UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC

THAÍS HELENA SAMED E SOUSA

Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises: *in vitro* e *in vivo*

São Carlos
2009

THAIS HELENA SAMED E SOUSA

Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises: *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de **Doutor em Engenharia Mecânica**.

Área de concentração: Projeto Mecânico

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

São Carlos
2009

DEDICATÓRIA

**Ao meu marido e Amor Eterno, e à
minha Querida Mãe.**

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grata a todas as pessoas que me ajudaram cada um a sua maneira, para o desenvolvimento dessa tese, que obviamente não poderia ter acontecido sem este valioso auxílio.

O meu muito obrigada:

Ao **Prof. Tit. Benedito de Moraes Purquerio**, pela oportunidade, pelo privilégio de poder compartilhar do seu conhecimento e pela sapiência demonstrada em guiar de forma majestosa os passos de seus alunos. Foi uma honra tê-lo tido como orientador durante minha permanência nesta Universidade. Obrigada pela confiança e por todos os seus ensinamentos!

Ao meu mestre e orientador, **Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan**, pela sua sabedoria, paciência, amizade, conhecimento científico, e personalidade brilhante. Pessoa à qual admiro e tenho eterna gratidão.

Ao professor Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo;

ao professor Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr;

ao cirurgião e amigo Edelto dos Santos Antunes;

ao professor Dr. Jonas de Carvalho;

à professora Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar;

à professora e amiga Dra. Zilda de Castro Silveira;

à Amada e companheira Família (Mãe, Irmão, Marido, Fazão, Tias (Leila, Irani, Marisa, Carminha), Seu Paulo e Dona Geralda);

ao meu grande incentivador, Thales Sousa;

aos amigos do LTC, Romeu Cavalcanti, Amauri Bravo, Rodrigo Canto, Volnei Tita, Claudia Camilo, Rogério Ikegami, Cassius Riul (**especialmente**), Roni Carvalho, Alejandra Gúzman, Karen Laurentti, Lucas Emanuel e Altibano Ortenzi;

ao Eng. Eletricista e amigo José Cláudio P. de Azevedo;

ao Biólogo e amigo Nélon Ferreira Jr;

aos funcionários e professores da Bioengenharia;

aos amigos da secretária da graduação da mecânica, Cristina, Maragno, Wilma, Joãozinho e Juliana;

ao José Carlos Risardi da oficina da EESC;

à Ana Paula, Denise e Beth secretárias e amigas da pós graduação do SEM;

à Escola de Engenharia de São Carlos – EESC - USP, e finalmente,

ao CNPq, que através de dinheiro público, possibilitou que esse trabalho pudesse ser realizado.

**"Talvez não tenhamos conseguido
fazer o melhor,
Mas lutamos para que o melhor
fosse feito...
Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser.
Mas, graças a Deus, não somos o
que éramos".**

Martin Luther King

RESUMO

SOUSA, T. H. S. Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em PMMA e HA. Análises: *in vitro* e *in vivo*. 2009. 152 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

Foram desenvolvidos e manufaturados compósitos porosos com estrutura de gradiente funcional em Poli (metacrilato de metila) (PMMA) e Hidroxiapatita (HAp) aplicáveis como implantes ósseos. O PMMA é largamente utilizável e aceito como material de implante tem boas propriedades mecânicas, baixo custo, fácil manufatura, porém é considerado bioinerte. A HAp é uma cerâmica comprovadamente bioativa, porém de baixas propriedades mecânicas, alto custo e de difícil manufatura. O PMMA com estrutura funcional e HAp apresentou valores próximos a 50 MPa, mas com potencial de melhoria. O objetivo deste desenvolvimento é produzir um implante com a sua superfície porosa e bioativa, para que este possa ser osteointegrado em um tempo menor ao tecido hospedeiro, melhorando a relação: material implantado/leito receptor. O conceito é baseado em uma estrutura de núcleo denso em PMMA e camada superficial porosa com superfície bioativa. A camada de PMMA porosa foi desenvolvida utilizando-se o carboximetilcelulose (CMC) como agente porogênico e HAp como agente bioativador da matriz polimérica. Foram elaboradas análises de biocompatibilidade, resistência mecânica, macro e microestrutura. Para testar a biocompatibilidade foram realizados inicialmente testes *in vitro* com cultura de células VERO, visando investigar a toxicidade dos materiais constituintes, a influência do novo biomaterial em atividades celulares e o comportamento destes em condições próximas daquelas a serem encontradas no ambiente de implantação. Em seguida, os testes *in vivo* realizados em coelhos averiguaram a interação tecido-material (bioatividade), a biocompatibilidade do material, e a potencialidade do uso do material em aplicação à superfícies (osteointegração). Foi realizada análise histológica dos tecidos explantados, onde os resultados basearam-se na análise da morfologia geral dos componentes teciduais encontrados junto ao implante. A caracterização da superfície foi realizada por testes de rugosidade, por microscopia ótica e eletrônica de varredura. Foram realizados ensaios mecânicos de compressão para analisar a resistência mecânica do biomaterial. Os resultados *in vitro* mostraram que os materiais utilizados não apresentaram qualquer indício de toxicidade. Através das imagens realizadas em MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) pode se observar o crescimento de células VERO na superfície do material e em direção aos poros da matriz. A análise macroestrutural dos poros também obtida por MEV demonstrou em uma caracterização inicial do material que este apresentou características biomiméticas como poros em formato oblongo e interconectados. A média obtida do tamanho dos poros foi de aproximadamente 250 μ m. Os resultados dos ensaios mecânicos de compressão mostraram que o PMMA denso é o que mais se aproximou do tecido ósseo cortical com 101 MPa. Por fim, os resultados histológicos apontam para a biocompatibilidade do compósito, tornando-o assim aplicável como camada superficial de implantes.

Palavras-chave: Poli (metacrilato de metila). Gradiente funcional. Implante bioativo. Análise *in vitro*. Análise *in vivo*.

ABSTRACT

SOUSA, T. H. S. Conceptual design of bioactive implant with functional gradient structure in PMMA and HA. Analysis: *in vitro* and *in vivo*. 2009. 152 f. Thesis (Doctoral) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.

Were developed and manufactured porous composite with functional gradient structure in Polymethylmethacrylate (PMMA) and hydroxyapatite (HAp) applicable as bone implants. PMMA is widely used and accepted as implant material, has good mechanical properties, low cost, easy manufacturing and considered a bioinert biomaterial, the HAp is a demonstrably bioactive ceramic with poor mechanical properties, high cost and difficult to manufacture. The PMMA functional structure and HAp had values close to 50 MPa, but with potential for improvement. The objective of this development was produced an implant with a porous surface and bioactive to be osteointegrated in a less time, improving the relationship: implanted material/receiver bed. The concept is based on a dense structure core of PMMA and a porous bioactive surface layer. The porous PMMA was developed using the carboxymethylcellulose (CMC) as a porogenic agent and HAp to bioactive the PMMA matrix. Biocompatibility tests, mechanical strength tests and macro and microstructure analysis were carried out. To evaluate the biocompatibility of this material were made primarily *in vitro* tests, the VERO cells were used in *in vitro* analysis aimed to investigate the toxicity of the constituent materials, the influence of the new biomaterial in cellular activities and behavior in these conditions close to those to be found in the environment of deployment. Then, *in vivo* tests conducted in rabbits evaluated the interaction with tissue-material (bioactivity), the biocompatibility of the material, and the potential use of the material in the application areas (osseointegration). Were performed histological analysis of tissues, where the results were based on the analysis of the general morphology of the tissue components found near the implant. The surface characterization was performed by roughness tests, optical microscopy and SEM. Mechanical tests were conducted to examine the compressive strength of biomaterial. Results *in vitro* showed that the materials did not present any evidence of toxicity. The samples were analyzed by SEM where the growth of cells can be observed in the surface of the material and towards the pores. The macrostructural analysis also obtained by SEM showed in an initial characterization of the material that presented bone biomimetics characteristics with oblong pores with interconnected. The average pore size obtained was approximately 250 μm . The results of mechanical tests showed that the compression of PMMA is the densest approached the cortical bone tissue near 101 MPa. Finally, the histological results point to the biocompatibility of the composite, thus making it applicable to the surface layers of implants.

Keywords: Poly (methyl methacrylate). Functional gradient. Bioactive implants. Analysis *in vitro*. Analysis *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Representação dos quatro componentes da microestrutura óssea	27
Figura 2.2 Representação das células osteoprogenitoras	28
Figura 2.3 Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea	28
Figura 2.4 Estrutura do osso	29
Figura 2.5 Esquema ilustrativo do processo de remodelamento no osso esponjoso	31
Figura 2.6 Poli (metacrilato de metila)	50
Figura 2.7 Rede cristalina da hidroxiapatita	53
Figura 3.1 Estrutura química do CMC	75
Figura 3.2 Diagrama de fluxo da metodologia utilizando sacarose	78
Figura 3.3 Diagrama de fluxo da metodologia utilizando CMC	80
Figura 3.4 Ilustração da lixiviação do CMC	81
Figura 3.5 Ilustração da estrutura de gradiente funcional	81
Figura 3.6 Estrutura com gradiente funcional	83
Figura 3.7 Ilustração do ensaio de citotoxicidade	86
Figura 3.8 Ilustração das células espalhadas pelo biomaterial	86
Figura 3.9 Ilustração dos defeitos realizados no fêmur	88
Figura 3.10 (a) Medidas do animal; (b) Radiografia do fêmur	89
Figura 3.11 (a) Fêmur fraturado; (b) Avulsão do implante e o implante na epiderme	89
Figura 3.12 (a) Assepsia do local; (b) Colocação do campo cirúrgico	91
Figura 3.13 (a) Incisão retilínea; (b) Exposição do fêmur	93
Figura 3.14 (a) Início com broca 2 mm; (b) Final com trefina 3 mm	94
Figura 3.15 (a) Colocação do implante controle; (b) Colocação do implante teste	95
Figura 4.1 MEV (a) Pó de PMMA não modificado aumento 500X; (b) o pó de PMMA modificado com HAp	98
Figura 4.2 (a) e (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e utilizando a sacarose como agente porogênico. Aumento 100X	99
Figura 4.3 (a) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e com a sacarose como agente porogênico; (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado	

com hidroxiapatita em outro método de processamento. Poros menores e mais arredondados. Aumento de 200X 100

Figura 4.4 (a) e (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e utilizando a sacarose como agente porogênico. Em (a) Aumento 100X; em (b) aumento 200X 101

Figura 4.5 EDX da amostra de PMMA incorporado com HAp 102

Figura 4.6 Mapeamento de EDX nas amostras PMMA/sacarose incorporado a HAp 103

Figura 4.7 Imagem em MO do CMC 103

Figura 4.8 Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 50X. (b) Aumento 100X 104

Figura 4.9 Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 500X. (b) Aumento de 50X 105

Figura 4.10 (a) Superfície externa com porosidade aberta; aumento 200X. (b) Superfície fraturada do PMMA poroso; aumento de 500X 106

Figura 4.11 Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 1470X. (b) Aumento de 800X 107

Figura 4.12 Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 900X. (b) Aumento de 2500X 108

Figura 4.13 Mapeamento de EDX nas amostras de PMMA/CMC incorporado a HAp 109

Figura 4.14 Espectro da análise química da superfície exposta 110

Figura 4.15 Amostra 01(a) Aumento 750 X e Amostra 01 (b) Aumento de 1000X 114

Figura 4.16 Amostra 01(a) Aumento 1500X. Amostra 01 (b) Aumento de 1500X 115

Figura 4.17 Amostra 01(a) Aumento 1000 X e Amostra 01 (b) Aumento de 1500X 116

Figura 4.18 Amostra 01(a) Aumento 1000 X e Amostra 01 (b) Aumento de 250X 117

Figura 4.19 Amostra 01(a) Aumento 150 X e Amostra 01 (b) Aumento de 250X 118

Figura 4.20 Amostra 02(a) Aumento 500 X e Amostra 02(b) Aumento de 1500X 119

Figura 4.21 Amostra 02(a) Aumento 500 X e Amostra 02 (b) Aumento de 500X 120

Figura 4.22 Amostra 02(a) Aumento 1500 X e Amostra 02 (b) Aumento de 250X 121

Figura 4.23 Amostra 02. Aumento 500 X 122

Figura 4.24 Toxicidade indireta e direta das amostras de PMMA. Análise qualitativa 123

Figura 4.25 Toxicidade indireta e direta das amostras de PMMA. Análise quantitativa 124

Figura 4.26 Determinação de crescimento de tecido ósseo neoformado (fêmur direito) 127

