

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO PRÉ-  
CLÍNICO DE DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS BIOCOMPATÍVEIS  
BASEADOS NO POLÍMERO POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)**

**Fabiana Medeiros da Silva**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na área de  
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:  
Profa. Dra. Olga Zazuco Higa**

**Co-orientador  
Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de  
Queiroz**

**São Paulo  
2011**

***“Não faço prefácio. Faço  
um canto de louvação.***

***Não faço prefácio. Faço  
esta serena invenção:  
como de açucena o brilho  
contente perante a luz  
da manhã que se levanta  
e impregnando vai a vida  
de sonora claridão.***

***(...)***

***Meu compromisso é com a vida do homem,  
a quem trato de servir  
com a arte***

***(...)***

***Assim trabalho o meu verso,  
com buril, plaina, sintaxe.***

***Não basta ser bom de ofício.  
Sem amor não se faz arte.”***

***(THIAGO DE MELLO)***

## **DEDICATÓRIA**

---

---

*Às minhas sobrinhas Laura, Leticia, Helena e Rafaela –  
que me transformam e inspiram a trabalhar por um mundo melhor, mais justo e  
humanitário.*

*Para minha família –  
por ser a base de tudo*

*A Deus,  
por me dar força física e espiritual para percorrer, refletir e aprender todos os dias.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

---

---

*Aos meus orientadores neste estudo –  
Profª. Dra. Olga Zazuco Higa  
e Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz –  
por toda compreensão, carinho, dedicação e profissionalismo.*

*Por seus imensos acervos científicos, culturais e humanísticos  
– generosamente irradiados nesses anos de trabalho e amizade.*

*Pelo valor imensurável, comprometimento e sabedoria de seus ensinamentos,  
minha eterna admiração e agradecimento.*

*"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."*

*(Isaac Newton)*

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

*À preciosa e querida equipe do Laboratório Biosíntesis P&D do Brasil Ltda – Monica Haimmoff, Paula Manetta, Ricardo Medeiros, Tatiana Cunha e Vanessa Borelli, pela amizade, competência, determinação e ousadia, e por representarem uma das mais gratificantes conquistas desta pesquisa: trabalhar Ciência, Tecnologia e Inovação de forma original, criativa e ousada, e me fazerem ter plena convicção do caminho certo.*

*Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, representado por seu Superintendente Dr. Nilson Dias Vieira Junior, e por seu Diretor de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Dr. José Carlos Bressiani, pela viabilização e realização deste trabalho.*

*À Dra Nanci do Nascimento, Gerente do CB do IPEN, e a toda a equipe administrativa e técnica do Centro e do Biotério: Arlete, Rute, Neide, Edu, D. Geni e Sr. Longino pelo incalculável apoio e auxílio.*

*À Helena Arantes, Janaina Baptista, Lilian Sakuno e Neide Aparecida pela contribuição técnica e científica nas diferentes fases desta pesquisa, e inestimável amizade e convivência.*

*À todos os pesquisadores e amigos do Centro de Biotecnologia e colegas de Pós-Graduação do IPEN, especialmente ao Grupo de Biocompatibilidade, representados pela Dra. Maria Aparecida Pires Camillo e Dra Andrea Rodas, pela convivência e aprendizado inestimável, incentivo e colaboração para o desenvolvimento de meu senso crítico e científico.*

*À Dra Christiane Ribeiro e ao Dr. Marcelo Yoshimoto, do CCTM/IPEN, pelas discussões científicas, troca de idéias e opiniões, colaboração no delineamento experimental e interpretação de resultados.*

*À Dra Ana Helena Bressiani, por permitir o uso dos laboratórios do CCTM/IPEN.*

*À Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, da Faculdade de Engenharia Mecânica, pela atenção dedicada, opiniões e contribuições científicas.*

*À Equipe da Pós-Graduação representada por Fernando Moreira, Gislene Madeira, Maria do Rosário Ferreira e Vera Lucia Garcia, pela dedicação e presteza em todos os momentos.*

*Ao Centro de Tecnologia das Radiações e Serviços do IPEN, pela esterilização de materiais e amostras.*

*Aos funcionários da Biblioteca “Terezine Arantes Ferraz” do IPEN, pela contribuição e apoio técnico.*

*À Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, pela oportunidade de desenvolvimento conjunto deste trabalho.*

*Ao CNPq, pela bolsa concedida.*

*À FAPESP e à FINEP pelo financiamento dos projetos de inovação tecnológica frutos deste trabalho.*

**A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e pela amizade, apoio e carinho me tornaram melhor pessoa, pesquisadora e cidadã.**

# DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS BIOCOMPATÍVEIS BASEADOS NO POLÍMERO POLI(ε-CAPROLACTONA)

Fabiana Medeiros da Silva

## RESUMO

Polímeros bioreabsorvíveis têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de novos biomateriais e aplicações na engenharia de tecidos. Dentre os poliésteres biodegradáveis, o polímero poli(ε-caprolactona) (PCL) é considerado um dos mais biocompatíveis pelo FDA. No presente trabalho, o objetivo foi sintetizar o polímero PCL pelo mecanismo geral da polimerização do monômero ε-caprolactona induzida pelo iodo a fim de se obter matrizes biocompatíveis, com biofuncionalidade adequada a aplicações como biomaterial na engenharia de tecido ósseo, caracterizar suas propriedades físico-químicas e biológicas, avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* das matrizes, obter protótipos implantáveis e realizar o estudo pré-clínico. O processo resultou na obtenção de matrizes puras de PCL, assim como matrizes do compósito com hidroxiapatita (PCL/HA) e com o antibiótico vancomicina (PCL/HA/VC). As partículas do polímero obtido exibiram estrutura macro-porosa com diâmetro médio de poros de 5 a 10µm. A determinação de biocompatibilidade das matrizes de PCL/HA obtidas foi realizada pela avaliação *in vitro* de citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e hemocompatibilidade, assim como avaliação *in vivo* de toxicidade aguda. As matrizes sintetizadas mostraram-se isentas de toxicidade nos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* estudados. O estudo pré-clínico de biodegradação *in vitro* evidenciou a degradação hidrolítica do PCL/HA a qual foi potencializada por atividade enzimática da lipase. Estes resultados foram evidenciados pela análise da superfície das pastilhas obtidas em MEV, assim como pelos dados gravimétricos e de FTIR obtidos. A finalização do estudo pré-clínico foi realizada por implantes em tíbias de coelho. Os resultados histológicos demonstraram que o compósito PCL/HA facilitou a osteocondução a partir de 30 dias do implante, proporcionando estrutura para deposição do tecido ósseo neo-formado. Esta consolidação se manteve ao longo dos períodos de 60 e 90 dias pós-implante. Os resultados indicaram o potencial do polímero como biomaterial para a aplicação na engenharia de tecidos, assim como para a obtenção de dispositivos implantáveis, capazes de melhorar a osteointegração, visando novas aplicações na medicina e odontologia.

# DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND PRECLINICAL EVALUATION OF THE IMPLANTABLE BIOCOMPATIBLE PROTOTYPES BASED ON POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE).

Fabiana Medeiros da Silva

## ABSTRACT

Bioabsorbable polymers have been played an important role in tissue engineering and biomaterial science. Among biodegradable polyesters, the poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) is considered by the FDA one of the most biocompatible polymer. The interest of bioresorbable polymers in development of novel biomaterials and medical applications is due to the advantage of being totally absorbed by the body. In the present work, the PCL synthesis by the general mechanisms of polymerization induced by iodine of the  $\epsilon$ -caprolactone monomer was realized for the obtainment of biocompatible matrices with biofunctionality to be used in tissue engineering. The main objective was the polymer synthesis, the physico chemical characterization, the *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of the matrices and obtainment of the implantable prototypes. In the synthesis process was obtained pure matrices of PCL and composite with hidroxiapatite (PCL/HA) and vancomicine (PCL/HA/VC). The polymer particles exhibited a macroporous structure with porous size between 5 to 10  $\mu\text{m}$  as average diameter. The biocompatibility evaluation of the PCL/HA matrices was performed following the conditions established by *in vitro* tests of citotoxicity, genotoxicity, immunotoxicity and hemocompatibility assay. For the *in vivo* studies samples were used to carry out the acute toxicity. The tests showed that the PCL is free from any toxicity. The degradation study *in vitro* evidenced the hydrolytic degradation of the PCL/HA which was increased with the enzymatic activity of lipase. These results were showed by the MEV topographic analysis of the membrane surface of PCL, and gravimetric and FTIR data. The final pre-clinical study was carried out by the implantation of PCL pines in the rabbit tibiae. The histological analysis showed that the PCL/HA composite favoured the osteoinduction in the 30 days period after implantation making an structure for the process of bone healing and the formation of new bone tissue. That consolidation was maintained through the 60 and 90 days pos-implantation. All the results indicated that the PCL polymer and composites are biocompatible with potential use as biomaterial for application in tissue engineering and for obtainment of implantable device capable of improving the osteointegration with applications in orthodontic and orthopedic medicine.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Biomateriais .....	<b>3</b>
2.2. Biomaterial Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) .....	<b>4</b>
2.2.1. Biodegradabilidade do Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) .....	<b>6</b>
2.3. Engenharia de Tecidos .....	<b>7</b>
2.4. Dispositivos Implantáveis .....	<b>10</b>
2.5. Biocompatibilidade e Avaliação Pré-Clínica .....	<b>11</b>
2.5.1. Ensaio <i>in vitro</i> .....	<b>13</b>
2.5.1.1. Mecanismo geral de ação <i>in vitro</i> .....	<b>15</b>
2.5.1.2. Citotoxicidade de Biomateriais .....	<b>16</b>
2.5.1.3. Genotoxicidade de Biomateriais .....	<b>19</b>
2.5.1.4. Imunotoxicidade de Biomateriais .....	<b>20</b>
2.5.1.5. Biodegradação <i>in vitro</i> .....	<b>23</b>
2.5.2. Ensaio <i>in vivo</i> .....	<b>24</b>
2.5.2.1. Toxicidade .....	<b>25</b>
2.5.2.2. Implantes .....	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
4.1. Delineamento Experimental .....	<b>29</b>
4.2. Fase 1 – Síntese e Caracterização Físico-Química.....	<b>30</b>
4.2.1. Obtenção das Matrizes de PCL .....	<b>30</b>
4.2.2. Síntese do compósito PCL/HA.....	<b>31</b>
4.2.3. Obtenção do compósito farmacológico PCL/HA/VC.....	<b>32</b>
4.2.4. Caracterização físico-química da matrizes de PCL .....	<b>32</b>
4.3. Fase 2 - Caracterização biológica das matrizes de PCL .....	<b>34</b>
4.3.1. Biocompatibilidade <i>in vitro</i> .....	<b>35</b>
4.3.1.1. Teste de Citotoxicidade .....	<b>35</b>
4.3.1.2. Teste de Genotoxicidade.....	<b>36</b>
4.3.1.3. Teste de Imunotoxicidade .....	<b>38</b>
4.3.1.4. Teste de Hemocompatibilidade .....	<b>41</b>
4.3.2. Biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....	<b>43</b>

4.3.2.1. Irritação dérmica primária .....	43
4.3.2.2. Toxicidade sistêmica aguda .....	45
4.3.3. Sensibilidade antimicrobiana .....	45
4.4. Fase 3 – Obtenção dos protótipos baseados na PCL .....	48
4.5. Fase 4 – Avaliação Pré-Clínica .....	49
4.5.1. Biodegradação enzimática <i>in vitro</i> .....	49
4.5.2. Implantes <i>in vivo</i> em tíbias de coelho .....	51
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
5.1. Fase 1 – Síntese e caracterizações físico-químicas.....	60
5.2. Fase 2 – Caracterização biológica das matrizes .....	68
5.2.1. Ensaio de Biocompatibilidade <i>in vitro</i> .....	68
5.2.2. Ensaio de Biocompatibilidade <i>in vivo</i> .....	82
5.2.3. Determinação da Sensibilidade Antimicrobiana.....	87
5.3. Fase 3 – Obtenção dos Protótipos baseados no PCL.....	91
5.4. Fase 4 – Avaliação Pré-Clínica.....	94
5.4.1. Biodegradação enzimática <i>in vitro</i> .....	94
5.4.2. Implantes em tíbias de coelhos e osteointegração .....	122
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>129</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>131</b>

---

---

# **1. INTRODUÇÃO**

---

---

Na última década, a ciência de biomateriais tornou-se responsável por grande parte das inovações tecnológicas presentes nas áreas biomédicas e biotecnológicas para aplicações em saúde. Dentre estes, os materiais poliméricos têm se destacado por sua importância especialmente na aplicação de dispositivos médicos. As aplicações incluem a engenharia de tecidos, implantes, órgãos artificiais, reparos ósseos, sistemas de liberação controlada, entre outros.

O expressivo desenvolvimento de biomateriais poliméricos tem representado um poderoso instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas. No entanto, sua utilização exige um cuidado pré-clínico e ético criterioso na análise dos riscos e benefícios que cada biomaterial possa oferecer.

Sistemas implantados compostos por polímeros podem ser biorreabsorvíveis ou não-biorreabsorvíveis, de acordo com suas características de biodegradabilidade. Aqueles que não são biodegradáveis precisam ser removidos posteriormente, o que requer processos cirúrgicos. Já, os biodegradáveis apresentam vantagens sobre esses anteriores, pois são totalmente absorvidos pelo organismo, por meio da hidrólise química ou enzimática, não necessitando remoção subsequente e proporcionando melhor adesão e aceitação dos pacientes. Estas características possibilitam seu uso para implantes, sem necessidade de subsequente remoção por novas operações cirúrgicas.

Os biomateriais para aplicações médicas se caracterizam pela necessidade de apresentarem sua biocompatibilidade comprovada assim como sua eficácia na aplicação final. Desta forma, a necessidade de caracterização e avaliação pré-clínica adequada se faz necessária. O biomaterial polimérico e seus produtos de degradação não podem causar efeitos tóxicos ou nocivos ao organismo e devem apresentar as resistências estruturais adequadas aos processos de regeneração

ou substituição de órgãos e tecidos. Neste trabalho de doutorado foram realizados estudos relacionados à síntese nacional do polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), a fim de demonstrar suas propriedades de biocompatibilidade desejáveis como biomaterial polimérico para futuras aplicações médicas e odontológicas.

Este projeto visou como inovação tecnológica e objetivo principal o desenvolvimento, caracterização e estudo pré-clínico de dispositivos microimplantáveis baseados em matrizes biorreabsorvíveis e biocompatíveis do compósito poli( $\epsilon$ -caprolactona) e hidroxiapatita (PCL/HA) com finalidade de induzir a regeneração óssea de forma controlada, e restaurar desta maneira as características originais do tecido que recebeu o implante.

Os dispositivos médicos usados no Brasil são, em sua maioria, importados e acabam por gerar gastos elevados por parte da Previdência Social e Sistemas de Saúde. Dados do Ministério da Saúde e do CGEE/MCT mostram que somente em 2004, foram gastos, pelo SUS, entre R\$ 60 e 100 milhões em implantes ortopédicos como placas, parafusos, hastes, entre outros. Aliado a isto, com o aumento continuado da longevidade do brasileiro – segundo o IBGE a expectativa de vida aumentou quase 10% entre 1980 e 2006 – haverá necessidade de se ampliar a oferta desta tecnologia.

Desta forma, este trabalho de doutorado corrobora com a enorme necessidade de desenvolvimento científico e tecnológico nesta área como forma de atender às necessidades da sociedade, melhoria da saúde geral, redução de custos dos materiais envolvidos, e oferecer alternativas para uma melhora na eficácia do processo de osteointegração e cicatrização óssea, assim como acompanhar o estado da arte mundial em biomateriais e dispositivos médicos.

---

---

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---

## 2.1. BIOMATERIAIS

Na maioria das especialidades médicas e odontológicas, materiais diferentes estão sendo bastante usados para fins diagnósticos e terapêuticos. Esses materiais que podem ser interpostos entre os sistemas biológicos a fim de se avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo são chamados de biomateriais (WILLIAMS, BLACK, & DOHERTY, 1992).

Tendo em vista sua utilização em aplicações médicas e terapêuticas em tratamentos, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corpóreas e extracorpóreas, as definições de “biomaterial” não se restringem a um conceito específico (WILLIAMS, 1986, 1992, 2008). Para se definir um biomaterial é preciso correlacionar suas propriedades físicas e químicas, associadas às suas propriedades biológicas.

A interação destas propriedades com outros fatores complexos tais como os clínicos e tecnológicos, de fabricação e processamento, também devem ser considerados, e alcançar a combinação entre as propriedades inerentes ao material através da interface entre tecidos vivos e não-vivos torna-se o grande desafio desta ciência (OREFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006).

No desenvolvimento de biomateriais, muitas classes diferentes de materiais têm sido usadas, tais como, metais, cerâmicas, polímeros naturais e sintéticos e compósitos. Estas substâncias, ou a combinação delas, quando designadas para incorporação em sistemas vivos, durante um período de tempo determinado e/ou indeterminado, devem ser inertes e apresentarem propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade (PARK & LAKES, 2007)

O termo biocompatibilidade pressupõe que a aplicação clínica de um biomaterial não causa nenhuma reação adversa no organismo, tal como inflamação e tromboembolismo, e nem põe em risco a vida de um paciente (WOLF, KAARWATH, & GROTH, 1988). Definições mais precisas do termo biocompatibilidade, incluem que o material não é nem tóxico, nem alergênico, nem carcinogênico, nem mutagênico, e não influencia na fertilidade de um dado paciente (KLINKMANN, WOLF, & SCHMITT, 1984; WILLIAMS, 2002, 2008). Ao lado da biocompatibilidade, a propriedade biológica que determina a capacidade do biomaterial realizar as funções para as quais ele será projetado é a chamada biofuncionalidade. E, ainda, os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico no organismo como biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. (HENCH & WILSON, 1993, apud CARDOSO, 2010)

O sucesso de reparo por meio da utilização de dispositivos médicos baseados em biomateriais biocompatíveis, na substituição de tecidos moles e duros, fixação de fraturas e implantes, está relacionado à condição fisiológica do paciente, e pericia clínica do profissional responsável. Assim, para uma dada aplicação, as propriedades físicas necessárias, tais como as mecânicas, ao lado da chamada biocompatibilidade de um material são vitais para seu uso como parte de um dispositivo biomédico (RATNER, HOFFMAN, SCHOEN et al, 2004; OREFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006).

## **2.2. BIOMATERIAL: POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)**

O polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) tem sido alvo de intensas pesquisas na área de polímeros reabsorvíveis devido a combinação de suas propriedades

de biocompatibilidade e biodegradabilidade (SAAD et al, 1999; JONES et al, 2002; SINHA et al, 2004; XIAO, LIU & HUANG, 2008; YE et al, 2009). Recentemente, o polímero PCL tem se destacado por suas aplicações como matriz para o crescimento celular na engenharia de tecido ósseo, demonstrando possuir as propriedades mecânicas necessárias para servir como um arcabouço em enxertos aloplásticos, onde as propriedades mecânicas têm que ser mantidas até que o processo de restauração do tecido biológico se complete (OYANE et al, 2005; YU et al, 2009).

Vários métodos de síntese do PCL têm sido propostos na literatura, destacando-se a polimerização por abertura de anel utilizando os mecanismos de iniciação radicalar ou iônica. Entre os vários métodos de polimerização, a polimerização por abertura de anel de lactonas cíclicas é uma importante alternativa, pois o processo não gera grupos que possam limitar a conversão do monômero em polímero (JONES et al, 2002; OYANE et al, 2005). O poli ( $\epsilon$ -caprolactona) é um poliéster com caráter hidrofóbico, como resultado da presença de grupos metilênicos não-polares e um único grupo éster relativamente polar em cada unidade que se repete. Tem alta permeabilidade, natureza semicristalina, alta solubilidade, baixo ponto de fusão e estabilidade ao calor (DE QUEIROZ et al, 2002; DE ALMEIDA & DE QUEIROZ, 2003; DE ARRUDA ALMEIDA et al, 2004).

O PCL é um polímero reabsorvível que devido a sua biocompatibilidade é aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em seres humanos, sendo atualmente utilizado em materiais de sutura e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Para aliar as propriedades de osteocondutividade e bioatividade, PCL e hidroxiapatita têm sido combinados para a obtenção de

compósitos de PCL/HA. (KIM, et al, 2004; HAE WON, 2007)

### **2.2.1 Biodegradabilidade do Poli( $\epsilon$ -Caprolactona)**

A biodegradabilidade apresenta-se como um importante requisito para um biomaterial sintético que será utilizado no reparo ósseo, uma vez que a melhor maneira de se reparar um defeito ósseo é estimulando o próprio tecido ao auto reparo. Para que ocorra uma substituição óssea ideal as propriedades mecânicas devem ser mantidas, ou seja, a degradação deve ocorrer em um ritmo no qual seja possível que a regeneração óssea possa formar um tecido com as propriedades mecânicas mais próximas do tecido original (RHEE, 2004).

O poli ( $\epsilon$ -caprolactona) é um poliéster semicristalino alifático dotado de uma variedade de propriedades biocompatíveis como a atoxicidade e reabsorção após um período apropriado de implante. A taxa de biodegradação do PCL pode variar consideravelmente de acordo com as condições de sua síntese. A principal peculiaridade deste polímero advém do seu mecanismo de biodegradação por hidrólise da ligação éster e formação de produtos de decomposição que são intermediários normais do metabolismo celular (PITT, CHASALOW & HIBIONADA, 1981; PITT, 1990).

Devido à combinação única da biocompatibilidade, permeabilidade e biodegradabilidade, os polímeros e copolímeros do PCI são aplicados na medicina principalmente como sutura biodegradável e próteses reabsorvíveis (RHEE, CHOI, & JIM, 2002, MEI et al, 2005).

### 2.3. ENGENHARIA DE TECIDOS BIOLÓGICOS

Um dos maiores objetivos da engenharia de tecidos é regenerar tecidos e órgãos. Assim, a substituição de tecidos ou órgãos, parcialmente ou na sua totalidade, decorrentes de trauma ou determinada patologia, é um dos grandes desafios para as ciências da saúde e dos materiais.

Atualmente, isto têm sido realizado no desenho de dispositivos cirúrgicos implantáveis na substituição ou reparo de tecidos moles ou duros, recobrimento de próteses com a função de acomodar o crescimento de tecido no interior dos poros intencionalmente produzidos, promovendo assim, a fixação biológica. Estes modelos denominados internacionalmente como “scaffolds” funcionam como arcabouços sintéticos porosos, ou uma matriz que mimetiza a própria matriz extracelular corpórea, na qual as células podem se aderir, multiplicar, migrar e facilitar a regeneração tecidual. Esses biomateriais utilizam-se de suas propriedades osteocondutoras, com o objetivo de facilitar a migração de osteoblastos do osso adjacente para o sítio implantar, auxiliando o processo de migração (WEN et al, 2002). A associação entre a presença de poros e uma superfície rugosa tendem a produzir melhor contato osso-implante e, conseqüentemente, favorecer a interação biomecânica do dispositivo implantado.

Historicamente, o primeiro trabalho a propor um modelo de crescimento ósseo foi realizado em 1901 por Greenfield (REF), o qual projetou uma raiz dentária artificial metálica em formato de gaiola. Essa estrutura permitiria o crescimento ou preenchimento por tecido ósseo e, no decorrer do tempo, demonstrou-se perfeitamente estabilizada ao leito cirúrgico. Somente cinquenta anos depois, no início da década de 60, é que surgiu o primeiro dispositivo poroso,

o material Cerosium®, um compósito com matriz à base da mistura de alumina, sílica e carbonato de cálcio, cujos poros eram parcialmente preenchidos com e resina epóxi inerte conferindo propriedades mecânicas adequadas para aplicações em áreas sujeitas a cargas funcionais (HENCH & WILSON, 1993). E, ao final desta década foi proposto também, pela primeira vez, o termo osteointegração (BRANEMARK et al., 1969; KIENAPFEL, 1999).

No caso do sistema esquelético, os biomateriais devem apresentar resistência mecânica adequada, além de propriedades morfológicas e físico-químicas, que permitam a este material alcançar o grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade necessários ao desempenho adequado de sua função, que se baseia em uma osteointegração adequada decorrente de processos bem sucedidos de implantologia e enxertia (GUEDES E SILVA et al, 2008; YOSHIMOTO et al, 2009).

O osso é um tecido de sustentação altamente especializado, e apresenta como funções principais: apoio mecânico, locomoção e proteção, atuando ainda como reservatório metabólico dos sais minerais. Apresenta-se como um tecido dinâmico, que sob a influência de fatores mecânicos, físicos e hormonais, indica atividades de formação, destruição e regeneração, o que exige um constante processo de remodelação (SPENCE, 1991; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O tecido ósseo é composto por células de sustentação (osteoblastos e osteócitos), matriz não mineralizada de colágeno e glicosaminoglicanas (osteóide), sais minerais inorgânicos depositados na matriz e células remodeladoras envolvidas no processo de reabsorção (osteoclastos). As superfícies, interna (endóstio) e externa (perióstio), do osso são recobertas por camadas de tecido

conjuntivo e responsáveis, respectivamente, pela nutrição e manutenção de um contínuo fornecimento de células osteoblásticas para a formação ou reparação óssea. Assim, durante um procedimento cirúrgico atenção especial deve ser dada a essas superfícies (WEINLAENDER, 1991).

Os tipos de tecido ósseo são identificados como osso primário ou imaturo, caracterizado pela organização irregular das fibras de colágeno e possuir baixa resistência mecânica, e o osso secundário ou lamelar, mais resistente e que apresenta uma organização regular das fibras colágenas dispostas paralelamente umas às outras, ou organizadas de maneira concêntrica ao redor do canal vascular. Na formação de cada tipo de osso, bem como no processo de reparo após uma fratura, trauma ou cirurgia de implante, o primeiro tecido ósseo a aparecer é o imaturo, que é substituído posteriormente pelo osso lamelar.

Dessa forma, além das propriedades essenciais de biocompatibilidade e biofuncionalidade necessárias à caracterização de qualquer biomaterial, em relação a um biomaterial implantável, aplicado à engenharia de tecidos, sujeito a cargas estáticas e dinâmicas são necessárias outras características como: capacidade de suportar e transferir cargas; possuir estabilidade no organismo e ser passível de esterilização; e, apresentar uma cinética de superfície controlada, indutividade e condutividade na cicatrização da região cirúrgica.

Dessa forma, na implantologia e enxertia, todos os grupos de materiais poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos vêm sendo estudados, desenvolvidos e aplicados, em maior ou menor escala, para atender aos requisitos desejados para uma reabilitação duradoura (COELHO et al, 2005, KONIG JR, 2010)

#### **2.4. DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS BIOREABSORVÍVEIS**

Os implantologistas estão amplamente familiarizados com os dispositivos metálicos para fixação de fraturas. Entretanto, os implantes metálicos não estão isentos de complicações decorrentes de fixação óssea. Estes materiais deveriam ser removidos após a consolidação óssea, por causa do fenômeno de remodelação óssea adaptativa, ou “stress-shielding”, e por poderem provocar dor devido a sua localização subcutânea (ENGH et al, 1992; VIEIRA, GUEDES & MARQUES, 2009).

É fato bem conhecido que a remodelação óssea ocorre sobre estresse pela lei de Wolff. Porém na presença de fixação rígida, através de implante metálico, este absorveria a maioria da tensão, ficando pequena parcela para o osso. Simultaneamente a tais fatos, pode ocorrer osteoporose abaixo do implante, com diminuição da resistência óssea, liberação de íons metálicos dos dispositivos de fixação, reação do tipo corpo estranho e migração tardia dos parafusos metálicos (BÖSTMAN et al, 1987, 1989; HIRVENSALO, 1990). A literatura mostra que a degradação dos parafusos biodegradáveis, especialmente os de poli-acido-láctico, ocorre dentro do organismo por hidrólise, sendo o tempo estimado entre 60 e 100 dias, o que poderia ser suficiente para fixar fraturas em ossos esponjosos até que o processo de consolidação se torne efetivo. Para o PCL a estimativa de biodegradabilidade no organismo está entre 12 e 18 meses (HOLLINGER & BATTISTONE, 1986; KIM, KNOWLES & KIM, 2004; FUNABASHI, NINOMIYA & KUNIOKA, 2009).

Nas duas últimas décadas, o interesse pelo desenvolvimento de dispositivos de fixação totalmente degradáveis com propriedades semelhantes às do osso tem aumentado significativamente. Neste sentido, vários estudos experimentais com implantes biodegradáveis para fixação de fraturas, em cirurgia ortopédica, têm sido publicados nos últimos anos e demonstram a efetividade de tais materiais quando comparados aos implantes metálicos (VAINIONPPA et al, 1986; VASENIUS et al, 1989; BOSTAMN, et al, 1987; BUCHOLS, HENRY & HENLEY, 1994; JACOBSEN, DE LICHTENBERG & JENSEN, 1997; MICHELSON, 1995, MULLER, et al, 1979).

Também é fato conhecido que o procedimento cirúrgico para implante de um biomaterial envolve um elevado risco associado à infecção devido a microorganismos gram negativos não fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter spp.*; *Stenotrophomonas maltophilia*); bactérias gram positivas (stafilococos coagulase negativo; *Enterococcus spp.*; estreptoco do grupo B), e fungos (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*); normalmente associados à pacientes com antibioticoterapia prolongada. Por isso, este trabalho aborda também a obtenção de uma matriz de PCL contendo o antibiótico vancomicina (CIAPETTI et al, 2003; DE ALMEIDA et al, 2003; DE ALMEIDA & DE QUEIROZ, 2004).

## **2.5. BIOCOMPATIBILIDADE E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA**

A avaliação biológica, ou biocompatibilidade, de biomateriais e dispositivos médicos é realizada por meio de ensaios efetuados de acordo com normas internacionais designadas mundialmente como “*guidelines*”. As normas são publicações técnicas internacionais de protocolos e métodos, *in vitro* e *in vivo*,

desenvolvidos e padronizados a partir de um consenso envolvendo revisões literárias, pesquisas científicas, entre outros. A adoção dessas normas na pesquisa pré-clínica e de biocompatibilidade visa práticas mais consistentes, eficazes e eficientes, assim como aprimoram e uniformizam a avaliação de eficácia e segurança dos produtos para a saúde, e possibilitam um melhor gerenciamento do risco destes produtos pelas agências reguladoras. A Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), e a International Organization for Standardization (ISO) têm desenvolvido as normas para estes testes e ensaios, assim como outras farmacopéias específicas tal como da Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM) (ASTM, 2010; ISO, 2010; OECD, 2010).

Uma vez que esses dispositivos são utilizados para diagnósticos, cirurgias e terapias em infecções, tumores, acidentes, ou ainda, malformação congênita, eles não devem provocar reações tóxicas e carcinogênicas, e nem reações inflamatórias locais. A interação com um ambiente fisiológico deve ocorrer de forma que o material não afete significativamente o corpo, e nem o ambiente do corpo afete de modo adverso o material.

Uma diretriz geral e compreensiva dos testes de biocompatibilidade de materiais para aplicações biomédicas é dado pela International Organization for Standardisation ISO – 10993 que contém atualmente 20 partes atualizadas até 2010, e engloba as diretrizes desde a caracterização de cada material ou dispositivo médico, até seleção adequada de ensaios necessários e requisitos técnicos específicos para cada ensaio de biocompatibilidade (ISSO 10.993, 2010).

Essa avaliação da biocompatibilidade é realizada através de um conjunto

de testes, *in vitro* e *in vivo*, que sejam complementares, de maneira a oferecer um resultado com os mais criteriosos níveis científicos e de informação, e que sejam validados e reconhecidos pelos meios científicos e pelos órgãos regulamentadores para utilização nas áreas de aplicação médicas.

### **2.5.1. Ensaio *in vitro***

No intento de se refinar e diminuir a utilização de animais de laboratório na pesquisa biomédica iniciou-se na década de 80 o desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* para a avaliação de eficácia e segurança de produtos. Estes modelos foram utilizados com sucesso para a demonstração de mecanismos de ações específicos, mostrando-se úteis e preditivos no que se referem aos sistemas biológicos realizados em microorganismos, células, tecidos e órgãos, animais ou humanos. Assim, vêm sendo desenvolvidos, validados e integrados nas diretivas internacionais tais como a ISO e OECD.

Assim, o uso de métodos *in vitro* diminui a extensão dos testes em animais, além de reduzir significativamente a quantidade de tempo necessária e o custo dos materiais testados (FRAZIER & GOLDBERG, 1990). Em muitos casos, uma investigação apropriada *in vitro* pode ser usada para a triagem prospectiva dos biomateriais, antes dos procedimentos em animais. Um exemplo disto é a Parte 4 da ISO 10993, que se refere à hemocompatibilidade de materiais biomédicos. Nesta ISO, a aplicação de diferentes métodos *in vitro* é sugerida para a estimativa da hemocompatibilidade. Esta abordagem reflete os numerosos esforços que têm sido desenvolvidos para a padronização de métodos *in vitro* e a oportunidade de se empreender pesquisas comparativas empregando métodos *in vitro*, *in vivo* ou

*ex vivo*, que permitem uma predição geral do desempenho clínico dos materiais (DAWIDS, 1993; SCHMIDT, 1994; ISO 10.993, 2010)).

