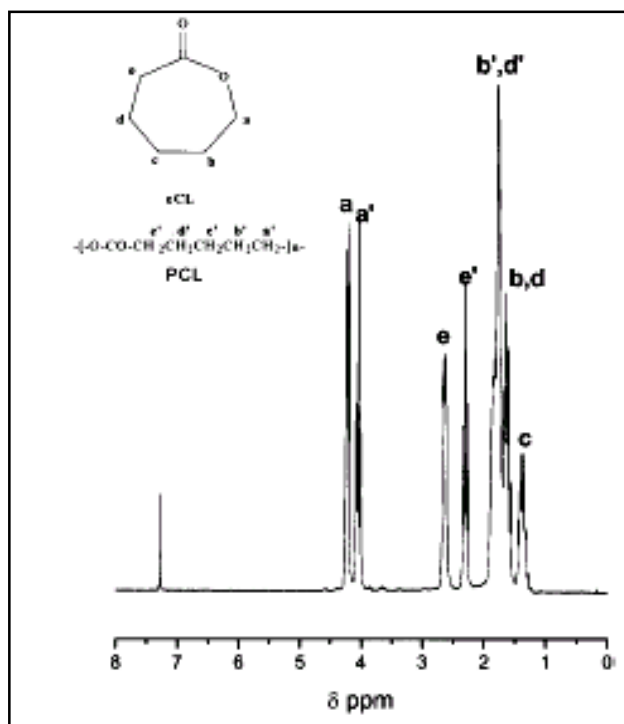


Figura 32 – Espectro ¹H-RMN do PCL:I₂ obtido em CDCl₃ a 298 K.

A Figura 33 ilustra a análise por GPC do PCL:I₂ obtido neste trabalho. A distribuição dos pesos moleculares é muito estreita, aproximando-se de um sistema monodisperso conforme pode ser observado pela razão $M_w/M_n = 1,11$. O peso molecular aparente (M_w) foi de 32.900g/mol.

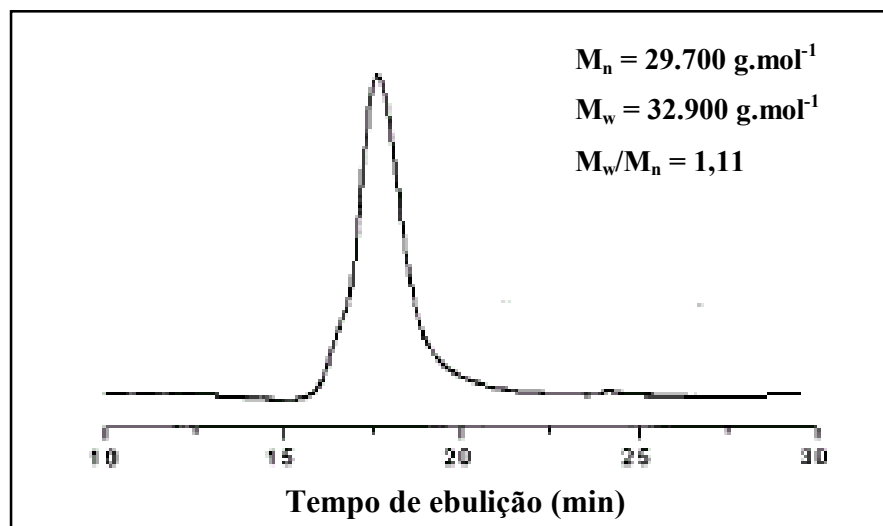


Figura 33 – Análise por GPC do polímero PCL:I₂.

As Figuras 34 e 35 mostram as micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a distribuição de tamanhos de poros no compósito PCI:I₂/HA, respectivamente. O sistema PCI:I₂/HA apresentou uma estrutura de poros interconectados com distribuição média de diâmetro de poros igual a 5 μm .

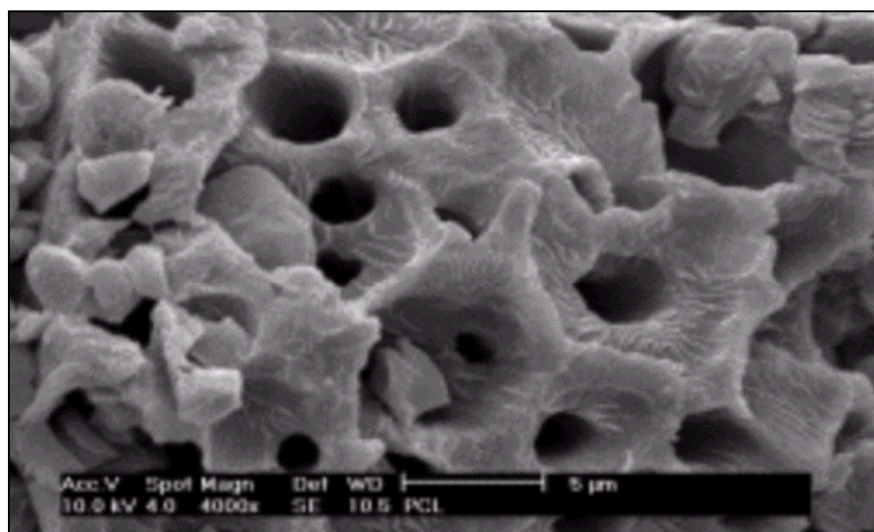


Figura 34 – Micrografia de MEV do polímero PCL:I₂.