Figura 4.27 Determinação de crescimento de tecido ósseo neoformado (fêmur esq)	127
Figura 4.28 Histologia (Lado direito). Aumento 176 X	129
Figura 4.29 Histologia (Lado direito). Aumento 68,5X	130
Figura 4.30 Histologia (Lado esquerdo). Aumento 176 X	131
Figura 4.31 Histologia (Lado esquerdo). Aumento 176 X	132
Figura 4.32 Histologia (Lado esquerdo). Aumento 176 X	133
Figura 4.33 MEV dos tecidos explantados	134
Figura 4.34 MEV dos tecidos explantados	135
Figura 4.35 Em (a) imagem digital; em (b) a imagem em MEV	136
Figura 4.36 Difratoograma de raio-X por EDS-line Scan	137
Figura 4.37 Representação gráfica do ensaio de porosimetria	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Passos do processo de indução óssea	32
Tabela 2.2 - Tipos de solicitações mecânicas que atuam nos ossos	36
Tabela 2.3 - Principais aplicações dos materiais aloplásticos	44
Tabela 3.1 - Quantidade dos materiais utilizados na manufatura da matriz porosa	77
Tabela 3.2 - Quantidade dos materiais utilizados na manufatura da matriz porosa	79
Tabela 4.1 - Resultados do Ensaio de Compressão	110
Tabela 4.2 – Resultados do Ensaio de Rugosidade Superficial	138
Tabela 4.3 – Resultados do Ensaio de porosimetria	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FCDO - Fator de Crescimento e Diferenciação Óssea

PMMA – Poli (metacrilato de metila)

MMA – Metacrilato de Metila

HAp – Hidroxiapatita

CMC – Carboximetilcelulose

BMP – Bone Morphogenetic Protein

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

SEM – Scanning Electron Microscope

ARF – Ativação-reabsorção-formação

FDA – Food and Drug Administration

ASPS - American Society of Plastic Surgeons

ISO – International Standards Organization

GBC – Glass Bioactive Cement

α -TCP – Alfa -Trifosfato de Cálcio

α -Al₂O₃ – Alfa - Alumina

PLA – Poli (ácido láctico)

HCA – Hidroxiapatita carbonatada

PEMA – Polietilmetacrilato

SFB – Soro Fetal Bovino

TC – Tomografia Computadorizada

ASTM – American Society for Testing and Materials

Cps – Corpos de prova

CAD - Computer Aided Design

CAM - Computer Aided Manufacturing

RE - Reverse Engineering

RP - Rapid Prototyping

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

EDX - Energy Dispersive X-ray

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

μ - Micron

Co - Cobalto

Cr - Cromo

OH – Hidroxila

Ca – Cálcio

P – Fósforo

TiO₂ – Óxido de Titânio

$\varnothing$ - Diâmetro

Ca₁₀(PO₄)₆ (OH)₂ – Hidroxiapatita

μm – Micrometro

nm – Nanômetro

kgf – Kilograma força

GPa – Giga Pascal

Psi – *Pounds square inch*

mm – Milímetro

g - Gramas

cm³ – Centímetro cúbico

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Nomenclatura

Abreviações

1. Introdução	17
2. Revisão da literatura	21
2.1. Cranioplastia	21
2.2. Biomateriais para Implantes	24
2.2.1. Tecido Ósseo	24
2.2.2. Tipos de Tecido Ósseo	26
2.2.3. Micro e Macro Estrutura do Tecido Ósseo	27
2.2.4. Reparação e Remodelação Óssea	30
2.2.5. Propriedades Elétricas do Osso	33
2.2.6. Propriedades Mecânicas do Osso	34
2.3. Fixação do Implante pelo Crescimento ósseo	36
2.4. Osteoindução, Osteocondução e Osteointegração	38
2.5. Origem dos Biomateriais	40
2.5.1. Biomateriais	41
2.6. Porosidade dos Biomateriais	45
2.7 Materiais Aloplásticos	46
• Poli (metacrilato de metila)	47
▪ Histórico	47
▪ Composição	50
▪ Polimerização	51
• Fosfato de Cálcio	52
• Hidroxiapatita	53
Origem	55
a) A Hidroxiapatita de Origem Natural	55
▪ Proveniente de Corais	55
▪ Proveniente de Ossos Bovinos	56
b) A Hidroxiapatita de Origem Sintética	56
▪ Configuração, densidade e tamanho do poro	57
• Metais	58
2.8. Revisão Bibliográfica da Utilização dos Materiais Aloplásticos	59
• Cirurgias Ortopédicas	59
• Cirurgias Neurológicas	66
• Cirurgias de Plástica Reconstrutiva	66
• Cirurgias Bucomaxilofaciais	70
3. Materiais e Métodos	72
3.1. Materiais	72
3.1.1 Materiais Aloplásticos	72
3.1.2 Materiais Auxiliadores de Processo	73
3.2. Características dos Materiais Empregados	76

3.3. Formulações Estudadas e Manufatura	77
3.3.1 Porosidade com Sacarose como Agente Porogênico	77
• Manufatura da Estrutura Porosa à Partir da Sacarose como Agente Porogênico	77
3.3.2 Porosidade com CMC como Agente Porogênico	78
• Manufatura da Estrutura Porosa à Partir do CMC como Agente Porogênico	79
3.3.3 Estrutura com Gradiente Funcional	81
3.3.4 Corpos de Prova Manufaturados	83
3.4 Ensaios Realizados	83
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	84
3.4.2 Análise Química por EDX ou EDS	84
3.4.3 Ensaio de Resistência Mecânica de Compressão	85
3.4.4 Ensaios <i>In Vitro</i>	85
• Cultura Celular	85
3.4.5 Ensaios <i>In Vivo</i>	87
• Procedimento Cirúrgico Experimental	87
• Estudo Piloto	87
• Procedimento Cirúrgico Final	90
3.4.6 Rugosidade Superficial	93
3.4.7 Porosimetria de Mercúrio	94
4. Resultados e Discussão	96
4.1 Acrílico Utilizado para Manufatura das matrizes	96
4.2 Corpos Porosos	96
4.2.1 Corpos Porosos a Partir da Sacarose	96
• Análise Química por EDX das Formulações Baseadas em Sacarose	100
4.2.2 Corpos Porosos a Partir de CMC	101
• Análise Química por EDX das Formulações Baseadas em CMC	107
4.3 Resultados do Ensaio de Compressão	108
4.4 Testes de Toxicidade	109
• Ensaio de Citotoxicidade Indireta	109
• Ensaio de Citotoxicidade Direta	110
• Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	111
• Resultados Quantitativos e Qualitativos das Amostras	120
4.5 Ensaios <i>In Vivo</i>	123
4.5.1 Métodos de Avaliação	123
• Microscopia de Luz Comum (MLC)/Análise Histológica	123
• Quantificação de Crescimento de Tecido Ósseo Neo Formado	124
• Fêmur Direito	126
• Fêmur Esquerdo	126
• Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	131
4.6 Line Scan	134
4.7 Porosimetria de Mercúrio	136
5. Conclusões	138
6. Referências Bibliográficas	141
ANEXO	149
ANEXO A – Aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa	150

1. Introdução

Segundo a Sociedade Brasileira de Neurocirurgia referindo-se a dados do Ministério da Saúde, cerca de dois milhões de pessoas são internadas por ano em hospitais da rede pública, vítimas de traumatismos em geral. Destas, quinhentas mil requerem hospitalização devido a traumatismo craniano-cerebral, sendo que mais da metade destes casos é devido à acidentes automobilísticos, 21% referente a quedas, 12% em assaltos ou agressões e 10% em esportes e recreações. Segundo o Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), o mercado nacional de implantes ortopédicos está estimado em US\$ 64 milhões anuais. No mundo, este índice atingiu o montante de US\$ 4,4 bilhões em 1999.

A cranioplastia é quase sempre uma indicação para o reparo do crânio em situações de trauma ou de cirurgias programadas. A maioria das falhas ósseas encontradas no crânio é decorrente de acidentes ou por violência. Outras causas são por tumores (osteomas, meningiomas, hemangiomas, granuloma eosinófilos, carcinomas epidermóides, sarcomas, etc), por infecções (osteomielites), por radionecroses e por anomalias congênitas (encefalocoele).

Reparar as falhas ósseas do crânio é uma prática paralela à trepanação entre as culturas antigas. A cranioplastia vem sendo realizada com diversos materiais por várias civilizações antigas desde 3000 AC, particularmente no período Inca no Peru. Estudos arqueológicos demonstram claramente que esta prática continuou em todo o mundo durante os períodos seguintes até a introdução da medicina moderna por Hipócrates na Grécia antiga. A história escrita mostra que os médicos ignoraram a prática da cranioplastia até o século XVI.

Logo após este período a primeira cranioplastia foi feita por Fallopius (1523-1562) e Petronius em 1565, que substituíram uma parte do osso craniano por uma placa de ouro,

uma prática bem conhecida dos tempos antigos. O primeiro enxerto ósseo bem sucedido em cranioplastia foi realizado em 1668 por Job Janszoon van Meekeren, um cirurgião de Amsterdã, que utilizou um enxerto de osso canino em um soldado e com isso definitivamente abriu os caminhos para a moderna cranioplastia. Em 1940, Zaner realizou a primeira cranioplastia com acrílico utilizando uma prótese pré-moldada.

A partir daí a cranioplastia vem cada vez mais incorporando procedimentos e materiais capazes de conferir uma melhor reabilitação ao paciente.

Atualmente a prototipagem, um método de reprodução de seguimentos corporais a partir da imagem adquirida por exames de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), tem sido usada na área médica para construção de moldes que facilitam a programação cirúrgica, a simulação cirúrgica e também a criação de próteses. Para correção de falhas ósseas (cranioplastia) a prototipagem permite a reconstrução do crânio evidenciando as reais proporções da falha óssea. As vantagens apresentadas por este método são: redução do tempo cirúrgico e facilitação técnica com conseqüente diminuição da taxa de infecção e melhor resultado estético.

Porém, existem as dificuldades em definir e restaurar com precisão os defeitos ósseos e principalmente a escolha de um material adequado para tanto. O principal desafio existente é o de encontrar um material (biomaterial) que seja o mais parecido possível com o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio.

Praticamente desde seu advento, os polímeros têm encontrado aplicação na prática cirúrgica. O material sintético ideal deverá ser biocompatível, não condutor térmico nem magnético, deverá ser radiopaco, leve, rígido, simples de preparar, facilmente aplicável e economicamente viável. Um material aloplástico promissor que atende essas características é o poli (metacrilato de metila) (PMMA).

Uma das principais vantagens da utilização dos materiais aloplásticos é a possibilidade da pré-fabricação das próteses possibilitando o planejamento da cirurgia, reduzindo assim o tempo e a complexidade da mesma, melhorando o resultado final.

O PMMA denso, considerado quase bioinerte não apresenta interação significativa com os tecidos, fato positivo do requisito de toxicidade, mas negativa no respeito fixação. Uma solução para esta característica é feita pela presença de porosidade na arquitetura interna de um biomaterial que torna-se condição fundamental para a estabilização e neoformação tecidual junto ao mesmo. Inicialmente estabeleceu-se uma média de 100-150 μ m como sendo este, o critério mais importante para a continuação do crescimento do osso em um material poroso. Em alguns casos, poros maiores que 300 μ m são recomendados devido às observações de formação de tecido ósseo juntamente com a formação de capilares sanguíneos. Também de extrema importância além do tamanho dos poros é sua relação com a interconectividade e acessibilidade destes, que juntos são cruciais para o crescimento do tecido ósseo.

O crescimento do tecido hospedeiro em direção aos poros do implante além de promover sua fixação também diminui a área do implante potencialmente exposta à infecções. Em casos de exposição ou contaminação, os processos infecciosos e inflamatórios ficarão restritos somente a área comprometida primariamente, assim não envolvendo a totalidade da estrutura implantada. Materiais porosos começaram a ser desenvolvidos em meados de 1909.

Os corpos porosos, entretanto, tem suas desvantagens, as principais estão relacionadas com a baixa resistência mecânica inicial, o intra crescimento ósseo é dependente das direções dos esforços de tensão e cisalhamento e da porosidade aberta e não preenchida.

Alguns projetos são baseados na deposição de uma camada porosa sobre um corpo denso por técnicas de *deeping*, plasma spray entre outras. Entretanto as desvantagens deste depósito é a possibilidade de laminação ou destacamento da camada porosa quando esta for relativamente espessa, e pouca aderência ao tecido ósseo se for muito delgada.

O objetivo deste trabalho é desenvolver um conceito original de implante em PMMA com núcleo denso e superfície porosa bioativada pela Hidroxiapatita, com a porosidade

diminuindo em direção ao núcleo em uma taxa denominada de gradiente funcional, obtida em uma única etapa de manufatura e com espessura planejada.

O PMMA poroso foi desenvolvido utilizando-se o carboximetilcelulose (CMC) mais a água como agente porogênico e a hidroxiapatita (Hap) foi utilizada como agente bioativador do PMMA. O objetivo deste conceito é tornar a superfície do implante bioativa, para que este possa ser osteointegrado em um tempo menor ao tecido hospedeiro, melhorando a relação material implantado/leito receptor.

Foi realizada caracterização da superfície deste material através de rugosidade e análise ótica por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Foram realizados testes *in vitro* com cultura de células VERO visando investigar a toxicidade dos materiais constituintes, a influência do novo biomaterial em atividades celulares e o comportamento destes em condições próximas daquelas a serem encontradas no ambiente de implantação.

Os testes *in vivo* são necessários para averiguar a interação tecido-material (bioatividade), a biocompatibilidade do material, e a potencialidade do uso do material em aplicação a superfícies (osteointegração). Análise histológica dos tecidos explantados foi elaborada, onde os resultados foram baseados na análise da morfologia geral dos componentes teciduais encontrados junto ao implante.