Dentre os métodos de bioensaios, os primeiros a serem realizados para prever a compatibilidade da substância aos vários tecidos são os ensaios de toxicidade celular. Os testes *in vitro* de cultura celular estimam a toxicidade da substância em relação a células específicas, e originam dados qualitativos e quantitativos de efeitos precisos. Estes resultados permitem identificar se há efeitos sobre a proliferação de células animais, as quais são colocadas em contato direto ou indireto com o material. A estimativa da citotoxicidade é parte da avaliação inicial da biocompatibilidade representada pela Parte 5 da norma. Os procedimentos para esta finalidade são descritos em várias padronizações internacionais e continuam sob investigação intensa gerando um enorme número de publicações na área. As normativas acompanham esta evolução com a atualização periódica das normas e suas partes específicas. No caso de citotoxicidade a primeira versão publicada data de 1993 e a última atualização foi realizada em 2009. (DIDISHEIM et al, 1984, a, b; ISO 10.993, 2010),

É digno de nota ser possível distinguir entre os testes *in vitro* de biocompatibilidade geral, e os específicos. O primeiro é desenvolvido usando linhagens celulares bem estabelecidas que possam ser facilmente cultivadas por várias passagens, por exemplo, fibroblastos (ex. BALB 3T3 clone 31, L929 fibroblastos de rato, CHO-K1 fibroblastos de hamster), e os resultados podem ser usados como uma primeira triagem de materiais. Para se obter informações mais específicas na compatibilidade de um biomaterial, linhagens celulares primárias, que sejam derivadas do tipo de tecido no qual o material, podem ser usadas. Um

exemplo de tais investigações é o uso de osteoblastos para testar a toxicidade de biomateriais prováveis de contactar o osso. Os resultados são mais apropriados e permitem um melhor prognóstico do desempenho *in vivo* do material pesquisado. Deve ser levado em conta que esses materiais biocompatíveis podem, também, ser bioativos, processo este que pode resultar na estimulação de parâmetros biológicos, tais como o crescimento celular (ISO 7405, 2008; ISO 10.993, 2010).

Dessa forma, na pesquisa de biomateriais e na engenharia de tecidos, os ensaios *in vitro* estão sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de processos tais como implantes, arcabouços (“scaffolds”) associados a culturas de células-tronco, e sistemas de liberação controlada de drogas.

#### 2.5.1.1. Mecanismo geral de ação *in vitro*

Substâncias tóxicas podem induzir os seguintes efeitos nas células: dano na membrana, enfraquecimento na atividade metabólica, e dano no material genético (genotoxicidade). Na maioria dos casos, entretanto, há um efeito sinérgico entre todos esses processos. Dano na membrana celular surge quando alguma substância tóxica perturba a estrutura das membranas biológicas, por exemplo, pelo aumento da permeabilidade, mudando assim os processos de transporte de água, íons e metabólitos. Estes eventos pode finalmente levar à lise celular, i.e., morte celular. Componentes de biomateriais que podem ser tóxicos incluem compostos símiles à surfactantes, monômeros residuais e plastificantes (TANZI et al, 1994). Danos à atividade metabólica da célula podem ser causados por substâncias reativas, por exemplo, íons de metais pesados, monômeros residuais ou radicais, que inibem a atividade de enzimas celulares. As influências

tóxicas exercida por estas substâncias podem levar a um decréscimo na produção de energia e síntese protéica, resultando em mudanças no transporte ativo via membranas celulares, proliferação celular reduzida, e finalmente morte celular (LUGSCHEIDER, 1994).

#### 2.5.1.2. Citotoxicidade de Materiais

Métodos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade envolvem o uso de mudanças que vão desde a morte celular até alterações bem sutis de certas funções celulares. Estas mudanças incluem: morte celular, indicado pelo arredondamento e descolamento das células do substrato, ausência ou mudança na atividade metabólica, e lise das células; redução da adesão celular; alterações na morfologia celular e aumento da vacuolização do citoplasma; e proliferação celular reduzida. Alguns exemplos de componentes de biomaterial que causam efeitos citotóxicos são: íons livres de metais, por exemplo,  $Ni^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ ; compostos cerâmicos, tais como nitreto de alumínio e diboreto de titânio; plastificantes, por exemplo, ftalato dioctil; e monômeros residuais, tais como metacrilatos (WATAHA, HANKS & CRAIG, 1993).

O teste de toxicidade deve ser desenvolvido com linhagens celulares estabelecidas, por exemplo, as linhagens celulares de camundongo L929 ou BALB 3T3 clone 131, ou com células primárias (TANZI et al, 1994) Linhagens celulares estabelecidas são particularmente bem adequadas para a finalidade de triagens, e têm mostrado resultados mais reproduzíveis que os ensaios usando culturas celulares derivadas de tecidos normais (JOHNSON et al, 1985).

Enquanto a perda da integridade da membrana possa ser considerada

como um evento terminal na vida de uma célula, a diminuição da atividade metabólica pode apresentar uma indicação inicial da morte celular. Um dos ensaios mais comuns para testar a viabilidade celular é o ensaio de MTT, desenvolvido por MOSMANN (1983). O ensaio é baseado na clivagem redutiva do sal tetrazólio amarelo (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a um composto formazan púrpura pela atividade desidrogenase da mitocôndria intacta (WILSON, 2000). Conseqüentemente, esta conversão somente ocorre nas células vivas. O teste do MTT foi comparado com a incorporação da <sup>3</sup>H-timidina ou <sup>3</sup>H-leucina, que mede o DNA ou a síntese protéica, e foi julgado ser uma técnica útil para a triagem preliminar da citotoxicidade (SGOURAS & DUNCAN, 1990). Por causa da facilidade de seu desempenho e seu impacto, o teste do MTT tem sido aplicado em muitas outras investigações, tais como nos testes de toxicidade de polímeros, ligas, e cerâmicas. O ponto fraco do ensaio de MTT é que os cristais de formazan são insolúveis em água, impedindo as observações espectrofotométricas diretas, e, portanto, o uso de solventes orgânicos tais como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou isopropanol, é necessário. Deste modo, um novo sal de tetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS), solúvel em água, foi sintetizado, e demonstrado ter vantagens significativas (BARLTROP, 1991).

O ensaio com MTS tornou-se um teste padrão para a avaliação da citotoxicidade de biomateriais. O ensaio fundamenta-se no procedimento originalmente desenvolvido por BOREFREUND & PUERNER (1984) para a triagem de agentes citotóxicos, em geral, sobre uma monocamada de células, e

tem sido largamente usado para testar a citotoxicidade de materiais (HIGA et al, 1999; ROGERO et al, 2000; MAIZATO et AL, 2003).

O método é baseado na avaliação quantitativa de células viáveis, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio MTS e o agente acoplador de elétrons metassulfato de fenazina (PMS). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto formazan que é solúvel no meio de cultura e então efetuada uma análise colorimétrica da coloração incorporada. A quantidade de MTS incorporada pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. O potencial citotóxico da amostra é avaliado em um intervalo de diluições do extrato concentrado do biomaterial, e a concentração que produzir uma redução de 50% na absorção de MTS é tomado como o parâmetro de citotoxicidade (BARLTROP et al.,1991; CORY et al., 1991).

O ensaio de citotoxicidade de biomateriais é efetuado conforme a ISO 10.993 – parte 5. A linhagem celular recomendada é que seja uma linhagem celular estabelecida de mamíferos obtida de um repositório reconhecido como o American Type Culture Collection (ATCC). Para a realização do ensaio, a cultura de células de ovário de hamster chinês CHO K<sub>1</sub> (CHO) é amplamente utilizadas. As células CHO têm sido apontadas como um sistema biológico adequado, pois são células que apresentam uma série de características vantajosas, em relação, por exemplo, aos linfócitos humanos. As células CHO pertencem a uma linhagem celular geneticamente estabelecida, e não se tornam senescentes com passagem por muitas gerações, ao contrário de células primárias (ISO 10.993, 2010).

### 2.5.1.3. Genotoxicidade de Materiais

Segundo definição da ISO 10.993, Parte 3, a genotoxicidade de biomateriais é um efeito danoso ao material genético comumente definido como dano ao material gênico induzido pela ligação covalente de produtos, que promove mudança na estrutura e/ou no número de genes e cromossomos (ISO 10.993, 2010).

Há testes *in vitro* amplamente validados que são usados para prever a genotoxicidade de uma substância usando várias cepas de bactérias ou células de mamíferos. Deve ser enfatizado aqui que a maioria dos agentes genotóxicos gera danos ao material genético em níveis de dose abaixo daqueles que causam citotoxicidade. Somente em concentrações muito altas, que resultam numa desintegração nuclear, permite ser observado um efeito citotóxico imediato de uma substância (AMES, 1979; HOLDEN, 1982; ROY, 2007; BRAMBILLA et al, 2010).

O teste do micronúcleo (MN) é um teste citogenético que utiliza células expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos e, após cultivo celular, permite detectar agentes clastogênicos, aqueles que produzem quebras cromossômicas, e agentes aneugênicos, aqueles que interferem no fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular. Os micronúcleos são originários de fragmentos cromossômicos e/ou cromossomos inteiros que não foram incorporados pelos núcleos-filhos na anáfase. A indução de micronúcleos pode ocorrer em qualquer tipo celular, desde que esse passe por uma divisão celular. A técnica foi desenvolvida inicialmente por SCHMID (1975)

em células da medula óssea de camundongos. Atualmente tem sido utilizado para avaliar novos fármacos (PHELPS, GARRIOT, & HOFFMAN, 2002; GARRIOT, PHELPS & HOFFMAN, 2002) e a biocompatibilidade de materiais para a área médica e odontológica como uma alternativa mais barata em relação à análise de aberrações cromossômicas (OECD 473, 1997; SINGH, et al 2009; TAVARES et al, 2009; ISO 10.993, 2010). No caso de células imortalizadas, são utilizadas principalmente as células de ovário de hamster chinês (CHO) e pulmão (V79 e CHL) (DEAN & DANFORD, 1984; OCHI-LOHMANN et al, 1996; RIBEIRO, 2003).

#### 2.5.1.4. Imunotoxicidade de Biomateriais

As interações com agentes imunotóxicos podem alterar o balanço do sistema imune, o qual pode resultar em efeitos indesejáveis, tais como imunossupressão, resultando em alterações nos mecanismos de defesa contra patógenos e neoplásicos, alergia e auto-imunidade.

O termo “agente imunotóxico” é utilizado para indicar produtos ou moléculas biológicas, incluindo subprodutos de sua biodegradação, em determinadas circunstâncias. No contexto da ISO 10993 – parte 20, esses agentes incluem materiais usados na produção de dispositivos médicos e / ou produtos químicos presentes como resíduos nesses materiais (ISO 10993, 2010).

Imunotoxicidade pode aparecer de diversas formas, tais como comprometimento funcional (como a supressão da função imune), desenvolvimento de sensibilização alérgica, e provocar, direta ou indiretamente, respostas auto-imunes. No caso da imunotoxicidade ocorrer devido a um efeito direto do sistema imune, sítios sistêmicos ou locais agem com alvo aos agentes, e

podem resultar no aumento da incidência ou severidade de um efeito infeccioso ou neoplásico. Por exemplo, uma infecção viral pode tornar-se um linfoma do tipo B, ou uma exposição UV-B pode progredir para um câncer de pele em pacientes transplantados imunossuprimidos. Imunotoxicidade direta pode deflagrar a produção de antígenos que não estão diretamente relacionados ao agente imunotóxico, mas que conseqüentemente podem estimular uma resposta alérgica ou auto-imune devido à exacerbação dessas respostas. Assim, imunotoxicidade pode resultar de efeitos indiretos. Por exemplo, lupus induzida por hidralizina é resultado de uma deficiência no sistema complemento. Assim, a imunotoxicidade pode ser resultado da indução de um agente ou de uma atividade do sistema imune modificada indiretamente (LUSTER & ROSENTHAL, 1993; KIMBER & DEARMAN, 2002; DESCOTES, 2004, 2006)

Em casos alérgicos, por exemplo, o sistema imune responde a compostos de alto peso molecular e conjugados químicos com sitio protéico. Os efeitos clínicos podem ser alergias de trato respiratório (asma e rinite, por exemplo), alergias gastrointestinais e dermatites alérgicas de contato. Auto-imunidade pode ocorrer como resultado de uma alteração tecidual, função endócrina ou regulação imune. Disfunção auto-imune se manifesta pela produção de anticorpos em resposta a antígenos próprios ou modificados, ou pela destruição tecidual de linfócitos T e/ou reação de macrófagos a antígenos endógenos (EPA, 1996). Produtos também podem induzir doenças auto-imunes. A ligação de materiais com tecidos ou proteínas séricas pode gerar uma resposta imune contra esses auto-antígenos modificados e resultar na injúria ou morte celular (ANDERSON & LANGONE, 1999; HUANG et al, 2010).

Em função da complexidade do sistema imunológico, diversos biomarcadores de toxicidade devem ser avaliados para caracterização do potencial imunotóxico de uma substância. As prostaglandinas são os principais mediadores de inflamação. Seu metabolismo começa com a liberação de ácido araquidônico por ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolípidos provenientes da membrana celular conforme mostrado na FIG. 1.

O ácido araquidônico é o substrato para ação das cicloxigenases 1 e 2 (COX 1 e COX2) e para a 5-lipoxigenase, formando as prostaglandinas e tromboxanas pelas primeiras enzimas, e os leucotrienos pela segunda enzima. É bem estabelecido que a COX1 é uma enzima que participa do metabolismo fisiológico celular, responsável para produção de muco pelas células gástricas, pela manutenção da pressão sanguínea nos rins e pela proliferação de queratinócitos, por exemplo. Por isso a COX1 é chamada de COX constitutiva. Já a COX2 é uma enzima sintetizada em processos inflamatórios, daí chamada de COX induzida. Ambas as COXs sintetizam a prostaglandina E2 (PGE2).

Para avaliação do potencial imunotóxico, métodos alternativos têm sido propostos, para avaliação e registro de produtos. Um estudo preliminar realizado por CARFI et al (2006), avaliou o potencial imunotóxico de substâncias com conhecidos efeitos imunotóxicos utilizando um conjunto de testes *in vitro*. Desta forma, uma metodologia *in vitro*, que detecte estas prostaglandinas, é um importante screening de atividade antiinflamatória.

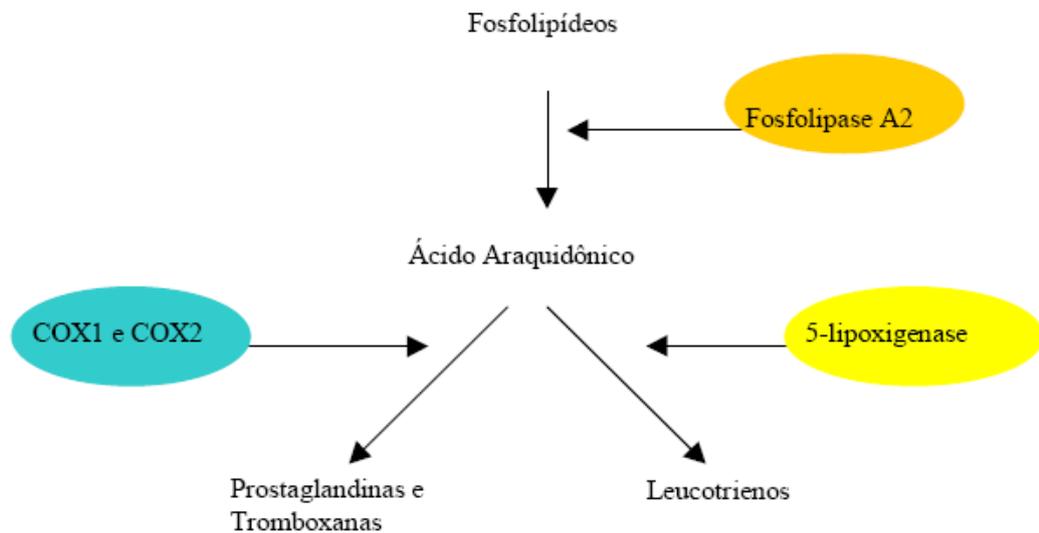


FIGURA 1- Cascata da produção de prostaglandina

#### 2.5.1.5. Biodegradação *in vitro*

Muitos fatores determinam a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis, entre eles: local de implante, solitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química e estereoisométrica, cristalinidade, morfologia, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga da superfície, pH, presença de aditivos e outros (LAM et al, 2008). A degradação *in vitro* mostra-se como uma boa alternativa de estudo quando comparados aos estudos *in vivo*. Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições do ensaio, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação, podem ser quantificados e monitorados (JOSHY & MADRAS, 2008).

Em todos os processos de biodegradação a hidrólise ou degradação hidrolítica é a etapa inicial do processo. Muitos autores têm proposto testes *in vitro* para medir a taxa de biodegradação. Uma das metodologias de degradação de polímeros é a mediada por enzimas. Enzimas são proteínas que aceleram as reações químicas e, portanto, são conhecidas como catalisadores biológicos. Uma das principais características das enzimas é aumentar a velocidade de uma reação sem alterar os processos reativos. Assim, durante os estágios intermediários da reação, a enzima pode permanecer ligada covalentemente ao substrato que está sendo transformado, porém, ao final da reação a enzima estará na sua forma original juntamente com os produtos formados. As enzimas aumentam a velocidade da reação sem alterar as propriedades termodinâmicas do sistema com o qual está interagindo. Portanto, na degradação enzimática as enzimas são capazes de quebrar ligações específicas da cadeia polimérica diminuindo a energia de ativação, ou seja, enfraquecendo certas ligações químicas e permitindo que uma menor quantidade de energia seja necessária para a reação (GAN et AL, 1997; KULKARNI et al, 2008).

### **2.5.2. Ensaio *in vivo***

Apesar do estabelecimento dos modelos *in vitro* ser fundamental, a utilização de animais de laboratório na avaliação da segurança de produtos, nos seus mais diversos aspectos, é imprescindível. Para tanto, todas as regras básicas de bioterismo e manipulação de animais devem, obrigatoriamente, ser observadas. Recomenda-se que os animais de laboratório utilizados em experimentação sejam manuseados dentro dos preceitos éticos preconizados

pelos guias internacionais, de forma a contribuírem para o refinamento dos ensaios e diminuição do estresse a que possam ser submetidos durante a realização de ensaios, com a redução do número de animais utilizados e complementação e/ou substituição por ensaios *in vitro*.

Os testes em animais, na avaliação de biomateriais e dispositivos médicos, são procedimentos inerentes à estimativa da biocompatibilidade, e freqüentemente usados para avaliar a compatibilidade de um novo biomaterial antes de seu uso clínico.

Esta avaliação de segurança, de acordo com a ISO 10.993 inclui muitas etapas que não podem ser preenchidas sem testes em animais, tais como, parte 6 para verificação de resultados de implantes, e partes 10 e 11 para verificação de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos e locais (irritabilidade dérmica, sensibilidade). Entretanto, a ISO, em sua parte 2, preconiza fundamentalmente todos os requisitos para a manipulação e bem estar dos animais a serem utilizados nos procedimentos experimentais (ISO 10.993, 2010).

#### 2.5.2.1. Toxicidade

A toxicidade *in vivo* pode ser avaliada por sinais clínicos e testes laboratoriais. Para os testes *in vivo* os períodos de estudo da toxicidade são: agudos (1 – 14 dias), subagudos (14 – 28 dias), crônicos (28 – 90 dias).

Para avaliação de toxicidade deve-se obter o máximo de informação com o menor número de animais. Para tanto são utilizado estudos combinados que permitem uma avaliação crítica e pormenorizada dos resultados pré-clínicos. São

analisados testes laboratoriais modernos de hematologia/ bioquímica sérica e urinálise, de acordo com a necessidade, avaliação de tecidos e órgãos, alterações macroscópicas e microscópicas, análise histopatológica, quantitativa ou semi-quantitativa, e qualificação de reação inflamatória. Toda mortalidade deve ser registrada, e o início, duração e reversibilidade dos sinais tóxicos devem ser registrados. São avaliados diariamente sinais de toxicidade (início, grau e duração), elevação da temperatura corporal, avaliação de pele e pêlos, olhos, membranas mucosas, sistemas respiratórios, circulatório, autonômico e sistema nervoso central, atividade somato-motora e comportamental. (OECD, 2010; ISO, 2010).

Os estudos de toxicidade sistêmica aguda podem fornecer informações preliminares sobre órgãos alvos de toxicidade e são úteis também para definir as doses a serem utilizadas nos estudos subseqüentes de toxicidade de doses repetidas. Esses estudos também fornecem dados e informações sobre possíveis efeitos esperados em casos de dose excessiva (DORATO & BUCKLEY, 1998). Segundo o guia Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals (OECD, 2010), os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma única dose ou mais de uma dose administradas durante um período não superior a 24 horas.

O guia também recomenda que os animais utilizados sejam observados por sete dias após a administração da droga. Mortes, alterações clínicas, latência, duração e reversibilidade de sinais e sintomas de toxicidade devem ser registrados. Todos os animais encontrados mortos, ou sacrificados por estarem

moribundos ou ao final do período de observação devem ser necropsiados com exame macroscópico das vísceras.

#### 2.5.2.2. Implantes

Em relação aos implantes, a resposta biológica só pode ser avaliada em condições *in vivo*, de acordo com as normas internacionais de utilização e experimentação animais. Apresenta resultados que podem ser extrapolados para a segurança em uso clínico humano, particularmente aqueles relacionados aos processos de restauração e regeneração na engenharia de tecidos relacionados às cirurgias ortopédicas e cardiovasculares. Os animais comumente utilizados são ratos e/ou coelhos, adultos. Entretanto, atualmente, modelos animais de porte médio, tais como suínos e caprinos, também vêm sendo bastante utilizados na avaliação de dispositivos médicos, especialmente os de aplicação cardiovascular.

Os implantes são realizados por meio de cirurgias nas regiões de estudo. Para a engenharia de tecidos são utilizadas as regiões da tíbia ou femur, nas quais são realizadas cavidades de aproximadamente 3mm de extensão longitudinal e 2mm de extensão transversal, somente nas regiões cortical óssea anterior e espaço medular, sem qualquer envolvimento cortical medial (ISO 10.993 – Parte 6, 2004; YU, VANDEVORD & MAO, et al, 2009).

---

---

### **3. OBJETIVOS**

---

---

### 3. OBJETIVOS

- Obtenção de matrizes de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) pura e dos compósitos poli ( $\epsilon$ -caprolactona):hidroxiapatita (PCL/HA) e poli ( $\epsilon$ -caprolactona):hidroxiapatita incorporado ao antibiótico vancomicina (PCL/HA/VC);
- Realizar caracterizações biológicas das matrizes por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro* segundo a norma internacional ISO 10.993;
- Realizar ensaios de biocompatibilidade *in vitro* de citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e hemocompatibilidade das matrizes do compósito PCL/HA;
- Realizar ensaios de biocompatibilidade *in vivo* de irritação dérmica e toxicidade sistêmica das matrizes do compósito PCL/HA;
- Realizar ensaios de atividade antimicrobiana da matriz do compósito PCL/HA/VC;
- Obter protótipos de dispositivos implantáveis;
- Realizar ensaios pré-clínicos de biodegradação *in vitro*;
- Realizar ensaios pré-clínicos de implantes *in vivo* em tíbias de coelhos para verificação da osteointegração.

---

---

## **4. METODOLOGIA**

---

---

#### 4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi uma parceria entre o Grupo de Biocompatibilidade do Centro de Biotecnologia do IPEN/CNEN – SP e o do Grupo de Desenvolvimento de Estruturas Nanométricas e Materiais Biocompatíveis da Universidade Federal de Itajubá – GDENB / UNIFEI, sob coordenação e co-orientação do Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.

O delineamento experimental do estudo se deu conforme as etapas mostradas no fluxograma da FIG. 2

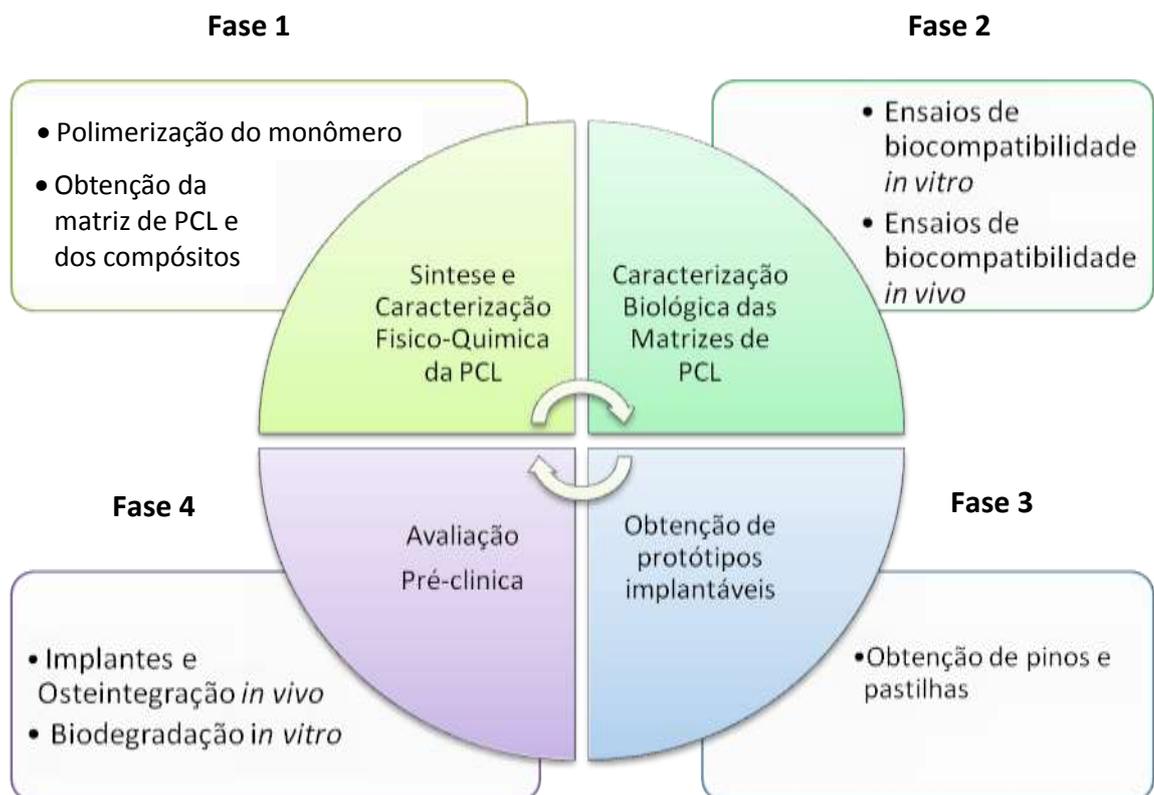


FIGURA 2. Fluxograma representativo do delineamento experimental

## **4.2. FASE 1 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

### **4.2.1. Obtenção das matrizes de PCL**

As matrizes baseadas no polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) foram sintetizadas e caracterizadas em seus aspectos físicos e químicos pelo Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz no GDENB da UNIFEI.

A síntese foi realizada a partir do mecanismo de polimerização induzida pelo iodo do monômero  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) e as matrizes obtidas foram caracterizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), espectrofotometria no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As matrizes experimentais selecionadas para este estudo foram obtidas em pó, puras ou como compósitos associadas ao biomaterial cerâmico hidroxiapatita reabsorvível (HA Resorb OSTEOGEN®). A partir do compósito também foi obtida uma matriz farmacológica associada ao antibiótico vancomicina.

Como controle foi utilizado o polímero policaprolactona comercial (SIGMA-ALDRICH®).

A TAB. 1 classifica as matrizes de estudo utilizadas neste estudo.

TABELA 1. Classificação das matrizes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) utilizadas no estudo

Matriz	Composição	Forma
poli( $\epsilon$ -caprolactona)	PCL	Pó
poli( $\epsilon$ -caprolactona):hidroxiapatita	PCL / HA	Pó
poli( $\epsilon$ -caprolactona):hidroxiapatita:vancomicina	PCL / HA / VC	Pó
poli( $\epsilon$ -caprolactona) comercial Sigma®	PCL/SI	Pellet

#### 4.2.2. Síntese do compósito poli( $\epsilon$ -caprolactona)/hidroxiapatita (PCL/HA)

Utilizou-se a técnica de polimerização em massa do monômero  $\epsilon$ -caprolactona através da polimerização por abertura do anel induzida por iodo à temperatura ambiente (25 °C). O sistema reacional foi composto por 0,037 mol de  $\epsilon$ -CL (Sigma/Aldrich) e 0,0003 mol de  $I_2$  (ressublimado, Sigma). Após reação o polímero obtido foi purificado por precipitação sucessiva em etanol e tiosulfato de sódio para remoção do iodo residual. O polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) obtido foi seco sob vácuo à temperatura ambiente (298K) até peso constante. O percentual de conversão do monômero  $\epsilon$ -CL em PCL foi calculado através da expressão:

$$\% \text{ Conversão} = \frac{m_{\text{polímero obtido}}}{m_{\text{monômero}}} \times 100 = \frac{m_{\text{PCL}}}{m_{\epsilon\text{-CL}}} \times 100$$

#### **4.2.3. Obtenção do compósito PCL/HA com o antibiótico vancomicina (PCL/HA/VC)**

O polímero PCL foi dissolvido em acetona de forma a se obter uma solução com concentração 20% m/v. O antibiótico vancomicina (150 mg, cloridrato, Sigma/Aldrich) foi dissolvido previamente em 0,5 mL de água destilada e deionizada. A solução resultante do antibiótico foi gotejada sobre 4 mL da solução de PCL contendo hidroxiapatita (1400 mg, Osteogen) sob agitação constante (5600 rpm) durante 40s. A suspensão resultante foi liofilizada e pastilhas foram preparadas para o estudo da liberação do antibiótico em condições *in vitro*.

Pastilhas de 200 mg ( $\varnothing=10$  mm, h=2mm) do compósito PCL/HA contendo vancomicina foram imersas em 10 ml de solução tampão PBS pH 7,4 e mantidas sob agitação (75 rpm) em banho termostaticado de 37 °C, simulando as condições do fluido fisiológico humano. A determinação da quantidade de vancomicina liberada das pastilhas foi realizada retirando um volume do sistema de liberação de 30 em 30 minutos. As alíquotas tomadas permitiram determinar a quantidade de vancomicina liberada em função do tempo através da espectroscopia UV a 282 nm. Solução tampão PBS foi adicionado ao sistema de liberação com a finalidade específica de manter o volume e não perturbar o equilíbrio do sistema.

#### **4.2.4. Caracterização Físico-Química das Matrizes de PCL**

As matrizes obtidas foram caracterizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), espectrofotometria no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H}$ -NMR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### **4.2.4.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

A distribuição do peso molecular da matriz PCL/HA foi determinada utilizando um cromatógrafo de permeação em gel, GPC da Waters modelo 510, equipado com detector de índice de refração série 200. Colunas tipo PL-gel de 103-, 104- e 500-Å. Foram usadas para a eluição de amostras de 10 mg/mL em cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) com fluxo de clorofórmio de 1 mL/min. Os pesos moleculares ponderal médio (Mw) e numérico médio (Mn) foram determinados usando a curva de calibração com padrão de poliestireno. O índice de polidispersividade foi calculado através da razão Mw/Mn.

#### **4.2.4.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros vibracionais da matriz PCL/HA foram obtidos no espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da Bomem em atmosfera inerte e à temperatura ambiente. Os espectros foram registrados na região de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup> utilizando-se a resolução de 20 scans/min.

#### **4.2.4.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (<sup>1</sup>H-RMN)**

A microestrutura do PCL foi caracterizada por ressonância magnética nuclear de prótons (<sup>1</sup>H-RMN) utilizando-se um equipamento Bruker 300 MHz em colaboração com o Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Tecnológicas”, ICTP/CSIC-Madri/Espanha. As amostras de PCL na proporção de 1 mg.mL<sup>-1</sup> foram

dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) sendo utilizado como referência interna o tetrametil silano (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si.

#### 4.2.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos pós obtidos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras dos pós foram dispersas em ultra-som e depositadas no suporte metálico utilizando-se fita dupla face e contato de prata. Após metalização com ouro, as amostras foram analisadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Philips, modelo XL30.