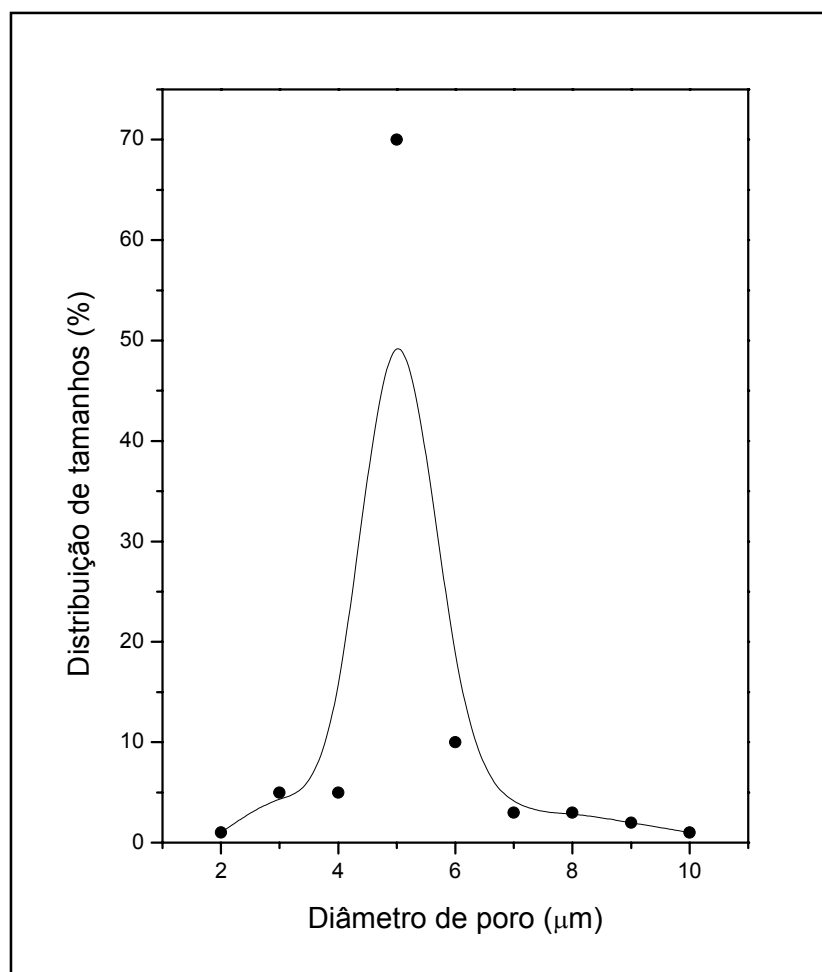


Figura 35 – Gráfico de distribuição do tamanho de poros no composto PCL:I₂/HA, obtido por meio de visão computacional.

Sistemas poliméricos biodegradáveis com microestruturas de poros interconectados são importantes para a engenharia de tecidos. Tais sistemas favorecem o crescimento celular ao mesmo tempo em que o polímero é degradado e absorvido pelo organismo biológico.

As Figuras 36-38 mostram as micrografias (MEV) do composto PCL:I₂/HA. A hidroxiapatita apresentou estrutura hexagonal característica com tamanho de partículas superior a 100 μm (Figuras 36-37). O composto apresentou microestrutura de agregados com tamanhos superiores a 200 μm (Figura 38).

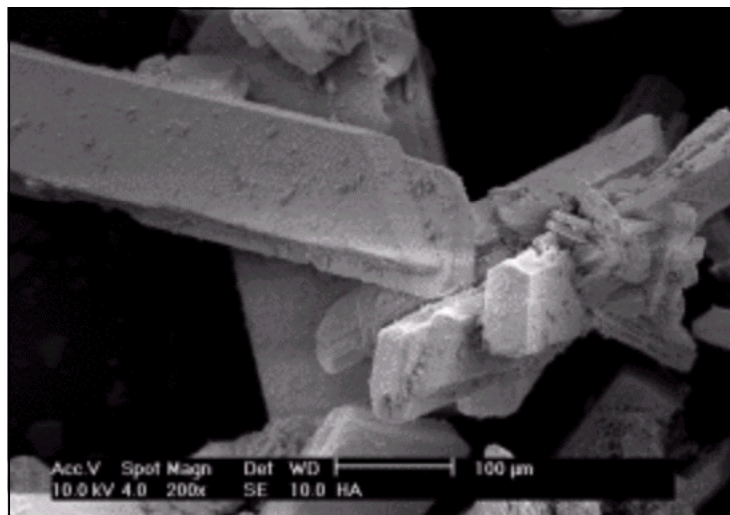


Figura 36 – Micrografia de MEV do composto PCL:I₂/HA.

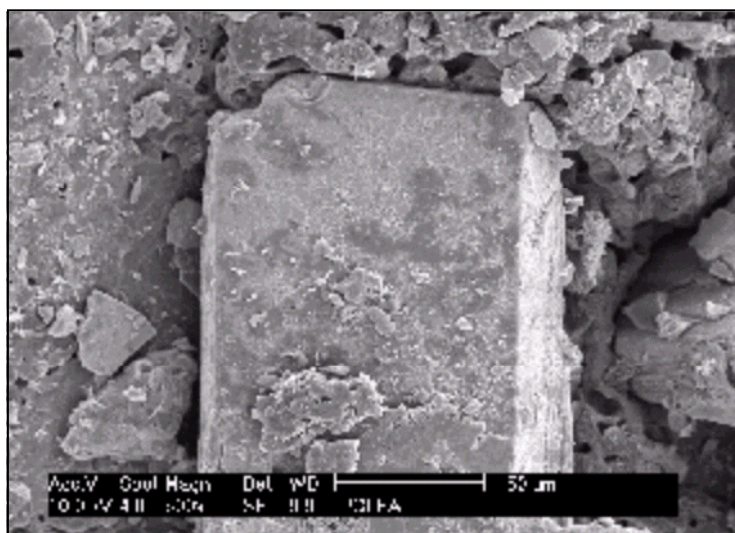


Figura 37 – Micrografia de MEV da Hidroxiapatita (Intra-Lock).

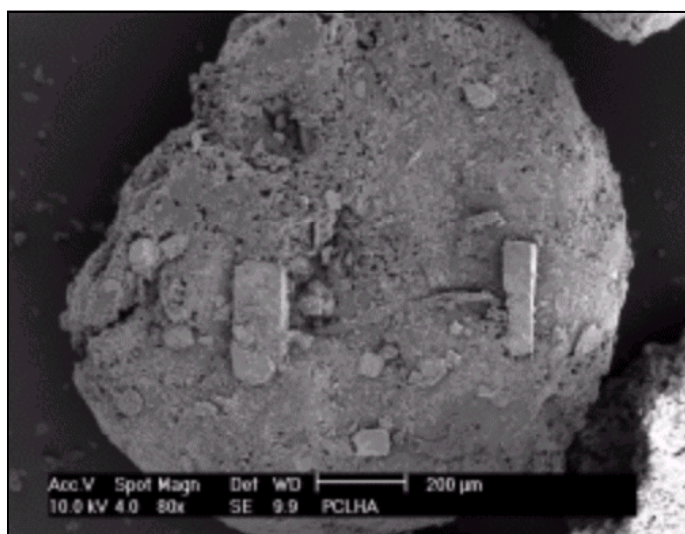


Figura 38 – Micrografia de MEV da Hidroxiapatita (Intra-Lock). Aumento de 80x.

É fato bem conhecido que o processo de reparo ósseo depende de vários fatores, tais como profundidade da lesão a ser reparada, ângulo da lesão, imobilização dos enxertos, técnica aplicada adequada e principalmente, vascularização. Desta forma, para que o processo de osteointegração se desenvolva com sucesso, a utilização de matrizes porosas biodegradáveis é de fundamental importância para sua utilização em enxertos aloplásticos.

4.2. Caracterização bioquímica

4.2.1. Análise da atividade antimicrobiana do PCL:I₂/HA

O enxerto de materiais sintéticos no organismo biológico, mesmo sob rigorosa assepsia, é um procedimento de alto risco de infecção devido à exposição do sítio cirúrgico à presença de microorganismos. A utilização de um material com atividade antimicrobiana é de fundamental importância, visto que, infecções no local do enxerto dificultariam o processo de reparo ósseo, além do risco de septicemias^[49].

A atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA foi avaliada em função da razão do número de colônias sobreviventes de bactérias de *S. aureus* e *E. coli* pela concentração do compósito PCL:I₂/HA na solução teste. A Figura 39 mostra o gráfico da atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA, que apresentou resultado positivo tanto para as culturas de bactérias gram negativa (*E. coli*) quanto para as culturas de bactérias gram positivas (*S.aureus*). Entretanto, podemos observar que a atividade antimicrobiana do compósito PCL:I₂/HA para a cultura de *E. coli* (Figura 38-A) é maior que para a cultura de *S. aureus* (Figura 38-A).

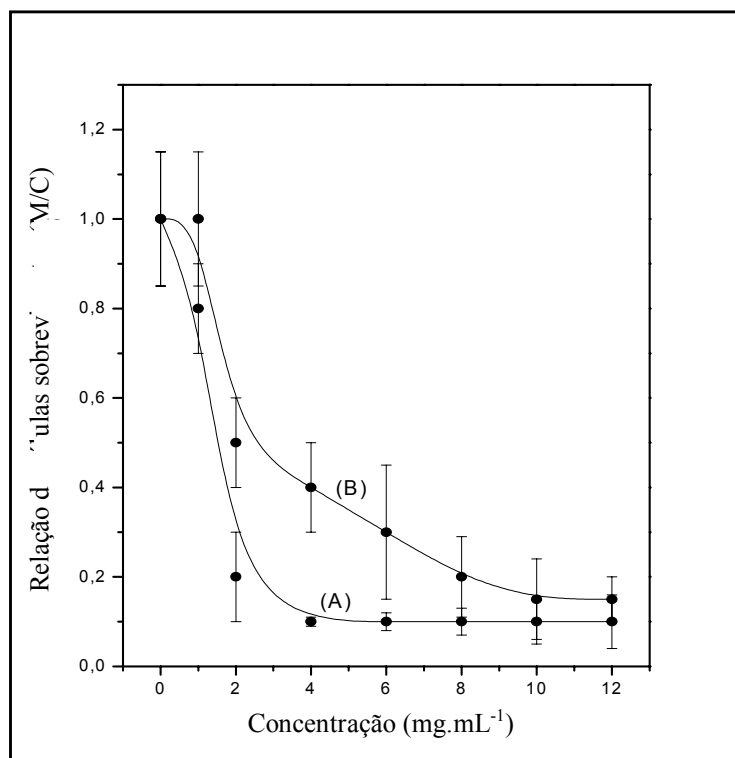


Figura 39 – Atividade antimicrobiana do composto PCL:I₂/HA contra *E. coli* (A) e *A. aureus* (B).

Não se conhece com precisão o modo de ação do iodo, mas acredita-se que esta substância afete a estrutura da membrana plasmática oxidando as ligações S–H da cisteína e da metionina, reagindo com grupos fenólicos da tirosina que reagem em sinergismo com grupos N–H (aminos - ácidos) para obstruir a ligação do hidrogênio.

Esta reação em cascata ocorre até atingir as bases dos nucleotídeos (adenina, guanina e citosina) bacterianos provocando a morte celular.^[49]

O *E. coli* é uma bactéria gram negativa, ou seja, possui além da membrana plasmática uma segunda membrana denominada esquelética, que quando atacada pelo iodo forma uma quantidade maior de radicais que irão atacar as bases dos nucleotídeos bacterianos de uma bactéria gram negativa. Esse efeito do sinergismo do iodo com a membrana esquelética atuando sobre a membrana plasmática da *E. coli* pode explicar sua maior sensibilidade ao composto PCL:I₂/HA do que o *S. aureus* que apresenta apenas a membrana plasmática^[50].

4.2.2. Análise da citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA

O ensaio de citotoxicidade representa a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizados em uma primeira análise para detectar se o material sintético apresenta características de biomaterial quanto à sua interação com o tecido biológico. O compósito PCL:I₂/HA, como todo material sintético destinado ao implante em organismos vivos, foi submetido à avaliação de sua citotoxicidade. No ensaio da citotoxicidade deste trabalho os resultados foram expressos em porcentagem de células CHO sobreviventes, sendo os resultados apresentados na Figura 40.

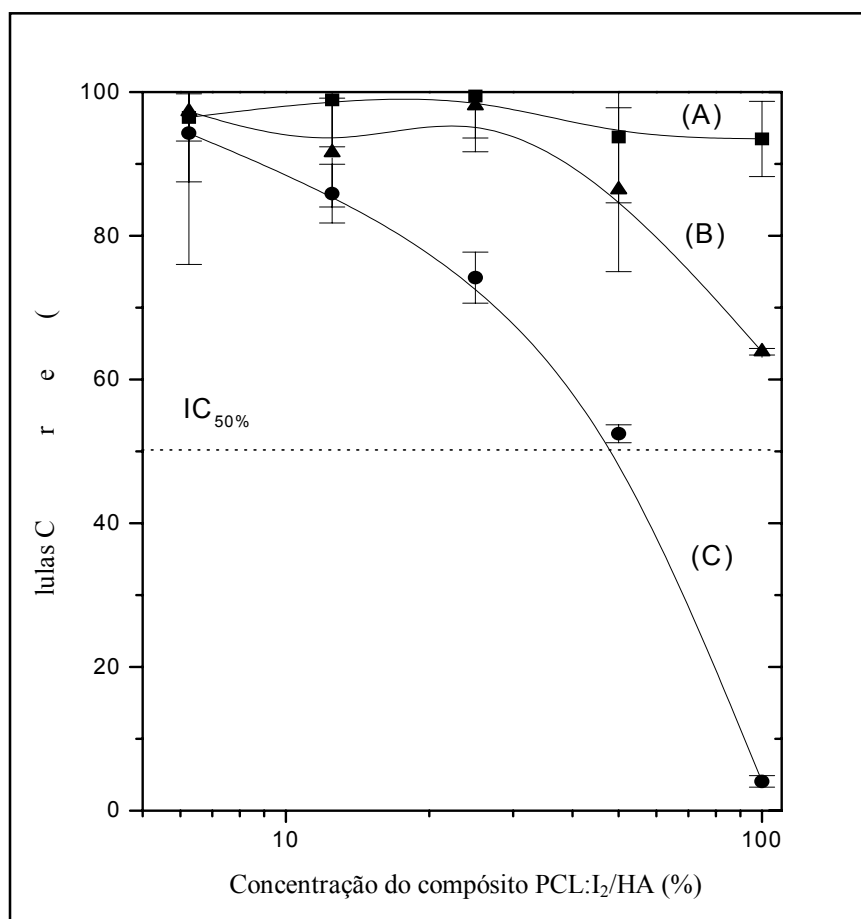


Figura 40 – Gráfico da atividade do compósito PCL:I₂/HA. Polietileno de alta densidade (A), compósito PCL:I₂/HA (B), solução de fenol 0,02% (C).