Os ensaios mecânicos de compressão foram realizados com o intuito de analisarmos algumas propriedades mecânicas do biomaterial.

2. Revisão da literatura

2.1 Cranioplastia

Reparar as falhas ósseas do crânio é uma prática paralela à trepanação entre as culturas antigas. A cranioplastia vem sendo realizada com diversos materiais por várias civilizações antigas desde 3000 AC, particularmente no período Inca no Peru. Estudos arqueológicos demonstram claramente que esta prática continuou em todo o mundo durante os períodos seguintes até à introdução da medicina moderna por Hipócrates na Grécia antiga. A história escrita mostra que os médicos ignoraram a prática da cranioplastia até o século XVI. Logo após este período a primeira cranioplastia foi feita por Fallopius (1523-1562) e Petronius em 1565, que substituíram uma parte do osso craniano por uma placa de ouro, uma prática bem conhecida dos tempos antigos. O primeiro enxerto ósseo bem sucedido em cranioplastia foi realizado em 1668 por Job Janszoon van Meekeren, um cirurgião de Amsterdã, que utilizou um enxerto de osso canino em um soldado e com isso definitivamente abriu os caminhos para a moderna cranioplastia. Em 1940, Zander realizou a primeira cranioplastia com acrílico utilizando uma prótese pré-moldada (ACIDUMAN, 2007).

A partir daí a cranioplastia vem cada vez mais incorporando procedimentos e materiais capazes de conferir uma melhor reabilitação ao paciente.

Mas a cranioplastia ainda é um desafio, pois persistem as dificuldades em definir e restaurar com precisão os defeitos ósseos e principalmente a escolha de um material adequado para tanto. O principal desafio existente é o de encontrar um material (biomaterial) que seja o mais parecido possível com o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio. Os primeiros materiais utilizados em cranioplastia foram os metais preciosos, como o

ouro e a prata; posteriormente, alumínio, chumbo, latão, vitallium, aço inoxidável, tântalo platina, titânio e materiais não metálicos como o silicone, a hidroxiapatita também têm sido utilizados. A principal desvantagem de todos estes materiais é dificuldade em conseguir um ajuste com bom resultado estético ao defeito (SANAN, 1997).

Técnicas atuais realizam a cranioplastia utilizando diferentes procedimentos. Dentre estes, inúmeros materiais podem ser utilizados para reconstruir a calota craniana incluindo o osso autólogo e os diferentes tipos de resinas sintéticas (SANAN, 1997). Quando os materiais utilizados, são os plásticos, o principal requisito para uma efetiva cirurgia de cranioplastia é a configuração pré-operatório do implante que irá se encaixar ao defeito ósseo precisamente (CHIARINI, 2004). A cranioplastia realizada com materiais aloplásticos vem sendo discutida por vários autores em detalhes substanciais (SANAN, 1997).

Normalmente são três os materiais aloplásticos mais utilizados: os metacrilatos (PMMA, PEMA), hidroxiapatita e os metais (ligas ferrosas, ligas à base de cobalto e ligas à base de titânio). Cada um com suas vantagens e indicações para a cranioplastia.

A escolha do metilmetacrilato como um dos materiais aloplásticos mais utilizados em cranioplastias tem como razões algumas vantagens em relação aos outros materiais. O metilmetacrilato apresenta baixo custo, excelente adaptação ao organismo, moldabilidade única, os implantes podem ser carregados com antibióticos, e na maioria das vezes são muito duráveis.

Na medicina atual cada vez mais pode-se observar o trabalho conjunto de equipes especializadas de forma a implementar tecnologias a serviço do bem comum. Um exemplo prático onde ocorre a colaboração de diversos setores acadêmicos e industriais é a medicina restauradora ou plástica reconstrutiva, que atualmente está desenvolvendo-se rapidamente.

Segundo a *American Society of Plastic Surgeons* (ASPS) (2003), a plástica reconstrutiva é executada nas estruturas anormais do corpo, causadas por defeitos de nascimento ou adquiridas (trauma ou ferimento, infecção, tumores, ou doenças, além do próprio envelhecimento). Aplica-se geralmente para melhorar a função, mas pode também

ser feita para aproximar de uma aparência normal. Essa área oferece inúmeros setores com prospecção mercadológica e, conforme MEYER et al. (2003), em muito se compartilham informações das áreas de cirurgia, computação e engenharia para a confecção dos implantes médicos. Como descrito anteriormente, a cranioplastia, durante uma longa trajetória, vem evoluindo e apresentando soluções cada vez mais próximas da realidade de cada paciente; hoje convencionalmente, a cranioplastia é tratada através de implantes individuais que segundo EUFINGER & SAYLOR (2001), de acordo com a fonte de obtenção dos implantes, estes podem ser:

- Autólogos; quando retirado do próprio ser vivo;
- Não autólogos; evidenciando que é originário de outro, podendo estes serem,
 - ✓ Homólogos; da mesma espécie;
 - ✓ Heterólogos; de outra espécie;
- Aloplásticos: com a utilização de materiais que são as resinas, polímeros, metais e as cerâmicas.

Esta classificação pode também ser encontrada em SHAND et al. (2002), CHIARINI et al. (2004) e ARTICO et al. (2003) entre outros.

Ainda segundo EUFINGER & SAYLOR (2001), as vantagens dos implantes aloplásticos (utilizando materiais como resinas, polímeros, metais e cerâmicas) são que estes são obtidos em qualquer quantidade, minimizam os riscos de agentes infecciosos e não se faz necessária a remoção de um enxerto do tipo autólogo, que aumentaria a morbidade da cirurgia e dor pós-operatória. Entretanto, dependendo do material empregado, podem ocorrer algumas reações inflamatórias dos tecidos periféricos, reações estas de nível moderado e na maioria das vezes controlada. Este é, por exemplo, o caso de alguns cimentos ósseos que resultam em altas temperaturas de polimerização e que por tempo prolongado resultam na liberação de monômeros para os tecidos periféricos. VALLO et al. (1999), estudaram a modificação do PMMA autopolimerizável incorporando diferentes quantidades de HAp afim de tentar reduzir a temperatura de polimerização deste cimento. Como resultado o monômero residual que foi encontrado no PMMA modificado com HAp

mostrou que a HAp diminuiu a temperatura de polimerização. Os autores concluíram também que a viabilidade (moldabilidade do cimento ósseo) de se trabalhar com esta formulação modificada com HAp limita-se a um valor máximo de 15% de HAp em vol. MULLEM et al. (1988) e, utilizando o CMC misturado ao PMMA em cirurgias de cranioplastia; mostrou que o uso deste na forma de gel diminuiu razoavelmente a temperatura de polimerização do PMMA utilizado *in situ*, não ultrapassando 60°C.

2.2 Biomateriais para Implantes

Avaliar a melhor ou pior aplicabilidade dos materiais destinados a implantes biomédicos implica conhecer a parte óssea humana e também alguns mecanismos de regeneração orgânica, entre outros. Com isto, as tentativas de simular em materiais esses mecanismos resultam não só na análise da sua composição química, mas também a da sua estrutura interna.

2.2.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, composto por 33% de matriz orgânica, dentre os quais 28% colágeno tipo I e 5% de proteínas não colagenosas, como a osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanas e proteínas, morfogenéticas ósseas. Os 67% restantes compõem-se de mineral, principalmente por cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (TEN CATE, 2001).

A função do tecido ósseo é de sustentação e proteção dos órgãos do corpo. Também serve como alavanca para os músculos, impulsionando a movimentação, e fisiologicamente apresenta a função de reservatório mineral, principalmente de íons cálcio (KATCHBURIAN & ARANA, 1999).

O tecido ósseo é composto por quatro tipos de células:

- Células Osteoprogenitoras: localizadas no periósteo, no endósteo, e revestindo os canais de *Havers*. Essas células são derivadas do mesenquima e apresentam potencial em se diferenciar nos osteoblastos, e quando privadas de oxigênio e nutrientes, diferenciam em células condrogênicas (GARTNER & HIATT, 2003).

- Osteoblastos: advindas de células progenitoras, são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, incluindo fibras colágenas e proteínas não colagenosas. Produzem a enzima fosfatase alcalina óssea, possibilitando a mineralização da matriz óssea. Localizam-se na superfície do tecido ósseo, quando inativos são denominados células de revestimento (DUCY et al., 2000).

- Osteócitos: são células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos. Estão aprisionadas em lacunas dentro da matriz óssea calcificada. Apresentam função de manutenção do tecido ósseo, pois apresentam prolongamentos citoplasmáticos unidos por junções comunicantes formando um complexo necessário à manutenção e vitalidade da matriz (GARTNER & HIATT, 2003).

- Osteoclastos: são células gigantes multinucleadas derivadas de granulócitos-macrófagos, localizadas frequentemente no endósteo, sendo responsável pela reabsorção do tecido ósseo (PRETEL, 2005).

A formação do tecido ósseo pode se dar de duas maneiras, intramembranosa e endocondral. Embora histologicamente um osso não seja diferente do outro, a ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de um tecido mesenquimatoso, ou seja, células progenitoras diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea formando uma malha de espículas e trabéculas ósseas. De outra maneira, na ossificação endocondral ocorre um adensamento de células mesenquimais, que se diferenciam em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Por fim, o molde de cartilagem cresce servindo de esqueleto estrutural para o desenvolvimento do osso, e posteriormente é reabsorvido.

2.2.2 Tipos de Tecido Ósseo

Seja qual for o processo de ossificação pelo qual um osso é formado, o tecido resultante é sempre o mesmo. Porém histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: osso primário, embrionário, imaturo, isotrópico, ou osteóide; e osso secundário, maduro, anisotrópico, ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células, porém, apresentam diferentes orientações das fibrilas de colágeno quando analisados sob microscopia de luz polarizada (PRETEL, 2005).

O osso primário é o primeiro tecido ósseo a se formar durante o desenvolvimento fetal, e durante a reparação óssea. Possui, proporcionalmente, grande número de osteócitos, dispostos irregularmente nas trabéculas ósseas neoformadas. As fibras colágenas apresentam-se sem organização definida e o teor mineral é menor do que no osso secundário.

O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de fibras colágenas modelando a forma trabecular do osso primário em lamelas dispostas paralelamente umas as outras, formando ângulos retos que definem pequenos espaços medulares, o chamado osso trabecular ou esponjoso. Quando as fibras colágenas encontram-se dispostas em camadas concêntricas em torno de capilares sanguíneos e nervos, denominamos de canal de *Havers*, constituindo o chamado osso cortical (GARTNER & HIATT, 2003).

Essa dinâmica de modelação óssea é explicada pela incidência de forças externas sobre o tecido, alterando assim a arquitetura das fibras colágenas, e por fim promovendo resistência ao tecido. Assim pode-se explicar porque o osso é um tecido adaptável, ou seja, o tipo de modelamento ósseo está diretamente ligado à carga que ele recebe, determinando assim o osso trabecular e cortical.

2.2.3 Micro e Macroestrutura do Tecido Ósseo

O osso é um tecido extremamente bem organizado, com um surpreendente baixo peso e que fornece uma excelente estrutura de suporte. Sua composição difere dependendo da sua localização, da idade, do histórico de alimentação do indivíduo e da existência de doenças. Categorizamos o osso em quatro componentes microestruturais: células (Figura 2.1 e Figura 2.2), matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores solúveis e em dois componentes macroestruturais integrados em hierarquias macroestruturais distintas: osso cortical e trabecular (Figura 2.3). A proporção de osso cortical e de osso trabecular difere nas várias regiões do esqueleto (RODRIGUES, 2003).

Figura 2.1 – Representação dos quatro componentes da microestrutura óssea: Seta azul - osteoblastos, Seta verde – osteoclastos; Seta amarela – osteócitos.

<http://www3.umdj.edu/histsweb/lab4/bone/bonecells.html>.

Acesso em 5 jun. 2008

Figura 2.2 – Em (a) representação das células osteoprogenitoras; (b) osteoblastos e (c) osteócitos.

<http://www3.umdj.edu/histsweb/lab4/bone/bonecells.html>.

Acesso em 5 jun. 2008

Figura 2.3 – Representação dos dois componentes da macroestrutura óssea

Osso cortical e osso trabecular.

<http://www.ama-cmeonline.com>.

Acesso em 15 março 2008

O osso cortical forma 80% do esqueleto, é duro, denso e forma a parte externa de vários ossos e o corpo dos ossos longos. As unidades constituintes são os ósteons e as regiões intersticiais, ou sistema haversiano. O osso cortical possui uma porosidade considerada baixa de 5 a 30%, sendo rígido e suportando um valor razoável de tensão antes de fraturar quando submetido a um carregamento.

O osso trabecular compõe 20% do esqueleto e é uma estrutura altamente porosa encontrada nos corpos vertebrais e na parte final dos ossos longos. Formado por numerosas e pequenas trabéculas interconectadas (100-300 μm de espessura com espaçamento de 300-1500 μm entre as trabéculas adjacentes). Entre 75-95% do volume do osso trabecular é constituído por poros interconectados e é preenchido com medula óssea. O osso trabecular possui uma porosidade considerada alta, de 30 a 90% sendo capaz de suportar alongamentos e deformações antes de fraturar quando submetido a um carregamento (RODRIGUES, 2003). A Figura 2.4 ilustra a estrutura geral do osso.