### 4.3. FASE 2 – CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS MATRIZES DE PCL

O delineamento experimental do estudo de caracterização biológica das matrizes de PCL foi realizado por meio das diretrizes da norma “ISO 10993 – Avaliação de Dispositivos Médicos” (ISO 10.993, 2009). Segundo orientações da norma, para a efetiva avaliação da biocompatibilidade a seleção de ensaios é realizada de acordo com a aplicação pretendida para o biomaterial em estudo. Essa seleção é planejada em função de dois requisitos:

Natureza do contato do biomaterial com o organismo: *superfície* (pele, membrana de mucosa, tecidos intactos ou lesados); *comunicação externa* (contato direto ou indireto com vias sanguíneas, osso, tecido ou dentina); *implantáveis* (tecido, osso, sangue);

Duração do contato do biomaterial com o organismo: a) *limitada* – até 24 horas; b) *prolongada* – de 24 horas à 30 dias; e c) *permanente* – acima de 30 dias.

Assim, a TAB. 2 demonstra a aplicação pretendida para este estudo e a natureza do contato com o organismo, e a TAB. 3 sintetiza a seleção dos ensaios para o estudo de caracterização biológica das matrizes de PCL.

**TABELA 2. Aplicação pretendida da PCL e natureza do contato com o organismo.**

Biomaterial:	Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)
Natureza do contato:	Dispositivos implantáveis em tecido ósseo
Duração do contato:	Acima de 30 dias
Aplicação pretendida:	Micro-implantes

**TABELA 3. Delineamento experimental dos ensaios de caracterização biológica.**

ESTUDOS	ENSAIOS
4.3.1. Biocompatibilidade <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citotoxicidade</li> <li>• Genotoxicidade</li> <li>• Atividade antiinflamatória</li> <li>• Hemocompatibilidade</li> </ul>
4.3.2. Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irritação dérmica primária</li> <li>• Toxicidade sistêmica</li> </ul>
4.3.3. Atividade Microbicida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidade Antimicrobiana</li> </ul>

### **4.3.1. Biocompatibilidade *in vitro***

#### **4.3.1.1. Teste de Citotoxicidade**

As amostras foram submetidas ao teste de citotoxicidade nos respectivos extratos. O método utilizado emprega células de linhagem permanente e o corante vital MTS.

Uma cultura de CHO-K1 em monocamada foi separada por tripsinização. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado ressuspensão em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após lavagem com PBS estéril. Uma microplaca de cultura celular de 96 poços foi preparada a partir da adição de diluições crescentes do extrato do biomaterial (50µl/poço, 4 poços/por diluição), em seguida, a placa foi equilibrada a 37° C numa atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, enquanto se efetuou a tripsinização das células para o ensaio. Em seguida, pipetou-se 50µl da suspensão celular (~3000 células) nos poços. O volume total em cada poço foi de 100µl. Colunas controle de 4 poços foram preparadas com o meio sem a colocação das células (branco), e apenas meio de cultura, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). Posteriormente, a microplaca foi incubada sob atmosfera úmida de CO<sub>2</sub>. Após 72 h, 20µl de uma mistura (20:1) de MTS a 0,2% e PMS a 0,09% em PBS foi adicionada aos poços teste e deixou-se incubando por 2 horas. A incorporação do corante foi medida por meio de um leitor de microplacas a 490nm contra o branco. A citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) foi estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação a concentração dos extratos a partir do gráfico.

#### 4.3.1.2. Teste de Genotoxicidade

As amostras foram submetidas ao teste de genotoxicidade com células CHO, pelo método do micronúcleo (OECD 473, 1997).

Células CHO-K1, subclones de células de ovário de hamster Chinês (*Cricetulus griseus*), em fase exponencial de crescimento foram mantidas em

garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de penicilina e estreptomicina (GIBCO), sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Para a detecção dos micronúcleos (MN) foi utilizado o método do bloqueio citocinético proposto por Fenech & Morley (1986).

Foram semeadas aproximadamente 100 células CHO-K1 em placas de seis poços com 60 mm de diâmetro (num total de 24 poços) contendo 3 ml de meio de cultura (RPMI 1640, GIBCO) acrescido de soro fetal bovino 10% (CULTILAB) e antibióticos (penicilina 1% e estreptomicina 1%, GIBCO). As placas foram mantidas a 37°C à atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

No dia seguinte foi adicionado o ativador celular S9 (MOLTOX) à metade das placas por um período de 4 horas. O sistema de ativação metabólica S9 utilizado é uma fração microssomal, pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada e homogeneizada a partir do fígado de roedores tratados com um agente indutor enzimático, Aroclor 1254. A fração S9 revela se a substância teste é mutagênica em sua forma original, ou necessita ser metabolizada e ativada para se tornar mutagênica.

Em seguida, após a lavagem do mesmo, foi adicionada em todos os poços a citocalasina B (SIGMA), 3 µg/ml durante 24 h de exposição, levando ao acúmulo de células binucleadas.

Também foram colocadas as amostras, o controle negativo com meio RPMI 1640 (GIBCO), e os controles positivos com Mitomicina C (FLUKA); Ciclofosfamida (FLUKA) e Benzopireno (FLUKA), segundo esquemas de placas e poços previamente planejados, e incubados por 24 horas. Ao final deste período as células foram recuperadas, fixadas em metanol/ácido acético (3:1), gotejadas

em lâminas de vidro e coradas com a solução Giemsa 5% em tampão Sorensen. Cada poço de cultura correspondeu à preparação de lâminas em triplicata.

Os micronúcleos foram contados somente em células com citoplasmas preservados, no mesmo plano focal, apresentando diâmetro de até 1/3 e com a mesma coloração do núcleo principal. Por lamina foram analisadas 2000 células binucleadas (CB), contando-se também células mono (CM) e multinucleadas (CMU) para o cálculo do índice de proliferação (IP).

$$IP = \frac{\text{Número de CM} + (2 \times \text{Número de CB}) + (3 \times \text{número de CMU})}{\text{Total do Número de Células}}$$

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico CARL ZEISS, sob aumento de 400 vezes.

#### 4.3.1.3. Teste de Imunotoxicidade

O ensaio para detecção da atividade anti-inflamatória *in vitro* foi baseado em um modelo imunoenzimático baseado na competição entre PGE<sub>2</sub>-livre e PGE<sub>2</sub>-fixada à peroxidase por meio de sítios de ligação no anticorpo específico para PGE<sub>2</sub>, conforme esquema representado pela FIG. 3.

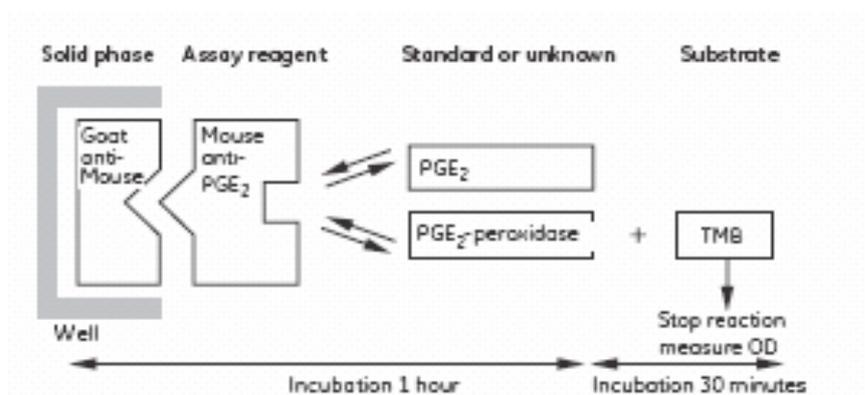


FIGURA 3 – Adaptado do esquema de ligação dos anti-corpos e antígenos System RPN222® (AMERSHAM).

Para a realização do ensaio utilizou-se o kit Prostaglandin E2 Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System RPN222 ® (AMERSHAM). A partir de 100µL do padrão estoque (256ng/ml em etanol) foi preparado um padrão concentrado de 320pg/50µL em solução de trabalho (REAG1). A partir desse padrão concentrado foram feitas diluições seriadas decrescentes para obtenção de oito níveis de padrões variando entre 2,5 e 320pg/poço (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; e 320pg). Os padrões foram utilizados no período de uma hora após o preparo.

Foram semeadas, em duplicata,  $10^4$  células de CHO mantidas em meio de cultura (RPMI 1640, GIBCO) acrescido de soro fetal bovino 10% (GIBCO), L – Glutamina (GIBCO) e antibióticos (penicilina 1% e estreptomicina 1%, GIBCO), em microplacas de 96 poços no volume de 100 µL/poço. As placas foram mantidas a 37°C à atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Após esse período foram adicionadas 100µL das substâncias testes pelo período de 24 horas, e os estímulos celulares foram adicionados aos controles e soluções-teste por um período de 90 minutos, segundo esquema de placas previamente planejado. Posteriormente ao período de incubação foi realizada lavagem com PBS, adicionado 100µL do REAG1 e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C por 10 minutos. Após este período, foi realizada uma avaliação microscópica utilizando o corante “trypan blue” para checar a lise celular. Essa verificação indica que as células rompidas estão prontas para sua utilização no protocolo do EIA.

Alíquotas das células rompidas, conforme as duplicatas dos padrões, controles e testes, foram então transferidas e distribuídas no volume de 50 µL/poço para a placa de ensaio *goat anti-mouse Ig*. Os poços da microplaca

foram preparadas em duplicata para as amostras de: branco, contendo 150µL de substrato enzimático; ligação não específica (“NSB”) contendo 50µL de reagente de lise 1 (REAG1), 50µL de reagente de lise 2 (REAG2) e 50µL do conjugado diluído; padrões contendo 50µL do padrão, 50µL do anticorpo diluído e 50µL do conjugado diluído; e as amostras contendo 50µL da suspensão celular, 50µL do anticorpo diluído e 50µL do conjugado diluído.

Neste protocolo de análise o reagente de lise 1 (REAG1) hidrolisa a membrana celular para liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) intracelular. O reagente de lise 2 (REAG2) seqüestra o componente chave do REAG1 permitindo que a prostaglandina E<sub>2</sub> esteja livre para a análise.

As placas então foram incubadas em temperatura ambiente (20-25°C) por 1 hora em um agitador. Após esse período todos os poços foram lavados 4 vezes com a solução de lavagem garantindo que qualquer resíduo de tampão tenha sido removido. Imediatamente foi então adicionado 150µL do substrato enzimático, e a placa foi novamente incubada em temperatura ambiente por 30 minutos, no agitador. A medida foi realizada espectrofotometricamente por meio de um leitor de microplacas a 450 nm. Para esta determinação foi adicionado 100µL de ácido sulfúrico 1M, conforme protocolo do kit.

Os resultados do ensaio permitem calcular a densidade óptica (DO) em cada duplicata, por poço e o percentual de ligação (%B/B<sub>0</sub>) para cada padrão e amostra segundo o cálculo:

$$\%B/B_0 = \frac{(\text{padrões ou amostras OD} - \text{NSB OD}) \times 100}{(\text{padrão 0 OD} - \text{NSB OD})}$$

A curva padrão é gerada pela interpolação entre o %B/B<sub>0</sub> como uma função do log da concentração de prostaglandina E<sub>2</sub>.

#### 4.3.1.4. Teste de Hemocompatibilidade

Nesse ensaio foi avaliada a hemocompatibilidade das amostras de PCL/HA comparadas à PCL Sigma<sup>®</sup> (PCL/SI), quando em contato direto com sangue bovino. O ensaio foi realizado em triplicata e os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: PCL/HA em pastilhas de 200 mg em 5 ml de sangue bovino; PCL/SI em “pellets” comerciais de 200 mg em 5 ml de sangue bovino; e controle negativo com apenas 5 ml sangue bovino total. Como valor de referência foram usados os valores obtidos no controle negativo como padrão de normalidade, onde o sangue entrou em contato apenas com os anticoagulantes.

O ensaio foi conduzido dentro das especificações da norma ISO 10.993 que estabelece a seleção de testes para interações com o sangue. De acordo com a norma, os dispositivos implantáveis que apresentam contato direto com o sangue por períodos superiores a 30 dias e/ou definitivos devem ser testados em relação a sua trombogenicidade, adesão plaquetária, hemólise e coagulação (ISO 10993-4, 2006). Assim, devido ao enquadramento do dispositivo pretendido como produto final, esses parâmetros foram selecionados para obtenção da hemocompatibilidade da matéria-prima em análise.

Foi coletado sangue venoso proveniente de bovino saudável, em tubo estéril contendo EDTA e citrato de sódio a 3,2%, através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer<sup>®</sup> – BD). Imediatamente após a coleta o sangue foi levado para o laboratório para início imediato dos procedimentos. Os animais foram provenientes da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ-USP), de acordo com os princípios de experimentação animal e comitê de ética.

Optou-se pelo modelo de ensaio dinâmico que simulou a utilização intermitente do dispositivo com proximidade máxima possível das condições clínicas de uso. O período de ensaio e exposição das amostras ao sangue foi de 2 horas. A metodologia envolveu o uso de um sistema dinâmico *in vitro* onde o sangue foi mantido em banho maria com sistema de agitação Dubnoff (Quimis®) à temperatura de 37° C e movimentação horizontal de 80 rocks/min. Após a exposição das amostras nos modelos dinâmicos foram realizadas as avaliações.

O tempo de coagulação foi obtido por kit (TP CLOT- Bios Diagnóstica) que mede o tempo de pró-trombina. O tempo de pró-trombina (TP) é a prova de escolha para a investigação do sistema extrínseco da coagulação sangüínea, permitindo revelar deficiências nos fatores que tomam parte neste sistema. O extrato de tecido (tromboplastina extrínseca), ao lado dos fatores II, V, VII e X, na presença de íons cálcio, age sobre a pró-trombina para formar a trombina, que, por sua vez conduz à formação do coágulo de fibrina. O TP foi observado no plasma obtido de cada amostra de sangue coletado durante os ensaios centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos. Foi usado como anticoagulante o citrato de sódio tamponado na concentração de 3,8%, na proporção sangue: anticoagulante de 9:1. No momento do teste foram incubados à 37°C, o plasma e o reagente Tromboplastina Cálcica, na proporção de 100ul Plasma: 200ul Reagente, e acionado o cronômetro imediatamente. No momento da formação do coágulo, o cronômetro foi parado e o tempo medido em segundos.

A avaliação da adesão plaquetária e trombogenicidade tem por objetivo identificar e verificar o comportamento das plaquetas na amostra de plasma ou sangue em contato com superfície do material analisado e, identificar a possível formação de trombos. Após a exposição foi realizada lavagem com solução salina

0,9% ao mesmo tempo em que o sangue foi retirado até que o líquido torne-se suficientemente transparente e incolor. As amostras foram fixadas por glutaraldeído 2,5%. Após o esgotamento do glutaraldeído, as amostras foram desidratadas à exposição das seguintes soluções: etanol 50%, mantido por 5 minutos, em seguida etanol 75%, mantido por 10 minutos e retirado, e finalmente introduzido etanol 95%, mantido por 15 minutos e retirado. Após a finalização do processo de desidratação, todas as amostras foram armazenadas em dessecador conectado a uma bomba de vácuo por 24 horas. As amostras foram identificadas e mantidas em um dessecador em ambiente de vácuo e submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a observação da presença de plaquetas e trombos.

#### **4.3.2. Biocompatibilidade *in vivo***

##### 4.3.2.1. Irritação Dérmica Primária

O presente método visa à avaliação do potencial de Irritação Cutânea Primária, após uma única aplicação, da substância a ser ensaiada. Os testes de irritação dérmica foram realizados de acordo com o método de Draize modificado.

Foram utilizados 2 (dois) coelhos, Nova Zelândia albinos, fêmeas, jovens e de peso corpóreo de 2 Kg a 3 Kg, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram alojados em gaiolas individuais devidamente acondicionadas em estantes ventiladas específicas a uma temperatura variável de 20°C a 22°C com umidade relativa entre 30% e 70% e ciclo claro-escuro de 12 horas por iluminação natural, durante todo o período do ensaio. O peso corpóreo dos animais foi registrado no início e no final do ensaio. Todos os animais foram

usados conforme as normas e guias baseadas na FELASA – Federation Of European Laboratory Animal Science Associations. O ensaio teve duração 7 dias e todos os experimentos foram realizados nos laboratórios no Biotério do Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN.

Foram utilizados materiais cirúrgicos (tesouras, pinças, aparelho de tricotomia e lâminas); EPIs (avental, luvas, toucas e pro-pés); gazes estéril; fitas adesivas hipo-alergênico; béqueres; balança analítica, solução isotônica de cloreto de sódio esterilizada, água destilada esterilizada, amônia 1% e as soluções-teste constituídas pelas amostras de PCL/HA, PCL/HA/VC, PCL/SI e controle salina 0,9%.

Para a aplicação das amostras, todas tinham uma área de 250 mm<sup>2</sup> (lâmina) e/ou 20mg (pó) e foram previamente umedecidas, à saturação, com solução fisiológica estéril. Os animais foram segurados delicadamente, até que se acalmassem, para dar início as aplicações. As amostras e os controles foram aplicados em pequenos pedaços de gazes estéreis e em seguida, através de massagens leves, colocados sobre as áreas tricotomizadas em posição de “X”, ou seja, uma amostra na área superior esquerda e inferior direita, e os controles nas outras duas. Após a aplicação das amostras, cobriu-se cada uma das 4 (quatro) áreas tricotomizadas com gaze estéril de aproximadamente 300 mm<sup>2</sup>, fixadas aos pêlos do animal com por fitas adesivas hipo-alergênicas, formando o “patch oclusivo”. A aplicação permaneceu no dorso do animal por 1 hora e as avaliações foram realizadas a partir da retirada das amostras nesta primeira hora até o 7º dia após a exposição.

#### 4.3.2.2. Toxicidade Sistêmica Aguda

Foram utilizados 24 (vinte e quatro) ratos, Wistar, machos, pesando entre 280 e 350g, provenientes do Biotério Central do IPEN. Os animais foram alojados em 5-6 animais gaiolas devidamente acondicionadas em estantes ventiladas específicas a uma temperatura variável de 20°C a 22°C com umidade relativa entre 30% e 70% e ciclo claro-escuro de 12 horas por iluminação natural, durante todo o período do ensaio. Todos os animais foram usados conforme as normas e guias baseadas na FELASA – Federation Of European Laboratory Animal Science Associations.

A administração dos extratos foi feita por via sub-cutânea. O ensaio teve duração 7 dias e todos os experimentos foram realizados nos laboratórios no Biotério do Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN. Os materiais cirúrgicos utilizados foram os mesmos listados para os procedimentos de Irritação Dérmica.

Os animais foram distribuídos em 10 grupos experimentais, conforme se segue: Grupo Controle – Salina 0,9%; Grupo I – PCL/HA 50 mg/kg; Grupo II – PCL/HA 500 mg/kg; Grupo III – PCL/HA 2000 mg/kg; Grupo IV – PCL/HA/VC 50mg/kg; Grupo V – PCL/HA/VC 500mg/kg; Grupo VI – PCL/HA/VC 2000mg/kg; Grupo VII – PCL/HA/SI – 50mg/kg; Grupo VIII – PCL/HA/SI – 500mg/kg; Grupo IX – PCL/HA/SI – 2000mg/kg

#### 4.3.3. Sensibilidade Antimicrobiana

Para o ensaio da atividade antimicrobiana, foram utilizados os seguintes grupos experimentais: PCL/HA, PCL/HA/VC nas seguintes concentrações de vancomicina: 15 µg, 30 µg e 60 µg (referência da matriz sintetizada – 1,1 mg de

vancomicina / 1 g de PCL/HA). Como controle positivo foram utilizados discos para antibiograma contendo vancomicina.

O método de Kirb-Bauer, recomendado pelo “Center For Disease Control” (EUA) para determinação de sensibilidade aos antimicrobianos foi recomendado por fornecer resultados correlacionáveis com as diferentes concentrações inibitórias mínimas sangüínea e urinária (BAUER A; KIRB & SHERRIS, 1976). Para o preparo das placas, foi utilizado o meio padronizado de Muller-Hinton, fundido e resfriado a 45°C. Foram distribuídas alíquotas de 50 a 45mL em placas de 150 mm que foram esfriadas sobre superfícies planas para formar uma camada uniforme de meio com 4 mm de altura. O pH foi mantido entre 7,2 -7,4.

Para o preparo do inóculo foram emulsionadas 4 colônias iguais de *Staphylococcus aureus* em 5mL de caldo de triptose, incubadas por 4 hs a 37°C e ajustada a suspensão para o padrão 0,5 da escala de Mc Farland: 0,5mL de BaCl<sub>2</sub> a 1% + 99,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  microrganismos por mL. Uma zaragatoa (swab) estéril foi embebida no inóculo e a suspensão bacteriana foi espalhada homoganeamente sobre a superfície do meio. Após alguns minutos, foram colocadas as pastilhas das amostras de PCL/HA, PCL/HA/VC, e o disco de vancomicina para antibiograma.

As amostras foram previamente esterilizadas com raios gama (R<sub>γ</sub>) na dose de 25 kGy para que fosse excluída qualquer possibilidade de contaminação durante o preparo das pastilhas. As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 hs para posterior leitura dos resultados com base no diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano encontrada para cada amostra. O diâmetro dos halos das zonas de inibição dos testes feitos com *S. aureus* foram comparados aos

especificados na tabela padrão (TAB. 4) do disco para antibiograma e classificados como: sensível, intermediário ou resistente.

Organismos classificados como *resistentes* referem-se aqueles que não são inibidos pelas concentrações sistêmicas de um dado antibacteriano quando administrado nas doses normais. A classificação *sensível* significa que uma dada infecção bacteriana pode ser adequadamente tratada com a dose do agente antimicrobiano recomendado para aquele tipo de infecção e espécies infectantes, a menos que haja contra-indicação. E a classificação *intermediária* inclui organismos com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) semelhantes àqueles atingidos por antibacterianos no sangue e tecidos cuja avaliação de resposta venha a ser inferior a isolados sensíveis.

Todos os ensaios foram medidos em triplicatas.

**TABELA 4. Padrão para interpretação de halos de inibição.**

Microrganismo	Padrão interpretativo (zona de inibição em mm)		
	Antibacteriano – vancomicina (30µg)		
	***Resistente	** Intermediária	**sensível
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	≥15

#### 4.4. FASE 3 – OBTENÇÃO DOS PROTÓTIPOS BASEADOS NO PCL

- **Pastilhas**

Foram confeccionadas pastilhas de PCL nas dimensões de 2,0 mm de espessura com 1,0 cm de diâmetro, prensadas em um molde de aço inoxidável e pressão uniaxial equivalente a 7-8 toneladas.

- **Pinos Cilíndricos**

Foram fabricados pinos cilíndricos nas dimensões de 6 mm de comprimento por 3 mm de diâmetro. Foi utilizado um molde de aço inoxidável e pressão uniaxial equivalente a 70 MPa. Os cilindros obtidos foram retirados dos moldes com auxílio de uma haste, tendo suas extremidades regularizadas após polimento em máquina politriz.

## 4.5. FASE 4 – AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA

### 4.5.1. Biodegradação enzimática *in vitro*

Neste experimento foi utilizado um modelo de biodegradação enzimática *in vitro* realizado com a enzima lipase (*Candida rugosa*) de 700U/mg fornecida pela Sigma<sup>®</sup>. As pastilhas de PCL/HA foram confeccionadas em prensa hidráulica com aplicação de uma força de 7-8 toneladas a partir de 200 mg do compósito, e foram utilizadas em triplicata de acordo com os seguintes grupos experimentais:

- Controle – Pastilhas de PCL/HA em solução tampão (PBS), pH 7,4, sem a presença de enzima durante os períodos de 96, 192 e 288 horas;
- Teste – Pastilhas de PCL/HA em solução tampão (PBS) mais lipase (40U/mL) em PBS pH 7,4, durante os períodos de 96, 192 e 288 horas;

Cada amostra, com tamanho de 2,0 mm de espessura x 1,0 cm de diâmetro foi colocada em um frasco graduado com 5 ml das soluções de tampão fosfato (PBS 0,05M, pH 7.4) sem enzima, utilizada como controle, e PBS com a enzima lipase 40U/mL, totalizando uma atividade enzimática de 200 U por amostra. Foi adicionada 0,1% de azida de sódio à cada solução. Os frascos foram colocados em incubadora com agitação microprocessada (TECNAL<sup>®</sup>) a uma agitação constante de 50 rpm e temperatura de 36,5°C ± 0,5. As soluções controle (PBS) e teste (PBS mais lipase) foram trocadas a cada 24 horas durante o período de avaliação. As medidas de pH das soluções foram feitas a cada 24 horas, e o pH das soluções-mãe também foi monitorado a fim de garantir a estabilidade destas soluções, mesmo sendo mantidas em geladeira a 4°C ± 2.

O delineamento experimental de avaliação seguiu o seguinte protocolo:

<b>Períodos (horas)</b>	<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Testes e Análises</b>
96	PBS 1 e lipase 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH das soluções;</li> <li>• absorção de água;</li> <li>• determinação de perda massa;</li> <li>• FTIR, DRIFT</li> <li>• DSC</li> <li>• MEV</li> </ul>
192	PBS 2 e lipase 2	
288	PBS 3 e lipase 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH das soluções;</li> <li>• absorção de água;</li> <li>• determinação de perda massa</li> </ul>

Após os períodos de 96, 192 e 288 horas de exposição às soluções de PBS e lipase, as amostras foram retiradas dos frascos, examinadas por gravimetria em balança analítica, para obtenção do peso úmido e determinação da absorção de água, e mantidas em estufa para secagem por, pelo menos, 48 horas. Após esse período, as amostras foram novamente analisadas por gravimetria para a obtenção do peso seco e determinação da perda de massa. Os grupos de 96h (PBS 1 e lipase 1) e 192h (PBS 2 e lipase 2) foram submetidos às análises por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Transmitância e Refletância Difusa (DRIFT) (FTIR – BOMEM MB100) para identificação e caracterização de compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), e avaliação morfológica da superfície, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – Philips XL 30). As medidas de pH das soluções de PBS e lipase das amostras em agitação foram realizadas a cada 24 horas, assim como a determinação do pH das soluções-mãe que ficaram armazenadas em geladeira à  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , para controle do experimento.

#### 4.5.2. Implantes *in vivo* em tíbias de coelho

O ensaio biológico da atividade osteointegradora foi realizado *in vivo* de acordo com as normas internacionais para a utilização de animais em pesquisa, NIH/EUA e, o projeto de lei PL-1153A/95, sobre a utilização de animais em atividades de ensino, pesquisa e experimentação de nosso país (HARGROVE, 1997).

Neste trabalho foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) fêmeas, adultas, com mais de quatro meses, pesando entre 2,3 e 2,7 kg provenientes de um criatório especializado na produção para animais de pesquisa (CRIEX CUNICULTURA LTDA, Mogi das Cruzes-SP), mantidos em alojamento com temperatura (18°C a 22°C) e umidade (30 a 40%) controladas. O ciclo de luz foi de 12h claro/12h escuro. Os animais permaneceram por cinco dias no biotério para ambientação em baias.

Os animais foram acomodados em duas baias, com 3,4 m de comprimento e 1,5 m de largura cada. Água e ração foram oferecidos *ad libitum*. A altura das baias era a mesma do teto da sala (2,5 m), com paredes revestidas com tinta lavável, canto sanitário e chão revestido com lajota, com um ralo por baia para facilitar a limpeza do recinto. Para melhor acomodação dos animais foi colocado ripado de madeira sobre o piso, para permitir escoamento de dejetos e conforto térmico. Como o espaço entre as ripas era menor que 0,5 cm, os animais conseguiam locomover-se sem dificuldades (FIG. 7).

A utilização de baias por períodos prolongados, além de reduzir o estresse produzido pelo confinamento e isolamento, promove o comportamento locomotor

natural dos animais e aumenta a solicitação mecânica do tecido ósseo no processo de osteointegração.



FIGURA 7: Alojamento de grupos de 6 animais em baias adequadas ao comportamento locomotor natural, redução do estresse e potencialização da solicitação mecânica do tecido ósseo para o processo de osteointegração.

No dia da cirurgia os animais foram pesados e mantidos em gaiolas individuais de PEAD (polietileno de alta densidade) com dimensões 65x55x50 cm (FIG. 8), até o momento da cirurgia. O jejum pré-operatório foi de duas horas para evitar estase gastrintestinal (RICH, 2002; BRADLEY, 2004).



FIGURA 8. Alojamento pré-operatório dos coelhos em gaiolas individuais.

Foi utilizada atropina 0,044 mg/kg na pré-medicação para reduzir os efeitos parassimpáticos produzidos pela xilazina (BRADLEY, 2004). Como profilaxia contra infecções foi utilizada uma dose de penicilina 42000 UI/kg (Benzetacil ® 1200000 U / 4 MI) (MARSHALL, 2008) pela via IM e para analgesia preemptiva Maxicam® Ouro Fino Pet 0,2 % ( Meloxicam 0,2mg/kg, via subcutânea) a cada 24 horas, por 48 horas (COOPER, METCALF-PATE & BARAT, 2009).

Para a anestesia foram utilizados na mesma seringa: cloridrato de ketamina (Cetaminr® 100 mg/mL - Syntec do Brasil Ltda) 15 mg/kg associado ao cloridrato de xilazina (Calmiun® 20 mg/mL - União Química Farmacêutica Nacional/SA) 2 mg/kg. Assim que os animais ficaram sedados, foi realizada a tricotomia da área cirúrgica (FIG. 9), além de três áreas adicionais (região cervical ventral e região peitoral bilateral) para colocação de eletrodos para a monitoração da função respiratória e circulatória (FIG. 10 e 11).



FIGURA 9. Isolamento e preparo da região cirúrgica da tíbia por tricotomia.



FIGURA 10. Colocação de eletrodos para a monitoração da função respiratória e circulatória dos animais durante a cirurgia.



FIGURA 11. Eletrodos posicionados na região cervical ventral e região peitoral bilateral para monitoramento das funções vitais.

Para a manutenção do plano anestésico foi reaplicada metade da dose dos anestésicos, aproximadamente uma hora após sua aplicação inicial. Os animais foram colocados sobre a mesa cirúrgica acolchoada como recomendado pela literatura em decúbito dorsal para exposição da região medial da tíbia.

A abordagem cirúrgica foi realizada pelo lado medial da tíbia e para assepsia utilizou-se iodo povidone 1 % (Asta-Med®). Uma incisão retilínea, de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, foi feita paralela ao eixo longitudinal da

tíbia, com lâmina de bisturi número 15. A fáscia muscular foi descolada com auxílio de uma tesoura de ponta romba e o periósteo com lâmina de bisturi.

A trepanação óssea foi realizada com uma broca odontológica (inicialmente com a de n. 5 e alargamento do orifício com a de n.7). Utilizou-se motor de baixa rotação e irrigação constante com solução fisiológica 0,9% estéril para evitar necrose do tecido ósseo. Na tíbia direita de cada animal foi realizado apenas o defeito ósseo (FIG. 12). Na tíbia esquerda foi inserido o pino do compósito PCL/HA (FIG. 13), encaixado manualmente para evitar folgas entre o compósito e o tecido ósseo.

Para as suturas foi utilizado o fio de nylon 4-0 (Johnson&Johnson). Em todos os planos foram utilizados pontos em X (FIG. 14). No tecido subcutâneo também foi feita sutura com finalidade de dar mais estabilidade à ferida cirúrgica principalmente no caso de algum animal retirar os pontos da pele. Terminado o procedimento, os animais foram colocados em gaiolas individuais, envoltas com pano para manutenção da termorregulação.

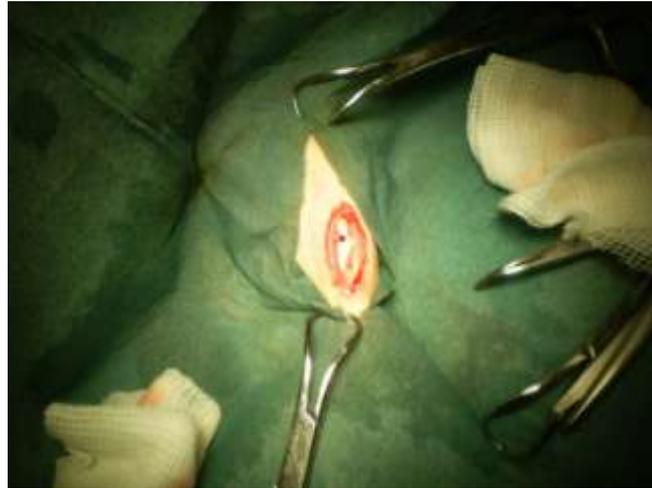


FIGURA 12. Produção do defeito ósseo na tíbia direita dos animais.