O material utilizado como controle positivo, solução de fenol 0,02%, apresentou atividade citotóxica extremamente alta, pois praticamente não restaram colônias sobreviventes sobre a placa de controle. Podemos observar na Figura 40-C que à medida que a concentração de solução de fenol 0,02% aumenta, a razão do número de colônias sobreviventes diminui, até praticamente não sobraem colônias visíveis sobre a placa de controle. Já no controle negativo, o polietileno de alta densidade (HDPE), demonstrou ser um material não citotóxico (Figura 40-A), visto que, mesmo em índices elevados de concentração do HDPE a razão do número de colônias sobrevivente é bem elevada. Pode ser ainda observado que quando comparado com a solução de fenol 0,02% ambos, o HDPE e o compósito PCL:I₂/HA (Figura 40-B) apresentam uma baixa atividade citotóxica Utilizando o compósito PCL:I₂/HA em concentrações inferiores a cerca de 30%, sua atividade citotóxica é bem semelhante a do HDPE, ou seja, o comportamento do compósito PCL:I₂/HA nestas concentrações é de um biomaterial não citotóxico. Mesmo aumentando a concentração do compósito PCL:I₂/HA, observamos que sua atividade citotóxica continua bem próxima do HDPE. A não citotoxicidade do compósito PCL:I₂/HA testado pode ser concluída tendo em vista que apesar de utilizarmos concentrações elevadas, o compósito PCL:I₂/HA apresenta uma atividade citotóxica muito baixa (Figura 40-B). Neste caso, a razão do número de colônias sobreviventes foi superior a 50%.

4.2.3. Análise histológica da atividade osteocondutora do compósito PCL:I₂/HA

A Figura 41 mostra o corte histológico da tíbia enxertada com sangue. A região de enxerto apresentou segmento ósseo exibindo lamelas ósseas típicas, revestidas por periósteo externamente e endósteo internamente. Observa-se aparente áreas de consolidação constituídas por lamelas em organização, associadas à moderada quantidade de tecido conjuntivo não ósseo com fibroblastos e osteoblastos de permeio.

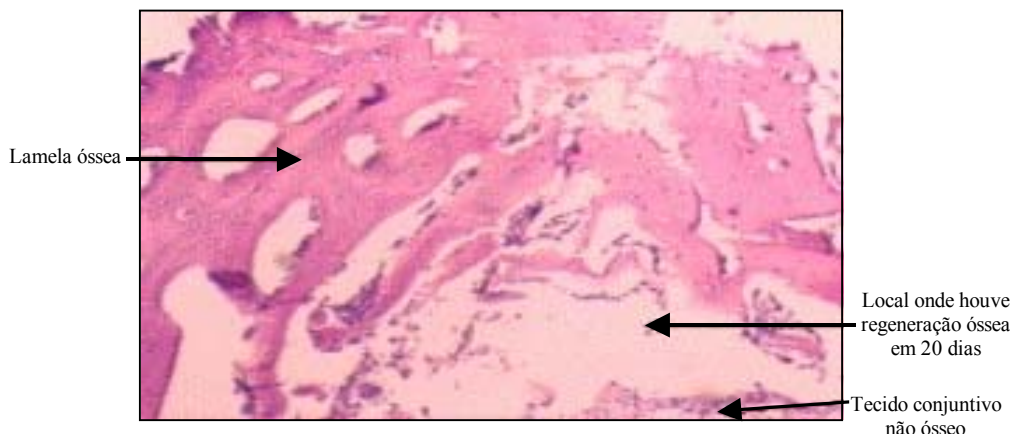


Figura 41 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com sangue. Aumento de 40×.

A amostra onde o material enxertado foi o PCL:I₂ (Figura 42) apresentou segmento ósseo exibindo lamelas ósseas típicas, revestidas por periósteo externamente e endósteo internamente, observa-se áreas de consolidação constituídas por grande quantidade de tecido conjuntivo não ósseo, com osteoclastos e osteoblastos de permeio.

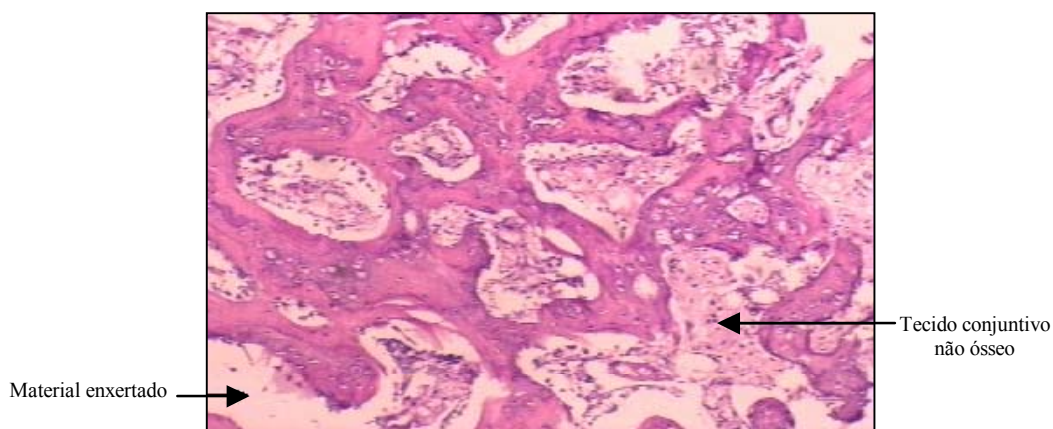


Figura 42 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com PCL. Aumento de 40×.

Na amostra de tecido ósseo onde foi enxertada a HA (Figura 43) observou-se um segmento ósseo com lamelas ósseas típicas, revestidas por periósteo externamente e endósteo internamente, com aparentes áreas de consolidação, constituídas por grande quantidade de lamelas em organização e associadas à pequena quantidade de tecido conjuntivo não ósseo, com fibroblastos e osteoblastos de permeio.

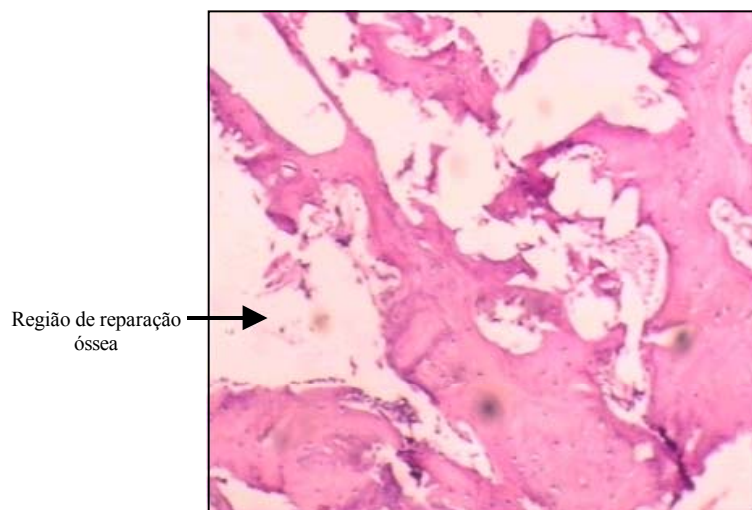


Figura 43 – Corte histológico corado com HE da região enxertada com HA. Aumento de 40 \times .