Figura 2.4 - Estrutura do osso
<http://www.ama-cmeonline.com>.
Acesso em 15 março 2008

2.2.4 Reparação e Remodelação Óssea

De acordo com GIORDANO et al. (2003), o osso é um órgão altamente especializado do sistema esquelético, formado por diferentes tecidos conjuntivos e que desempenha importantes funções de ordem mecânica, metabólica e de proteção. Para tanto, ocorre também uma perfeita interação entre o osso e seus tecidos moles adjacentes, que se dão através das superfícies externas (periósteo) e internas (endósteo), revestidas por células osteogênicas organizadas em camadas. Os exatos mecanismos implicados *in vivo* na gênese do tecido ósseo promovem continuamente um equilíbrio entre formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) óssea.

A remodelação óssea não ocorre apenas no desenvolvimento do tecido, ou após uma injúria, seja esta patológica ou traumática. É um processo dinâmico, que ocorre no decorrer de toda a vida, porém com menor intensidade quando comparado ao processo de reparação tecidual geral (PRETEL, 2005). Ela ocorre por meio de dois ciclos intimamente acoplados (reabsorção e formação), determinados pela clássica seqüência ARF: ativação - reabsorção - formação. Após a ativação, os osteoclastos formam a lacuna de reabsorção. Uma vez terminada essa fase, os pré-osteoblastos migram para a cavidade, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a formação da matriz óssea. A mineralização da matriz somente ocorre vários dias após sua síntese e, durante esse processo, alguns osteoblastos serão enclausurados, transformando-se em osteócitos. A esse conjunto de células ósseas e o osso novo formado dá-se o nome de unidade metabólica óssea. As mudanças na massa óssea são causadas por um desequilíbrio da remodelação óssea, que pode ser reversível ou não. Quando o número de unidade metabólica óssea aumenta, as novas cavidades de reabsorção surgem antes que a formação no interior delas se complete, causando diminuição da massa óssea, tanto em osso cortical (aumento da porosidade) quanto em trabecular (afilamento, perfuração e perda da conectividade das trabéculas). Esse processo pode ser reversível quando cessarem as causas que o provocaram. A persistência do

mesmo pode alterar a microarquitetura óssea e comprometer, de maneira irreversível, a função mecânica do esqueleto.

O remodelamento ósseo é de longa duração e ocorre principalmente por intermédio dos osteoblastos realizando aposição óssea, e com os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. O resultado da atividade dessas células é uma verdadeira escavação acompanhada de liberação óssea, na qual produtos da degradação do tecido são incorporados pelos capilares sanguíneos, promovendo uma perfeita homeostase tecidual. Essa seqüência de eventos, na verdade, constitui um mecanismo de auto-reparação da estrutura óssea, preservando a massa e a arquitetura óssea dos organismos (RICHTER & BOYNE, 1989; PASCHOAL, 2003).

Sabe-se que a regeneração óssea não é somente um processo biológico, mas, fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos são também de fundamental importância na regeneração e manutenção do osso vivo (PASCHOAL, 2003). A Figura 2.5 exemplifica o processo de remodelação óssea.

Figura 2.5 - Esquema ilustrativo do processo de remodelamento no osso esponjoso RODRIGUES, 2003.

Após a injúria do tecido ósseo, ocorrem inúmeras reações no processo de reparação óssea. A Tabela 2.1 resume os eventos histofisiológicos desse processo.

Tabela 2.1 – Passos do processo de indução óssea (PRETEL, 2005)

Tempo após defeito ósseo	Evento Celular	Processo Molecular
1 Min	➤ Formação do coágulo sanguíneo;	➤ Formação da rede de fibrina; ➤ Liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas; ➤ Aparecimento de fibronectina;
1 Hora	➤ Chegada de polimorfonucleares (PMN) por quimiotaxia;	➤ Liberação de enzimas proteolíticas semelhantes: cologenase e elastina; ➤ Liberação de peptídeos colágenos;
3-18 Horas	➤ Acúmulo de (PMN), e adesão das células;	➤ Proteólise limitada; ➤ Liberação de fatores quimiotáticos para fibroblastos;
1º Dia	➤ Quimiotaxia de fibroblastos e união celular da matriz extracelular implantada;	➤ Liberação de peptídeos da fibronectina; ➤ Aumento da mobilidade celular; ➤ Desempenha papel de microtúbulos e microfilamentos;
2º Dia	➤ Continuação da quimiotaxia por fibroblastos;	➤ Início da síntese de proteínas e ácido nucléicos; ➤ Liberação de fatores de crescimento;
3º Dia	➤ Tradução do sinal originado da matriz para células superficiais;	➤ H - Timidina incorporada no DNA;
5º Dia	➤ Proliferação celular; ➤ Proliferação celular; ➤ Diferenciação de condroblastos;	➤ Aumento da atividade da ornitina descarboxilase; ➤ Síntese de colágeno tipo III; ➤ Aumento de SO ₄ incorporação proteoglicanas;
7º Dia	➤ Condrócitos, síntese e secreção de matriz;	➤ Síntese de colágeno tipo II;
9º Dia	➤ Hipertrofia de condroblastos;	➤ Aumento da incorporação de Cálcio e atividade da fosfatase alcalina;
10º- 12º Dia	➤ Osteoblasto; ➤ Formação óssea e Mineralização;	➤ Síntese de colágeno tipo IV; ➤ Fator VIII nos vasos sanguíneos; ➤ Síntese de colágeno tipo I; ➤ Síntese de proteoglicanas ósseas; ➤ Pico de incorporação de Cálcio e de atividade da fosfatase alcalina;
12º- 18º Dia	➤ Osteoclasto; ➤ Remodelação óssea e dissolução da matriz implantada;	➤ Aumento das enzimas lisossômicas (fosfatase ácida, sulfatase, e glucoronidase - β);
21º Dia	➤ Diferenciação medula óssea.	➤ Aumento da incorporação de ferro no grupo (Heme); ➤ Acúmulo de lisossoma; ➤ Síntese de colágeno tipo III.

2.2.5 Propriedades Elétricas do Osso

Os fenômenos elétricos constituem aspectos integrais, embora não exclusivos, de processos biológicos em todos os tecidos, incluindo o osso. As interações eletromecânicas são consideradas como reguladoras da proliferação, diferenciação e função celular.

As fontes de energia elétrica residem intrinsecamente dentro do osso (potenciais de repouso); podem resultar do esforço aplicado ao osso, desse modo os componentes extracelulares do osso, principalmente o colágeno, agem como transdutores para converter energia mecânica em elétrica (potenciais gerados pelo esforço); ou são provenientes de eletricidade aplicada externamente ou campos eletromagnéticos variando com o tempo. O tecido ósseo vivo apresenta potenciais estáveis de repouso, registrados na faixa de microvolts. Estes potenciais de repouso parecem provir em parte de potenciais de fluxo originados nos vasos sanguíneos, visto que a interrupção do fluxo arterial para o osso produz uma queda significativa nos potenciais de repouso enquanto que a oclusão venosa produz um aumento.

Quando a diáfise é fraturada, toda a diáfise se torna eletronegativa, em particular sobre o local da fratura, e a eletronegatividade da metáfise torna-se maior. A medida que a fratura cicatriza, as diferenças de potencial voltam ao normal.

O osso mecanicamente comprimido gera um potencial elétrico. As áreas de compressão tornam-se eletronegativas e apresentam uma osteogênese aumentada, já as áreas de carga de tração apresentam uma eletropositividade e osteogênese reduzida. Supõe-se que esses potenciais elétricos se originam de um efeito piezoelétrico, presumivelmente originado de tensões mecânicas aplicadas ao colágeno, e/ou potenciais de fluxo.

A piezoelectricidade óssea pode ser explicada segundo os efeitos de transdução de energia elástica em energia elétrica, já que o osso sofre uma deformação (energia elástica), colocando cargas na superfície celular (energia elétrica).

Devido as propriedades bioelétricas do osso, a carga mecânica que nele atua por ação de forças hemodinâmicas, age como estímulo externo, fazendo com que a matriz extra-celular óssea se deforme induzindo campos elétricos intramoleculares. De acordo com este sinal elétrico, o osso operará mudanças materiais de maneira adequada quanto a quantidade, tempo e direções necessárias à regeneração, remodelamento ou crescimento ósseo, segundo o processo de retroalimentação negativo (GUIRRO, 1995).

A lei de Wolff (1869) explica em parte o mecanismo celular e molecular através do qual o osso responde às tensões mecânicas (RODRIGUES, 2003).

O osso possui, em condições normais, um vetor permanente de polarização na direção do crescimento. Esta polarização é devido ao alinhamento dos dipolos existentes na molécula de tropocolágeno, que coincide com a orientação das fibrilas colágenas.

FUKADA & YASUDA (1964), demonstraram que o efeito piezoelétrico não deve ser função dos cristais de hidroxiapatita, uma vez que permaneceu inalterado no osso desmineralizado e sim devido ao colágeno.

A propriedade do colágeno de gerar sinais elétricos mediante a aplicação de uma tensão mecânica e contribuir para a reparação óssea, foi descrita pela primeira vez em 1962 pelos pesquisadores BASSET & BECKER apud GUIRRO, 1995. De acordo com os autores, o controle da atividade celular e a orientação das macromoléculas dadas pelos sinais elétricos, estariam ocorrendo de acordo com o mecanismo de retroalimentação negativa e é caracterizado pelo aumento do tecido ósseo, com conseqüente aumento da resistência aos estímulos externos.

2.2.6 Propriedades Mecânicas do Osso

O osso não é totalmente flexível e nem propriamente quebradiço, é uma combinação de ambos, com a parte mineral sendo mais rígida e a parte orgânica mais flexível. Visto que o osso demonstra características subordinadas ao tempo (mudanças nas propriedades

mecânicas com índices alterados e duração das aplicações de carga), é considerado um material viscoelástico. As propriedades mecânicas dos ossos dependem fundamentalmente da idade do osso. Estudos com o fêmur de 3, 5, e 35 anos mostraram que o módulo de elasticidade foi respectivamente de 7.0, 12.8, e 16.7 GPa. Geralmente após a maturação do osso, a resistência à tração e o módulo de elasticidade do osso cortical femoral diminui aproximadamente 2% a cada década (KARAGEORGIU, 2005).

O osso apresenta um limite de deformação elástica e um ponto crítico que delimita o alcance de deformação de uma variação não elástica. O osso não é linear nem inteiramente elástico na porção inicial da sua curva tensão-deformação, mas curva-se levemente. Portanto o osso é sujeito a uma deformação recuperável (escoamento plástico), mas pode ceder sob tensão e se recuperar da deformação dentro do seu limite. O osso não exibe uma alta recuperação de deformação quando ocorre uma significativa perda de energia, uma histerese ocorre durante uma carga e descarga (GUIRRO, 1995).

O tecido ósseo frequentemente é submetido a diversos tipos de solicitações mecânicas, que são as forças que atuam sobre ele. O osso raramente é sobrecarregado de uma única maneira, devido a sua estrutura geométrica ser irregular. As forças que atuam sobre um osso podem ser de compressão, de tração, de flexão, de torção e de cisalhamento (Tabela 2.2), e a combinação dessas forças pode ocasionar diversos tipos de fratura quando a carga ao qual o osso é submetido supera a sua resistência.

Tabela 2.2 - Tipos de solicitações mecânicas que atuam nos ossos, RODRIGUES, 2003.

Solicitação Mecânica	Efeito da Solicitação Mecânica no osso e sua Ocorrência
Compressão	Tende a diminuir o comprimento e aumentar a largura do osso. Nas vértebras e ossos dos membros inferiores.
Tração	Tende a aumentar o comprimento e separar as partes. Na suspensão em barra e carregamento de peso.
Flexão	Atua através de um momento de força que age num plano contendo o eixo longitudinal. As forças dos músculos atuando nos ossos longos.
Torção	Atua através de um momento de força que age em um plano perpendicular ao eixo longitudinal do osso. Nas fraturas de tibia.
Cisalhamento	Atua quando cargas são aplicadas de forma transversal à superfície da estrutura e são contrárias entre si. Nas fraturas do osso esponjoso e fêmur.

As propriedades mecânicas descrevem o comportamento do material quando sujeito à tensões externas. Deste modo, para a determinação das propriedades mecânicas do tecido ósseo é necessário que ele seja submetido a ensaios mecânicos. Como exemplo, temos o ensaio mecânico de compressão, onde uma tensão produz contração e deformação numa amostra cilíndrica de osso cortical.