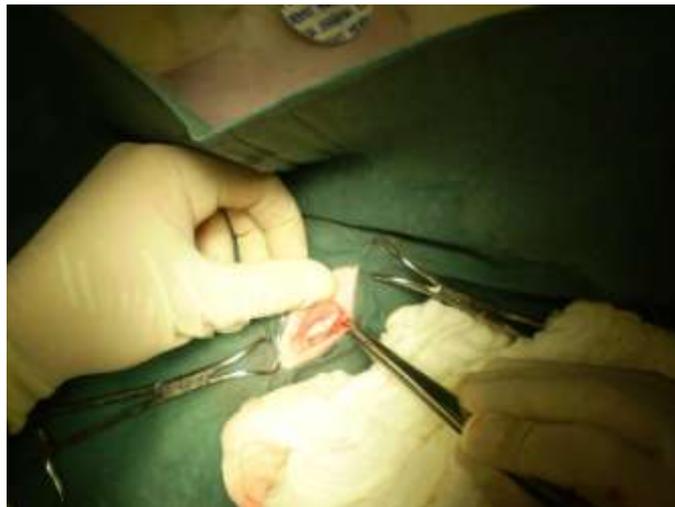
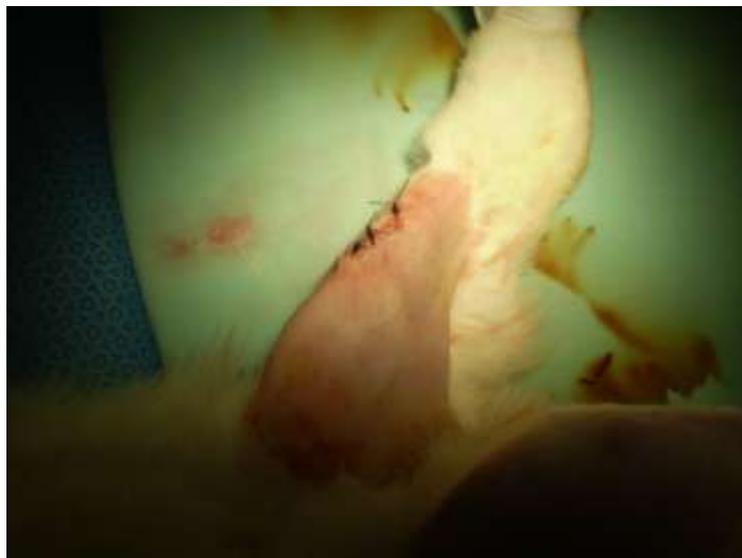


FIGURA 13. Inserção do protótipo do pino implantável de PCL/HA na tíbia esquerda dos animais.



(A)



(B)

FIGURA 14. Suturas realizadas com pontos em X no plano muscular (A) e tecido subcutâneo (B) a fim de dar mais estabilidade à ferida cirúrgica.

Imediatamente após recuperação da anestesia aplicou-se a medicação analgésica, e foi oferecido feno como alimento de preferência da espécie para estimular o apetite e evitar o risco de anorexia e estase intestinal neste período provocada por dor ou estresse. Também foi oferecido água e ração *ad libitum*. Estes cuidados contribuem para uma boa recuperação.

Os animais permaneceram nas gaiolas individuais utilizadas no período pré-operatório por sete dias e após este período voltaram ser alojados nas baias em grupos de seis animais.

Após 30, 60 e 90 dias, quatro animais foram pesados e anestesiados com dobro da dose da anestesia cirúrgica (cloridrato de ketamina associado ao cloridrato de xilazina) por via intramuscular (IM) profunda para realização de exames radiológicos (FIG. 15).



FIGURA 15. Realização dos exames radiológicos após 30, 60 e 90 dias pós-operatório.

Logo após os exames radiológicos, foi inserido cateter n. 22 na veia marginal da orelha e administrado cloridrato de tramadol seguido de tionembutal para a indução de plano anestésico mais profundo e irreversível evoluindo ao óbito. Após a confirmação do óbito, foram retiradas as porções da tíbia correspondentes aos locais dos implantes e dos controles com o fio serra, que a seguir foram armazenados e identificados em coletores universais para a fixação em formol 20%.

#### **4.5.2.1. Análise Histológica**

Para a análise histológica, os espécimes colhidos foram fixados por mais 24 horas com formol a 20 %. Depois de fixados, os ossos (controle e implantados) foram clivados transversalmente a 0,5 cm das áreas de interesse e foram submetidos a processo de desmineralização ácida com ácido fórmico a 10 % por aproximadamente 72 horas. Após desmineralização, os ossos foram lavados com água corrente por 6 horas e subsequente foram desidratados com passagens sucessivas em soluções de álcool em concentrações crescentes (70 %, 80 %, 90 % e absoluto), diafanizados em xilol, incluídos em parafina e emblocados. Foram feitos cortes de 3µm de espessura com micrótomo e posterior montagem das lâminas corando-as com hematoxilina-eosina como descrito na literatura (FIORIO, 1998). Foram colocadas as lamínulas e visualizadas ao microscópio.

---

---

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

### 5.1. FASE 1 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As FIG. 16 a 23 mostram os resultados da síntese das matrizes de PCL/HA, assim como as caracterizações físico-químicas realizadas no GDENB/UNIFEI.

A FIG. 16 ilustra o mecanismo geral da polimerização do monômero  $\epsilon$ -CL induzida pelo iodo. Recentemente, complexos de transferência de carga envolvendo o iodo tem recebido uma atenção especial da literatura devido ao seu potencial para aplicações em sínteses orgânicas para a obtenção de novos materiais. No caso do monômero  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) a polimerização parece ocorrer pela transformação de um complexo de transferência de carga (CT) entre o iodo e o monômero  $\epsilon$ -CL. Nossos estudos indicam que o oxigênio carbonílico apresenta um caráter altamente eletrofílico, propício para a interação com o iodo e formação de um CTC altamente estável e demonstram que a interação com o iodo parece enfraquecer o anel da lactona, o que levaria à formação de espécies  $(\epsilon\text{-CL})^+$  acelerando portanto o processo de propagação da reação de polimerização.

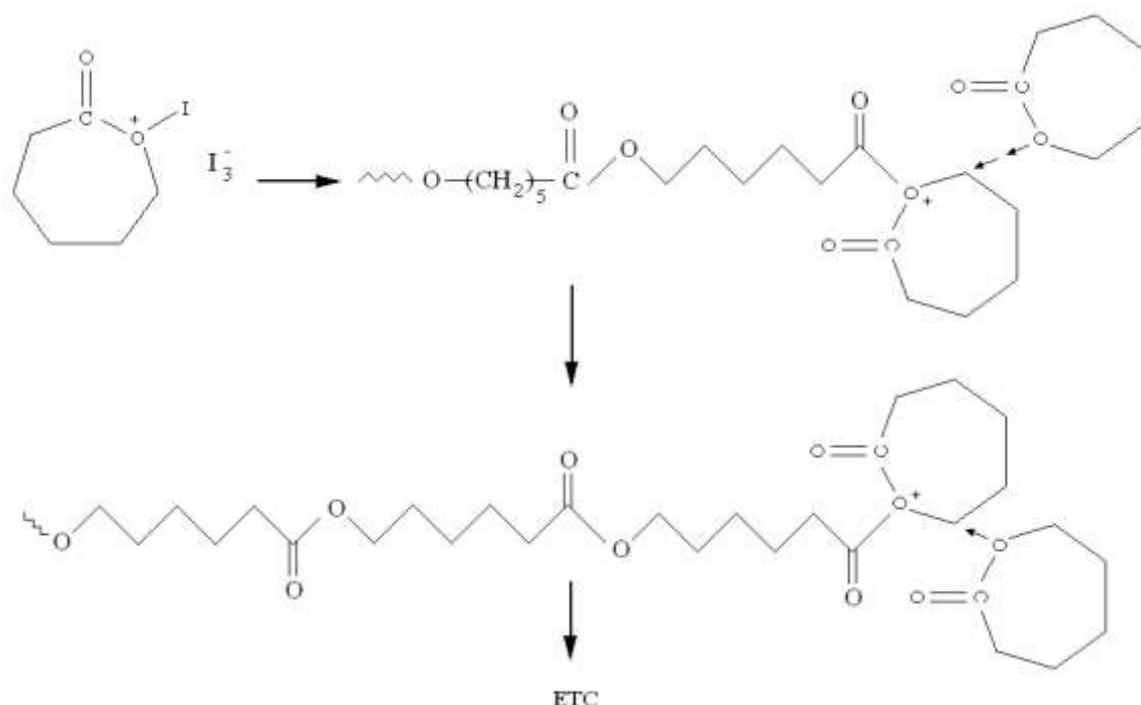


FIGURA 16 – Reação de polimerização por abertura do anel do monômero  $\epsilon$ -CL induzido pelo iodo para obtenção do polímero PCL.

A FIG. 17 mostra o percentual de conversão do monômero  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) em poli( $\epsilon$ -caprolactona) em função do tempo à temperatura ambiente (25°C), estudado por  $^1\text{H}$ -RMN. Neste caso, estudou-se quantitativamente a conversão em pequenos intervalos de tempo, de modo a não se perturbar o equilíbrio do sistema reacional. A reação foi estudada em um capilar em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) com a finalidade específica de se obter dados quantitativos de conversão do monômero  $\epsilon$ -CL em PCL. A conversão de monômero em polímero foi calculada a partir da integração das razões dos prótons metilênicos  $\text{CH}_2^*$  do PCL  $(-\text{O}-\text{CH}_2^*-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-)_n$  e os mesmos prótons da lactona. Após 2 horas de reação observou-se um crescimento monotônico no processo de polimerização, indicando que o consumo do monômero não segue uma cinética de ordem zero. A cinética da reação de polimerização do monômero  $\epsilon$ -CL parece

concordar com a observação de que baixas concentrações de iodo parece favorecer o mecanismo de formação do CTC e conseqüente abertura do anel da lactona.

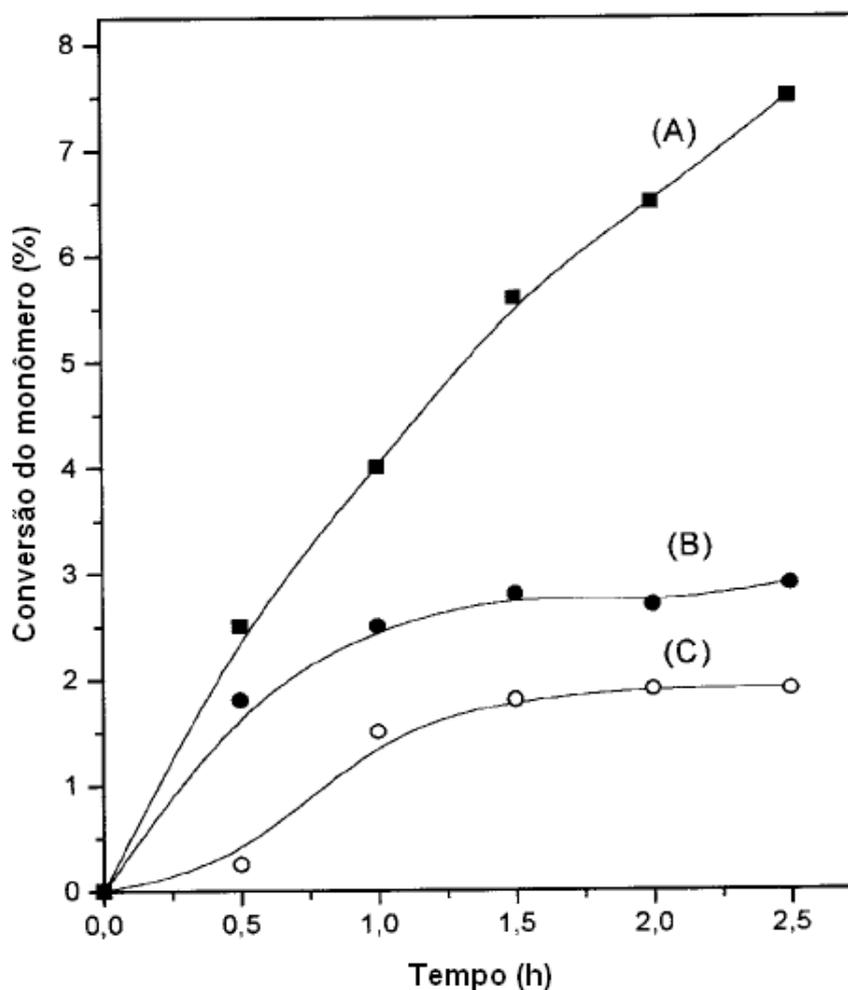


FIGURA 17 – Conversão do monômero em curtos intervalos de tempo reacional. Temperatura: 25 °C,  $[\epsilon\text{-CL}]/[\text{I}_2]$ : 20:1 (A), 20:4 (B) e 20:10 (C).

As FIG. 18 e 19 mostram os espectros  $^1\text{H-NMR}$  e FTIR do polímero PCL. Os deslocamentos químicos dos prótons (FIG. 18) e as bandas de absorção da carbonila a  $1720\text{ cm}^{-1}$  (FIG. 19) associados ao polímero PCL estão em boa concordância com os valores do polímero comercial (Sigma®).

## 5. Resultados e Discussão

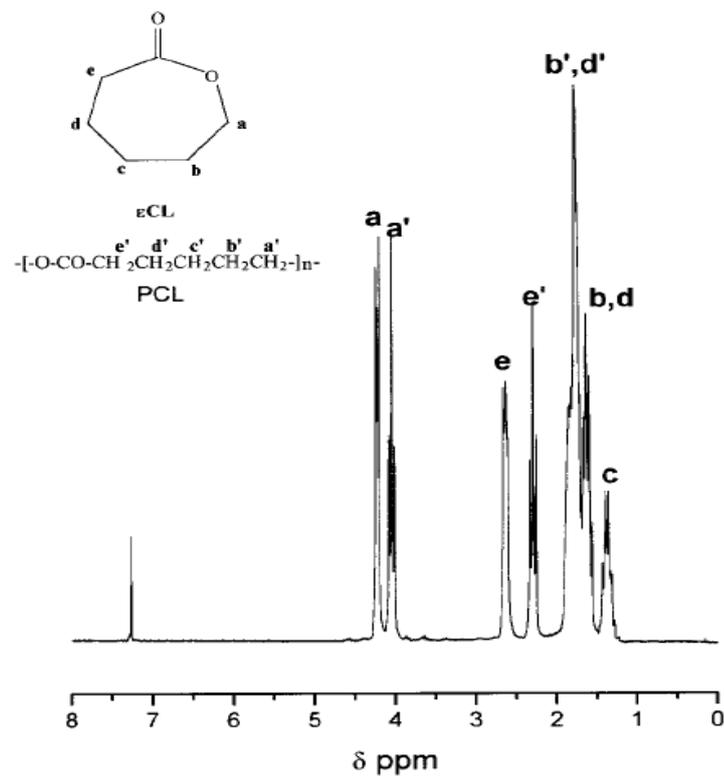


FIGURA 18 – Espectro  $^1\text{H-NMR}$  do PCL obtido a baixo porcentual de conversão (2h) em  $\text{CDCl}_3$ .

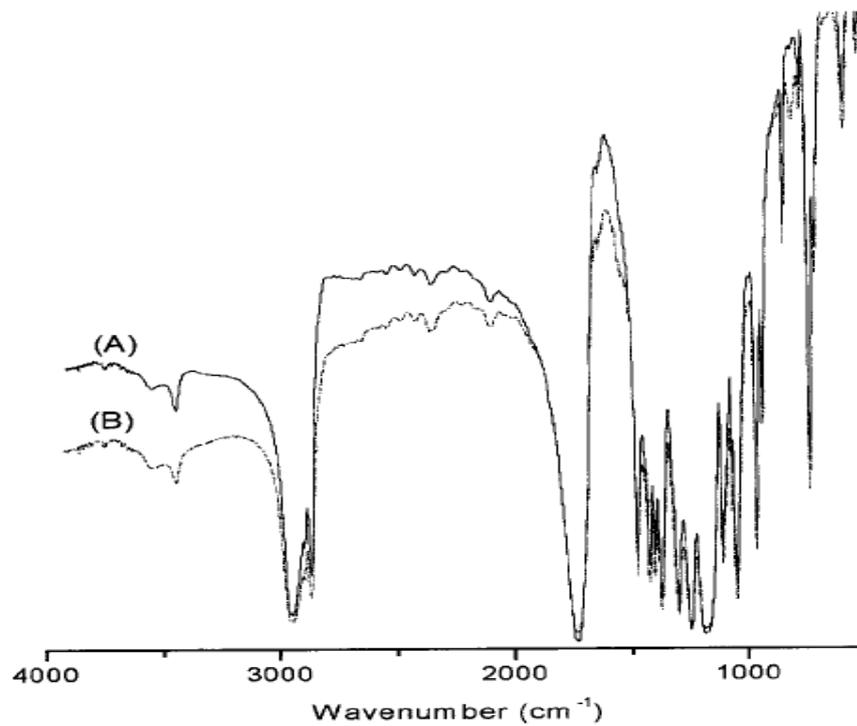


FIGURA 19 – Espectro FTIR do polímero PCL: obtido através da polimerização induzida pelo iodo (A) e amostra comercial Sigma (B).

A FIG. 20 ilustra a análise por GPC do PCL produzido neste trabalho através da polimerização induzida pelo iodo a 25 °C e 70 °C. Observou-se que a polidispersão ( $M_w/M_n$ ) aumentou significativamente com a elevação da temperatura indicando que a reação de polimerização parece obedecer o mecanismo “vivo” de propagação.

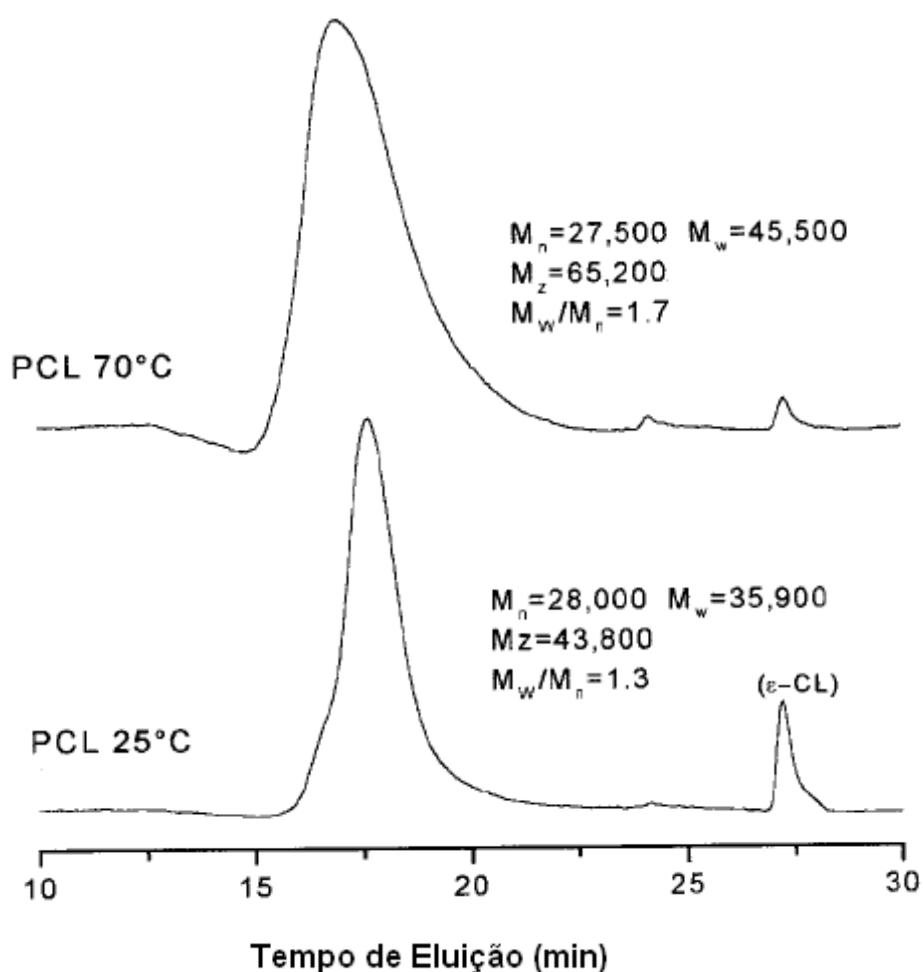
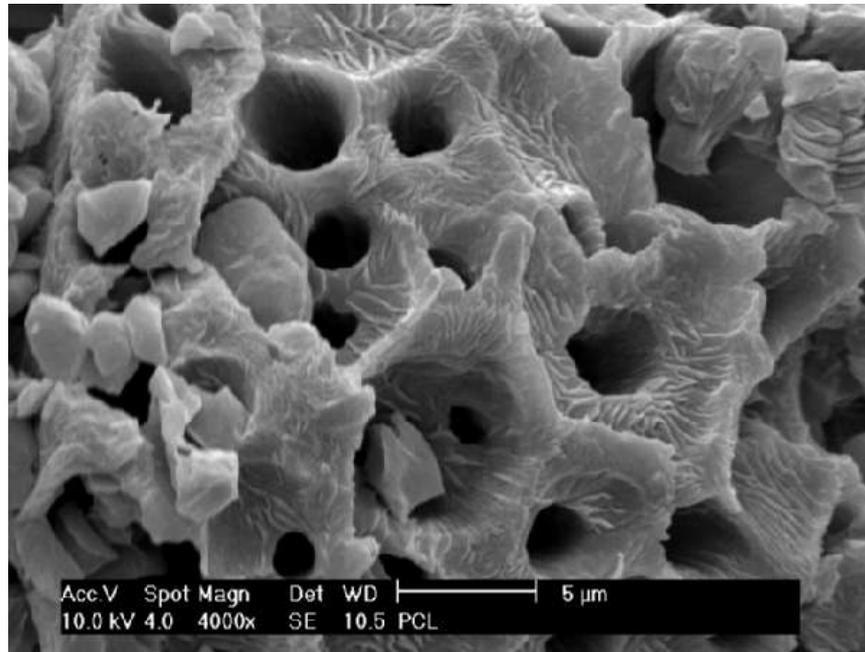
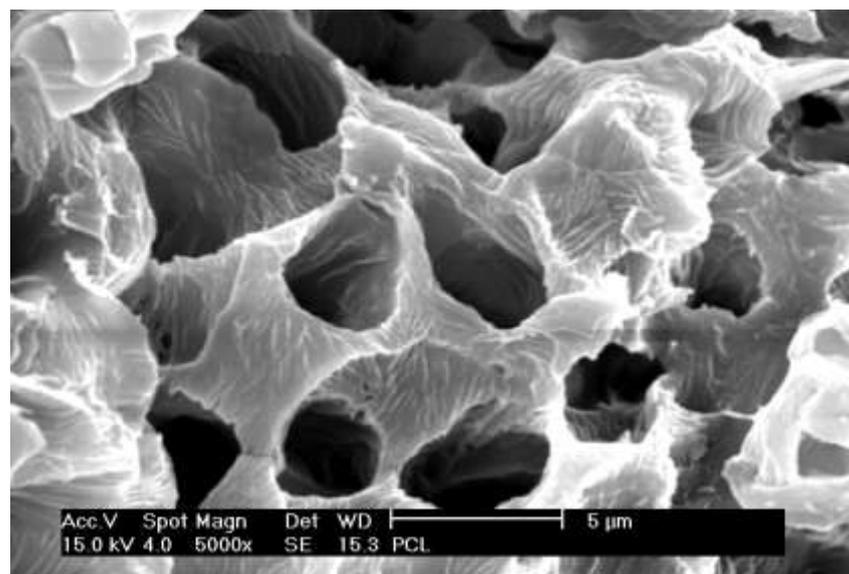


FIGURA 20 – Análise por GPC do polímero PCL produzido pelo processo CTC induzido pelo iodo.

As FIG. 21 a 23 mostram as micrografias MEV das partículas (pós) do polímero PCL e, PCL/Hidroxiapatita obtidos neste trabalho. As partículas do polímero obtido exibiram estrutura porosa com diâmetro médio de poros de 5 a 10 $\mu$ m.

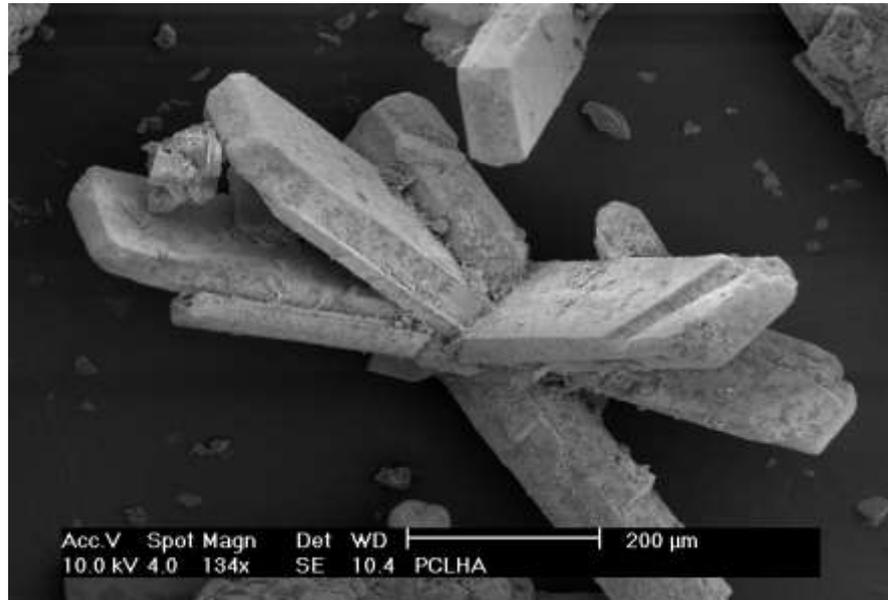


(A)

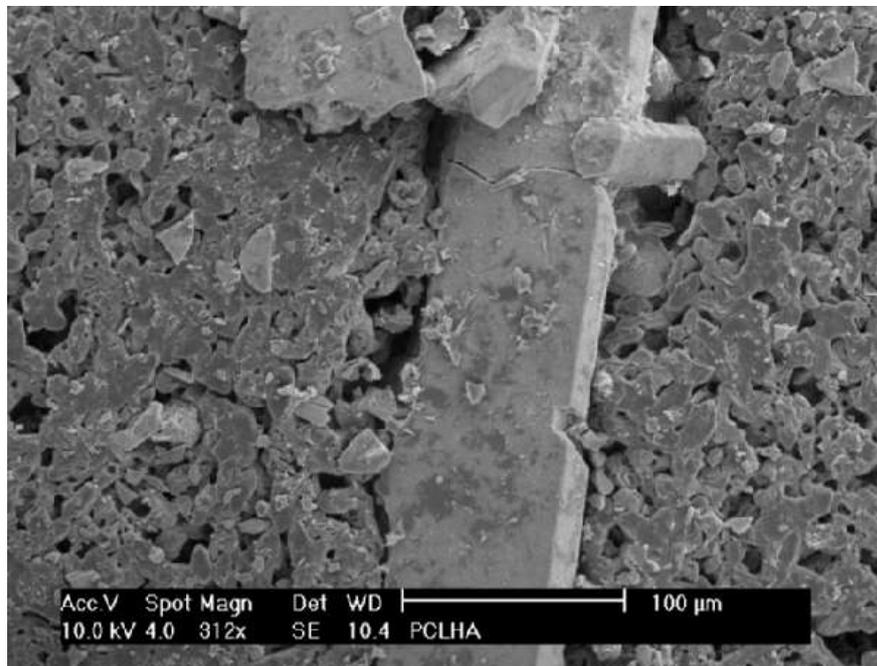


(B)

FIGURA 21 – Micrografia MEV do PCL (pó) obtido neste trabalho.

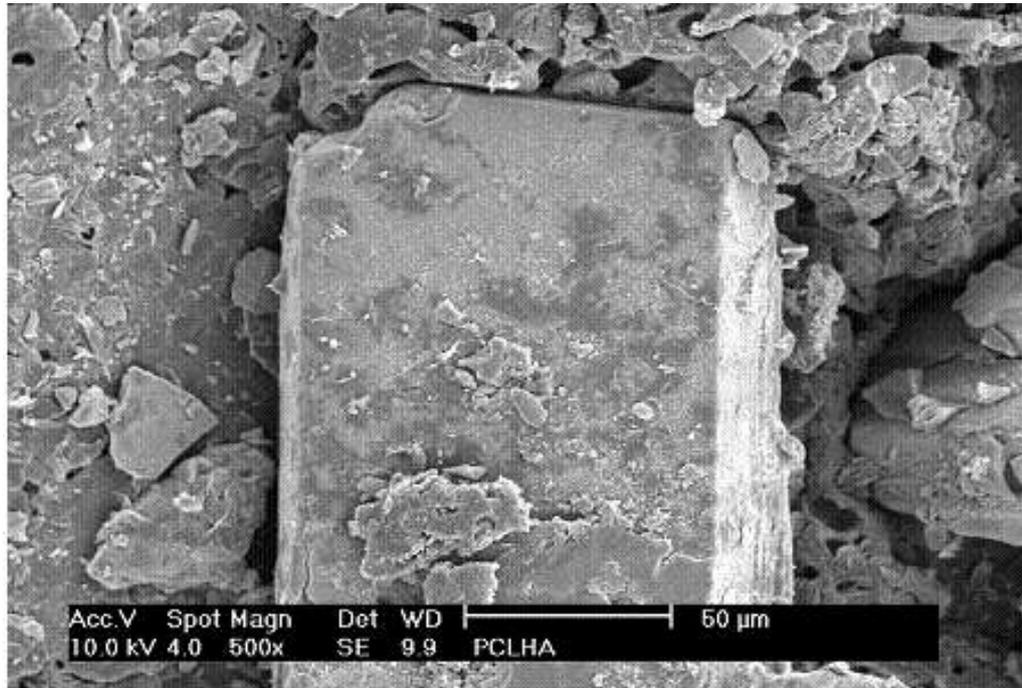


(A)



(B)

FIGURA 22 – Micrografia MEV da hidroxiapatita Osteogen® (A) e do compósito PCL/HA, obtidos neste trabalho (B).



(C)

FIGURA 23 – Micrografia MEV do composto PCL/HA, obtido neste trabalho (C).

A macroporosidade presente nas amostras pode indicar caminhos de acesso para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetra pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução. O preenchimento dos poros pelo novo tecido ósseo pode promover um forte entrelaçamento osso-implante, conferindo um aumento da resistência mecânica do implante. A fração de poros pequenos detectada na amostra e observada nas micrografias, pode contribuir para o efeito de rugosidade superficial que influencia de maneira positiva na dinâmica de adsorção celular e resposta celular osteogênica. Poros com dimensões próximas de 5 µm, ainda podem facilitar a difusão iônica que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, estabelecendo a formação de cargas que definirão o tipo de interface formada.

## 5.2. FASE 2 – CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS MATRIZES

### 5.2.1. Ensaios de Biocompatibilidade *in vitro*

#### 5.2.1.1. Citotoxicidade do PCL/HA

Para estimar a biocompatibilidade inicial do PCL, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* mostrou-se um importante parâmetro no processamento das matrizes. A avaliação da viabilidade celular em meio de cultura do primeiro lote da matriz obtido apresentou um grau de citotoxicidade elevado devido à presença do iodo utilizado na primeira síntese. Uma vez que existe uma forte dependência quanto às propriedades do material e do contexto em que é utilizado suas propriedades mecânicas e físico-químicas deixam de ser prioridade se o material causar danos biológicos celulares ou teciduais em seus sítios de aplicação ou implante. Além disso, o material em seu processo de fabricação ou uso não devem, igualmente, causar danos ao profissional que o manipulará ou ao pessoal auxiliar e de laboratório (RATNER et al, 2004; BINYAMIN, SHAFI, & MERY, 2006; ORIFICE, PEREIRA & MANSUR, 2006; WILLIANS, 2008).

Desta forma foi realizada a síntese de um segundo lote de PCL controlando-se as taxas de iodo utilizado na polimerização. Foram conduzidos ensaios iniciais de citotoxicidade em células CHO nos quais foram realizadas amostras a partir de 100% da concentração absoluta dos extratos das amostras. A FIG. 24 mostra o resultado do teste de citotoxicidade da PCL purificada e não purificada em células CHO comparado às curvas do controles negativo (PEAD) e positivo (Fenol 0,3%). O ensaio celular do realizado em células CHO mostrou que a PCL não purificada apresentou citotoxicidade no extrato diluído a 80%, concentração que matou metade das células viáveis (CT<sub>50%</sub>). Em comparação, o

controle positivo apresentou  $CT_{50\%}$  na concentração do extrato diluído à 35%. Assim, uma vez que a PCL purificada não apresentou qualquer citotoxicidade, o resultado obtido com a PCL não purificada indicou que a citotoxicidade encontrada era devida ao iodo.