A Figura 44 mostra o corte histológico em que foi enxertado o compósito PCL:I₂/HA. Observa-se um segmento ósseo exibindo lamelas ósseas típicas, revestidas por periósteo externamente e endósteo internamente. Existem áreas de consolidação constituídas por grande quantidade de lamelas em organização associadas à pequena quantidade de tecido conjuntivo não ósseo com fibroblastos e osteoclastos de permeio. Comparando as quatro amostras entre si, observa-se que a quantidade de tecido ósseo regenerado é maior no local onde foi enxertado com compósito PCL:I₂/HA, conforme pode ser observado no gráfico feito com auxílio da visão computacional.

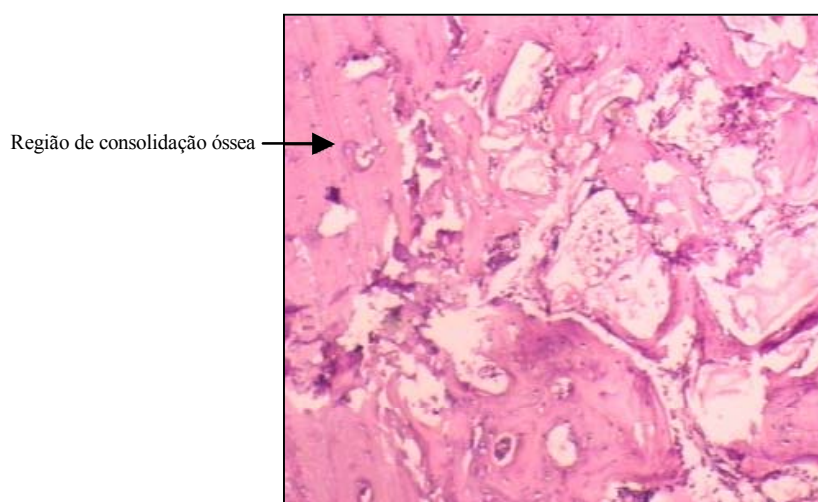


Figura 44 – Gráfico da atividade do compósito PCL:I₂/HA. Polietileno de alta densidade (A), compósito PCL:I₂/HA (B), solução de fenol 0,02% (C).

4.2.4. Análise dos cortes histológicos por visão computacional

Uma análise quantitativa da capacidade do compósito PCL:I₂/HA em promover a reparação óssea pode ser efetuada utilizando-se a análise de imagens dos cortes histológicos por visão computacional.

A análise de imagens por visão computacional consiste na realização de operações que permitem caracterizar os diferentes objetos encontrados na mesma imagem. Para isto, são realizados cálculos que determinam elementos da imagem denominados descritores ou atributos, tais como: área, perímetro, diâmetro e medidas de distribuição de níveis de cinza. O número de atributos a serem calculados depende do tipo de aplicação a ser empregada. Em muitos casos, poucos atributos podem definir satisfatoriamente objetos da imagem, sem necessidade de se realizar operações complexas^[41].

As características obtidas de uma imagem em análise são comparadas com os mesmos tipos de características previamente armazenadas em um banco de dados padrão. O objetivo é o de se obter um valor provável que forneça a interpretação correta da imagem analisada. Neste caso, os dois métodos que podem ser empregados são: ponderação dos dados das características extraídas e o casamento de padrões. Na ponderação, o peso de uma característica extraída é calculado para ser utilizada na avaliação de sua contribuição relativa, durante a operação de interpretação da imagem. No casamento de padrões é realizada uma comparação entre os valores de características armazenadas em um banco de dados e as características de uma amostra conhecida, bem como entre pixels da imagem em análise e os pixels de uma imagem padrão. Nas duas situações anteriores, o objetivo é obter o menor resultado entre as diferenças dos valores extraídos da imagem em análise e o da imagem padronizada, que determina o perfeito casamento de padrões entre elas^[41-43].

Para uma determinação mais precisa da área de regeneração óssea, as imagens obtidas foram segmentadas. A segmentação de imagens consiste na

separação de objetos do fundo, visando à extração de características desses objetos. O objetivo é classificar a imagem, isto é, realizar um procedimento de identificação. O pré-processamento na segmentação de imagens é relativo às operações de limiarização e detecção de objetos na imagem.

A limiarização é uma técnica de pré-processamento, empregada para a detecção de objetos em imagens digitais. O caminho para extrair o objeto do fundo é selecionar um limiar T que separe os modos de intensidade no histograma. Portanto, pontos (x,y) nos quais $f(x,y) > T$, são os pontos que formam o objeto e $f(x,y) < T$ são os pontos que formam o fundo da imagem^[46].

O próximo passo consiste na detecção das bordas, através de um algoritmo que emprega cálculos locais. Este método permite detectar transições na intensidade dos níveis de cinza existentes em uma imagem. Em uma imagem bidimensional, as bordas podem ser detectadas através dos operadores diferenciais Gradiente (G) e Laplaciano (L).

O operador gradiente de uma imagem $f(x,y)$ nas coordenadas (x,y) é definido como um vetor bidimensional, e para a detecção de bordas, o interesse está na amplitude do vetor G , que é denominado Gradiente, denotado por $G[f(x,y)]$ ^[41,46]. A relação entre G e $f(x,y)$ pode ser escrita como:

$$G[f(x,y)] = [G_x^2 + G_y^2]^{1/2} = \left\{ \left[\frac{\partial f}{\partial x} \right]^2 + \left[\frac{\partial f}{\partial y} \right]^2 \right\}^{1/2}$$

O cálculo do gradiente é baseado na determinação das primeiras derivadas $\partial f / \partial x$ e $\partial f / \partial y$. Para executar este cálculo em uma imagem digital emprega-se uma matriz 3x3:

$$\begin{pmatrix} a & b & c \\ d & (x,y) & e \\ g & h & i \end{pmatrix}$$

Para o cálculo da derivada, é realizada a diferença de primeira ordem entre pixel centrado em (x,y) e os pixels vizinhos, representados pelas letras de a até i. Assim, o resultado é:

$$G_x = \frac{\partial f}{\partial x} = (g + 2h + i) - (a + 2b + c) \quad \text{e} \quad G_y = \frac{\partial f}{\partial y} = (c + 2e + i) - (a + 2d + c)$$

O Laplaciano é um operador derivativo de Segunda ordem, definido como:

$$L[f(x,y)] = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2}.$$

Para imagens digitais, o Laplaciano é definido como:

$$L[f(x,y)] = [f(x+1,y) + f(x-1,y) + f(x,y+1) + f(x,y-1) - 4 * f(x,y)]$$

O Laplaciano, responde as transições de intensidade isto é, ele é utilizado para estabelecer se um dado pixel está do lado iluminado ou escuro de uma borda, isto é, do lado do fundo ou do lado de dentro do objeto^[41-44]. A área da imagem é definida como o número de pixels contidos em um objeto:

$$Área = \sum_{x,y} g(x,y),$$

sendo $g(x,y)$ o pixel da imagem na posição (x,y) .