2.3 Fixação do implante pelo crescimento ósseo

A reparação de um defeito quando realizado, por exemplo, dentro do canal medular de um osso longo estará associada à formação de um coágulo e de desenvolvimento de tecidos mesenquimais, que logo são substituídos por tecido ósseo. Então o primeiro tecido a entrar em contato com o implante é o sangue, cujo volume envolvendo o implante irá variar em função da geometria do implante e do sítio cirúrgico. O coágulo sofrerá uma série de eventos biológicos que terminarão na formação de tecido ósseo ao redor do implante. A resposta fisiológica do implante quando este trata-se de um implante com a superfície porosa, assemelha-se a cicatrização dos defeitos de um osso trabecular, com tecidos recém

formados ocupando o espaço vazio do material poroso. O implante entrará em contato com percentagens variáveis de osso cortical, osso trabecular e medula óssea. Algumas áreas estarão comprimindo o tecido ósseo enquanto outras estarão em contato com sangue e uma variedade de células. Essa característica aponta para o fato de haver na verdade várias interfaces com o implante.

As células não vêem um material “nu” *in vivo* ou *in vitro*. A todo o momento, o material está condicionado pelos componentes do fluido onde está inserido, seja soro, saliva, ou meio de cultura de células. A superfície do biomaterial estará coberta com uma mistura de lipídios, açúcares, íons e proteínas específicas para a composição química, topografia e a densidade de carga do substrato. As características da superfície determinarão quais moléculas irão adsorver, ao passo que a natureza e orientação dessas biomoléculas terão conseqüências diretas no recrutamento, ancoragem, proliferação e diferenciação das células. A ancoragem das células requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e diferenciação requerem que fatores de crescimento e citocinas estejam presentes. A aderência de células ao biomaterial é um pré-requisito para que haja a integração de tecidos ao implante.

Para um entendimento das interações dos diferentes biomateriais com os tecidos hospedeiros, é necessário um estudo do fenômeno da osteointegração, da fisiologia do osso e das propriedades que regulam a ligação osso-implante.

A interação mecânica entre um implante e o tecido vizinho é fator determinante na estabilização do primeiro. A grande diferença entre os módulos de elasticidade dos tecidos vizinhos e dos materiais usualmente empregados na confecção de implantes faz com que estes últimos apresentem uma resposta à tensão diferente da apresentada pelo tecido vivo. Assim, as duas estruturas tenderão a se deformar de maneira diferente e, conforme a direção das tensões aplicadas poderá ocorrer movimento relativo entre elas. A influência dos fatores mecânicos na interface se faz sentir de duas maneiras inter-relacionadas: a ação direta das tensões sobre os tecidos e a ação dos movimentos provocados por estas tensões. Forças de tração e de cisalhamento tendem a provocar movimento relativo na

interface, o que resulta no encapsulamento fibroso do implante quando em contato direto com o tecido vivo ou quando de fratura do cimento acrílico utilizado como meio de fixação.

A concentração de tensões em determinadas regiões pode ser produzida pela forma ou adaptação inadequadas da prótese. Para se evitar esse efeito, a prótese deve adaptar-se harmonicamente ao leito receptor do osso, possibilitando assim maior área de transmissão de carga. Com o objetivo de se transformar as forças de tração ou cisalhamento em forças de compressão, passou-se a dotar os implantes permanentes de uma superfície porosa para inclusive estimular o crescimento de tecido no seu interior.

Assim, as forças de tração ou cisalhamento entre o tecido vivo e o implante se transformarão em compressão das paredes internas dos poros. Além disso, superfície porosa preenchida com tecido vivo funciona como compósito com módulo de elasticidade intermediário entre estes componentes, favorecendo a integração biomecânica do implante (KIENAPFEL, 1999).

As condições essenciais para o crescimento ósseo e a osteointegração foram apresentadas e são bem conhecidas. O sucesso clínico de um implante por meio da fixação por osteointegração e pelo crescimento de tecido ósseo através do implante depende principalmente da união estável entre o implante e o leito receptor (KIENAPFEL, 1999).

2.4 Osteoindução, Osteocondução e Osteointegração

Segundo DAY et al. (2000), o termo osteoindução tem sido utilizado para descrever o processo de diferenciação de células osteoprogenitoras em condroblastos e osteoblastos, resultando na regeneração do tecido danificado. Pelo trabalho de URIST et al. (1965), apud GIORDANO, et al. (2003), pôde-se isolar e descrever o primeiro fator de crescimento e diferenciação óssea (FCDO): observou-se que fragmentos de osso desmineralizado, implantados em região subcutânea e intramuscular de cobaias, induziam a formação de

tecido ósseo, atribuindo este achado a um fator osteoindutor ativo presente na matriz óssea, ao qual chamaram de proteína morfogenética do osso (*bone morphogenetic protein* – BMP).

Ainda GIORDANO, et al. (2003) descreve que as células osteoprogenitoras, em contato com substâncias osteoindutoras promovem a proliferação e diferenciação celular. Alguns comentários adicionais sobre as teorias propostas quanto a origem dos osteoblastos, bem como dos fatores de crescimento e diferenciação óssea podem ser encontrados nesta literatura.

O outro conceito que pode então ser introduzido é o de osteocondução. Basicamente pode-se referir a este termo para designar a função de carregadores dos FCDO; assim, podem funcionar como veículo que induz a neoformação óssea no caso de fraturas. Almeja-se que os biomateriais possam exercer estas funções, recorrendo aos materiais que mimetizem as características mecânicas e bioquímicas contidas no osso. Por fim, pode-se também ser dito que o termo osteointegração compreende o mecanismo de osteoindução e a osteocondução.

A osteointegração é a união anatômica e funcional direta entre o osso vivo remodelado e a superfície do implante capaz de receber cargas funcionais. De acordo com Skalak & Branemark o termo osteointegração pode ser definido em vários pontos de vista e com relação a várias escalas de interesse científico.

Uma definição completa de Osteointegração somente é possível pela soma total de todos estes pontos de vista:

Do ponto de vista do paciente, uma fixação está osteointegrada se oferecer um suporte estável e aparentemente imóvel de uma prótese sob cargas funcionais, sem dor, inflamação ou afrouxamento.

Do ponto de vista da biologia macroscópica e microscópica e da medicina, a osteointegração de uma fixação no osso é definida como a aposição íntima de osso neoformado e reformado em congruência com as fixações, incluindo irregularidades de superfície, de forma que, à análise por microscopia óptica, não haja interposição de tecido conjuntivo ou fibroso e seja estabelecida uma conexão estrutural e funcional direta, capaz

de suportar cargas fisiológicas normais sem deformação excessiva e sem iniciar um mecanismo de rejeição.

Do ponto de vista biomecânico macroscópico uma fixação está osteointegrada se não houver movimento relativo progressivo entre a fixação e o osso vivo e medula circundantes sob níveis e tipos de carga funcionais por toda a vida do paciente. Também é necessário que as deformações sejam da mesma ordem e magnitude de quando as mesmas cargas forem aplicadas diretamente no osso.

Do ponto de vista biofísico microscópico a osteointegração implica que, na microscopia óptica e eletrônica, os componentes identificáveis do tecido em uma fina zona ao redor da superfície da fixação sejam identificados como componentes ósseos e medulares normais, que continuamente constituem uma estrutura óssea normal ao redor da fixação. Isto implica que o tecido mineralizado deve estar em contato a nanômetros, de forma que não exista material significativo interposto funcionalmente na interface.

2.5 Origem dos Biomateriais

Historicamente, pode-se considerar que os biomateriais são tão velhos quanto os homens e o registro histórico de sua primeira utilização se refere a materiais de sutura e datam de 4000 a.C. Há registros em que os egípcios usaram placas metálicas para reparos em lesões cranianas e membros artificiais. Estas práticas também já eram conhecidas desde a época do império romano até a idade média (CAMPOS, 2005).

Destes tempos até hoje houve um aumento exponencial no número de processos clínicos utilizando biomateriais e no número de materiais utilizados nestes processos clínicos. O campo da ciência dos biomateriais se desenvolveu muito rapidamente. Isto pode ser considerado um assunto multidisciplinar, com o envolvimento de muitas disciplinas tais como a química, a física, a biologia e a medicina.

A ciência dos biomateriais é uma das áreas de tecnologia avançada onde um grande número de novos termos foram introduzidos ou inventados (WILLIAMS, 1986).

2.5.1 Biomateriais

Segundo SANTOS (2002), os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Recorda SHARMA (2001) que o termo pode ser definido de várias maneiras e ressalta o aspecto de que devem inexistir reações adversas onde são implantados e que, portanto exprimem uma biocompatibilidade com o organismo. São vários os critérios que um material precisa atender para ser enquadrado como um biomaterial.

Em termos de biomateriais, uma análise da estrutura dos tecidos que constituem o corpo humano permite mostrar que os mesmos são tipicamente compósitos. Assim sendo, tais materiais são formados por dois ou mais componentes que, em conjunto, são responsáveis pelas propriedades finais do tecido. A partir de tal consideração, sugere-se que a substituição de tecidos vivos por materiais sintéticos pode estar ligada ao desenvolvimento de compósitos especiais capazes de reproduzir as propriedades dos tecidos humanos.

A escolha de um material para ser usado como biomaterial permanente, passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados:

- ✓ o material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar prejuízos a curto e longo prazo no local do implante ou no sistema biológico;
- ✓ os tecidos não devem causar a degradação do material implantado, como, por exemplo, corrosão em metais, a não ser de forma tolerável;

- ✓ o material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características adequadas para cumprir a função (estática ou dinâmica) desejada, pelo tempo desejado;
- ✓ o material deve ser esterilizável.

Por outro foco, HENCH e WILSON (1993), apud SANTOS (2002), sugerem a classificação desses biomateriais de acordo com o seu comportamento fisiológico:

- ✓ **Biotoleráveis:** materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso (encapsulamento fibroso). Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais.
- ✓ **Bioinertes:** materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação do encapsulamento fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou o faz em quantidade mínima. Os materiais bioinertes mais utilizados são a alumina, a zircônia e carbono.
- ✓ **Bioativos:** materiais que promovem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração, já comentada). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita, os compostos de fosfato de cálcio e segundo HELSEN (1998) o titânio e as ligas de titânio.
- ✓ **Absorvíveis:** materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, sendo representados, por exemplo, pelo fosfato tricálcico e o ácido polilático.
- ✓ **Reabsorvíveis:** são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos in vivo; por

exemplo, materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra “bioreabsorção” é utilizado quando a eliminação é total. Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Por exemplo, este é o caso da lenta dissolução de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Um polímero reabsorvível pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas.

GOSAIN (2003) ressalta algumas características específicas à reconstrução facial as quais esses biomateriais devem apresentar, como:

- ✓ biocompatibilidade, sem gerar uma reação inflamatória ou de corpo estranho;
- ✓ que sejam radiopacos, para fácil localização no corpo por meios radiográficos;
- ✓ facilmente configurados na forma que preenche a deformidade;
- ✓ capaz de manter o seu volume a longo prazo, após o implante;
- ✓ osteoatividade, induzindo a substituição do biomaterial por osso, num índice igual a reabsorção do biomaterial, e
- ✓ prontamente disponível.

A diversidade das aplicações dos biomateriais mostrados pela Tabela 2.3 faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro com análises detalhadas de osteointegração. (KAWACHI, et al. 2000).

Tabela 2.3 - Principais aplicações dos materiais aloplásticos. Fonte: Kawachi, 2000

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros			
➤ Polietileno	-Elasticidade	-Baixa resistência	Suturas / artérias / veias,
➤ PTFE	-Fácil fabricação	Mecânica	maxilofacial (nariz, orelha,
➤ Poliéster	-Baixa densidade	-Degradação dependente	maxilar, mandíbula, dente);
➤ Poliuretano		do tempo	cimento / tendão artificial /
➤ PMMA			oftalmologia
➤ Silicona			Fixação/ ortopédica (parafusos,
			pinos, placas, fios, hastes)/
			implantes dentários
Metais e Ligas			
➤ Aço inoxidável	-Resistência	-Baixa biocompatibilidade	Suturas / artérias / veias,
➤ Liga de titânio	mecânica	-Corrosão em meio	maxilofacial (nariz, orelha,
➤ Liga de cobalto-cromo	-Alta resistência ao	fisiológico	maxilar, mandíbula, dente);
	desgaste	-Perdas das propriedades	cimento / tendão artificial /
	-Alto modulo elástico	mecânicas com tecidos	oftalmologia
		conectivos moles	Fixação/ ortopédica (parafusos,
		-Alta densidade	pinos, placas, fios, hastes)/
			implantes dentários
Cerâmicas e Vidros			
➤ Alumina	-Boa	-Baixa força de tensão	Ossos/ Articulações / dentes /
➤ Zircônia	Biocompatibilidade	-Baixa resistência	válvulas / tendões, vasos
➤ Carbono	-Resistência à	mecânica	sanguíneos / traquéias artificiais
➤ Fosfato de Cálcio	corrosão	-Baixa elasticidade	
➤ Porcelana	-Inércia	-Alta densidade	
➤ Vidros Bioativos	-Alta resistência à		
	compressão		
Compósitos			
➤ Fibra de carbono – resina termofixa	-Boa	-Material de fabricação	- Válvula cardíaca artificial
	Biocompatibilidade	incompatível	(carbono ou grafite pirolítico) /
➤ Fibra de carbono - termoplástico	-Inércia		implantes/ joelhos (fibra de
	-Resistência à		carbono reforçada com polietileno
➤ Carbono – Carbono	corrosão		de alta densidade)
➤ Fosfato de Cálcio- Colágeno	-Alta força de tensão		

2.6 Porosidade dos Biomateriais

A porosidade, conforme LEON Y LEON (1998), é definida como a porcentagem de espaços vazios em um sólido e é uma propriedade morfológica independente do material. No caso de matriz para implantes, os poros são necessários para a formação do tecido ósseo porque eles permitem a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, bem como a vascularização. Em adição, a superfície porosa promove fixação mecânica entre o implante e o osso (KUBOKY et al, 1998).