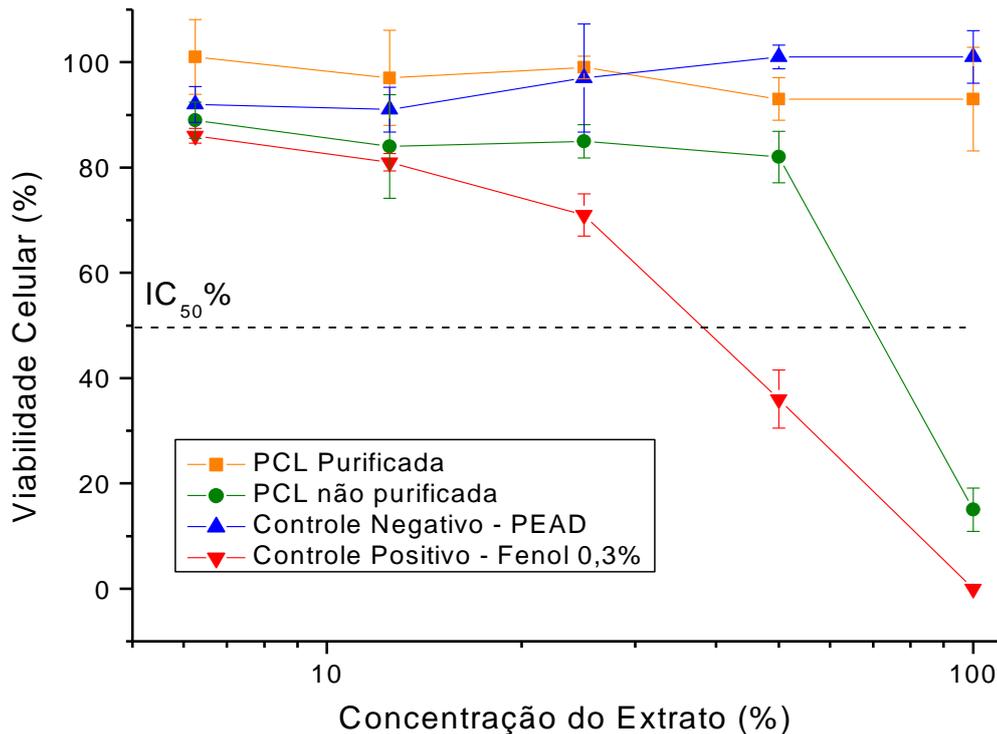


FIGURA 24 - Teste de citotoxicidade do PCL purificado e não purificado em células CHO comparado às curvas dos controles negativo (PEAD) e positivo (Fenol 0,3%).

Na avaliação de uma possível resposta toxicológica, o ensaio de citotoxicidade prediz a biocompatibilidade do biomaterial em estudo por meio do contato direto deste, ou de seu extrato, em uma cultura celular de mamíferos. Quando ocorre o efeito citotóxico, as membranas celulares são danificadas e a viabilidade celular diminuída. Os resultados obtidos para o PCL purificado apresentaram um comportamento não-citotóxico, semelhante ao controle

negativo, e representam uma indicação primária de que a matriz polimérica sintetizada, com as taxas de iodo utilizadas na polimerização controladas, está adequada e em consonância com a biocompatibilidade esperada para o PCL (VERT, 2007; CHANDRA & RUSTGI, 1998; LOTZ et al, 2009; HUANGA, GAOD & GOUA, 2010).

Na engenharia de tecidos o sucesso de reparação depende da presença de sinais regulatórios apropriados que promovam um ambiente adequado ao restabelecimento da função celular – migração proliferação e diferenciação celular – e conseqüente na regeneração tecidual. Para que as células tenham tempo suficiente de se proliferar e se diferenciar é necessário que se evite danos celulares ocasionados pelos efeitos citotóxicos, genotóxicos e imunotóxicos (REDDI, 1994).

#### **5.2.1.2. Genotoxicidade do PCL/HA**

Um agente genotóxico é aquele capaz de causar mutação, ou seja, altera parte da estrutura do DNA da célula o que resulta em mudanças permanentes da função celular (JOHNSON et al, 1998). Na avaliação de biomateriais e dispositivos médicos, a parte 3 da norma ISO 10.993 recomenda a avaliação da genotoxicidade que seja capaz de fornecer informações sobre o potencial mutagênico dos produtos em estudo (ISO 10.993, 2010). O teste do micronúcleo (MN) é um teste citogenético *in vitro*, complementar ao de citotoxicidade, que utiliza células de mamíferos cultivadas e expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos a fim de se comparar e detectar o potencial de indução de mutações gênicas por parte destes produtos.

Os micronúcleos se constituem em pequenas massas nucleares delimitadas por membrana e separadas do núcleo principal. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. O ensaio detecta respostas referentes aos processos que afetam a divisão celular e provocam alterações de quebras cromossômicas (clastogênicas) ou interferem na mitose celular (aneugênicas). Devido à impossibilidade de se separar os micronúcleos nas células que sofreram apenas uma divisão celular é utilizada a citocalasina B, um bloqueador da citocinese, que resulta no acúmulo de células binucleadas mas não interfere no processo normal de divisão celular. A presença dos micronúcleos indicam as possíveis alterações cromossômicas (FENECH & MORLEY, 1985; FENECH, 2000).

Os valores de referência de genotoxicidade são resultantes da extrapolação dos dados obtidos na avaliação da citotoxicidade das substâncias testes. Para efeitos não-carcinogênicos assume-se que existe uma dose abaixo da qual determinado efeito adverso não é observado (“not observed adverse effect level” – NOAEL). Essa dose/concentração limite, denominada NOAEL, corresponde ao valor limite resultante da curva dose-resposta derivada de ensaio de citotoxicidade (OECD 473, 2007). O NOAEL obtido nos estudos experimentais de genotoxicidade para o PCL foi determinado a partir de três doses pré-selecionadas. Após os ensaios demonstrarem ausência de citotoxicidade para o PCL, a seleção das três concentrações a serem utilizadas para o MN foi determinada e distanciada por índice calculado a partir da raiz quadrada de 10 a partir da concentração máxima não-citotóxica de 100%, obtendo-se então as concentrações de 31,6% e 10%.

Os resultados das TAB. 5 mostram o Índice de Proliferação Celular (IP).

TABELA 5. Índice de Proliferação Celular (I.P.) das diversas condições de cultura.

	Sem ativação celular	Com ativação celular (S9)
Meio RPMI	1,91 (1,93 / 1,90)	1,73 (1,74 / 1,72)
Mitomomicina C	1,20 (1,19 / 1,21)	Não se aplica
Colchicina	1,67 (1,84 / 1,55)	Não se aplica
Ciclofosfamida	Não se aplica	1,56 (1,71 / 1,46)
Benzopireno	Não se aplica	1,72 (1,68 / 1,78)
Teste 100 %	1,82 (1,86 / 1,78)	1,76 (1,78 / 1,75)
Teste 31,6 %	1,85 (1,81 / 1,90)	1,66 (1,62 / 1,70)
Teste 10 %	1,90 (1,92 / 1,89)	1,77 (1,82 / 1,73)

I.P. = Os dados estão expressos como Total (duplicata1/duplicata2)

$$I.P. = \frac{\text{Número de CM} + 2 \times \text{Número de CB} + 3 \times \text{número de CMU}}{\text{Total do Número de Células}}$$

I.P.=Índice de proliferação após bloqueio da citocinese

CM=células mononucleadas,

CB=células binucleadas

CMU=células multinucleadas

Os resultados das TAB. 6 mostram a porcentagem de Células Binucleadas com Micronúcleo (% CBMN) e Total de Micronúcleos por Células Binucleadas (MNCB) para as concentrações de PCL/HA estudadas nos ensaios com e sem ativação metabólica.

TABELA 6. Resultados obtidos no Teste do Micronúcleo para a substância PCL

	Total CB	Total MN	MNCB	% CBMN
Sem ativação celular				
Meio RPMI	2040 (1020/1020)	24 (8/16)	<b>0,012</b> (0,008/0,016)	<b>0,98</b> (0,78/1,18)
Mitomomicina C	2040 (1020/1020)	70 (35/35)	<b>0,034</b> (0,034/0,034)	<b>3,04</b> (1,08/0,98)
Colchicina	2040 (1020/1020)	54 (30/24)	<b>0,026</b> (0,029/0,024)	<b>2,30</b> (2,55/2,06)
Teste 10 %	2040 (1020/1020)	23 (16/7)	<b>0,011</b> (0,016/0,007)	<b>0,88</b> (1,08/0,69)
Teste 31,6 %	2040 (1020/1020)	25 (19/6)	<b>0,012</b> (0,021/0,020)	<b>1,26</b> (1,156/0,67)
Teste 100 %	2040 (1020/1020)	28 (21/7)	<b>0,014</b> (0,021/0,007)	<b>1,23</b> (1,86/0,59)
Com ativação celular				
Meio RPMI	2040 (1020/1020)	6 (5/1)	<b>0,003</b> (0,005/0,001)	<b>0,29</b> (0,49/0,10)
Ciclofosfamida	2040 (1020/1020)	19 (15/4)	<b>0,009</b> (0,015/0,004)	<b>0,88</b> (1,37/0,39)
Benzopireno	2040 (1020/1020)	21 (12/9)	<b>0,010</b> (0,004/0,012)	<b>0,93</b> (1,18/0,69)
Teste 10 %	2040 (1020/1020)	8 (12/6)	<b>0,004</b> (0,012/0,006)	<b>0,25</b> (0,88/0,59)
Teste 31,6 %	2040 (1020/1020)	9 (17/14)	<b>0,004</b> (0,017/0,014)	<b>0,30</b> (1,37/1,37)
Teste 100 %	2040 (1020/1020)	8 (10/6)	<b>0,004</b> (0,010/0,006)	<b>0,29</b> (0,98/0,39)

Os dados estão expressos como Total (duplicata1/duplicata2).

MN/CB – número de micronúcleos/células binucleadas %

CBMN – porcentagem de células binucleadas com micronúcleos

Segundo a metodologia proposta, a cultura celular deve ser exposta às amostras testes na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica apropriado. O sistema mais usado é a fração pós-mitocondrial co-fator-suplementada (S9) obtida a partir do fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas. Este sistema contém uma mistura de diversas enzimas e é capaz de converter espécies químicas não mutagênicas em mutagênicas, após a ativação metabólica. Assim, para ser considerado não genotóxico, o produto estudado não deve induzir alterações cromossômicas mesmo após o contato com o sistema de ativação metabólica.

Nas três concentrações de PCL/HA testadas, tanto o IP quanto o CBMN e o MNCB não diferiram do controle negativo (Meio RPMI 1640) quanto aos parâmetros analisados. No ensaio com ativação metabólica por S9 foram analisados como controles positivos o Benzopireno (BZP) e a Ciclofosfamida, com propriedades clastogênicas e aneugênicas, respectivamente. No ensaio sem ativação metabólica por S9 foram analisados como controles positivos a Mitomicina C e a Colchicina, com propriedades clastogênicas e aneugênicas, respectivamente. Para os parâmetros % CBMN e MNCB os controles positivos apresentaram-se, aproximadamente, três vezes maior que o controle negativo (Meio RPMI 1640). As concentrações de PCL/HA estudadas não diferiram do controle negativo (Meio RPMI 1640) quanto aos parâmetros analisados.

Os estudos de genotoxicidade *in vitro*, para detecção de micronúcleos, com e sem ativação metabólica, apresentaram resultados negativos para as concentrações de PCL/HA testadas. Desta forma não há evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade *in vitro* e os dados sugerem que o PCL/HA não é um agente genotóxico com características aneugênicas ou clastogênicas.

Estes dados estão de acordo com os encontrados para a biocompatibilidade e segurança de matrizes de PCL, lineares ou nanoestruturadas, como biomaterial para aplicações médicas. (LOTZ et al, 2009; HUANGA, GAOD & GOUA, 2010; WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

### **5.2.1.3. Imunotoxicidade do PCL/HA**

A maior preocupação com relação aos possíveis efeitos adversos dos biomateriais e dispositivos médicos voltou-se, historicamente, principalmente para o estudo de seu potencial citotóxico e genotóxico. Contudo, pesquisadores e órgãos regulamentadores passaram a reconhecer a importância de eventos adversos não-carcinogênicos, tais como os de imunotoxicidade, no perfil de biocompatibilidade destes produtos (ANDERSON & LANGONE, 1999).

Em 1998, o Centro de Materiais e Saúde Radiológica do FDA publicou uma diretriz de orientação para testes de avaliação em imunotoxicidade, cujo objetivo foi fornecer uma orientação sistemática para avaliação de efeitos imunológicos adversos que poderiam ser deflagrados por dispositivos médicos e biomateriais constitutivos (FDA, 1998). Na avaliação da biocompatibilidade de biomateriais e dispositivos médicos é importante conhecer, e reconhecer, que respostas imunológicas podem apresentar-se como mecanismos biológicos tóxicos no processo inflamatório de cicatrização da ferida ou implante. Assim, a ISO 10.993, também referendou em uma de suas mais recentes publicações especificadas na parte 20 da norma, a avaliação da imunotoxicidade em biomateriais. Imunotoxicidade é todo o efeito adverso na função ou na estrutura do sistema imune, ou de outros sistemas que ativem este sistema. As reações imunotóxicas incluem hipersensibilidade, inflamação crônica, imunossupressão,

imunoestimulação e auto-imunidade. A resposta de hipersensibilidade pode ser classificada em quatro tipos: Tipo I (resposta anafilática), Tipo II (citotóxica), tipo III (complexo imune), e tipo IV (hipersensibilidade). A hipersensibilidade é sinônimo de alergia e pode ser considerada como uma reação aumentada a um antígeno ao qual um ser humano, ou um animal, tenha sido exposto previamente. As respostas imunotóxicas mais prováveis em biomateriais e dispositivos médicos baseiam-se nas reações anafiláticas e na hipersensibilidade (ISO 10.993, 2010).

O conhecimento dos efeitos adversos decorrentes da interação entre biomateriais e componentes do sistema imunológico é o principal foco da Imunotoxicologia. Estes efeitos indesejados podem resultar da ação direta e/ou indireta do biomaterial e/ou dispositivo médico, assim como os subprodutos decorrentes dos processos de lixiviação ou biodegradação, sobre o sistema imunológico. O resultado da ação tóxica sobre o sistema imunológico pode levar à disfunção imunológica facilitando o aparecimento de doenças auto-imunes e reações de hipersensibilidade, bem como, a susceptibilidade aumentada ao aparecimento de infecções oportunistas, e ao desenvolvimento de neoplasias (DESCOTES et al., 2000; KIMBER & DEARMAN, 2002).

Na TAB. 7 são mostrados os valores da curva padrão da prostaglandina E2 e dos extratos das amostras PCL/HA, PCL/HA/VC, PCL/SI.

## 5. Resultados e Discussão

TABELA 7. Resultados obtidos no ensaio imunoenzimático para prostaglandina E2 (PGE2)

	Média DO 450nm	Desvio Padrão	Média DO - NSB	%B/B <sub>0</sub>
Curva Padrão (pg/poço)				
Blank	0,155	0,001		
NSB	0,334	0,002		
0	1,136	0,006	0,802	
2,5	1,066	0,009	0,732	91
5	1,038	0,003	0,704	88
10	0,960	0,005	0,626	78
20	0,840	0,002	0,506	63
40	0,771	0,002	0,437	54
80	0,756	0,002	0,422	53
160	0,722	0,004	0,388	48
320	0,567	0,011	0,232	29
Amostras (pg/poço)				
Suspensão Celular	1,109	0,006	0,775	97
PEAD	1,118	0,005	0,784	98
Fenol	0,984	0,008	0,650	81
Formaldeído	1,020	0,009	0,686	86
PCL/HA	1,103	0,006	0,769	96
PCL/HA/VC	1,012	0,003	0,678	85
PCL/SI	1,011	0,004	0,677	84

*Os dados estão expressos como média (duplicata1/duplicata2).*

Os ensaios foram conduzidos com controle utilizando apenas a suspensão celular, e os extratos puros 100%, para as três amostras PCL, PCL/VC, PCL Comercial (Sigma). Foram utilizados os mesmos controles do ensaio de citotoxicidade, PEAD (Negativo) e Fenol (Positivo), e também Formaldeído 20%, agente flogístico amplamente utilizado na indução de imunotoxicidade. Os resultados de índice do percentual de ligação (%B/B0) do ensaio foram obtidos das duplicatas. Todos os resultados mostrados estão baseados na observação de 10.000 células. O estudo de imunotoxicidade *in vitro* apresentou resultados negativos corroborando com a ausência de toxicidade mostrada nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade realizados.

#### **5.2.1.4. Hemocompatibilidade da PCL/HA**

As FIG. 25 e 26 representam as fotomicrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise das imagens demonstraram ausência de adesão de plaquetas o que representa a ausência de trombogenicidade causada pelo PCL e compósitos.

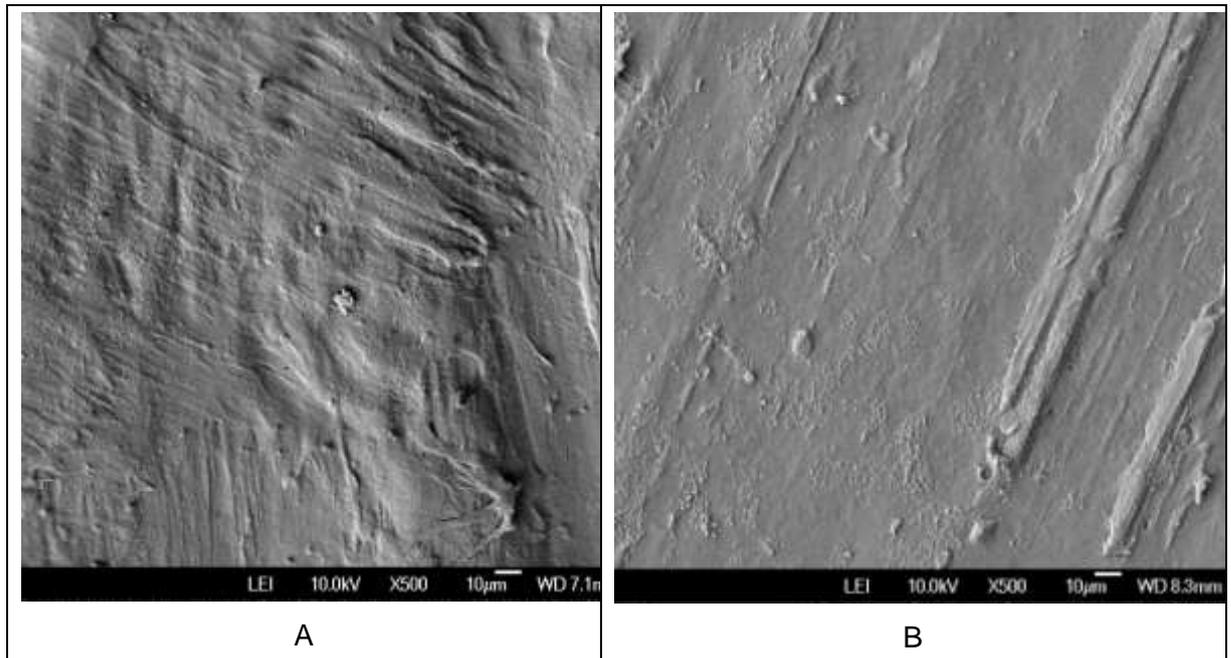


FIGURA 25. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras PCL/SI (A) e PCL/HA (B), após exposição ao sangue bovino em modelo dinâmico. Aumento de 500x.

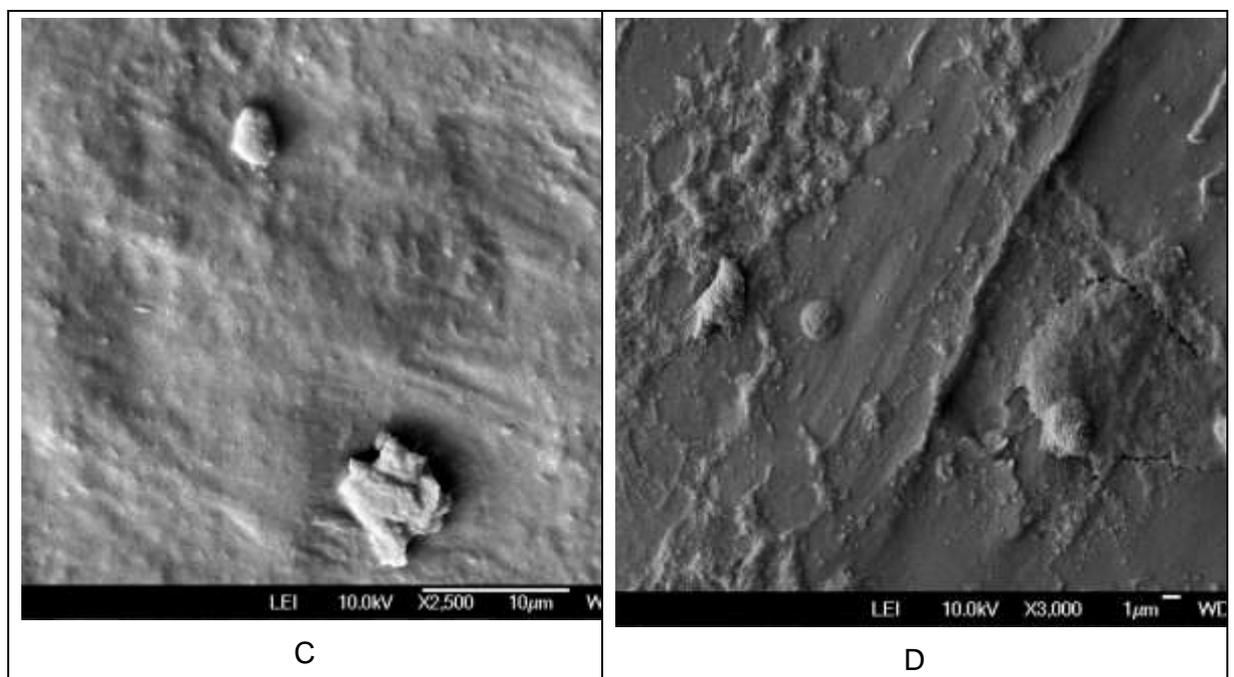


FIGURA 26. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras PCL/SI (C) e PCL/HA (D), após exposição ao sangue bovino em modelo dinâmico. Aumento de 2500x e 3000x.

A TAB.8 mostra a média do tempo de coagulação em função do tempo do estudo. O tempo de coagulação de PCL/HA sofreu alteração significativa em relação ao controle negativo (CN) após 120 minutos. A amostra de PCL/HA teve tempo de coagulação aumentado em relação ao controle no mesmo período. Do mesmo modo, houve diferença entre as amostras PCL/HA e a PCL/SI comercial, também aos 120 minutos, sendo a amostra de PCL/HA também apresentou tempo de coagulação maior do que a amostra de PCL/SI.

TABELA 8. Tempo de coagulação em função do tempo de incubação

	T0		Após 60 min.		Após 120 min.	
	Média (s)	D.P.	Média (s)	D.P.	Média (s)	D.P.
CN	24,22	1,716	24,22	1,093	23,6*	1,517
PCL/HA	24,22	1,716	25,78	1,302	27,83 <sup>***</sup>	4,07
PCL/SI	24,22	1,716	24,67	1,414	23,5 <sup>**</sup>	2,38

\*  $p < 0,05$  Controle (após 120 minutos) e PCL purificada, \*\* $p < 0,05$  PCL purificada e PCL comercial, após 120 minutos; D.P. – Desvio Padrão. Tempo de coagulação expresso em segundos

O tempo de coagulação aumentado da amostra de PCL/HA após 120 minutos (em relação ao controle e a PCL/SI) sugere que a PCL/HA pode ter interferido com a cascata da coagulação. Outros estudos com polímeros (ex: polilactona PLA) aplicados sobre *stent* não demonstraram alteração com a coagulação (HIETALA et al, 2003). Existe a possibilidade que a PCL/HA tenha consumido uma maior quantidade de fatores de coagulação e por isso, na última leitura houve um atraso em relação ao controle e a PCL/SI.

Deste modo, a PCL/HA demonstrou resultados divergentes em relação à amostra comercial. Isto pode ser devido às diferenças relacionadas à síntese e purificação e diferenças na apresentação das mesmas, sendo a PCL/HA na forma de pastilha (pó prensado) e a PCL/SI na forma de *pellets*. Sabe-se que diferenças nas propriedades físico-químicas dos materiais como: energia de superfície, rugosidade, microheterogenicidade e flexibilidade da superfície têm ação sobre a ativação celular (HSU, TANG & LIN, 2004). Deste modo, levando-se em conta a geometria e a superfície, os resultados dos padrões esperados para o desenho do protótipo dos dispositivos implantáveis da PCL/HA a serem conduzidos na próxima etapa deverão ser ajustados de forma que estejam dentro do esperado em relação à compatibilidade sangüínea para o parâmetro de coagulação.

As alterações relacionadas à trombocitopenia observada no hemograma após 60 minutos e 120 minutos, nas amostras da PCL/HA e da PCL/SI, demonstram que as duas amostras de PCL podem interferir com a cinética plaquetária, e com isso diminuir seu número em relação ao tempo. O fato de apenas 1/3 das amostras demonstrarem esta interferência no número de plaquetas pode ser devido a heterogenicidade de cada amostra. A morfologia de superfície e a nanotopografia influenciam não apenas a adesão e crescimento celular, como também na ativação de plaquetas e monócitos (HSU, TANG & LIN, 2004; SEYFERT, BIEHL & SCHENK, 2002).

Estudos com vários tipos de biomateriais (metálicos, metálicos revestidos com polímeros) mostram que eles interferem com a contagem de plaquetas, diminuindo seu número (trombocitopenia) após exposição da substância teste. Estes estudos mensuraram a liberação de  $\beta$ -TG (beta-tromboglobulina) pelos  $\alpha$ -

grânulos das plaquetas durante sua ativação. Com a ativação plaquetária o número de plaquetas diminui (TEPE et al, 2006) . Isto pode explicar a trombocitopenia e a impossibilidade de contagem das plaquetas no último período analisado pelo ensaio. Entretanto, nenhuma resposta de adesão plaquetária ou formação de trombos foi verificada pela análise da microscopia eletrônica de varredura. Desta forma, esses resultados parecem não interferir na compatibilidade sangüínea geral do material.

### 5.2.2. Ensaio de biocompatibilidade *in vivo*

As reações cutâneas foram analisadas nos intervalos de 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a aplicação das amostras. Retiraram-se os tampões oclusivos 1h após a aplicação do produto, e imediatamente realizada a primeira leitura. As áreas controles tiveram como finalidade única, facilitar a comparação com as áreas testes. As TAB. 10 e 11 apresentam as graduações atribuídas às reações cutâneas de eritema e edema.

TABELA 10. Graduação das reações cutâneas: formação de eritemas.

<b>Formação de eritema</b>	
<b>Grau 0</b>	Pele normal: Geralmente, de cor branca, podendo apresentar-se rósea.
<b>Grau 1</b>	Eritema leve: A pele apresentar-se levemente avermelhada, em toda a área-teste.
<b>Grau 2</b>	Eritema moderado: A pele apresenta-se vermelha, geralmente em toda a área-teste.
<b>Grau 3</b>	Eritema definido: A pele apresenta-se com vermelhidão intensa e difusa, em toda a área-teste.
<b>Grau 4</b>	Eritema severo: A pele apresenta-se vermelho-escuro, com leve formação de escaras (injúrias em profundidade).

TABELA 11. Graduação das reações cutâneas: formação de edemas.

<b>Formação de edema</b>	
<b>Grau 0</b>	Nenhum edema: O valor do edema é igual a 0 (zero).
<b>Grau 1</b>	Edema leve: O valor do edema está compreendido entre 0,25 e 0,49 mm.
<b>Grau 2</b>	Edema moderado: O valor do edema está compreendido entre 0,5 e 0,74 mm.
<b>Grau 3</b>	Edema definido: O valor do edema deve estar compreendido entre 0,75 e 1 mm.
<b>Grau 4</b>	Edema severo: O valor do edema é maior do que 1 mm, podendo às vezes ser maior do que a área de exposição.

Os cálculos do índice de irritação cutânea primária, e suas classificações, foram realizados através da média aritmética destas graduações nos períodos de 1, 24, 48, 72h e 7 dias. Obteve-se a somatória dessas 5 médias aritméticas que foram divididas por 2 (parâmetros: eritemas/edemas). O valor encontrado foi o *Índice de Irritação Cutânea Primária* da amostra.

## 5. Resultados e Discussão

A classificação de irritante cutâneo primário foi obtida de acordo com os índices mostrados na TAB 12. As TAB. 13 a 17 apresentam os resultados comparativos dos parâmetros.

TABELA 12. Classificação de irritante cutâneo.

VALOR DO ÍNDICE	CLASSIFICAÇÃO
0 - 0,9	Não irritante
1 - 1,9	Ligeiramente irritante
2 - 4,9	Moderadamente irritante
5 - 8	Severamente irritante

TABELA 13. Peso dos Animais

	Peso Inicial	Peso Final
<b>Animal 1</b>	2,550 kg	2,550 kg
<b>Animal 2</b>	3,100 kg	3,100 kg

TABELA 14. Verificações de edemas e eritemas após exposição à amostra de PCL/HA.

	Classificações			
	Controle		PCL	
	Eritema	Edema	Eritema	Edema
<b>1 hora</b>	0	0	0,5	0
<b>24 horas</b>	0	0	0,5	0
<b>48 horas</b>	0	0	0	0
<b>72 horas</b>	0	0	0	0
<b>7 dias</b>	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0,2	0
<b>Índice</b>	0		0,1	

*Atribuição de scores às avaliações realizadas em 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a exposição.*

## 5. Resultados e Discussão

TABELA 15. Verificações de edemas e eritemas após exposição à amostra de PCL/Vancomicina (PCL/VC)..

	<b>Classificações</b>			
	<b>Controle</b>		<b>PCL/VC</b>	
	<b>Eritema</b>	<b>Edema</b>	<b>Eritema</b>	<b>Edema</b>
<b>1 hora</b>	0	0	0	0
<b>24 horas</b>	0	0	1,0	0
<b>48 horas</b>	0	0	0,5	0
<b>72 horas</b>	0	0	0	0
<b>7 dias</b>	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0,3	0
<b>Índice</b>	0		0,15	

*Atribuição de scores às avaliações realizadas em 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a exposição.*

TABELA 16 – Verificações de edemas e eritemas após exposição animal à amostra de PCL/Sigma (PCL/Si).

	<b>Classificações</b>			
	<b>Controle</b>		<b>PCL/Si</b>	
	<b>Eritema</b>	<b>Edema</b>	<b>Eritema</b>	<b>Edema</b>
<b>1 hora</b>	0	0	0,5	0
<b>24 horas</b>	0	0	0,5	0
<b>48 horas</b>	0	0	0,5	0
<b>72 horas</b>	0	0	0,5	0
<b>7 dias</b>	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0,4	0
<b>Índice</b>	0		0,2	

*Atribuição de scores às avaliações realizadas em 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a exposição.*

TABELA 17 – Índice e classificação do grau de irritação cutânea primária das amostras avaliadas

<b>Grupos</b>	<b>Controle</b>	<b>PCL</b>	<b>PCL/VC</b>	<b>PCL/SI</b>
<b>Índice</b>	0	0,1	0,15	0,2
<b>Classificação</b>	Não irritante	Não irritante	Não irritante	Não irritante

Não houve quaisquer alterações nos ensaios de toxicidade sistêmica entre os grupos e parâmetros avaliados. Segundo GAD (2006), a dose máxima administrada não deve ser superior a 2g/kg de peso corporal (do animal). Para DE PASS, (1989), se não há mortalidade ou sinais clínicos indicativos de toxicidade na dose experimental limite, o estudo pode ser finalizado e a substância pode ser classificada como de baixa toxicidade aguda. Se não há mortalidade ou sinais clínicos indicativos de toxicidade na dose experimental limite, o estudo pode ser finalizado e a substância pode ser classificada como de baixa toxicidade aguda.

A extrapolação dos dados obtidos nos estudos com animais para o ser humano e de doses mais elevadas para doses baixas deve considerar as diferenças inter e intra-espécie quanto à toxicocinética, à toxicodinâmica e à normalização da dose. O intuito dessa extrapolação é o estabelecimento da Dose de Referência (DRf). A DRf é a estimativa de um nível de exposição diário para a população humana, incluindo os grupos suscetíveis, que provavelmente não apresenta risco apreciável de causar efeito adverso mesmo que a exposição ao toxicante ocorra durante toda a vida do indivíduo. As DRf são definidas considerando-se a via de exposição (oral, dérmica, inalatória), do efeito crítico estudado e do tempo de exposição (crônico, subcrônico). As concentrações e as doses de referência (CRf/DRf) são obtidas dividindo-se o NOAEL ou a DB por

fatores de incerteza que podem variar de 1 a 10 000, dependendo da natureza do efeito crítico, da adequabilidade dos dados utilizados na obtenção do NOAEL ou da DB e das variações inter e intra-espécie (WHO, 2005).