As Figuras 45-47 ilustram a seqüência de análise de imagem dos cortes histológicos anteriormente descritos pela técnica de visão computacional.

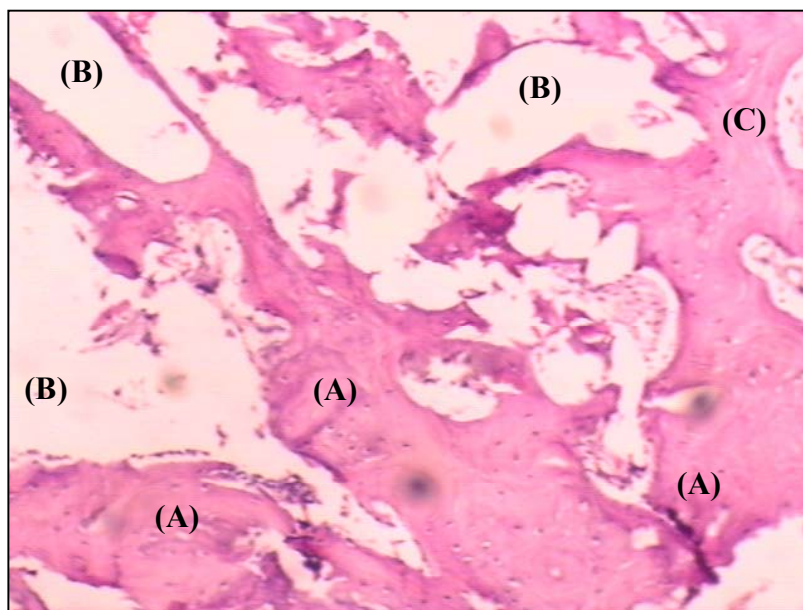


Figura 45 – Micrografia óptica correspondente a um corte histológico da área da tíbia enxertada com HA preparada para segmentação e posterior determinação da área de reparo ósseo por visão computacional. Na imagem destacam-se: área de reparo ósseo consolidado (A), região sem reparo ósseo (B), e região de tecido conjuntivo não ósseo (C). Aumento de 40 \times .



Figura 46 – Tratamento da imagem por visão computacional. A área escura representa o reparo ósseo e a área clara representa a região onde não ocorreu a formação de tecido ósseo.

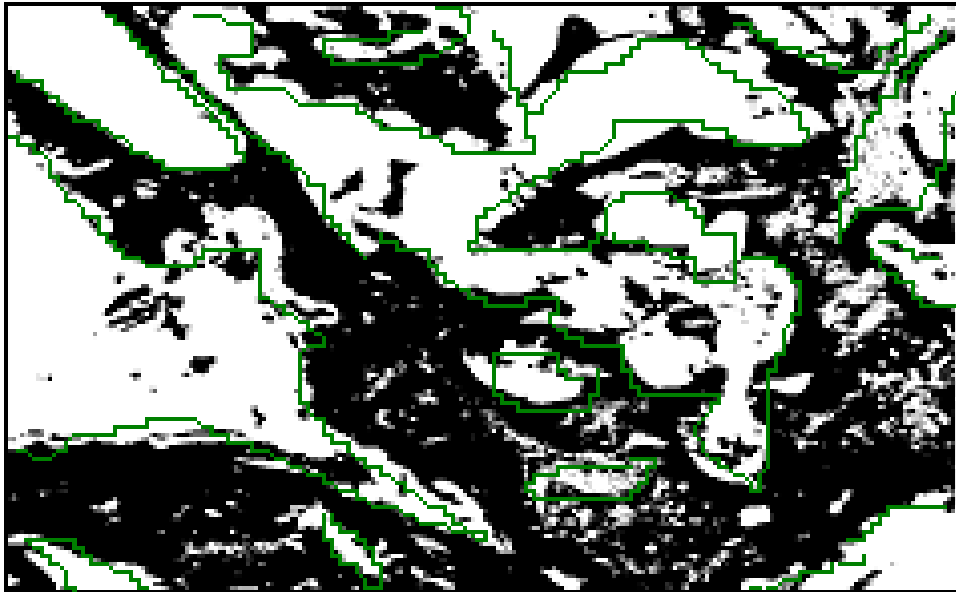


Figura 47 – Imagem segmentada. Cada segmento marcado corresponde a uma área, que será somada e totalizada como a área total da reparação óssea.

A análise quantitativa comparando os quatro tipos de enxertos (Sangue, PCL, HA e PCL:1₂/HA) é mostrado na Figura 48.

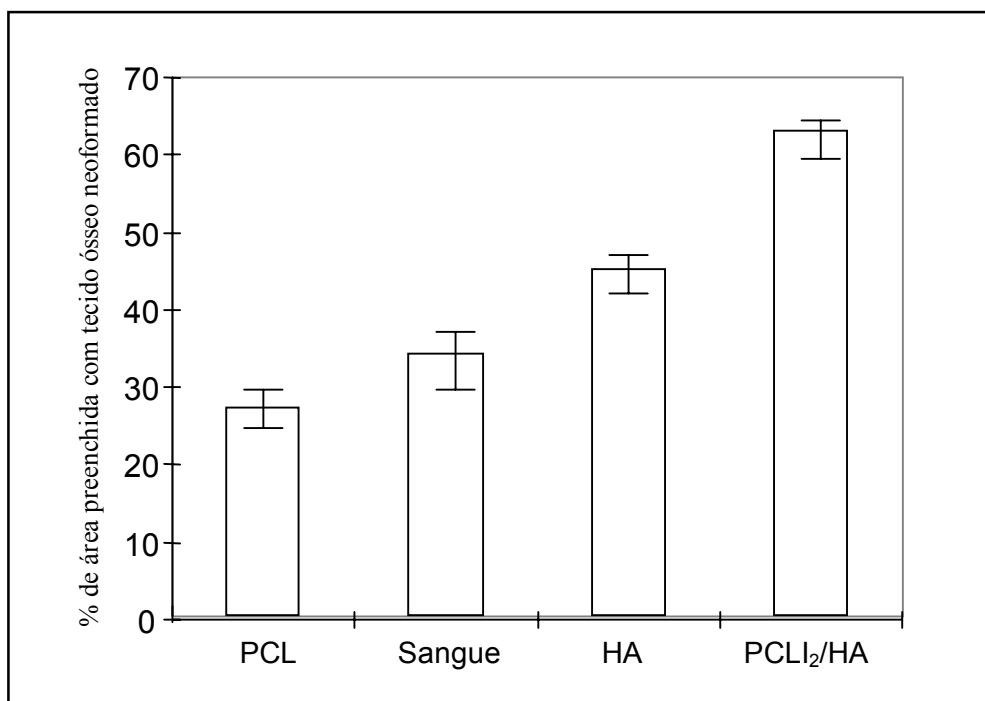


Figura 48 – Gráfico da atividade osteocondutora de cada material enxertado após 20 dias.