A presença de porosidade na arquitetura interna de um biomaterial é condição fundamental para a estabilização e neoformação tecidual junto ao mesmo. Inicialmente estabeleceu-se uma média de 100-150 μ m como sendo este, o critério mais importante para a continuação do crescimento do osso em um material poroso (JONES, 2007).

Segundo KARAGEORGIOU (2005), os poros fornecem local para o tecido ósseo crescer e fixar o implante biologicamente e segundo ele o tamanho mínimo necessário para o crescimento de células ósseas é de 100-200 μ m. Poros menores entre 75-100 μ m resultam no crescimento de tecido osteóide não mineralizado. Poros menores ainda, entre 10–75 μ m, permitem a penetração apenas de tecido fibroso, o que ajuda na fixação mecânica da peça. Em alguns casos, poros maiores que 300 μ m são recomendados devido às observações de formação de tecido ósseo juntamente com a formação de capilares sanguíneos.

De extrema importância além do tamanho dos poros é sua relação com a interconectividade e acessibilidade destes, que juntos são cruciais para o crescimento do tecido ósseo (OTSUKI, 2006). Através dos trabalhos com biomateriais observa-se que é também de fundamental importância a obtenção de porosidades em torno de 60 a 90% em volume de poros além da preocupação em se manter uma resistência mecânica compatível com a região tecidual à ser implantada. Ainda num mesmo material podem existir poros com grande variedade de formas e tamanhos.

2.7 Materiais Aloplásticos para Implantes

CHIARINI et al. (2004) descreve que dentro de uma gama de possibilidades, o material sintético ideal deverá ser biocompatível, inerte, não condutor térmico nem magnético, deverá ser radiopaco, leve, rígido, simples de preparar, facilmente aplicável e de baixo custo. Na opinião destes autores, o que melhor se aproxima dessas qualidades é o poli (metacrilato de metila) (PMMA); ainda sugerem que as maiores vantagens da utilização dos materiais aloplásticos (sintéticos) é a possibilidade de prepará-los pré-operativamente e, portanto reduzir o tempo e a complexidade da cirurgia, proporcionando melhores resultados. CALIXTO (2001) sugere que os materiais normalmente utilizados para implantes, aplicados em todo o corpo humano, são os metais ou ligas metálicas (titânio, titânio-alumínio-vanádio, cobalto-cromo-molibidênio, ferro-cromo-níquel), as cerâmicas (hidroxiapatita, fosfato tricálcico, aluminatos de cálcio), os polímeros (silicones, poliamida, ácido polilactico, ácido poliglicólico, polipropileno, polietileno, poli (metacrilato de metila), politetrafluoretileno, poliuretanas), os compósitos (cerâmicas de vidro, cimentos de ionômero de vidro) e, mais recentemente, os vidros bioativos. Entretanto, para as aplicações em cranioplastia, são utilizados apenas os materiais de menor susceptibilidade a rejeições – por se tratar de uma região crítica – e os que são mais leves, favorecendo o aspecto do conforto por parte do paciente.

Estes biomateriais são regulamentados nos EUA pelo FDA (*Food and Drug Administration*), pela padronização existente para a avaliação da biocompatibilidade desses materiais. Segundo MALMONGE et al. (1999), uma fase inicial para essa avaliação dá-se por meio dos testes de citotoxicidade, sendo utilizados em uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares. Cita também diferentes protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade:

- ✓ ASTM F-813-83: Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células;
- ✓ ASTM F-895-84: Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade;
- ✓ ISO 10993-5: Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes para citotoxicidade (métodos *in vitro*).

- **Poli (metacrilato de metila)**

- **Histórico**

Atualmente, todos os cimentos ósseos no mercado são baseados quimicamente na mesma substância: metilmetacrilato (MMA). Quimicamente, o MMA é um éster do ácido metacrílico, substância que os cientistas iniciaram seu estudo, intensivamente, no começo do vigésimo século.

A fim de aprender mais sobre estes interessantes polímeros, o professor Pechmann atribuiu o tema “Produtos de polimerização do ácido acrílico” a seu aluno Otto Rohm, para sua tese, há mais de 70 anos em Tübingen, Alemanha.

Baseado nos resultados de sua pesquisa, Otto Rohm fundou mais tarde a companhia Rohm e Haas, onde os acrilatos foram desenvolvidos em seus laboratórios de pesquisa. Por volta de 1928, uma técnica para síntese de MMA em grande escala já tinha sido estabelecida. Isto conduziu ao nascimento das dentaduras utilizando MMA, em 1935. No mesmo ano a técnica foi patenteada por Bauer. Quando os problemas a respeito da produção técnica foram solucionados e a disponibilidade dos materiais foi garantida, os cientistas ocuparam-se intensivamente com as perguntas de como e de onde usar estas novas substâncias e como desenvolver modificações que conduziram a aplicações desconhecidas (KUHN, 2000).

Em 1936, a companhia Kulzer descobriu que uma massa poderia ser produzida misturando poli (metacrilato de metila) (PMMA) (Figura 2.6) em pó e um monômero líquido,

que endurecesse quando o peróxido de benzoíla (BPO) fosse adicionado e a mistura aquecida à 100° C em um molde de pedra. O primeiro uso clínico destas misturas de PMMA foi uma tentativa para fechar defeitos craniais em macacos, no ano de 1938. Quando estas experiências tornaram-se conhecidas, os cirurgiões ficaram ansiosos para tentar estes materiais na cirurgia plástica em seres humanos.

O polímero Paladon 65, nesta base, foi então usado para fechar defeitos craniais nos seres humanos através da produção de placas em laboratório e mais tarde ajustando o endurecimento do material no local de aplicação.

Quando os químicos descobriram que a polimerização de MMA ocorreria por si própria em temperatura ambiente se um co-iniciador fosse adicionado, as companhias Degussa e Kulzer, usando aminos aromáticos terciários, estabeleceram em 1943 um protocolo para a produção química de cimentos ósseos de PMMA; este processo é válido até hoje. Estes estudos devem ser considerados como o nascimento do cimento ósseo de PMMA.

Ao fim da Segunda Guerra Mundial, muitas patentes alemãs no campo dos metacrilatos tiveram de ser entregues aos vencedores devido ao perigo de um possível rearmamento alemão. Após este acontecimento, o uso prático dos estudos de Otto Rohm pelo mundo ocorreu rapidamente. Os cimentos ósseos de PMMA (o qual está ainda no mercado até hoje) foram desenvolvidos independentemente em diversos países; estes cimentos incluem as marcas CMW, Palacos R e Simplex P.

As vantajosas propriedades de manipulação das misturas do polímero de MMA remaneceram o objeto de muitos projetos de pesquisa, isto porque os cimentos no mercado diferem consideravelmente neste respeito, mesmo que suas bases químicas sejam idênticas. Em 1951 Kiaer foi o primeiro a utilizar o material como escora, para a fixação de cápsulas de vidro acrílico na cabeça femoral, após ter removido a cartilagem.

Os estudos sobre o uso destes materiais em plásticas no crânio se iniciaram com a produção técnica em grande escala dos polímeros.

Os pré-requisitos essenciais para a aceitação do cimento ósseo de PMMA na cirurgia foram os estudos da reação do tecido aos implantes. A boa biocompatibilidade dos implantes de PMMA em curto prazo era da importância vital.

Em 1958, Sir. John Charnley, considerado o inventor da recolocação moderna de articulações artificiais, introduziu, pioneiramente, o cimento ósseo na cirurgia ortopédica, fixando com sucesso os componentes femural e acetabular na artroplastia total do quadril. Charnley chamou o material usado de “cimento ósseo na base acrílica”. Seus estudos descreveram uma técnica cirúrgica totalmente nova (KUEHN, 2005).

Em 1969 o professor Buchholz e a companhia Kulzer foram os primeiros a adicionar um antibiótico aos cimentos ósseos. Baseado na consideração do conhecido processo da difusão, a liberação do monômero residual, investigaram se um ingrediente ativo poderia ser dissolvido na matriz do cimento. A adição do sulfato de gentamicina no Palacos R rendeu os primeiros resultados satisfatórios. Os estudos se iniciaram nos laboratórios da Endoklinik, em Hamburgo, Alemanha, e resultaram no desenvolvimento do tipo Refobacin-Palacos R, o primeiro cimento ósseo com antibiótico introduzido no mercado (KUEHN, 2005).

Em parte, devido aos resultados positivos a respeito da sua biocompatibilidade, o interesse clínico no material de PMMA e o número de cimentos ósseos no mercado cresceram. Com a finalidade de criar uma base uniforme para reproduzir e testar os cimentos ósseos de PMMA iniciou-se em 1976 o desenvolvimento de um padrão nos Estados Unidos, onde a American Society for Testing and Materials (ASTM) publicou a norma F 451 – Standard Specifications for Acrylic Bone Cements, em 1978. Na mesma base, foi desenvolvido o protocolo ISO 5833 pouco tempo depois, em 1979. Hoje, todos os cimentos ósseos devem obedecer ao padrão atual, ISO 5833/2 (2002). No Brasil, ela é representada pela publicação da Associação Brasileira de Normas Técnicas, denominada ABNT NRB ISO 5833 – Implantes para cirurgia – Cimentos de resina acrílica - a qual se aplica este trabalho.

Figura 2.6 – Poli (metacrilato de metila).

▪ Composição

Os cimentos ósseos são fornecidos geralmente como um sistema de dois componentes, sendo 66,6% de poli (metacrilato de metila) em pó e 33,3% de monômero líquido.

O pó consiste principalmente em partículas de forma granulada com um diâmetro típico variando entre 1-125 μm , podendo apresentar pesos moleculares na faixa de 60.000 a 1.000.000 g/mol, com densidade de 1,18g/cm³, temperatura de fusão cristalina (T_m) igual a 160°C e temperatura de transição vítrea (T_g) igual a 105°C, sendo um polímero predominantemente amorfo. Estas partículas contêm além do homopolímero PMMA e/ou copolímeros do metilmetacrilato, um dos três ativadores do processo da polimerização, o peróxido de benzoíla (BPO) (chamado iniciador).

O líquido, com densidade 1,18 g/cm³, e como o segundo componente, contém principalmente o monômero MMA, mas também o segundo ativador do processo de polimerização, N,N-Dimetil p-toluidino (DMPT) (chamado acelerador), e a hidroquinona ou o

ácido ascórbico, como um estabilizador para impedir a auto-cura do monômero no líquido durante o armazenamento.

▪ Polimerização

Adicionando o polímero ao monômero, os componentes são misturados e o processo de polimerização é então iniciado ocorrendo a auto-cura. Em temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), a polimerização do monômero somente pode ser iniciada na presença de radicais livres. Radicais são átomos ou grupos de átomos com pelo menos um elétron desemparelhado, considerados altamente reativos, são normalmente destruídos rapidamente, por uma recombinação ou pela quebra, até a criação de outro radical e uma molécula estável. Estes radicais são produzidos durante a reação do iniciador BPO, que se encontra no pó, e do acelerador DMPT, presente no líquido. Por esta razão, este tipo especial de polimerização é denominado “polimerização do radical livre”.

O processo transforma o líquido grosso inicial em um material deformável macio e finalmente em um cimento, endurecendo-se rapidamente com um aumento associado na temperatura. É crítico que o processo da polimerização seja reproduzido assim que o cirurgião possa aplicar o cimento corretamente.

O aumento da temperatura é governado pela quantidade de monômero reagente e da composição química dos componentes do cimento. Além disso, a necrose química pode ser atribuída também à liberação de monômero não-reagido.

A polimerização muda o volume do cimento: a mistura retrai no início, expande durante a fase da liberação do calor, e retrai finalmente outra vez quando esfria. Na teoria, o monômero perde 20% de seu volume. Dado que o cimento é composto de aproximadamente um terço de líquido e dois terços de pó, a perda do volume é aproximadamente 8%. Portanto, poderia ser de importância clínica reduzir-se o índice do monômero residual, sem influenciar a qualidade do cimento. Por outro lado, a retração do

cimento durante a polimerização e seu comportamento mecânico ao longo do tempo seria prejudicado, contribuindo para o afrouxamento do implante.

- **Fosfato de Cálcio**

Há aproximadamente vinte anos que os implantes compostos de fosfato de cálcio estão comercialmente disponíveis como materiais de substituição óssea. Os materiais de fosfato de cálcio não são osteoindutivos por si próprios, mas fornecem um substrato físico sobre o qual o osso das superfícies adjacentes pode ser depositado e potencialmente guiado. Segundo CALIXTO (2001), apresentam porosidades que permitem o crescimento fibro-vascular e ósseo para seu interior (osteocondução) e, conseqüentemente, a fixação do material implantado. As cerâmicas de fosfato de cálcio mais freqüentemente utilizadas são a hidroxiapatita e o fosfato tricálcio, nas formas densas (microporosa) e macroporosa, indicadas para preenchimento de defeitos ósseos, aumento do rebordo alveolar e cobertura de implantes metálicos.