### 5.2.3. Determinação da Sensibilidade Antimicrobiana

A TAB. 9 mostra os resultados de atividade antimicrobiana na presença de *S. aureus*, demonstrando ser sensível às diferentes concentrações de PLC/HA/Vancomicina, utilizadas para este ensaio.

TABELA 9. Atividade antimicrobiana da PCL/HA/Vancomicina frente ao *Staphylococcus aureus*.

Amostras	Microrganismo
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	***halo/mm
**PCL/HA (56 mg)	0
*PCL/HA(14mg) / Vancomicina(15,4 µg)	15 mm
*PCL/HA(28mg) / Vancomicina(30,8 µg)	20 mm
*PCL/HA (56mg) / Vancomicina(61,6 µg)	20 mm

\*\*\* Dimensão do halo em milímetro

\*\* PCL/HA – Poli (ε-caprolactona)/Hidroxiapatita

\*PCL/HA/Vancomicina – Poli (ε-caprolactona)/ Hidroxiapatita/Vancomicina

A FIG. 27 representa a análise macroscópica das placas com as amostras. Como controle negativo, temos a placa (A) com a PCL/HA demonstrando ausência da formação do halo, e como controle positivo, temos os discos de vancomicina em cada uma das placas (A, B, C e D), indicados com as setas.

As imagens capturadas mostram a ausência da formação de halo pela amostra PCL/HA na placa A, e a formação de halo de inibição pelas placas B, C e D demonstrando sensibilidade na relação concentração-dependente do *S. aureus* frente à vancomicina presente no compósito PCL/HA/Vancomicina.

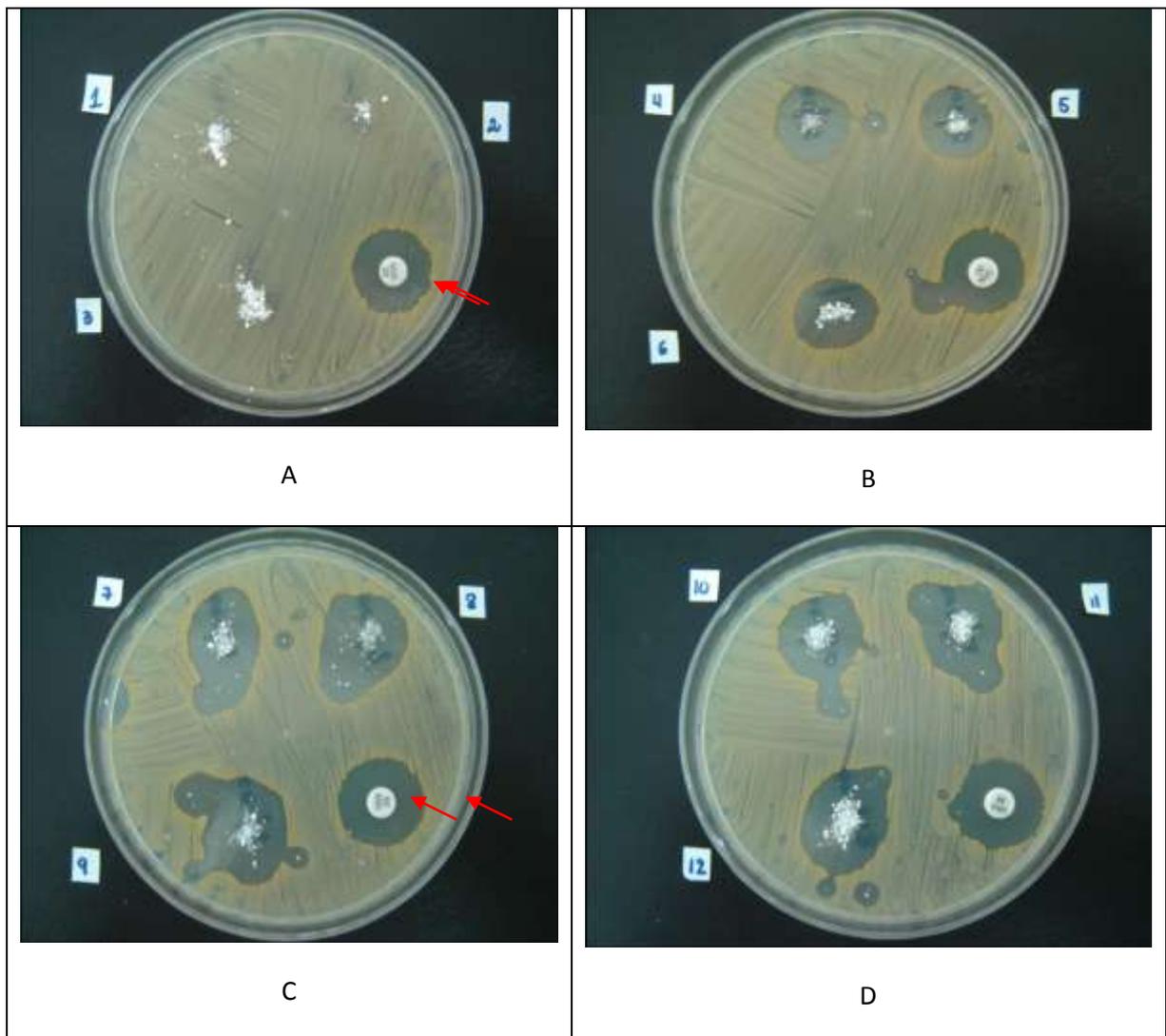


FIGURA 27. Fotografias das placas do ensaio preparadas com suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* para as triplicatas das amostras PCL/HA (A) e PCL/HA/Vancomicina com 15,4  $\mu\text{g}$  de vancomicina (B), PCL/HA/Vancomicina com 30,8  $\mu\text{g}$  de vancomicina (C), PCL/HA/Vancomicina com 61,6  $\mu\text{g}$  de vancomicina (D). As concentrações de vancomicina para o ensaio foram determinadas a partir da concentração de referência da matriz sintetizada igual a 1,1mg vancomicina para 1000 mg de PCL/HA.

O local do implante de um biomaterial tem sempre um papel significativo no risco potencial de infecções após o procedimento. Uma área maior da superfície exposta ao ambiente do hospedeiro está em risco para uma maior resposta tecidual do que um implante que exiba uma área de superfície mínima. A suscetibilidade óssea à invasão aumenta no trauma, na isquemia ou na presença de corpos estranhos, pela exposição de sítios nos quais as bactérias podem aderir. Para fugirem das defesas do hospedeiro, ligam-se ao osso lesado por receptores (adesinas), penetram e persistem nos osteoblastos e cobrem-se com um biofilme protetor rico em polissacarídeos (HINRICHSEN, 2007; SUN, MEI & SONG, 2006).

Em infecções associadas aos biomateriais o *S. aureus* está associado com infecção aguda de ferida pós-cirúrgica, e a virulência intrínseca de *S. aureus* é, isoladamente, suficiente para produzir o processo infeccioso. A sobrevivência intracelular do *S. aureus*, agente preponderante, poderia explicar a persistência das infecções ósseas, pois uma vez aderida ao osso, a bactéria expressa resistência fenotípica aos antibióticos.

ZANETTI et al.(2006) demonstraram que a profilaxia de rotina com vancomicina foi mais efetiva do que com a cefazolina, em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, tendo prevenido um maior número de infecções de ferida cirúrgica ou óbitos por estafilococos e enterococos resistentes à metilina.

Algumas vezes, a administração sistêmica dos antimicrobianos é insuficiente para prevenir a infecção de prótese, pois a concentração do antimicrobiano no tecido em volta da prótese é muito baixa. HIROSE et al. (2004) desenvolveram, recentemente, um sistema de liberação sustentada do

antimicrobiano através da utilização de caprolactona biodegradável, monômero da poli( $\epsilon$ -caprolactona), que mantém uma concentração tecidual efetiva do antimicrobiano em volta do enxerto protético. Os mesmos autores demonstraram que a liberação sustentada de vancomicina reduziu a taxa de infecção em próteses em modelo animal.

Buscando avaliar a resposta da atividade antimicrobiana da vancomicina incorporada no PCL/HA frente a *S. aureus*, ensaios em triplicata foram conduzidos nas concentrações: PCL /HA com 15,4  $\mu\text{g}$  de vancomicina, PCL /HA com 30,8  $\mu\text{g}$  de vancomicina e PCL /HA com 61,6  $\mu\text{g}$  de vancomicina, demonstrando resultados preliminares satisfatórios da atividade deste antibiótico, verificando a formação de halos de inibição na presença de *S. aureus*. Foi observado também, que a medida destes halos, mantiveram-se constantes nas concentrações de 30,8  $\mu\text{g}$  e 61,6  $\mu\text{g}$  da vancomicina, induzindo, que após uma determinada concentração a atividade permanece constante (TAB. 17).

Com a resposta positiva da atividade antimicrobiana da vancomicina incorporada no PCL/HA frente a *S. aureus*, obtida neste estudo, outros ensaios *in vitro* deverão ser realizados, no futuro, utilizando diferentes microrganismos para mostrar o espectro de ação do antibiótico.

### 5.3. FASE 3 – OBTENÇÃO DOS PROTÓTIPOS BASEADOS NO PCL

#### Pastilhas

Foram confeccionadas pastilhas de PCL (FIG. 28) nas dimensões de 2,0 mm de espessura com 1,0 cm de diâmetro, prensadas em um molde de aço inoxidável e pressão uniaxial equivalente a 7-8 toneladas. As pastilhas obtidas possuíam massa inicial estimada de 200 mg. As amostras foram esterilizadas por radiação gama a uma dose de 25 kGy.



FIGURA 28. Pastilha obtida por prensagem a partir de 200mg de pó da matriz do compósito biodegradável PCL/HA.

#### Pinos Cilíndricos

Foram fabricados pinos cilíndricos nas dimensões de 6 mm de comprimento por 3 mm de diâmetro. Foi utilizado um molde de aço inoxidável e pressão uniaxial equivalente a 70 MPa. Os cilindros obtidos foram retirados dos moldes com auxílio de uma haste, tendo suas extremidades regularizadas após

polimento em máquina politriz. Os pinos foram esterilizados com raios gama provenientes de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  até a dose de 25 kGy (FIG. 29 e 30).

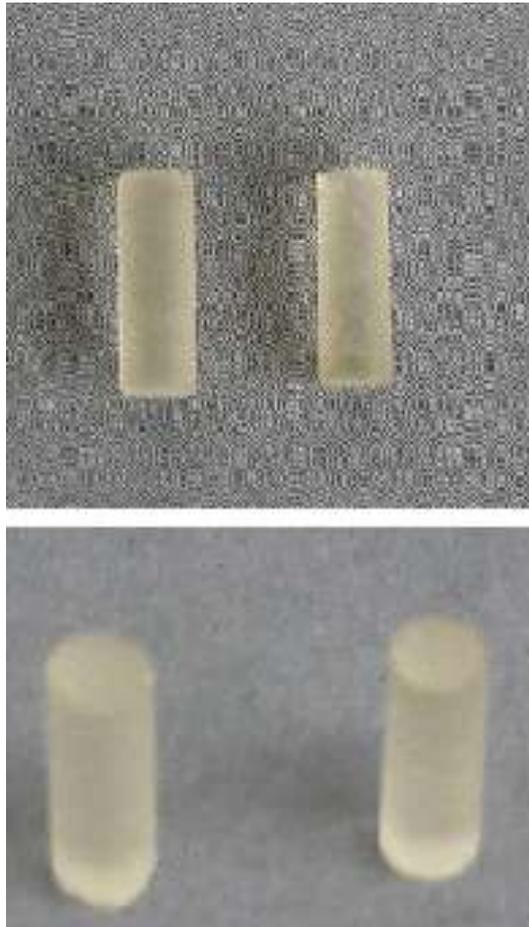


FIGURA 29. Primeiros moldes obtidos. Dimensões dos pinos:  $\phi = 3,0$  mm e  $h = 7,0$  mm.

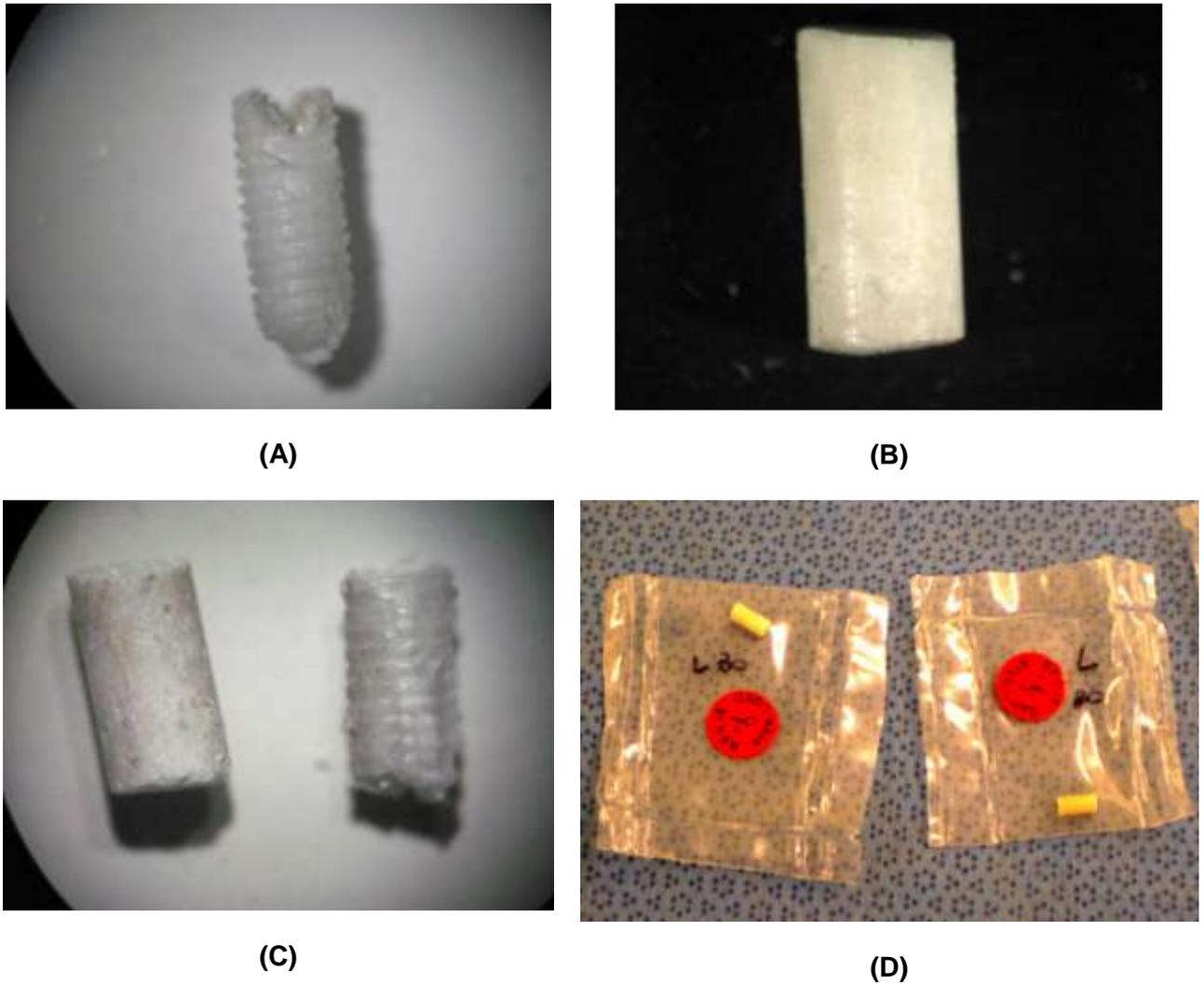


FIGURA 30. Fotos dos protótipos do composto de PCL/HA com dimensões de:  $\varphi = 3,0$  mm e  $c = 6,0$  mm. (A), (B) e (C) visão longitudinal (aumento 20x em estereomicroscópio) (D) pinos esterilizados por raio gama, fonte Co-60, dose 25 kGy (conforme indicador esférico).

## **5.4. FASE 4 – AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA**

### **5.4.1. Biodegradação Enzimática *In Vitro***

#### **5.4.1.1. Perda de Massa, Absorção de Água e pH**

As pastilhas foram submetidas ao ensaio de degradação hidrolítica e enzimática por um período total de 288 horas. As TAB. 18, 19 e 20 apresentam os resultados das análises gravimétricas relativas à determinação da massa inicial (MI), massa úmida (MU) e massa seca (MS). A partir desses dados foi determinada a porcentagem de perda de massa e a taxa de absorção de água. O aumento na diferença da porcentagem de perda de massa das pastilhas observada entre os grupos PBS e Lipase nos períodos de 192 e 288 horas foi estatisticamente diferente entre os dois grupos. Não houve alteração no período de 96 horas. Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

TABELA 18. Massa das pastilhas em solução de PBS e Lipase, após 96h

Massa das pastilhas	Grupos			
	PBS 1		Lipase 1	
	Média	D.P	Média	D.P
<b>Massa Inicial (MI)</b>	0,1930	0,0019	0,1965	0,0016
<b>Massa Úmida (MU)</b>	0,1966	0,0025	0,2003	0,0009
<b>Massa Seca (MS)</b>	0,1904	0,0025	0,1939	0,0007
<b>Absorção de Água (MU – MI)</b>	0,0062	-----	0,0065	-----
<b>% de absorção</b>	3,14	-----	3,23	-----
<b>Perda de Massa (MI – MS)</b>	0,0026	-----	0,0026	-----
<b>% de perda</b>	1,33	-----	1,32	-----

- \* $p < 0,05$  (ANOVA) – teste de Tukey; D.P. – Desvio Padrão

TABELA 19. Massa das pastilhas em solução de PBS e Lipase, após 192h

Massa das pastilhas	Grupos			
	PBS 2		Lipase 2	
	Média	D.P	Média	D.P
<b>Massa Inicial (MI)</b>	0,1916	0,0032	0,1871	0,0040
<b>Massa Úmida (MU)</b>	0,1946	0,0039	0,1890	0,0038
<b>Massa Seca (MS)</b>	0,1879	0,0049	0,1830	0,0039
<b>Absorção de Água (MU – MI)</b>	0,0067	-----	0,0060	-----
<b>% de absorção</b>	3,46	-----	3,17	-----
<b>Perda de Massa (MI – MS)</b>	0,0037	-----	0,0041	-----
<b>% de perda</b>	1,95	-----	2,19 *	-----

- \* $p < 0,05$  (ANOVA) – teste de Tukey; D.P. – Desvio Padrão

TABELA 20. Massa das pastilhas em solução de PBS e Lipase, após 288h

Massa das pastilhas	Grupos			
	PBS 3		Lipase 3	
	Média	D.P	Média	D.P
<b>Massa Inicial (MI)</b>	0,1912	0,0080	0,1903	0,0054
<b>Massa Úmida (MU)</b>	0,1951	0,0080	0,1927	0,0055
<b>Massa Seca (MS)</b>	0,1882	0,0070	0,1862	0,0054
<b>Absorção de Água (MU – MI)</b>	0,0069	-----	0,0064	-----
<b>% de absorção</b>	3,54	-----	3,34	-----
<b>Perda de Massa (MI – MS)</b>	0,0030	-----	0,0041	-----
<b>% de perda</b>	1,57	-----	2,15 *	-----

- \* $p < 0,05$  (ANOVA) – teste de Tukey; D.P. – Desvio Padrão

A FIG. 31 representa as determinações de pH relativas às análises das soluções de PBS e de Lipase das amostras. As dosagens foram realizadas diariamente durante o ensaio de biodegradação *in vitro*, para a solução hidrolítica de PBS e enzimática de Lipase por um período total de 384 horas. O perfil gráfico apresentou-se similar para as duas soluções ao longo do período estudado. No período de 168h houve uma diminuição da temperatura ambiente no laboratório ocasionado por uma variação do ar condicionado de mais ou menos 2 °C (temperatura ambiente normal  $\pm$  22 °C) o que acarretou na diminuição do pH para as duas soluções.

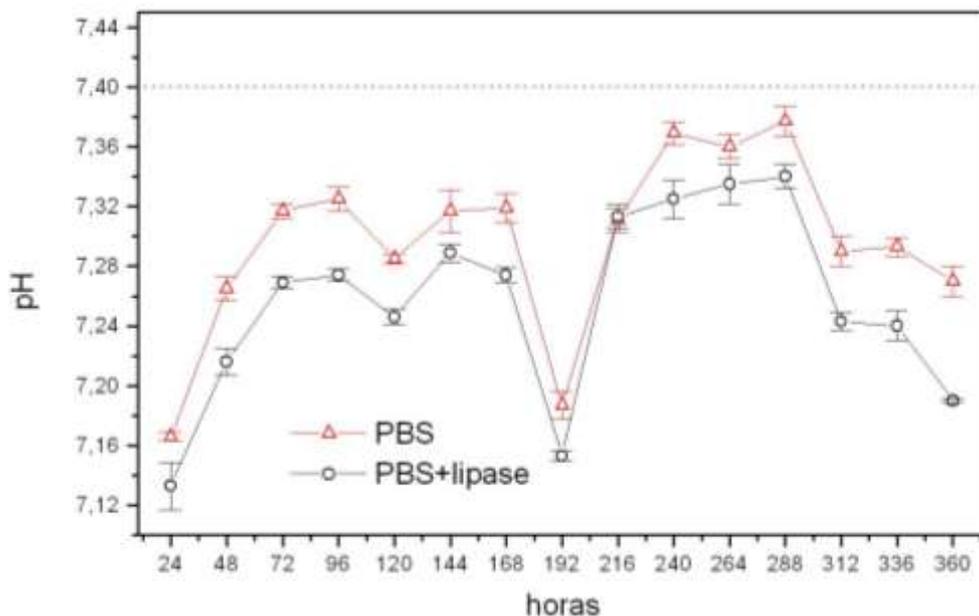


FIGURA 31. Variação de pH das soluções PBS e PBS+lipase durante ensaio de degradação de amostras de PCL durante 15 dias.

Ambas soluções PBS e PBS + lipase apresentaram mesma tendência de variação de pH, sendo que as soluções que contêm lipase demonstraram um sutil deslocamento para intervalos de maior neutralidade, ou seja, uma ligeira acidez

comparada a condição inicial de pH igual a 7,4 das soluções originais. Apesar dos comportamentos similares das soluções, houve uma diferença estatística entre elas.

A variação de pH para intervalos ligeiramente ácidos, ainda que em valores de pH que expressam uma condição praticamente neutra, pode estar associada a degradação hidrolítica dos polímeros, gerando espécies levemente ácidas e, ainda pouco expressivas no meio.

As medidas de pH monitoradas por período de até 15 dias, provavelmente não favoreceram uma reação de hidrólise do grupo éster de forma mais significativa, é provável que a degradação hidrolítica da PCL de forma passiva e ativa nos meios, PBS e PBS + lipase, respectivamente, seja mais intensa em períodos mais longos. Sabe-se que a PCL apresenta uma taxa de biodegradação menor quando comparada a outros polímeros e que um pH básico e alta temperatura favorecem sua degradação em meios aquosos.

As oscilações de pH do meio podem influenciar a degradação ativa (catálise) do polímero na presença da lipase.

Apesar de as lipases atuarem em uma faixa de pH relativamente larga, apresentam um intervalo ideal de ação. A literatura menciona que a lipase apresenta estabilidade superior a 65 % e atividade acima de 30% a temperatura de 37°C, para os mesmos intervalos de pH verificados neste estudo. Sua estabilidade diminui com aumento de pH (7,4=60%); valores acima resultam em estabilidade menor e, abaixo uma maior estabilidade, já a atividade é próxima de 100 % no intervalo de pH envolvido neste estudo.

Assim como o pH do meio pode afetar a estabilidade e atividade das enzimas, também sua imobilização na superfície do material pode ser afetada, pois variações de pH podem modificar interações entre grupos de carga elétrica ou dipolo, da enzima e do suporte, podendo influenciar na afinidade entre os mesmos. Enzimas como a lipase podem ser imobilizadas por adsorção, como resultado de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, envolvendo a enzima, o suporte, o solvente e alguns solutos.

A FIG. 32 ilustra a taxa de absorção de água das amostras ao longo dos tempos estudados.

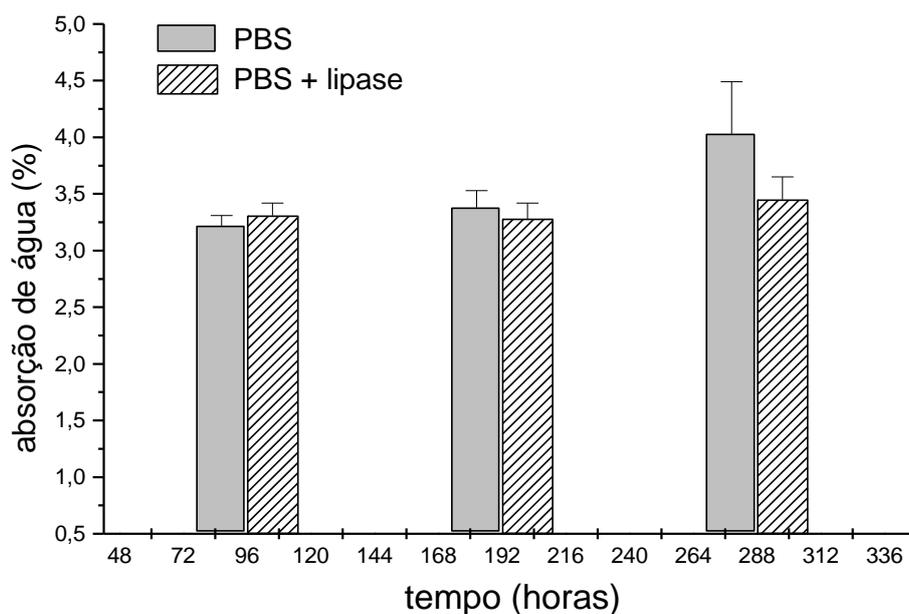


FIGURA 32. Gráfico representativo da absorção de água das amostras durante 288 horas de degradação em PBS e solução enzimática de PBS, mantidas a  $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  e agitação de 50 rpm.

Observa-se que as amostras absorvem uma quantidade de água entre 3,2 e 4% dentro do período analisado. Os valores encontrados neste estudo foram

superiores aos relatados pela literatura para os intervalos de tempo analisados. Esta diferença pode estar relacionada a massa molar do polímero, além da presença de uma fase cerâmica (hidroxiapatita), considerando que trata-se de um compósito PCL/HA. A presença da cerâmica pode afetar a molhabilidade do material, já que a PCL é um polímero de natureza hidrofóbica.

Para os três períodos investigados houve uma diferença entre os grupos (PBS e PBS + lipase) apenas no último período analisado. Foi observado um valor de absorção mais expressivo para as amostras do grupo PBS. A absorção de água para as amostras expostas em ambiente enzimático manteve praticamente o mesmo teor de absorção durante os tempos analisados. Baseado neste comportamento pode-se afirmar que houve uma competição entre as moléculas de água e da enzima por sítios específicos do material, principalmente nos tempos que sucederam as primeiras 96 horas. Este comportamento pode estar associado a preferência da lipase adsorver em substrato de natureza hidrofóbica, ou seja, sítios que não apresentam afinidade por moléculas de água. Por isso as amostras na presença da lipase não obtiveram uma absorção igual ou superior às do grupo PBS no último período.

Na FIG. 33 está apresentada o comportamento de perda de massa das amostras para os diferentes grupos, nos períodos de 96, 192 e 288 horas de degradação em meio de PBS e solução enzimática (PBS + lipase).

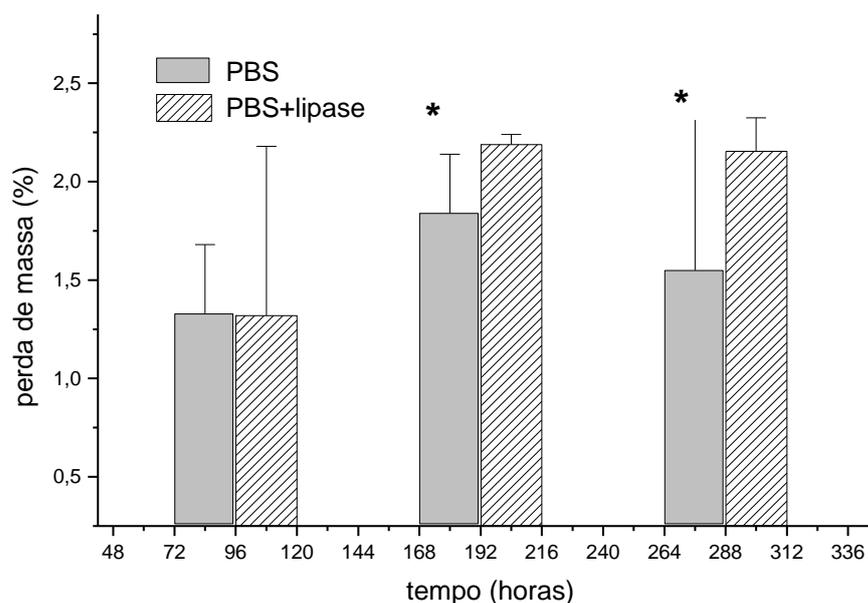


FIGURA 33. Gráfico representativo da perda de massa das amostras decorrente de processo de degradação em PBS e solução enzimática de PBS mantidas a  $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  e agitação de 50 rpm por 288 horas .

Quanto à perda de massa, não foi observada uma diferença estatística entre os grupos para o período de 96 horas, apenas nos demais tempos analisados (192 e 288 horas). Este comportamento está de acordo com os dados de absorção de água para o mesmo período (FIG. 32).

Analisando os grupos individualmente, observa-se que há uma diferença estatística na perda de massa perante os tempos de degradação estudados para as amostras decorrentes da degradação passiva (PBS), já para as amostras do outro grupo que sofreram catálise, não apresentaram uma diferença significativa entre os dois últimos tempos analisados. Comparativamente aos dados de absorção onde não foi observada uma variação significativa para este grupo, é possível afirmar que a perda de massa não se deve a presença de água, o que

está de acordo com a natureza hidrofóbica da PCL, mas a ação da lipase, sugerindo uma degradação enzimática do material.

O efeito da degradação também pode expor mais facilmente a fase cerâmica de hidroxiapatita presente na matriz polimérica. Esta exposição pode ocasionar a solvatação da matriz, permitindo maior facilidade de difusão da água pela rede, preferencialmente pelas regiões amorfas, facilitando também o ataque enzimático. Com isso, é possível verificar diferenças entre as frações amorfa e cristalina com relação ao polímero original, antes da degradação. Essas mudanças estruturais podem trazer um aumento na elasticidade e na flexibilidade, como também uma diminuição de densidade, rigidez e resistências mecânica e térmica do material durante os diferentes estágios de degradação.

É fato que a incorporação de água pode facilitar a ação enzimática, podendo inclusive, induzir um processo de autocatálise no interior do polímero, justificando valores de perda de massa mais expressivos que os relatados na literatura para o mesmo polímero.

Considerando a degradação hidrolítica enzimática, é importante acrescentar que lipases apresentam preferência na imobilização em suportes hidrofóbicos, caso da PCL perante materiais hidrofílicos onde a competição pela água disponível do meio torna-se um fator negativo perante a adsorção da enzima.

#### **5.4.1.2. Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)**

A técnica de FTIR permite identificar substituições ou alterações importantes na composição dos materiais durante o processo de degradação, por

exemplo. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais destes grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos.

A aquisição de dados pelo método de reflectância difusa permite analisar a superfície do material de forma não destrutiva, em uma profundidade de aproximadamente 0,5 $\mu$ m, possibilitando a detecção de teores da ordem de uma parte por milhão dos compostos presentes.

As bandas de absorção relativas ao PCL estão representadas na TAB. 21. A FIG. 34 mostra os espectros de FTIR da matriz intacta do polímero PCL utilizado para a confecção das pastilhas submetidas ao ensaio de biodegradação e uma figura ilustrativa do espectro de FTIR para a enzima lípase.