Comparando a capacidade de reparação óssea do compósito PCL:I₂/HA com os materiais utilizados como controle (Sangue, HA, PCL) observa-se que o compósito PCL:I₂/HA apresentou um resultado muito superior, inclusive sobre a HA comercialmente vendida para uso em enxertos ósseos. A formação de um compósito macroporoso formado entre o PCL, polimerizado pelo iodo, e a HA pode ser a explicação para esse bom resultado do compósito PCL:I₂/HA, visto que esses macroporos funcionariam como uma base de sustentação para que as células ósseas pudessem crescer através da emissão de seus pseudópodos pelos poros do compósito PCL:I₂/HA, facilitando a fixação dessas células ósseas na cavidade a ser reparada. A presença desses poros facilitaria ainda o fornecimento de nutrientes para o novo tecido ósseo em formação atuando como canais por onde os nutrientes e o oxigênio necessário para o crescimento do tecido ósseo pudesse circular com maior facilidade pelo novo tecido em reparação^[41].

5. Conclusão

Nossos resultados mostram um horizonte promissor para a utilização do compósito PCL:I₂/HA na área clínica. Os resultados deste trabalho indicam que o compósito PCL:I₂/HA pode ser sintetizado em um processo de polimerização relativamente fácil e de baixo consumo energético.

Avaliando os ensaios *in vitro* observamos que os resultados são satisfatórios. O compósito PCL:I₂/HA possui significativa atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade.

A interessante descoberta a ser ressaltada é a propriedade osteocondutora do compósito PCL:I₂/HA. Evidentemente, esta descoberta é fundamental para o processo de regeneração óssea.

Os estudos referentes aos cortes histológicos indicam que o processo de reparo ósseo é bastante significativo quando consideramos o compósito PCL:I₂/HA como material para enxerto. Embora o ensaio *in vivo* tenha um significado importante para este trabalho, reconhecemos que uma experimentação em animais de maior porte deve ser projetada, onde um volume maior de dados estatísticos, relativos ao processo de osteocondução, possa ser analisado com o rigor da estatística.

Acreditamos que nossa pesquisa poderá trazer uma contribuição significativa para a área ortopédica. Trabalhos futuros nesta área dirão da flexibilidade da aplicação do compósito PCL:I₂/HA nas áreas ortopédica e odontológica. O que fizemos até agora representa apenas um primeiro passo nesta direção.

6. Sugestões para trabalhos futuros

A aplicação do compósito PCL:I₂/HA representa uma vertente interessante quanto ao desenvolvimento de novos biomateriais no presente século. Neste sentido, a química nanoscópica tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de estruturas poliméricas macroporosas.

Aliado à bioquímica e engenharia de materiais, sistemas implantáveis compostos de polímeros e cerâmicas têm sido oferecidas à medicina ortopédica. Entretanto, o elevado custo destas técnicas que excluem a população de baixa renda em nosso país é um desafio que deve ser vencido.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e versáteis quanto ao seu tipo de aplicação nas áreas ortopédica e odontológica.

O escopo do presente trabalho, e obviamente, também o binômio tempo/instrumentação nos privaram de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar a aplicação do compósito macroporoso PCL:I₂/HA na engenharia de tecidos.
- Incorporar fármacos com propriedades antiinflamatórias e avaliar sua performance.
- Estudar a cristalinidade do compósito PCL:I₂/HA por difração de raios-X bem como o efeito da radiação γ sobre o compósito PCL:I₂/HA no processo de esterilização.

- Analisar a biodegradação do compósito PCL:I₂/HA por GPC e o seu impacto nas propriedades mecânicas do sistema.
- Avaliar o mecanismo de transporte de proteínas globulares e não globulares para uma melhor compreensão da interação entre o compósito PCL:I₂/HA e o fluido biológico.

7. Referências bibliográficas

- [1] GREENWALD, A.S.; BDEN, S.D.; GOLDBERG, V.M.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T.; ROSIER, R.N. **J. Bone J. Sur.**, v. 83, n. 2, p. 98-103, 2001.
- [2] LAURENCIN, C.T.; KHAN, Y. **Medicine**, 2002.
- [3] GERSHENFELD, L. **Am. J. Surg.**, v. 94, p. 938-940, 1957.
- [4] ALTERTHUM, F.; TIMENETSKY, J. Zanini, A.C. & OGA, S. **Anti-sépticos e desinfetantes. In: Farmacologia aplicada.** 4^a ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1989, p.583-590.
- [5] *Guidelines for prevention of surgical site infection.* **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 247-278, 1999.
- [6] www.hcanc.org.br/acta/2004/acta04_16.html. Acessado: 20 de jul. de 2003.
- [7] ROSSI, R. J.; ARUN, K. G.; **Implantodontia - Bases Clínicas e Cirúrgicas.** Robe Editora, 1996, p. 225.
- [8] YUAN, H.; KURASHINA, K.; BRUIJN, J. D.; LI, Y.; DE GROOT, K.; ZHANG, X. **Biomat.**, v. 20, p. 1799-1806, 1999.
- [9] www.baumer.com.be. Acessado em: 23 de jun. de 2003.
- [10] www.bioe.psu.edu/faculty/brown.html. Acessado em: 23 de jun. de 2003.
- [11] OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; SILVA, T. M.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M.; GRANJEIRO, J.M. **Rev. FOB.**, v. 7, n. 3, p. 85-93, 1999.