Segundo SANTOS (2002), a hidroxiapatita (HAp) é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. A equação química da hidroxiapatita é representada por: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A hidroxiapatita é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, como veremos mais detalhadamente no tópico abaixo. A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água e, também, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual. Infelizmente, as cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam a desvantagem de serem quebradiças, apresentando baixa resistência ao impacto.

- Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa, sendo o mais eficaz dos biomateriais osteocondutores. É representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, onde cada cristal de hidroxiapatita é formado por centenas ou milhares destas unidades, que se mantêm unidas através de atrações eletrostáticas de seus átomos. Normalmente o cristal de hidroxiapatita apresenta uma forma hexagonal (MOREIRA, 2000). A Figura 2.7 ilustra a estrutura química da hidroxiapatita.

Figura 2.7 – Rede cristalina da hidroxiapatita.
Revista CBPF

A HAp apresenta como características uma textura microgranular e lenta velocidade de reabsorção pelo organismo, demandando cerca de 4 a 6 meses para a sua completa reabsorção (PRETEL, 2005). A cerâmica de hidroxiapatita vem sendo estudada por se tratar de uma substância bioativa não tóxica, que provoca pouca reação tecidual, mostrando-se um importante recurso para a substituição óssea (USCHIDA et al. 1990). Seu emprego tem se destinado ao preenchimento de falhas ósseas e reconstrução de defeitos ósseos (após ressecções tumorais), revestimentos de componentes metálicos para a fixação promovendo uma cimentação óssea bioativa e revestimento de superfícies de metais porosos, sem cimento, fornecendo uma fixação mais rígida e forte (OONISH, 1991).

USHIDA, et al. (1990) utilizam clinicamente a hidroxiapatita desde 1983, para preenchimento de superfícies ósseas após ressecção e curetagem de tumores ósseos benignos, e têm obtido bons resultados, tais como a ausência de reações imunológicas, satisfatório preenchimento dos defeitos ósseos auxiliando a osteogênese, confirmando que a cerâmica de hidroxiapatita é um eficiente substituto ósseo.

Entre as vantagens para o uso desta cerâmica, destacamos a ausência de reação imunológica, o que comprova sua biocompatibilidade e permite adequado preenchimento ósseo, ausência de mudanças morfológicas no pós-operatório e estímulo da formação de tecido novo (MOREIRA, 2000).

A hidroxiapatita e o trifosfato de cálcio durante a sua biorreabsorção liberam íons de fosfato e cálcio. A degradação do implante ocorre pela dissolução simples ou pelo processo de fagocitose realizado pelos osteoclastos. Segundo, BUCHOLZ, et al. (1987), a taxa de biodegradação depende da composição química do cristal, e também de sua densidade, área específica exposta e de sua proximidade com os tecidos moles e o osso. O trifosfato de cálcio dissolve muito mais rapidamente do que a hidroxiapatita, especialmente quando colocado em tecidos moles (MOREIRA, 2000).

Os processos de biodegradação e biorreabsorção dos materiais de fosfato de cálcio (Ca-P) resultam em alterações físico-químicas, após o seu contato com o meio biológico.

As mudanças físicas incluem:

- ✓ Desintegração ou quebra do material em partículas menores;
- ✓ Perda da força mecânica;
- ✓ Perda da densidade;
- ✓ Alteração da micro e macro porosidade;
- ✓ Alterações do tamanho e/ou peso do implante.

As mudanças químicas incluem:

- ✓ Diminuição do pH no meio do implante causando dissolução parcial do material;

- ✓ Redução do tamanho das partículas ou do cristal de cálcio fosfato individualmente;
- ✓ Aumento nas concentrações de íons de fosfato de cálcio no meio biológico, levando à formação e depósito de outros Ca-P intimamente associados com uma matriz orgânica sobre a superfície dos materiais de fosfato de cálcio;
- ✓ Incorporação destes cristais no interior do osso novo formado na interface óssea entre o implante e o hospedeiro (LE GEROS, 1993).

Origem

a. A Hidroxiapatita de Origem Natural

▪ Provenientes de Corais

A hidroxiapatita de origem natural proveniente de corais é formada por recifes encontrados em regiões costeiras do pacífico sul e oeste da Índia (HOLMES, 1979 apud MOREIRA, 2000). A couraça destes corais é formada pelos invertebrados marinhos que extraem cálcio e carbonato das águas oceânicas. Estes corais, submetidos a uma conversão química por meio de trocas hidrotermais, permitem a conversão do carbonato de cálcio em hidroxiapatita pura, representada pela fórmula química já conhecida, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A estrutura do coral permanece inalterada após a conversão química e os grânulos de hidroxiapatita resultantes desta conversão ficam destituídos de qualquer matéria orgânica (BUCHOLZ, et al. 1987).

O estudo dos corais tem se direcionado para dois tipos, os quais apresentam arquitetura microscópica semelhante ao osso, sendo adequados para conduzir a osteogênese humana (WEBER & WHITE, 1973 apud MOREIRA, 2000). O gênero *Porites* tem dimensões em média de 230µm de diâmetro, interconectados por aberturas (fendas) da ordem de 190 µm de diâmetro; apresentando configurações parecidas com enxerto autógeno, sendo mais utilizado como um enxerto cortical para tratamento de fraturas

cominutivas. O gênero *goniopora*, da ordem *Scleractinian*, conhecido como um “coral verdadeiro” é cercado por inúmeros invertebrados marinhos com poros em sua carcaça, apresentam uma microestrutura semelhante ao osso esponjoso, sendo utilizado em defeitos ósseos subcondrais e fraturas metafisárias de ossos longos.

O primeiro estudo realizado com a hidroxiapatita derivada de corais para o preenchimento de falhas ósseas foi realizado na década de 70. O experimento constituiu de implantes de cilindros de hidroxiapatita medindo 5 mm de diâmetro e foi colocado em osso trabecular da porção distal do fêmur e proximal da tíbia em cachorros, mostrando que não houve formação de tecido fibroso ou de células inflamatórias interpostas entre o implante e a superfície óssea, reforçando a idéia de biocompatibilidade (MOREIRA, 2000).

▪ **Provenientes de Ossos Bovinos**

Outra fonte de hidroxiapatita de origem natural é proveniente do osso bovino. Este tipo de hidroxiapatita é obtido através da calcinação do osso bovino cortical e medular a 1000°C, resultando em um produto bastante pesado com alta densidade, estando disponível para o uso na forma macrogranular, microgranular e na forma de blocos (TAGA, 1998).

A indicação para este tipo de biomaterial se direciona para a cirurgia buço-maxilo-facial, cirurgia ortognática e, talvez a cirurgia plástica.

b. A Hidroxiapatita de Origem Sintética

Existem vários tipos de hidroxiapatita sintéticas parcialmente reabsorvíveis disponíveis no mercado mundial. Normalmente, este tipo de hidroxiapatita sofre um processo denominado sinterização, que é o tratamento térmico da cerâmica próximo ao seu ponto de fusão. Nesta técnica a hidroxiapatita é levada até 1100°C e mantida nesta temperatura por cerca de 3 a 4 horas. Ao final deste processo, surgem alterações dramáticas nas propriedades cristalinas deste biomaterial. Uma outra propriedade

modificada é a superfície do cristal que se torna mais lisa e principalmente torna o material insolúvel ao meio fisiológico (TAGA, 2000).

Cerâmicas de hidroxiapatita obtidas por métodos sintéticos diferem em sua cristalinidade. Diferenças nas temperaturas de sinterização promovem alteração na dissolução do cristal e, portanto, na sua bioatividade, perfeição e, ainda, no tamanho do cristal. Cristais menores de mesma composição irão dissolver mais rapidamente que cristais maiores devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico. Da mesma forma, cristais com maior número de defeitos vão dissolver mais rapidamente que aqueles com menores defeitos (LE GEROS, 1993).

▪ **Configuração, densidade e tamanho dos poros**

A hidroxiapatita derivada do coral apresenta seus poros com tamanho uniforme, configurações e aberturas interconectadas. Apresenta teoricamente vantagens vasculares para o crescimento ósseo, quando comparada a outros tipos de cerâmica (fosfato tricálcio), que não possuem uniformidade em seus poros. Sólidos porosos têm a vantagem de permitir a circulação de fluidos corpóreos e aumentam o potencial para uma firme fixação com o tecido ósseo. A hidroxiapatita, sendo um material poroso, inorgânico e estéril, deve ser altamente compatível com o tecido corpóreo e, quando usadas como um implante ósseo, pode se integrar com o osso. A escolha do tamanho do poro depende da localização do defeito a ser preenchido (MOREIRA, 2000).

Ainda segundo MOREIRA (2000), nas cerâmicas de hidroxiapatita sintética, a microporosidade é uma consequência da temperatura e duração da sinterização. Quanto maior a temperatura e maior o período de sinterização, menor será o grau de microporosidade. Por outro lado a macroporosidade é deliberadamente introduzida por adição de agentes voláteis como o peróxido de hidrogênio, naftaleno ou materiais orgânicos que aquecidos volatilizam, sublimam ou se decompõem.

A densidade do material Ca-P depende das condições de pressão e de temperatura na sinterização. As maiores pressões e temperaturas mais elevadas proporcionam maior densidade.

A FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a utilização da hidroxiapatita em humanos em 1982. A hidroxiapatita era utilizada inicialmente para preencher pequenos defeitos nos ossos longos, sendo empregada posteriormente em escalas maiores devido ao seu bom aproveitamento (BUCHOLZ et al., 1987).

Umas das grandes combinações que vêm sendo realizada nas últimas duas décadas são entre cerâmicas e polímeros. Esta combinação busca produzir compósitos de desempenho satisfatório tanto na área biológica quanto na área mecânica. O grande objetivo por trás deste conceito é de fazer uso de propriedades inerentes das entidades envolvidas, propriedades estas que estão fundamentalmente ligadas à estrutura básica destes materiais (como ligações químicas primárias e arranjo atômico).

- **Metais**

Os metais têm sido usados há mais de 30 anos em cirurgia plástica para reconstrução de crânio. A biocompatibilidade dos metais implantados é principalmente determinada por suas propriedades de superfície e resistência à corrosão. Segundo EUFINGER & SAYLOR (2001), o titânio puro ou ligado tem demonstrado alto grau de biocompatibilidade para as uniões ósseas e metálicas, favorecendo em muito as cirurgias cranio-maxilofaciais e ortopédicas. Ele é comumente fabricado e disponível clinicamente tanto como titânio puro ou como uma liga com quantias pequenas de outros metais, como por exemplo, Ti₆Al-4V (6% alumínio e 4% vanádio), que melhora a resistência mecânica do material consideravelmente. O titânio forma uma camada superficial de óxido de titânio que é muito aderente e altamente resistente a corrosão; além disso, a baixa densidade do metal permite ter atenuação mínima em radiografias e inexistência de artefatos em tomografias

computadorizadas ou ressonâncias magnéticas. Estas propriedades, combinadas com sua resistência, fazem do titânio um metal atualmente disponível para reconstrução craniofacial.

2.8 Revisão Bibliográfica da Utilização dos Materiais Aloplásticos

Dentre os materiais aloplásticos mais utilizados o poli (metacrilato de metila) e a hidroxiapatita têm se destacado com bons resultados nas principais áreas descritas abaixo:

- **Cirurgias Ortopédicas:**

ROSSI et al. (1993), os autores realizaram testes a fim de verificar a possibilidade de aplicação do compósito de hidroxiapatita-poli (metacrilato de metila) (HABOND 40/0) como material de enxerto. Foram realizados testes comparativos de compressão axial em dez corpos de prova cilíndricos à base de compósito e dez de poli (metacrilato de metila) puro (controle). Todos os corpos foram imersos em soro fisiológico durante 48 horas, exceto dois corpos de compósito, mantidos secos. O compósito apresentou resistência, elasticidade e rigidez significativamente menores que o cimento acrílico. Observou-se interferência da solução fisiológica em suas propriedades. Os autores concluem que o compósito de hidroxiapatita-poli (metacrilato de metila) não deveria ser utilizado em casos de solicitação mecânica elevada.

SCHOENAERS et al. (2000), os autores investigaram a integração do tecido ósseo em quatro tipos de materiais de implantes porosos (*Interpore* 2001 ou hidroxiapatita coralina, blocos de hidroxiapatita, grânulos de hidroxiapatita e poli (metacrilato de metila)) foram avaliadas *in vivo*. Os blocos porosos mediam 20mmX 610mmX68 mm e foram implantados na mandíbula e na crista ilíaca de ovelhas. A cicatrização óssea nos blocos porosos foi estudada no período de 2 e 6 meses depois de implantados. O comportamento do próprio material também foi analisado. A histologia e a análise histomorfométrica revelaram que a cicatrização do osso depende, ambos do tempo de cura e do tipo de material utilizado.