TABELA 21. Bandas de absorção do PCL

		Abreviação
2949	Estiramento assimétrico do CH <sub>2</sub>	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub>
2865	Estiramento simétrico do CH <sub>2</sub>	$\nu_s$ CH <sub>2</sub>
1727	Estiramento da carbonila	$\nu$ (C=O)
1293	Estiramento do C-O e C-C na fase cristalina	$\nu_{cr}$
1240	Estiramento assimétrico da ligação C-O-C	$\nu_{as}$ (C-O-C)
1190	Estiramento OC-O	$\nu$ (OC-C)
1170	Estiramento simétrico COC	$\nu_s$ (COC)
1157	Estiramento simétrico C-O e C-C na fase amorfa	$\nu_{am}$

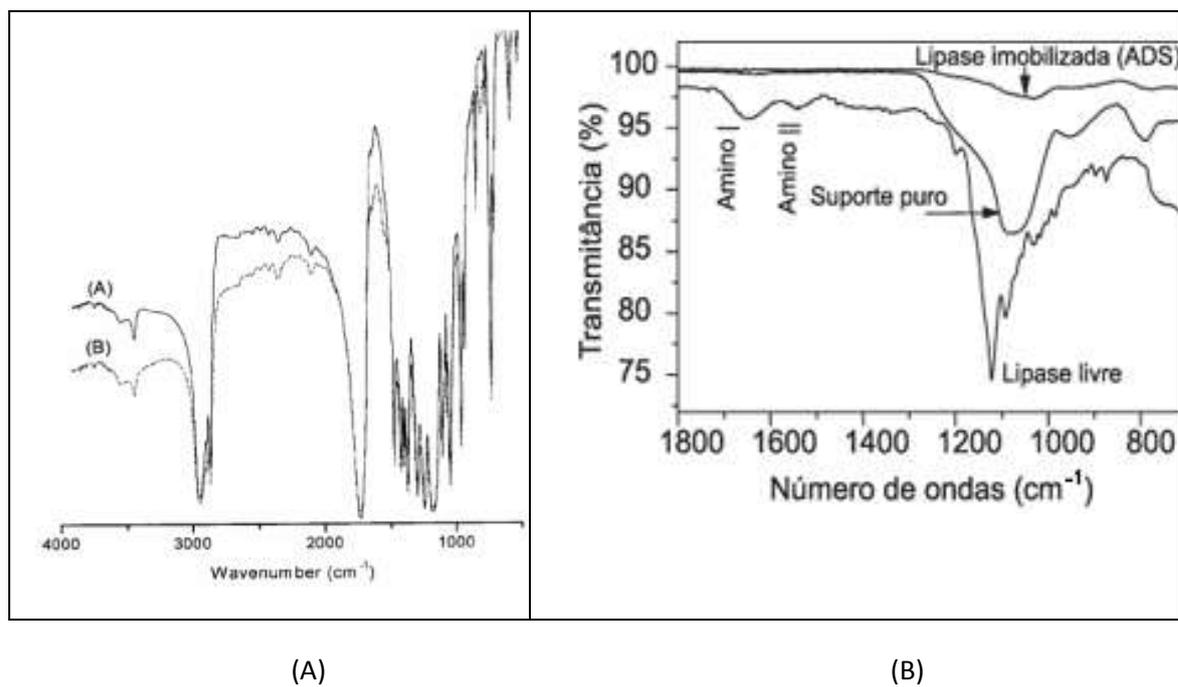


FIGURA 34. (A) Espectro FTIR da matriz intacta do polímero PCL utilizada na confecção das pastilhas. Dispersão da amostra em pastilhas de KBr. (B) Representação gráfica ilustrativa do espectro FTIR da Lipase.

Na FIG. 35 estão apresentados os espectros de infravermelho por reflectância difusa das amostras após período de 8 dias de degradação em diferentes meios, PBS e PBS com solução enzimática de lipase

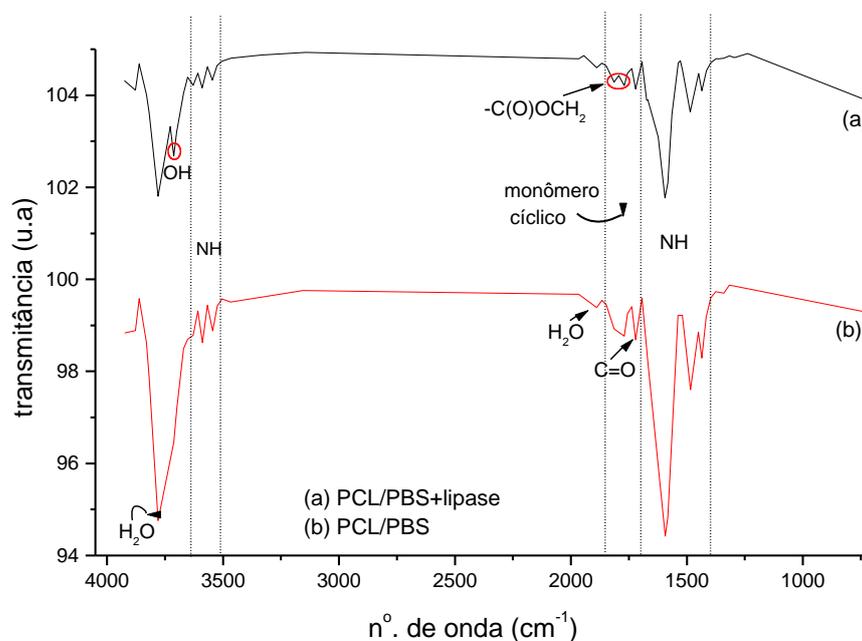


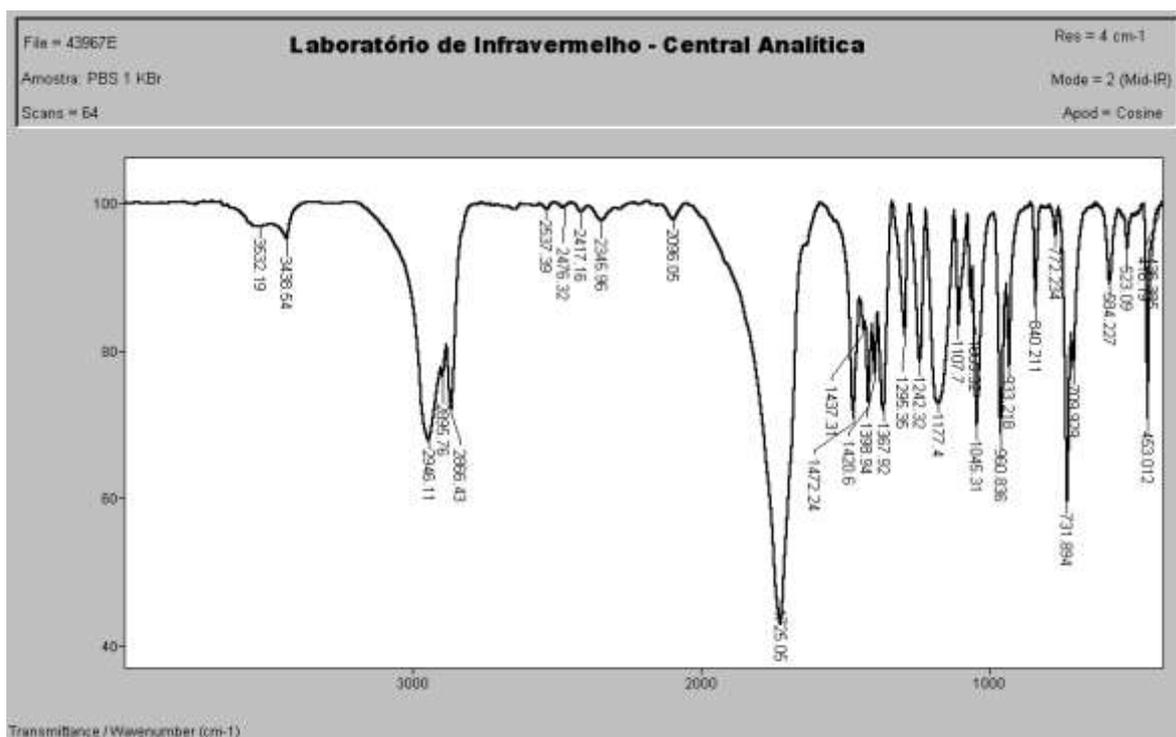
FIGURA 35. Espectros de infravermelho obtidos pela técnica de reflectância difusa (DRIFT) das amostras de PCL após ensaio de degradação em meio: (a) PBS + lipase e (b) PBS, após 192h (8 dias).

As FIG. 36 a 39 mostram os espectros de FTIR por transmitância (KBr) e por reflectância difusa (DRIFT) dos grupos PBS 1, Lipase 1, PBS 2 e Lipase 2, respectivamente.

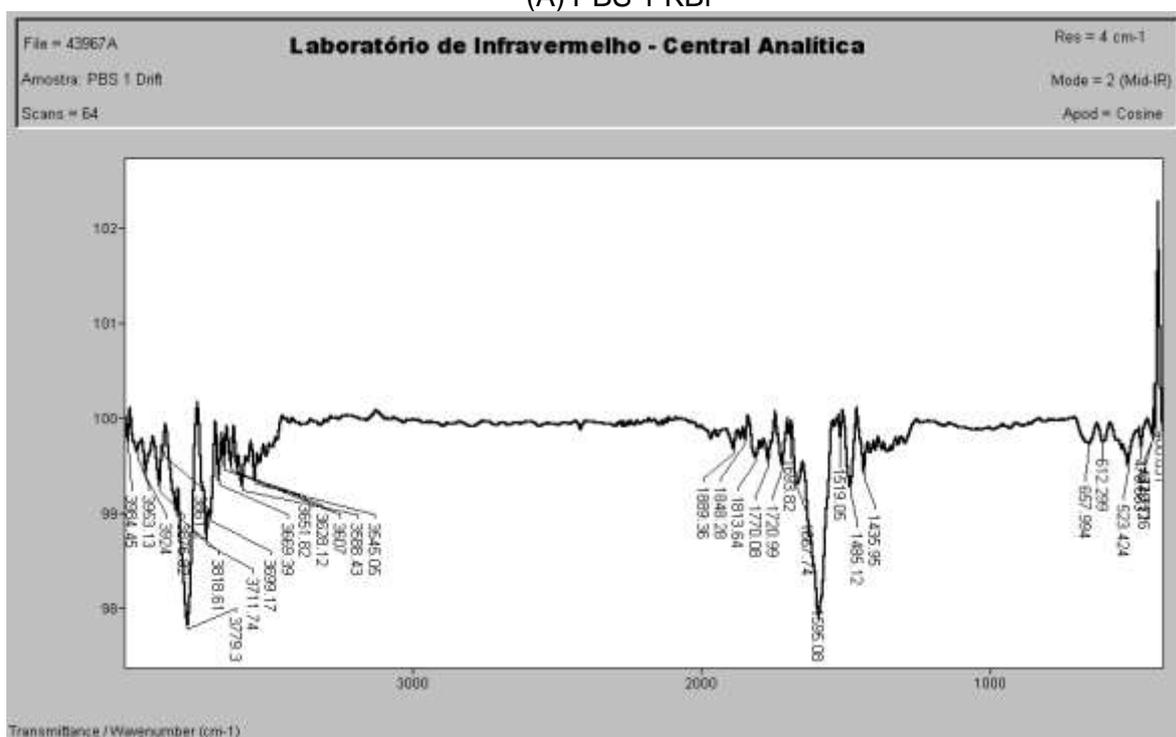
Em relação aos tempos estudados para o grupo exposto à solução enzimática de Lipase, o espectro de DRIFT da Lipase 2, após 192 horas (FIG. 39), apresentou uma diminuição da intensidade na banda de absorção da carbonila a 1720 cm<sup>-1</sup> em relação ao espectro de DRIFT da Lipase 1, após 96 horas (FIG. 38). Esse mesmo comportamento foi observado comparando-se os

dois grupos experimentais. No mesmo período avaliado em 192 horas, o espectro de DRIFT obtido para a Lipase 2 (FIG. 39) apresentou diminuição da mesma banda de absorção em relação ao espectro de DRIFT obtido para PBS 2 (FIG. 37). A banda de absorção da carbonila a  $1720\text{ cm}^{-1}$  está associada ao polímero PCL, dessa forma os resultados corroboram com a taxa de degradação gravimétrica encontrada anteriormente e sugerem aumento da taxa de degradação tanto na relação tempo-dependente quanto a potencialização sob ação da solução enzimática de lipase. A lipase é uma enzima da classe das hidrolases que exhibe atividade para quebra de ligações químicas do tipo éster de poliésteres insolúveis em água.

## 5. Resultados e Discussão



(A) PBS 1 KBr



(B) PBS 1 DRIFT

FIGURA 36 – Espectros FTIR das pastilhas do grupo experimental PBS 1 obtido após ensaio de biodegradação em solução de PBS durante 96 horas. (A) Espectro por transmitância (KBr); (B) Espectro por refletância difusa (DRIFT). Eixo X: número de ondas (cm-1). Eixo Y: Transmitância.







#### 5.4.1.3. Difração de Raios-X (DRX)

De acordo com os difratogramas apresentados na FIG. 40 é possível observar dois picos mais intensos, que são característicos da fase cristalina da policaprolactona. Também é possível observar a presença de pequenos picos associados a fase de hidroxiapatita, presente em menor quantidade no compósito PCL/HA destacados em maior aumento na mesma FIG. 40.

Durante a biodegradação da PCL pode ocorrer uma diminuição de sua massa molar. Esta redução, inicialmente, está associada apenas à porção amorfa do polímero, tendendo a aumentar sua cristalinidade durante o estágio de degradação onde a difusão das moléculas de água fica restrita apenas a fração amorfa do polímero. Neste caso, a permeação de água não atinge os domínios cristalinos da matriz polimérica. Este efeito pode resultar em uma variação da cristalinidade e como consequência, uma maior definição dos picos característicos da PCL após um ensaio de degradação. Em particular, tal comportamento pode ser verificado no perfil de difração de raios-X, contudo, não foram observadas variações nos difratogramas das amostras após 8 dias de degradação. Foi verificado um deslocamento dos picos que pode estar associado ao posicionamento das amostras durante a realização das medidas. Este comportamento não se deve a formação de solução sólida, já que a evidência de um maior deslocamento com o aumento do ângulo ( $2\theta$ ) não foi detectado.

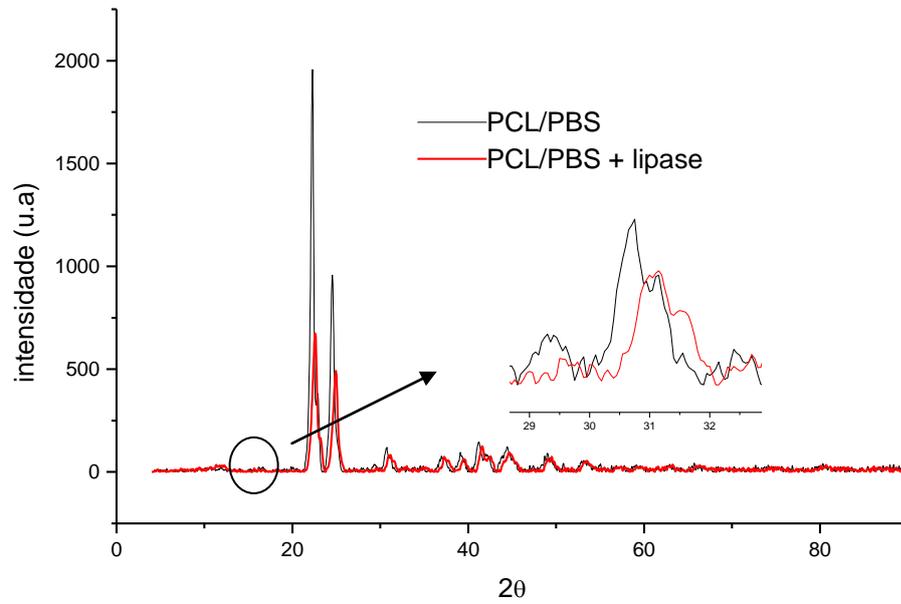


FIGURA 40. Difrátogramas das amostras de PCL obtidos por DRX após ensaio de degradação em meio PBS e PBS + lipase após 8 dias de experimento.

#### 5.4.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As FIG. 41 e 42 mostram as curvas térmicas de DSC realizadas sob fluxo de nitrogênio relativas ao primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento. Os polímeros são um exemplo típico de substâncias químicas que dão lugar ao estado vítreo por resfriamento do material fundido. Se não houver cristalização, o polímero pode se esfriar sem que varie sua desordem. Nesse resfriamento chega-se a alcançar uma temperatura característica de cada polímero, que se denomina temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). A transição vítrea dos polímeros biodegradáveis úteis para a ortopedia se encontra acima da fisiológica ( $37^\circ\text{C}$ ) e, nessa condição eles se encontram na forma cristalina. Esta característica é, também, um fator determinante da velocidade de degradação dos polímeros já que está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, a temperatura de transição vítrea pode ser um fator determinante na cinética de degradação ou absorção de polímeros biodegradáveis no organismo biológico. Entretanto, os termogramas obtidos após o ensaio de biodegradação nos tempos de 96h e 192h indicam que não houve modificação no comportamento térmico entre os grupos estudados.

## 5. Resultados e Discussão

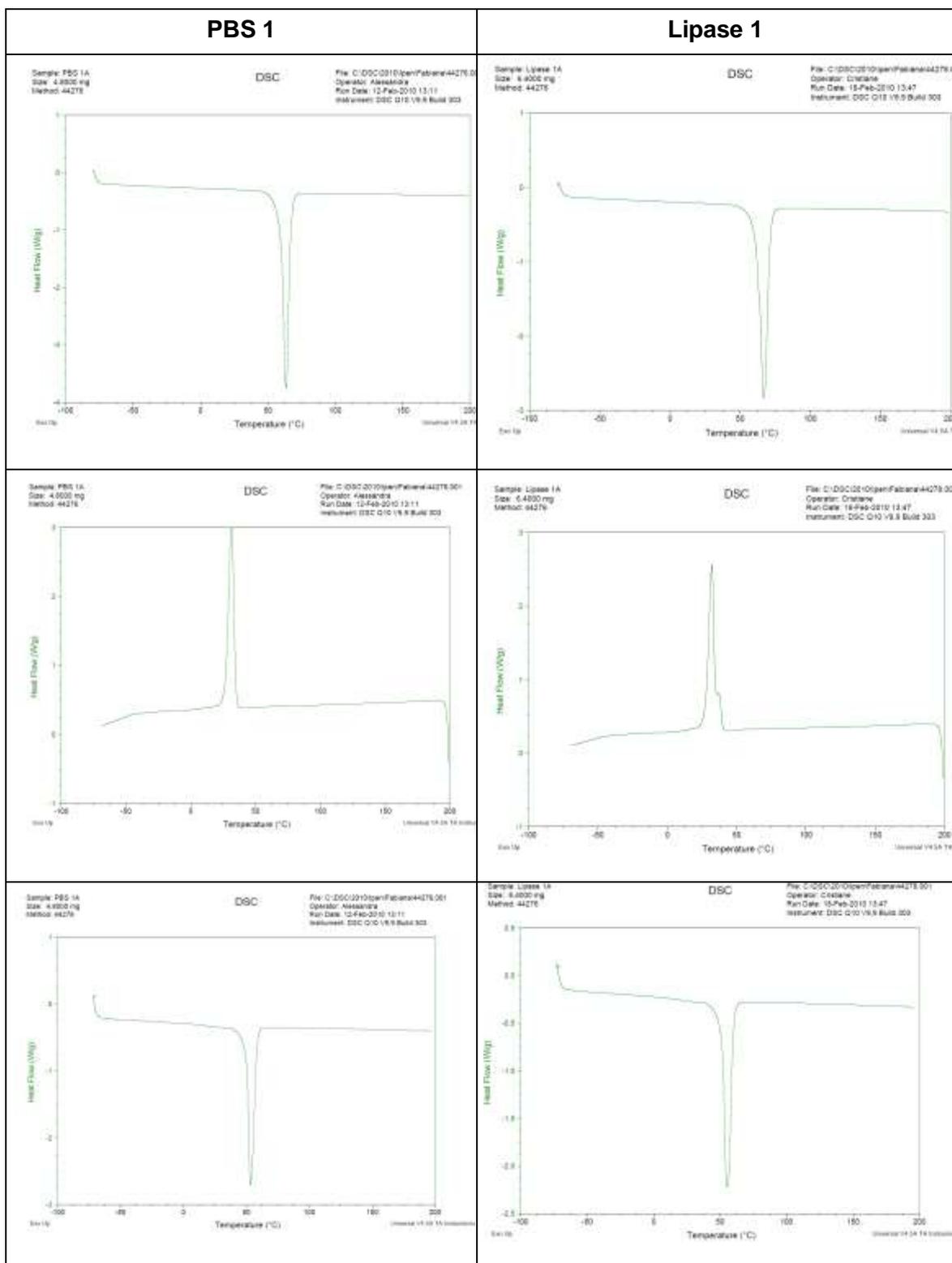


FIGURA 41. Curvas térmicas de DSC dos grupos experimentais PBS 1 e Lipase 1 obtidas após ensaio de biodegradação 96 horas.

## 5. Resultados e Discussão

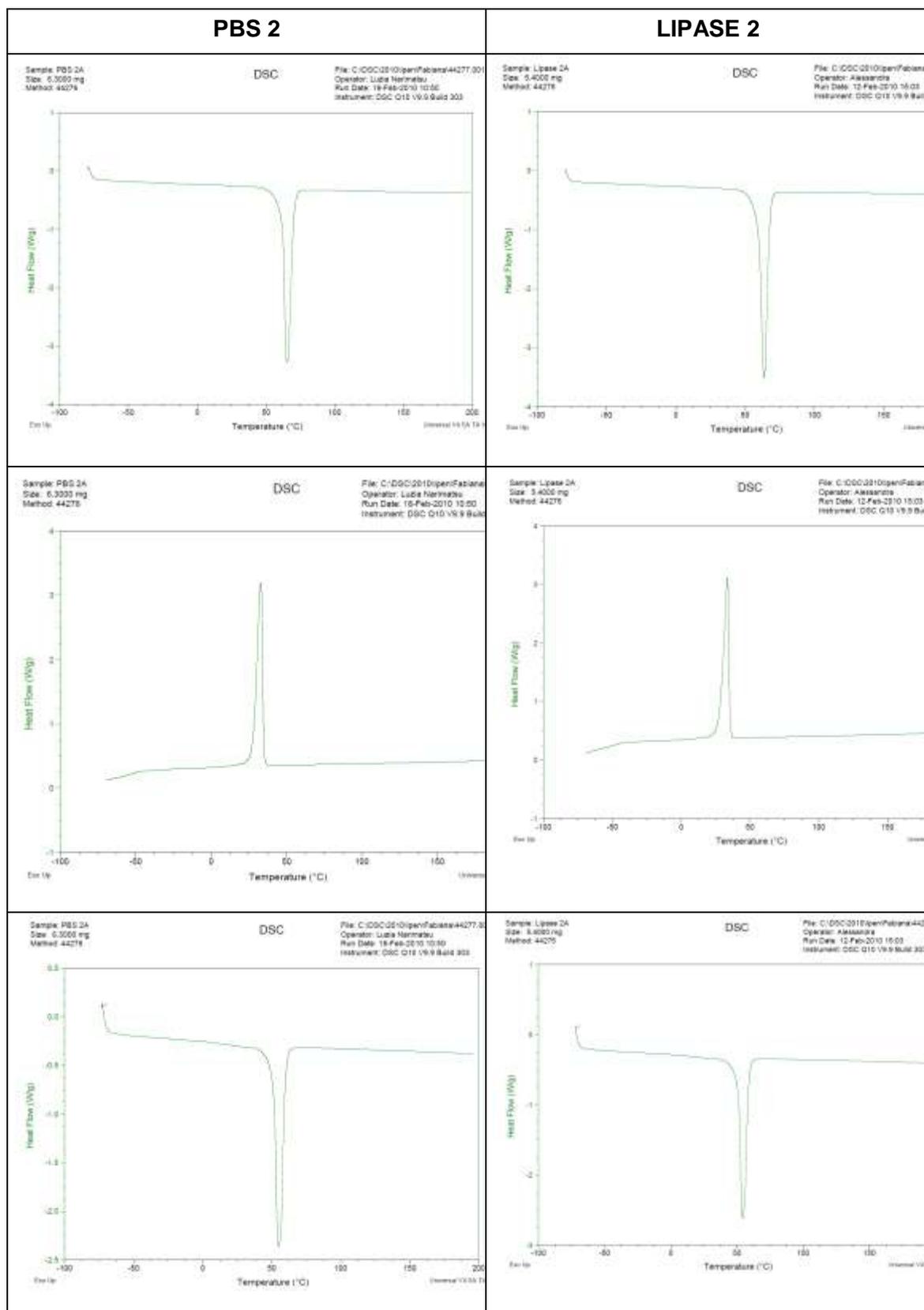


FIGURA 42. Curvas térmicas de DSC dos grupos experimentais PBS 2 e Lipase 2 obtidas após ensaio de biodegradação 192 horas.

#### 5.4.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

As FIG. 43 e 44 mostram as fotomicrografias da análise topográfica da superfície das pastilhas, em aumento de 300x a 1000x, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens permitem obter informações quanto ao comportamento das pastilhas imersas em solução de PBS e de lipase, após 96 e 192 horas.

Quando comparadas à superfícies de pastilhas intactas, as quais não foram submetidas ao ensaio de biodegradação, as amostras dos grupos experimentais apresentaram pontos de degradação espalhados por toda a superfície. Os pontos de degradação dos grupos lipase apresentaram predominância desses pontos em relação aos grupos PBS, e esse comportamento se intensificou após 192h, quando comparados aos grupos de 96 horas.

Dessa forma corroborando com os dados gravimétricos, na qual a solução enzimática de lipase em PBS aumentou a taxa de degradação do PCL/HA, a atividade enzimática também alterou a superfície do polímero quando comparado à ação do tampão fosfato sem enzima. Este resultado representa que a atividade enzimática da lipase promove uma taxa de degradação significativa para o compósito PCL/HA.

A degradação (PCL) é mais lenta do que a do poli(ácido glicólico) e outros poliésteres. Isso permite que o PCL seja utilizado em tratamentos de longa duração. Esse processo pode ser dividido em duas fases, envolvendo inicialmente, quebras aleatórias das cadeias, que reduzem o peso molecular para

até 5000; e após esse período segue-se a perda de massa, devido um aumento na probabilidade das quebras de cadeias gerarem fragmentos menores que podem ser fagocitados. Outros estudos demonstraram que em polímeros de superfície porosa a taxa de degradação é aumentada. Isto ocorre, pois há um maior contato entre a água e os poros, que aumenta o tamanho destes e permite que mais moléculas de enzima penetrem por eles (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

O principal mecanismo de biodegradação dos polímeros é a hidrólise química simples que 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 (CHANDRA & RUSTGI, 1988; NAIR & LAURENCIN, 2007; LUCIANI et al, 2008).

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 da massa do polímero. Em seguida, as moléculas resultantes da biodegradação polimérica são eliminadas pelo organismo. Assim, quando há a presença de enzimas, as energias dos reagentes e dos produtos não são diferentes da reação não catalisada por enzima. O que ocorre é que as enzimas alteram o caminho

para atingir o estado final, mas não a termodinâmica do sistema. A enzima permite que a reação ocorra com menor energia (OKADA, 2002 LUCIANI et al, 2008).

Em estudos *in vivo*, o processo de biodegradação e bioreabsorção é um mecanismo complexo de eventos celulares e bioquímicos. Com o implante do material sintético o organismo promove uma típica resposta à uma reação inflamatória de corpo estranho. A influência na degradação pela presença de peróxidos, enzimas e células fagocitárias, representa ainda hoje um importante enfoque nas pesquisas dos polímeros bioreabsorvíveis (ALI, et al, 1993).

## 5. Resultados e Discussão

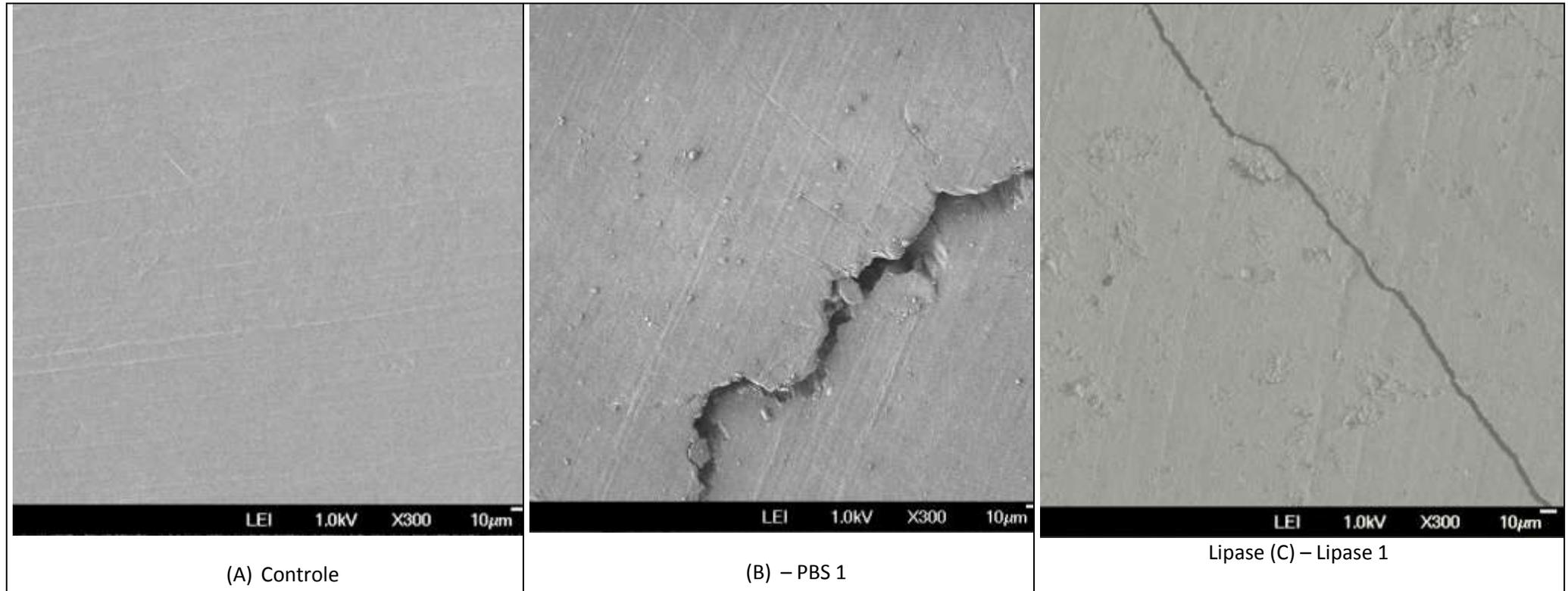


FIGURA 43. Fotomicrografias em aumento de 300x de microscopia eletrônica de varredura das superfícies das amostras após exposição ao ensaio de biodegradação *in vitro*: (A) – Controle: superfície de pastilha intacta; não foi submetida ao ensaio (B) – Pastilha imersa por 96h em solução hidrolítica de PBS; (C) – Pastilha imersa por 96h em solução enzimática de lipase 40U/mL.

## 5. Resultados e Discussão

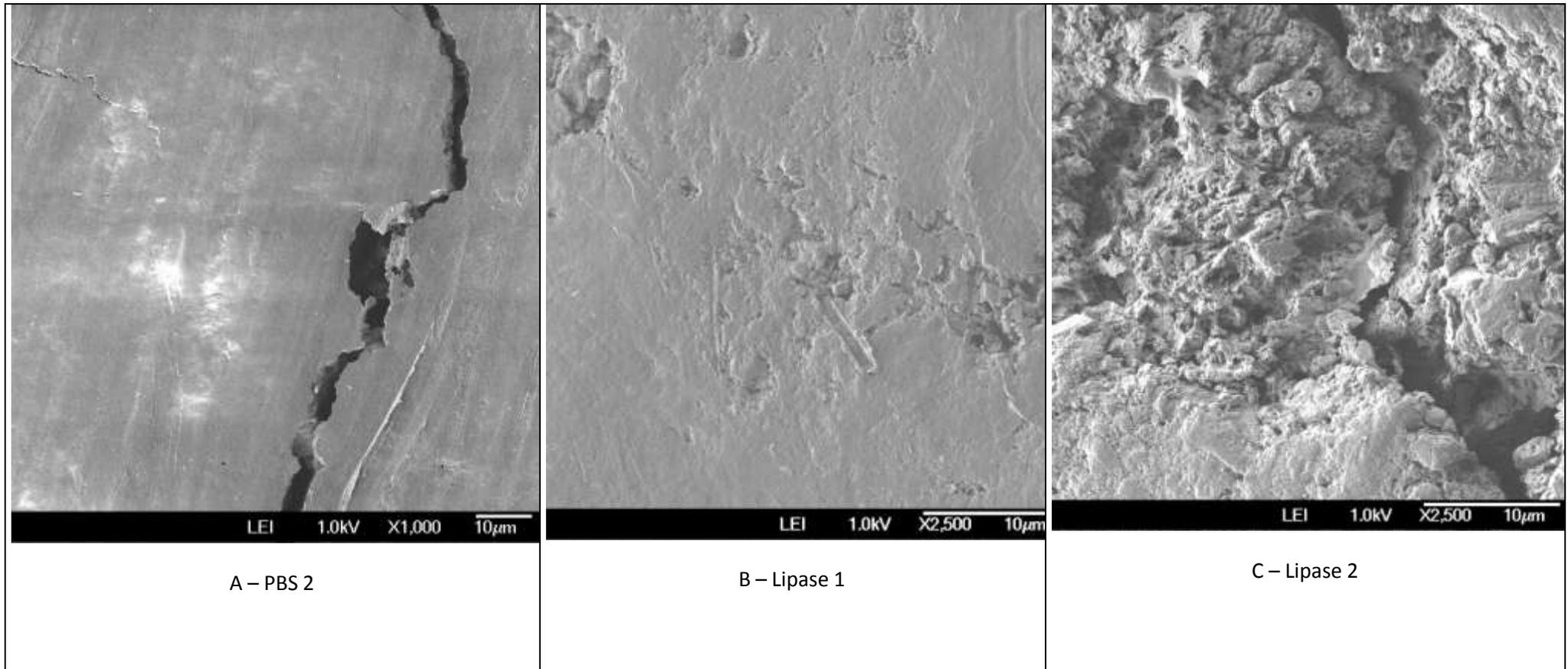


FIGURA 44. Fotomicrografias em aumento de 1000x de microscopia eletrônica de varredura das superfícies das amostras após exposição ao ensaio de biodegradação *in vitro*:: (A) – Pastilha imersa por 192 h em solução hidrolítica de PBS (B) – Pastilha imersa por 96h em solução de lipase (C) – Pastilha imersa por 192h em solução de lipase.