- [12] BRONZINO, J.D. **The Biomedical Engineering Handbook**. CRC Press, 1995.
- [13] www.wheelessonline.com/image8/aace11.jpg. Acessado em: 23 de mar. de 2003.
- [14] VILLADSEN, J.Lyngby, **Danmarks Tekniske Hojshole**, p. 85-87, 1970.
- [15] MEFFERT, R.M.; LAUGER, B.; FRITIZ, M.E. Dental implants: A review. **J. Peri.**, v. 63, n. 1, p.859-870, 1992.
- [16] MULLIKEN, J.B.; GLOWACKI, J.; KABAN, L.B.; FOLKAMN, J.; MURRAY, J.E. **Ann. Surg.**, v. 194, n. 3, p.366-372,1981.
- [17] GUIZZARDI, S.; GALLI, C.; GOVONI, P.; BORATO, R.; CATTARINE G.; MARTINI, D.; BELETTI, S.; SCANDROGLIO, R. **Life Sci.**, v.73, p. 1973-1983, 2003.
- [18] lhoepner.bei.t-online.de/uebersetzen/OSSEOINTEGRACAO.htm. Acessado em: 23 de jun. de 2003.
- [19] DRESSMAN, H. Beitr. **Klin. Chir.**, v. 1894, n. 9, p.804, 1894.
- [20] DENTON, F. R.; LAHTI, P. M.; KARASZ, F. E. **J. Polym. Sci., Part A**, v. 30, p. 2223, 1992.
- [21] www.afh.bio.br/sustenta/Sustenta2.asp. Acessado em: 23 de mai. de 2003.
- [22] www.faidherbe.org/site/cours/dupuis/conjug.htm. Acessado em: 23 de mai. de 2003.
- [23] quark.qmc.ufsc.br/vitaminas_frame.html. Acessado em: 7 de mar. de 2003.
- [24] VAN WINKELHOF, A.J.; GOENÉ, R.J.; BENSCHOP C.F. **Clin. Oral Implant Res.**, v. 11, p.511-520, 2000.

- [25] www.micro.magnet.fsu.edu/plasmamembrane.htm. Acessado em: 7 de mar. de 2003.
- [26] people.alfred.edu/demo/hy_sin_atomstruc.html. Acessado em: 3 de nov. de 2003.
- [27] AMÉDÉE, J. **Biomat.**, v. 21, p.1345-1352, 2003.
- [28] BARNEY, V.C; LEVIN, M.P.; ADAMS, D.F. **J. Period.**, v. 57, p.764, 1986.
- [29] www.md.huji.ac.il/B/bone/grafting/b4_5.jpeg. Acessado em: 12 de set. de 2003.
- [30] PILLIAR, R.M.; DAVIES, J.E.; SMITH D.C. **M.R.S. Bulletin.**, v. 16, n. 9, p. 55-61, 1991.
- [31] PARK, J.B. **In Biomaterials: an introduction**. 4a. Ed. New York: Plenum Press, 1980, p. 347.
- [32] MARX, R.E.; SAUNDERS, T.R. **Sug.**, p. 347-428, 1986.
- [33] FROST, A. A.; PEARSON, R. G. **Kinetics and Mechanism**. 2^a Ed. New York: John Wiley & Sons, 1961, p. 49.
- [34] CHO, B. R.; SUH, Y. S.; LEE, S. J.; CHO, E. J. **J. Org. Chem.**, v. 59, p. 3681, 1994.
- [35] GANDLER, J. R.; PATAI, S. **In The Chemistry of Double Bonded Functional Groups**. New York: John Wiley & Sons, Vol. 2, Part 1, 1989, p. 734.
- [36] GILCHRIST, T. L. *Heterocyclic Chemistry*, 2nd ed.; Longman Scientific: London, 1992; p. 22.
- [37] DE QUEIROZ, A.A.A.; FRANÇA, E.J; ABRAHAM, G.A; SAN ROMAN J. **J. Polym. Sci. Part B: Polym Phys.**, v. 40, p.714-722, 2002.

- [38] CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N.; PAGANI, S.; GUIZARDI S.; CAUSA, F.; GIUNTI, A. **Biomat.**, v. 24, p.3815-3824, 2003.
- [39] DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A. **Key Engin. Mat.**, v. 16, p. 589-592, 2004.
- [40] DE ALMEIDA, K.A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA O.Z.; ABRAHAM, G.A.; SAN ROMÁN J. J. **Biomed. Mat. Res. Part A.**, v. 68, n. 3, p. 473-478, 2003.
- [41] SHELANSKI, HA.; SHELANSKI, MV. **J. Int. Coll. Surg.**, v. 25, p. 727-734, 1956.
- [42] LARSON, F. **Comm. Rep.**, v. 15, n. 6, p. 25-35, 1987.
- [43] TEERLINCK, J.; QUIRYNEN, M.; DARIUS, P.; VAN STEENBERGHE, D. **Int. J. Oral and Maxill. Implants.**, v. 6, p. 55-61, 1991.
- [44] ISO (1992) **Biological evaluation of medical devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: in vitro methods.** ISO document 10993.
- [45] GARNER, R. **Animal rights: The changing debate.** 1^a Ed. London: MacMillan Press, 1996.
- [46] HARGROVE, E.C. **The Animal Rights/Environmental Ethics Debate.** New York: University of New York Press, 1992.
- [47] LOW, A. **Introductory Computer Vision and Image Processing.** London: McGraw-Hill Book Co., 1991.
- [48] MARQUES, D. C.; FELICIANO, R., RANGEL, A.; ASSADA, D.; MARTIN, R. **Um Sistema de Medição de Volume por Visão Computacional.** Projeto de Conclusão de Curso, Faculdade de Engenharia Industrial – FEI, São Bernardo do Campo, 1999.

- [49] SHU, J.S.P. **Pattern Recognition.**, v. 22, n. 6, p. 665-673, 1989.
- [50] GIULISNS. G. **Oral Surg. Oral Med.Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 87, n. 1, p. 44-49, 1999.
- [51] GUANALINI, S. L.; MELO, N.S.F.O.; SANTOS, E.C.P. **Como controlar a infecção na odontologia.** Londrina: Gnatus, 2000, p. 42.

8. Apêndice

8.1 Trabalhos publicados em periódicos

1. DE ALMEIDA, K.A.; De QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; ABRAHAM, G.A.; SAM ROMÁN, J. Macroporous Poly (ϵ -caprolactone) with antimicrobial activity obtained by iodine polymerization. **J. Biomed. Mat. Res. Part A**, v. 68, n. 3, p. 473- 478, 2003.
2. DE ALMEIDA, KA.; DE QUEIROZ, A.A.A.: Hybridized Hydroxyapatite Bioactive Bone Substitutes. **Key Engin. Mat.** v. 254 – 256; p. 589-592, 2004.
3. DE QUEIROZ, A.A.A.; FRANÇA, E.J.; ABRAHAM, G.A.; SAN ROMÁN, J. Ring-openning polymerization of ϵ -caprolactone by iodine charge-transfer complex. **J. Polym Sci. Part B: Polym. Phys.** v. 40, p. 714-722, 2002.

8.2 Trabalhos apresentados em congressos

1. DE ALMEIDA, K.A. Hybridized Hydroxyapatite Bioactive Bone Substitutes. In: 16th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CERAMICS IN MEDICINE, 2003, Porto/Portugal.
2. DE ALMEIDA, K.A. Compostos Híridos Orgânicos – Inorgânicos para Aplicación em Odontologia. In: 20th CONGRESSO INTERNACIONAL DE ODONTOLOGIA, 2003, São Paulo.