#### 5.4.2. Implantes em Tibias de Coelhos e Osteintegração

Observou-se presença de calo ósseo nos quatro animais do grupo controle (FIG. 45). Nos 4 animais do grupo experimental foi possível visualizar o local do implante do compósito PCL/HA (FIG. 46). Não foi observado sinais de infecção, formação de gás ou lise óssea em nenhum animal de ambos os grupos.

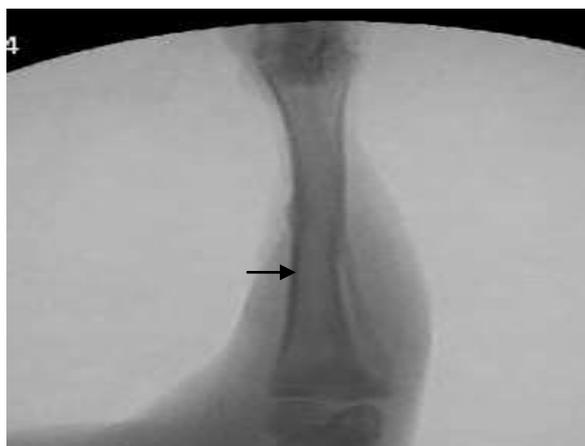


FIGURA 45. Formação de calo ósseo do animal 3 do grupo controle (30 dias pós-cirúrgico).  
A seta indica o local do calo ósseo.

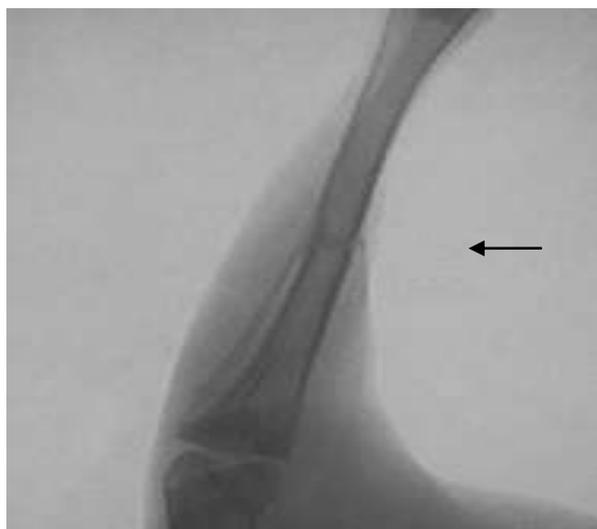


FIGURA 46. Local do implante do compósito do animal 4 experimental (30 dias pós cirúrgico). A seta indica o local do implante do compósito.

Observação de calo ósseo no grupo controle, não sendo mais visível o defeito ósseo em nenhum dos animais (FIG. 47). Nos animais do grupo experimental os implantes estavam inseridos nos tecido ósseo, sem espaço entre o osso e o implante (FIG. 48). Não foram observadas quaisquer alterações na estrutura óssea (fraturas, fissuras) e nem na coloração do tecido ósseo nos animais de ambos os grupos.



FIGURA 47. Tíbia do animal 1 do grupo controle (30 dias pós-cirúrgico). A seta indica o local da formação do calo ósseo.



FIGURA 48: Tíbia do animal 2 do grupo experimental (30 dias pós cirúrgico). A seta indica o local do implante do compósito.

#### 5.4.2.1. Análise Histopatológica

A osteoindução é o processo em que um estímulo, como fratura ou instalação de um implante, induz à diferenciação das células mesenquimais imaturas em células osteoprogenitoras, as quais se desenvolvem em osteoblastos e iniciam a osteogênese pela secreção de matriz orgânica. O estímulo neste tecido faz liberar os fatores de crescimento que guiam a diferenciação e a organização das células. Já na osteocondução, o crescimento do osso se dá na superfície do biomaterial utilizado. Na situação prática a osteocondução depende da osteoindução. A indução de um implante deve ser suficientemente correta para a indução das células ósseas indiferenciadas. Este processo depende de um suprimento sanguíneo ideal, fatores de crescimento, e principalmente do biomaterial usado e das reações teciduais do local receptor. A osteointegração refere-se ao contato direto do osso neoformado na superfície do implante. (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001; JUNIOR, 2010).

Nos estudos com os implantes inseridos nas tíbias de coelhos, a atividade responsável pela formação de osso adjacente aos implantes cilíndricos de PCL/HA foi avaliada nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias por meio de secções descalcificadas e coradas histologicamente com HE. Tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, observou-se necrose de discreta extensão e células polimorfonucleares (heterófilos), eosinófilos, macrófagos, células multinucleares e osteoblastos. Aos 30 dias pós implante observou-se no grupo experimental a infiltração de osteoblastos e neoformação de tecido ósseo primário no interior do compósito (FIG. 49). A região que não foi corada pelo HE do grupo experimental correspondeu ao compósito. Observou-se na região da interface

osso-implante do grupo experimental, além de alguns pontos de necrose, a presença de uma camada de osteoblastos indicando neoformação de tecido ósseo. No grupo controle observou-se a presença de osteoclasto na interface do defeito ósseo-osso indicando início da modelagem da matriz óssea. Não foram observados sinais de degeneração tecidual, infiltração gordurosa, fibrose ou granuloma. Não foram visualizadas partículas do implante no interior de macrófagos. Não houve diferença estatística nos números de células observadas entre os grupos controle e experimental utilizando o teste t não paramétrico e não pareado com correção de Welch.

Ocorreu uma resposta heterogênea entre os animais, tanto no grupo controle, quanto no grupo experimental, sendo que alguns apresentaram resposta mais pronunciada que outros, apesar da mesma não ter sido estatisticamente significativa, refletindo a variação individual frente ao procedimento.

Aos 60 e 90 dias os grupos experimentais exibiram estruturas de remodelação sempre mais evidentes que os controles, independente do corte. Nestes tempos experimentais não foi presenciada qualquer ossificação intramembranosa clássica. Os cones de corte dos grupos experimentais mostram maior deposição de fibras conjuntivas delicadas assim como maior número de capilares, entretanto houve maior hiperplasia e ativação dos osteoblastos nos grupos experimentais.

Os dados do exame radiológico e da análise macroscópica e microscópica mostram início da osteointegração e isto indica que a técnica cirúrgica (materiais estéreis, irrigação durante perfuração) e os procedimentos pré e pós-operatório (anestesia, analgesia, cuidado alimentar) foram adequados para obtenção destes resultados. Além disso, nenhum animal morreu durante o período experimental.

Por não ter apresentado fraturas ou fissuras o material possui um módulo elástico compatível com do osso. Isto demonstra que o compósito possui um grande potencial como biomaterial, promovendo uma facilitação na formação do tecido ósseo e com rigidez mais semelhante ao tecido ósseo quando comparada aos implantes metálicos. Contudo, não apresenta resistência à pressão uma vez que parte de dois pinos se esfarelaram durante a sua implantação.

A utilização do compósito PCL/HA apresenta sinergismo dos materiais na reparação óssea, pois polímeros biodegradáveis com cinética de degradação lenta (como no caso do PCL) auxiliam no crescimento do tecido, equivalendo o tempo de degradação do material e a maturação do tecido; e a utilização de hidroxiapatita é um estímulo de osteocondução e osteoindução para o tecido. A utilização do compósito de polímero e cerâmica mostrou boas qualidades como biomaterial (ausência de toxicidade, reação inflamatória discreta) na utilização facilitação da osteoindução. Estudos futuros associarão o compósito com células para diminuir o tempo de recuperação tecidual.

A cicatrização óssea consiste em várias fases que se sobrepõem: coagulação, inflamação, formação de calo mole, formação de calo duro e remodelação. A formação dos calos mole e duro corresponde à fase proliferativa da cicatrização. A fase da inflamação, que dura aproximadamente quatro dias, é caracterizada por hemorragia local, devido à lesão dos vasos sanguíneos do osso

e do periósteo, formação de hematoma, edema e dor. Esta lesão vascular torna o meio hipóxico e ácido, resultando em necrose tecidual local, a qual será removida por macrófagos de origem hematogênica e leucócitos polimorfonucleares, de origem tecidual. Ambos liberam mediadores que estimulam a proliferação de células reparadoras como osteoblastos, células endoteliais e condroblastos. Durante esta fase os osteoclastos removem o osso necrótico e os fragmentos teciduais do local. O periósteo e o endóstio locais, em um período de três a quatro semanas, respondem com intensa proliferação de fibroblastos e frequentemente condroblastos, formando uma matriz rica em glicoproteínas e colágeno, no interior da qual crescem novos vasos sanguíneos. A atividade proliferativa da camada osteogênica do periósteo produz um colar de calo mole externo que une e estabiliza o local da reparação. Na fase da formação do calo duro, três a quatro semanas após, este tecido é gradualmente convertido em tecido ósseo imaturo, com osteogênese e condrogenese. Os osteoclastos continuam a remoção do tecido necrótico local até a formação de uma união óssea consistente em um período de dois a três meses (VAN LENTHEA, GHAGENMÜLLERA & BOHNERD, 2007; KONIG JR, 2010).

Assim, as áreas de cirurgia e implantologia apresentam demanda por selecionar materiais cerâmicos ou compósitos que apresentam melhores propriedades osteocondutivas a fim de se acelerar a osteogênese e aumentar a osteointegração (MIDDLETON & TIPTON, 2000, SUN, MEI & SONG, 2006).

---

---

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

As análises dos resultados e das discussões permitem ressaltar o seguinte:

- As análises físico-químicas da poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) sintetizada pelo método do iodo mostraram uma boa concordância com os valores analíticos do polímero comercial Sigma®.
- As partículas das matrizes obtidas para o compósito poli-( $\epsilon$ -caprolactona) / hidroxiapatita (PCL/HA) mostraram uma estrutura macroporosa com diâmetro médio de 5 a 10  $\mu\text{m}$ , favorável ao crescimento do tecido ósseo.
- O teste de citotoxicidade nas amostras iniciais do PCI/HA sintetizado mostrou uma toxicidade devido a taxa de iodo utilizada na síntese e que uma vez purificada, o PCI mostrou-se sem nenhuma citotoxicidade.
- Os estudos de genotoxicidade *in vitro*, para detecção de micronúcleos, com e sem ativação metabólica, apresentaram resultados negativos para as concentrações de PCL/HA testadas. Não houve evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade.
- O estudo de imunotoxicidade *in vitro* por meio do teste de enzimaensaio de detecção dos níveis de prostaglandina E2 em cultura celular demonstrou não haver ação tóxica do PCL/HA sobre o sistema imunológico sem evidências de possíveis atividades inflamatórias ou de hipersensibilidade.
- Na avaliação da hemocompatibilidade das superfícies das pastilhas de PCL/HA, a ausência de adesão de plaquetas mostrou que as mesmas não são trombogênicas.
- Nos testes de biocompatibilidade *in vivo*, de irritação dérmica e toxicidade sistêmica os resultados para as amostras de PCI, PCI/HA e PCI /SI, nos modelos animais de ratos e coelhos estudados, não houve alteração entre os grupos e parâmetros avaliados. As amostras foram classificadas como não irritante e de toxicidade aguda baixa.
- No teste de atividade antimicrobiana com *Staphilococcus aureus* foi demonstrado a sensibilidade às diferentes concentrações de vancomicina no compósito PCI/HA/Vancomicina. Este resultado mostra que a incorporação do antibiótico vancomicina à matriz do compósito PCL/HA foi efetiva e pode vir apresentar papel significativo na prevenção de infecções após procedimentos de implantes.
- Na análise da biodegradação *in vitro* para os testes de degradação hidrolítica e enzimática, a perda maior de massa das amostras na solução enzimática só apareceu nos tempos mais longos de exposição.
- Nos resultados dos implantes realizado em tíbias de coelho, os dados dos exames radiológicos e análise macroscópica indicaram que a técnica cirúrgica e os procedimentos pré e pós-operatório foram adequados. A formação dos calos corresponde à fase proliferativa da cicatrização.

- Por não ter apresentado fraturas ou fissuras o material possui um módulo elástico compatível com do osso. Isto demonstra que o compósito possui um grande potencial como biomaterial, promovendo uma facilitação na formação do tecido ósseo e com rigidez mais semelhante ao tecido ósseo quando comparada aos implantes metálicos.
- Pela análise histopatológica, não foram observados sinais de degeneração tecidual, infiltração gordurosa, fibrose ou granuloma. Observou-se na região da interface osso-implante de animais do grupo experimental a presença de camada de osteoblastos indicando neoformação de tecido ósseo.
- A macroporosidade presente nas amostras de PCL/HA e ausência de ativação imunológica tóxica parecem indicar caminhos de acesso para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetra pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução.

Assim, podemos concluir que o polímero sintetizado poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), e seus compósitos com hidroxiapatita (PCL/HA) e vancomicina (PCL/HA/VC), possui a biocompatibilidade desejada para um biomaterial de acordo com a ISO. 10.993.

A porosidade presente no polímero estudado indica o grande potencial do biomaterial para a engenharia de tecidos, uma vez que estabelece o processo de biodegradação e osteocondução comprovado pela neoformação do tecido ósseo.

Como trabalhos futuros continuaremos a fase de avaliação de avaliação pré-clínica e daremos início a fase clínica dos protótipos de pinos implantáveis com especialistas médicos e dentistas. Esta avaliação servirá para que sejam realizadas alterações, correções e melhorias na síntese das matrizes objetivando o uso do PCL em diferentes aplicações clínicas.

---

---

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- ALI, S.A.M., ZHONG, S.P., DOHERTY, P.J., WILLIAMS, D.F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices – poly(caprolactone). *Biomaterials*, v. 14, pp. 648–656. 1993
- AMES, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* (New York) 204, 587-593.
- ANDERSON, J.M., LANGONE, J.J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. *Journal of Controlled Release*, v. 57, pp. 107-113, 1999.
- ASTM. Medical devices and Services. Standards and Engineering Library. American Society for Testing and Materials, USA, 2010.
- BARLTROP, J.A., OWEN, T.C., CORY, A.H., CORY, J.G. (1991) – 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4,5-dimethylthiazol)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5- dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. & Med.Chem.* . 1, 611.
- BINYAMIN, G., SHAFI, B.M., MERY, C.M. Biomaterials: A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery*. V.15, pp. 276-283, 2006.
- BOREFREUND, E., PUERNER, J.A. (1984.) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J.Tissue Culture Meth.*, v. 9, pp. 7-9
- BÖSTMAN, D., VAINIONPÄÄ, S., HIRVENSALO, E., MAKELA, E.A., VIHTONEN, K., TÖRMÄLÄ, P. & ROKKANEN, P.: Biodegradable internal fixation for malleolar fractures. *J Bone Joint Surg [Br]* 69: 615-619, 1987.
- BÖSTMAN, O., HIRVENSALO, E., VAINIONPÄÄ, S., MAKELA, E.A., VIHTONEN, K., TORMALA, P. & ROKKANEN, P.: Ankle fractures treated using biodegradable internal fixation. *Clin Orthop* 238: 195-203, 1989.
- BRAMBILLA G, MATTIOLI F, ROBBIANO L, MARTELLI A. Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals: correlations between induction of DNA lesions and carcinogenic activity. *Mutat Res*. 705(1):20-39. 2010
- BRANEMARK, P.I., ADELL, R., BREINE, U., HANSSON, B.O., LINDSTROM, J., OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scan J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, vol. 3, n. 2, pp. 81-100, 1969.
- BUCHOLZ, R.W.; HENRY, S.; HENLEY, Fixation with bioabsorbable screws for the treatment of fractures of the ankle. *Journal of Bone and Joint Surgery*. v. 76, Issue 3 319-324, 1994.

- CARDOSO, GBC. Matriz Tridimensional Polimérica com Adição de Cerâmicas para Reconstruções Ósseas. Faculdade de Engenharia Mecânica. Campinas: Dissertação, 2010.
- CARFI M. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology*. 2007 ;229(1-2):11-22
- Center For Disease Control-Antimicrobial Susceptibility Tests, National Nosocomial Infection Study, Quartely Report, April 1974.
- CHANDRA, RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progr Polym Sci*, v. 23, pp. 1273–1335, 1998.
- CIAPETTI,G.;AMBROSIO.L.;SAVARINO,L.;GIANCHI,D.;CENNI,E.;BALDINI,N.;PAGANI,S.;GUI ZADI,S.;CAUSA,F.;GIUNTI,A. *Biomat*, v.24, p.3815-3824,2003.
- COELHO, P.G., BOTTINO, M.C., SUZUKI, M. Biomateriales em implantologia – Aspectos Físicos, Químicos e biológicos. In: *Implantodontia Contemporânea*. Todescan, FF.; Bechelli, A; Romanelli, H. Artes Médicas, 2005. pp. 497-519.
- CORY, A.H., OWEN, T.C., BARLTROP J.A., CORY, J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium formazan assays in culture. *Cancer Comm*. 3(7): 207-212
- DE ALMEIDA, K.A.;DE QUEIROZ,A.A.A.*Key Engin.Mat*,v.16,p.589-592,2004.
- DE ARRUDA ALMEIDA, K.; DE QUEIROZ, A.A.A.; HIGA, O.Z.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN J.S. Macroporous poly(epsilon-caprolactone) with antimicrobial activity obtained by iodine polymerization.*J. Biomed. Mat. Res.Part A*, 68A(3): 473-78, 2003.
- DE QUEIROZ, A.A.A.; FRANÇA, E.J.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN J.S. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone by iodine charge-transfer complex. *J.Poly.Sci.: Part B: Polymer Physics* 40 (8): 714-22, 2002
- DEAN, B. J.; DANFORD, N. (1984) Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *Mutagenicity testing. A practical approach*. Venitt, S. & Parry, J. M. (Eds.) IRL PRESS, 187-232.
- DESCOTES, J. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective (Review). *Toxicol Lett*. 2004 ;149(1-3):103-8.
- DESCOTES, J. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Drug Opin Drug Metab Toxicol*. 2006; 2(2):249-59.
- ENGH C.A., O'CONNOR D., JASTY M., et al. Quantification of implant micromotion, strain shielding, and bone resorption with porous-coated anatomic medullary locking femoral prostheses. *Clin Orthop Relat Res*. v. 285, pp. 13-29. 1992

- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Health effects test guidelines: OPPTS 870.7800 Immunotoxicity. 1996.
- FUNABASHI M., NINOMIYA F., KUNIOKA M. Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2. *Int J Mol Sci.* v. 10(8), pp. 3635-54. 2009
- GAN, Z., LIANG, Q., ZHANG, J. et al. Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases. *Polymer Degradation and Stability.* V. 56, pp. 209-213, 1997.
- GARRIOT, M. L.; PHELPS, J. B.; HOFFMAN, W. P. (2002) A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat. Res.* 517, 123-134.
- GUEDES E SILVA C.C., KÖNIG B. JR, CARBONARI M.J. et al. Tissue response around silicon nitride implants in rabbits. *J Biomed Mater Res A.* v. 84(2), pp. 337-43. 2008
- Guidelines for prevention of surgical site infection. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, v.20, p.247-278, 1999.
- HAE WON, K. 2007. Biomedical Nanocomposites of Hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation. *Journal of Biomedical Materials Research part A.* pp. 169-177, 2007.
- HENCH, L.L., WILSON, J. 1993. *Introduction to Bioceramics.* Singapore: World Scientific Publishing Co. Ltd., pp.1-15, 1993.
- HIETALA, E.M.; MAASILTA, P.; VÄLIMAA, T.; HARJULA, A.L.R.; TÖRMÄLÄ, P.; SALMINEN, U.; LASSILA, R. Platelet responses and coagulation activation on polylactide and heparinpolycaprolactone-L-lactide-coated polylactide stent struts. *J. Biomedical Materials Research Part B*, v 67A Issue3, p.785-791, 2003.
- HIGA, O.Z., ROGERO, S.O., MACHADO, L.D.B., et al. (1999) Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. *Rad.Phys.Chem* 55, 705-709.
- HINRICHSEN, S.L. *A Tecnovigilância e o Controle de Infecções Prática Hospitalar.* Ano IX. Nº 50. Mar-Abr/2007.
- HIRVENSALO, E., BÖSTMAN, O. & ROKKANEN, P.: Absorbable polyglycolic pins in fixation of displaced fractures of the radial head. *Arch Orthop Trauma Surg* 109: 2058-2061, 1990.
- HOLDEN, H.E. (1982). Comparison of somatic and germ cell models for cytogenetic screening *Journal of Applied Toxicology*, 2, 196-200.

- HOLLINGER, J.O. BATTISTONE, G.C.: Biodegradable bone repair materials: synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop* 207: 290-305, 1986.
- HSU, S.; TANG, C.; LIN, C. Biocompatibility of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/ poly(ethylene glycol) diblock copolymers with nanophase separation. *Biomaterials*. v 25, p 5593-5601, 2004.
- HUANGA, Y., GAOD, H., GOUA, M., et al. Acute toxicity and genotoxicity studies on poly(-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(-caprolactone) nanomaterials. *Mutation Research*. Volume 696, Issue 2, 2 February 2010, Pages 101-106
- ISO 10.993. Biological testing of medical and dental material devices. International Organization for Standardization, Partes 1 – 20, 2010.
- ISO 7405. Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. International Organization for Standardization, 2008
- JACOBSEN, S., DE LICHTENBERG, M.H., JENSEN, C.M. Removal of internal fixation – the effect on patients' complaints: a study of 66 cases of removal of internal fixation after malleolar fractures. *Foot Ankle Int* 15: 170-171, 1997.
- JOHNSON, H.J., NORTHUP. S.J., SEAGRAVES, P.A., et al. 1985. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II Objective methods of toxicity assesment. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 19, pp. 489-508.
- JONES, T. et al. Optimization of living ring-opening polymerization of caprolactone. p. 2002.
- JOSHY, P., MADRAS, G. Degradation of polycaprolactone in supercritical fluids. *Polymer Degradation and Stability*. V.93, pp. 1901–1908, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Guanabara Koogan. 8.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- KIENAPFEL, H., SPREY, C., WILKE, A., GRIIS, P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty*, vol. 14, n. 3, pp. 355-68, 1999.
- KIM, H.W., KNOWLES, J.C., KIM H.E. (2004) Hydroxyapatite poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery *Biomaterials* 25:1279-1287.
- KIMBER, I., DEARMAN, R.J. Immune response: adverse versus non-adverse effects. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30:54-58
- KLINKMANN, H., WOLF, H. & SCHMITT, E. (1984). Definition of biocompatibility. *Contributions in Neprology* 37, 70-77.
- KONIG JR, B. *Implantologia e Osteointegração*. Quanto à pesquisa em cerâmicas, aplicações clinicas e outros materiais. Editora Roca. 337p. 2010.

- KULKARNI A.; REICHE J.; HARTMANN J.; KRATZ K.; LENDLEIN A. Selective enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) containing multiblock copolymers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. v. 68, n. 1, p. 46-56, 2008.
- LAM, C., SAVALANI, M.M., TEOH, SH. et al. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomedical Materials*, v.3, n.3, p.34108-34123, 2008.
- LOTZ, A.S., HAVLAA, J.B., RICHTER, E., et al. Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. *Toxicology Letters*. v. 190, pp. 128–133, 2009.
- LUCIANI, A., COCCOLI, V., ORSI, S. L., et al. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, v. 29, pp. 4800–4807. 2008
- MAIZATO, M.J.S., HIGA, O.Z., MATHOR, M.B., ET AL. (2003). Glutaraldehyde-treated Bovine Pericardium: Effects of Lyophilization on Cytotoxicity and Residual Aldehydes Artificial Organs 28 (8), 692-694.
- MEI, N., CHEN, G., ZHOU, P. et al. Biocompatibility of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffold Modified by Chitosan—The Fibroblasts Proliferation in vitro. *Journal of Biomaterials Applications*. V. 19. Pp. 323-339, 2005.
- MICHELSON, J.D.: Fractures about the ankle – Current concepts review. *J Bone Joint Surg [Am]* 77: 142-152, 1995.
- MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v. 21, pp. 2335–2346, 2000.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application in proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, pp. 55-63.
- MULLER, M.E., ALLGOWER, H., SCHNEIDER, R. et al: *Manual of internal fixation: techniques recommended by the AO group*, 2nd ed., Berlin, Springer Verlag, 1979.
- NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr Polym Sci*. v. 32, pp. 762–798. 2007
- OCHI-LOHMANN, T.A., OKAZAKI, K., MARUGA, M.R., ET AL. (1996) Radiosensitivity of blood lymphocytes from basocellular carcinoma patients, as detected by the micronucleous assay. *Mut.Res.*, 357, 97-106.
- OECD 473. In vitro mammalian chromosome test (no. 473), in OECD guidelines for testing of chemicals. Organization for economic cooperation and development, Paris, 1997.

- OECD. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. In ***OECD guidelines for testing of chemicals***, Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, 2010 revisada (original 1981).
- OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progr Polym Sci.* v. 27, pp. 87–133. 2002
- OREFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. *Biomateriais – Fundamentos e Aplicações*, 538p, Cultura Médica, 2006.
- OYANE, A., UCHIDA, M., YOKOYAMA, Y., CHOOLG, C., TRIFFIT, J., ITO, A. (2005) Simple surface modification of poly(e-caprolactone) to induce its apatite-forming ability. *J. of Biomedical Materials Research Part A* 75(A)(1):138-145.
- PARK, J., LAKES, R.S. *Biomaterials: An Introduction*, 2007
- PHELPS, J. B.; GARRIOT, M. L.; HOFFMAN, W. P. (2002) A protocol for the in vitro micronucleus test II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat. Res*, 521, 103-112.
- PITT, C.G. Poly (caprolactone) and its co-polymers. In: M. Chansin & R. Langer. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Decker, 1990, pp. 71-120, 1990.
- PITT, C.G., CHASALOW, F.I., HIBIONADA, Y.M., et al. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(epsilon-caprolactone) in vivo, *J Appl Polym Sci*, v. 26, pp. 3779–3787, 1981.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 851p. Elsevier Academic Press. 2004.
- RHEE, S.H., (2004) Bone like apatite forming ability and mechanical properties of poly(e-caprolactone) silica hybrid as a function of poly(e-caprolactone) content. *Biomaterials* 25:1167-1175.
- RHEE, S.H., CHOI, J.Y., JIM, H.M. (2002) Preparation of a bioactive and degradable poly(e-caprolactone) silica hybrid through a sol-gel method *Biomaterials* 23:4915-4921.
- RIBEIRO, RL (2003) Teste do micronúcleo em células humanas in vitro, Cap. 8, p. 201-223, In: *Mutagênese Ambiental*, Canoas, ULBRA,
- ROGERO, S.O., HIGA, O.Z., SAIKI, M., et al. (2000)- Cytotoxicity due for corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in vitro* 14, 497-504.
- ROY MD. Approach for assessing total cellular DNA damage. *Biotechniques*. 42(4):pp 425-29. 2007

- SAAD, B., NEUENSCHWANDER, P., UHLSCHMID, G.K., SUTER, U.W. (1999). New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine *Int.J.Biol.Macromol.*25, 293-301.
- SCHMID W.(1975) – The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31, 9-15.
- SEYFERT, U.T.; BIEHL, V.; SCHENK, J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*. v19, p.91-96, 2002.
- SGOURAS, D., DUNCAN, R. (1990) Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use. I. Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 1, pp. 61-68.
- SINGH N, MANSHIAN B, JENKINS GJ, et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. v.30(23-24), pp. 3891-914. 2009
- SINHA, V.R. et al. Poly-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, pp.1-23, 2004.
- SPENCE, A.P. *Anatomia humana básica*. Manole. 2 ed. São Paulo, Brasil, 1991.
- SUN, H., MEI, L., SONG, C., et al. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL - based implant. *Biomaterials*, v. 27, pp. 1735–1740, 2006
- TANZI, M.C., VERERIO, P. LAMPUGNANI, M.G., et al. (1994). Citotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v. 5, pp 393-396.
- TAVARES JC, CORNÉLIO DA, DA SILVA NB, et al. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. *Toxicology*. 3;262(2):138-45. 2009
- TEPE, G.; SCHMEHL, J.; WENDEL, H.P.; SCHAFFNER, S.; HELLER, S.; GIANOTTI, M.;CLAUSSEN, C.D.; DUDA, S.H. Reduced thrombogenicity of nitinol stents- In vitro evaluation of different surface modifications and coatings. *Biomaterials*. v. 27, p. 643-650, 2006.
- VAINIONPAA, S., VIHTONEN, K., MERO ET AL: Fixation of experimental osteotomies of the distal femur of rabbits with biodegradable material. *Arch Orthop Trauma Surg* 106: 1-4, 1986.
- VAN LENTHEA, G.H., HAGENMÜLLERA, H., BOHNERD, M. et al. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. *Biomaterials*. v28, pp. 2479-2490, 2007
- VASENIUS, J., VAINIONPAA, S., VIHTONEN, K. ET AL: Biodegradable self reinforced polyglucolide (SR-PGA) composite roads coats with slowly biodegradable polymers for

- fracture fixation. Strength and biodegradable polymers for fracture fixation. Strength and strength retention in vitro and in vivo. *Clin Mater* 1989.
- VERT, M. Polymeric biomaterials: strategies of the past vs. strategies of the future, *Progr Polym Sci*, v. 32, pp. 755–761, 2007.
- VIEIRA A.C., GUEDES R.M., MARQUES A.T. Development of ligament tissue biodegradable devices: a review. *J Biomech.* v. 42(15), pp, 2421-30. 2009
- WATAHA, J.C., HANKS, C.T., CRAIG, R.C. (1993). The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys. *Dental Materials.* v. 9, pp. 172-176, 1993.
- WEINLAENDER, M. Bone growth around dental implants. *Dent Clin North Am*, vol. 35, n. 3, pp. 585-601, 1991.
- WEN, C.E., YAMADA, Y., SHINOJIMA, K., CHINO, Y., ASAHINA, T., MABUCHI, M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci-Mater M*, vol. 13, n. 4, pp. 397-401, 2002.
- WHO. Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. Geneva, 2005. 100p.
- WILLIAMS, D.F. (1986). Definitions in biomaterials. In *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, pp. 3-5, Amsterdam: Elsevier
- WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, pp. 2941–2953, 2008.
- WILLIAMS, D.F. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Dev Technol*, v. 14, pp. 10–13, 2003.
- WILLIAMS, D.F., BLACK, & DOHERTY, P.J. (1992). Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials. In *Advances in Biomaterials, Vol.10, Biomaterials-Tissue Interfaces* (ed.P.Doherty, R.L.Williams, D.F.Williams & A.J.C.Lee), 525 pp.Amsterdam: Elsevier.
- WILSON, A.P., *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3rd ed. Oxford University Press: Oxford, vol. 1., 2000.
- WOLF, H., KAARWATH, R. & GROTH T. (1988). Interaction of blood with biomedical polymers - some basic aspects. In *Advances in Biomedical Measurements* (ed.E.R.Carson, P.Kneppo & I.Krekule), pp.133-142. New York & London: Plenum Press.

- WOODRUFF, M.A., HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. Available online 7 April 2010.
- XIAO, X., LIU, R., HUANG, Q. 2008. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 19, pp, 3429–3435, 2008.
- YE, L., ZENG, X., LI, H., et al. 2009. Fabrication and Biocompatibility of Porously Bioactive Scaffold of Nonstoichiometric Apatite and Poly (ε-caprolactone) Nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*. p. 762-770, 2009.
- YOSHIMOTO M., WATANABE I.S., MARTINS M.T. et al. Microstructural and ultrastructural assessment of inferior alveolar nerve damage following nerve lateralization and implant placement: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. v. 24(5), pp. 859-65. 2009
- YU, H., VANDEVORD, P.J., MAO, L. et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*. v. 30, pp. 508–517, 2009.