Baseado na análise de discrepância, diferenças em quantidades de crescimento ósseo em 2 e 6 meses foi estatisticamente significativa (p. 0:0039 em mandíbula; p. 0:0351 na crista ilíaca). Os autores concluem que a hidroxiapatita tem capacidade osteocondutiva. O PMMA poroso mostrou ser biocompatível, mas mostrou também menos crescimento ósseo dentro dos poros. A hidroxiapatita *Interpore* 2001 foi a que apresentou na superfície os mais altos níveis de osteointegração e biodegradação.

SHINZATO et al. (2000), desenvolveram um PMMA bioativo que foi designado GBC (*Glass Bioactive Cement*). Este material bioativo apresentava partículas de biovidro como um preenchedor inorgânico e o PMMA funcionava como uma matriz orgânica. O estudo examinou o efeito das variadas concentrações do biovidro adicionadas ao GBC em relação as propriedades mecânicas e biológicas. A resistência à compressão e o módulo de elasticidade do GBC aumentaram de acordo com o aumento da quantidade do biovidro. Histologicamente, a formação de osso estava presente na superfície de todos os tipos de GBC. Os autores concluíram que em relação a propriedades mecânicas e osteocondutividade o GBC que apresentava 60% em peso de biovidro foi o de melhor desempenho.

BERUTO et al. (2000), os autores estudaram a incorporação de α -TCP, estando este disperso em uma solução de água destilada, ao PMMA. O PMMA foi utilizado como sendo uma matriz celular com porosidade por volta de 100 μ m e a esta matriz foi incorporada a solução de α -TCP. Os autores desenvolveram uma estrutura porosa polimérica com a sua fase bioativa inorgânica confinada no interior dos poros somente e não ligada a estrutura do polímero. Os autores concluíram que isto foi possível devido ao PMMA ser hidrofóbico e o α -TCP ser hidrofílico. As propriedades mecânicas do compósito apresentaram valores comparáveis aos das biocerâmicas porosas normalmente utilizadas como substituto ósseo.

WIEICKI et al. (2000), os autores desenvolveram biocompósitos utilizando como matrizes o PMMA e o PLA e como agente bioativador o cimento fosfato e o biovidro. As propriedades mecânicas foram analisadas e correlatadas com a microestrutura dos

biocompósitos. Os resultados apresentaram grandes diferenças no comportamento mecânico dos compósitos examinados. O melhor valor do parâmetro calculado foi para os compósitos com uma matriz de PMMA. A observação ao microscópio revelou uma alta adesão destes grãos na matriz de PMMA. Os compósitos com uma matriz de PLA também demonstraram uma boa adesão deste polímero para com os grãos de alumina, porém, suas propriedades mecânicas não foram tão boas quando comparadas a matriz de PMMA. Os autores concluem que a utilização destas duas combinações podem ser sugeridas para a prática clínica em cirurgias ortopédicas.

OREFICE et al. (2001), os autores sintetizaram e caracterizaram compósitos de matriz polimérica reforçada por partículas de vidro bioativo. Os compósitos foram produzidos a partir da polimerização em massa na presença de partículas de vidro bioativo. As partículas de vidro foram adicionadas ao monômero em diversas concentrações para permitir a variação das propriedades mecânicas e da bioatividade desses compósitos. A bioatividade dos materiais produzidos foi avaliada através de testes *in vitro* realizados a 37°C em uma solução simuladora do fluido humano por períodos de tempo de 0 hora a 30 dias. Em seguida, os compósitos submetidos aos testes *in vitro* foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho. O procedimento de síntese mostrou-se eficaz na produção de compósitos com diferentes frações volumétricas de partículas distribuídas homogeneamente pelo material. Os resultados dos testes *in vitro* revelaram a deposição de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície dos materiais, comprovando a bioatividade dos compósitos. Foi ainda observado que a cinética de deposição da camada de HCA pode ser controlada pela fração volumétrica da fase bioativa.

ARCOS et al. (2001), estes autores utilizaram o PMMA como um compósito formado de biovidro/PMMA/gentamicina. Os resultados mostraram que este material pode ser utilizado como um sistema de liberação controlada de fármacos, mantendo o comportamento bioativo do vidro. O compósito fornece altas doses do antibiótico durante as primeiras horas quando eles estão encharcados de líquido fisiológico artificial. Após este período a entrega de antibiótico se torna lenta, mantendo apenas o suprimento de pequenas

doses até o final do experimento. Os autores concluíram que a entrega do antibiótico está relacionada com a troca de íons Ca^{+2} e H_3O^+ entre o compósito e o líquido fisiológico artificial. A estrutura porosa do compósito permitiu o crescimento de cristais de apatita na superfície e dentro dos poros.

DALBY et al. (2001), os autores pesquisaram a introdução de uma fase bioativa composta de HAp que foi misturada ao PMMA buscando com isto aumentar a fixação de implantes ao tecido ósseo, ao invés da encapsulação do implante pelo tecido fibroso. Ao PMMA foi adicionado 17,5% em peso da HAp. O estudo foi realizado *in vitro* e utilizou-se células osteoblásticas humanas. Os resultados encontrados mostraram um significativo aumento da proliferação e da diferenciação celular na mistura de PMMA/HAp quando comparados somente ao PMMA (controle) após 21 dias de cultura em ambos os materiais.

DALBY et al. (2002a), os autores investigaram a bioatividade da mistura PMMA/HAp, capaz de fortalecer a retenção mecânica do implante permitindo a aposição direta de osso. Estudos *in vitro* foram utilizados de modelo para avaliar a resposta biológica no PMMA convencional aos diferentes volumes de 4.6% e 8.8% em peso de hidroxiapatita. As características biológicas foram avaliadas e os valores de compressão e de flexão foram encontrados e tiveram uma redução que foi de 9% para 6%. Entretanto quando o material foi testado em relação à fadiga, a adição de HAp causou uma diminuição significativa. Quando o material foi testado no vácuo não havia nenhuma influência prejudicial vista pela incorporação da HAp. Estes resultados demonstram que um volume relativamente pequeno de HAp pode ser adicionado antes de uma significativa deterioração mecânica.

DALBY et al. (2002b), os autores compararam o PMMA ao PEMA (Polietilmetacrilato). O PEMA foi desenvolvido com temperaturas mais baixas de polimerização e também com menos lixiviação de monômero, quando comparado ao tradicional PMMA. O estudo comparou as respostas biológicas dos materiais por meio da técnica *in vitro* utilizando células osteoblásticas humanas. As respostas foram dadas pela adesão celular ao material e qualificadas pela imunolocalização de vinculina e actina ao citoesqueleto, mostrando também uma maior organização no PEMA quando comparado ao

PMMA. Dentre os resultados obtidos pelos autores, concluem-se a excelente biocompatibilidade do PEMA.

FINI et al. (2002), investigaram as propriedades biológicas do compósito PMMA e α -TCP. As investigações foram feitas *in vitro* e *in vivo*. Os resultados com a cultura de osteoblastos demonstraram uma viabilidade significativamente positiva na matriz PMMA + α -TCP. Os implantes foram realizados em coelhos. Após 12 semanas já se apresentava osteointegrado ao tecido ósseo trabecular e cortical. Os autores concluíram que possivelmente estes resultados positivos apresentados devam ser pela macroestrutura porosa do PMMA + α -TCP e a presença de uma cerâmica bioativa que deva ter contribuído para um efeito sinérgico e também ser responsável pela melhoria da colonização do material pelas células, pela atividade osteoblástica, pelos processos de osteoindução e osteocondução e finalmente pelo remodelamento ósseo.

MOURSI et al. (2002), os autores investigaram a incorporação da HAp em uma matriz de PMMA. Os experimentos foram realizados somente *in vitro*. Observou-se que a proliferação de osteoblastos após 8 dias foi significativamente maior na matriz de PMMA + HAp quando comparada somente ao PMMA e ao titânio comercialmente puro, que foram utilizados como controle. Os autores após as investigações de imunohistoquímica concluíram que a adição de HAp ao PMMA melhora a resposta aos osteoblastos quando comparados somente ao PMMA, e sendo assim esta incorporação pode ser útil para melhorar as propriedades osteogênicas do PMMA.

OHGAKI et al. (2003), os autores desenvolveram um compósito chamado de híbrido funcional, sendo o poli (metacrilato de metila) (PMMA) o polímero escolhido e a hidroxiapatita (HAp) a cerâmica. A HAp foi distribuída e sedimentada em uma matriz de PMMA, para isto utilizou-se uma centrifuga para evitar a convergência de tensão na interface. Os resultados mostraram que a curva de tensão-deformação do híbrido PMMA/HAp apresentou suficiente resistência mecânica com fragilidade reduzida. O MEV mostrou evidência de HAp exposta na superfície do compósito. Os autores concluem que o

híbrido de HAp com PMMA foi desenvolvido para preservar a força, dobrando e flexibilidade do PMMA e a biocompatibilidade da HAp. O compósito pode ser considerado vantajoso em relação aos compósitos existentes. Os autores concluem que este compósito devido à curva de tensão-deformação que foi apresentada pode ser utilizado para a prática clínica.

SERBETCI et al. (2004), analisaram a adição de HAp ao PMMA em relação as propriedades mecânicas e térmicas do biomaterial resultante. Os experimentos foram realizados em coelhos. Os resultados mostraram que a adição de HAp ao PMMA, aumentou a viscosidade do material tornando-o mais fácil de manipular. A temperatura de polimerização caiu de 111°C para 87°C. A resistência a compressão aumentou de 110 MPa para 122 MPa. Os testes *in vivo* demonstraram compatibilidade biológica deste material. Os autores concluíram que esta mistura de HAp e PMMA pode ser eficientemente utilizada na prática clínica.

KIM et al. (2004), os autores propuseram a formação de um compósito de PMMA / HAp / Quitosana. O estudo deste material foi realizado através da análise de diferentes composições em peso. Os estudos foram desenvolvidos *in vitro* com células osteoblásticas humanas e *in vivo* em coelhos. Os resultados mostraram que a proliferação celular, a biocompatibilidade e a osteocondutividade estavam presentes e foram satisfatórias no composto que apresentava 40% PMMA, 50% HAp e 10% Quitosana quando foram comparados as demais composições e ao PMMA puro. Não foram encontradas características de toxicidade em nenhum dos compostos. Os autores concluem que o composto que foi desenvolvido neste estudo apresenta um potencial clínico e poderá ser utilizado como substituto do cimento ósseo normalmente utilizado na ortopedia.

FILIPCZAK, et al. (2005), os autores desenvolveram matrizes porosas constituídas de PMMA e PCL poly(ϵ -caprolactona) com diferentes microarquiteturas utilizando uma técnica de lixiviação de partículas. Os resultados mostraram que todas as amostras foram altamente porosas com boa interconexão entre os poros. A porosidade das amostras obtidas utilizando grãos de NaCl de tamanho maior foram as que obtiveram resistência mecânica menor. Os escafoldes de PMMA porosos eram muito mais rígidos e duros do que

os de PCL. A cultura de fibroblastos mostrou que a biocompatibilidade da matriz de PMMA é muito melhor do que a de PCL, embora ainda um pouco baixa, ela está na média aceitável para a utilização como biomaterial.

GOTO et al. (2005), os autores desenvolveram três tipos de PMMA bioativado com partículas de titânia (TiO_2). As propriedades mecânicas e a osteocondutividade foram avaliadas. Amostras do biomaterial foram inseridas em tíbias de ratos. A osteocondução foi significativamente melhor na amostra que continha 60% em peso de titânia. A resistência a compressão desta amostra (60% TiO_2) foi equivalente a amostra que só apresentava o PMMA (controle). Os autores concluíram que estes resultados da amostra de 60% de TiO_2 coloca este material entre os que se apresentam como promissor para a substituição do tecido ósseo.

HERNANDEZ et al. (2005), os autores estudaram o PMMA reforçado com fibras naturais. O compósito é formado de PMMA com biofibras de proteína natural de penas de galinha. Este compósito foi analisado por uma série de testes de tração. Posteriormente, as amostras foram analisadas por MEV para a obtenção de uma clara visão dos danos elástico-induzidos. A natureza hidrofóbica da fibra de queratina produziu uma compatibilidade excelente entre a fibra e matriz de PMMA. Normalmente o comportamento rígido do PMMA pode ser modificado usando fibras de queratina como foi demonstrado através de prova de ruptura por tração; enquanto que ao mesmo tempo, o módulo de *Young* deste material composto também aumentou. Os estudos microscópicos realizados na superfície da fratura mostraram boa aderência entre as fibras e a matriz. Os autores concluem com estes resultados que as fibras das penas poderiam ser uma fonte nova de fibras com satisfatórias propriedades. O PMMA é um importante polímero por causa de sua aplicação em campos muito diferentes, um fato considerável para a quantidade de pesquisas existentes e informações sobre este material. O PMMA foi modificado com barro, grafite, partículas de borracha, nanotubos de carbono, diamante, e fibras de carboneto de silicone, entre outros reforços sintéticos.

RIESA et al. (2006), os autores investigaram as propriedades mecânicas do cimento comercial Simplex (PMMA/HAp) em 43 pacientes que sofreram revisão de artroplastia total de quadril. O tempo *in vivo* variava desde 1 mês até 27 anos. As variáveis estudadas foram: resistência à fratura, porosidade, peso molecular, tempo *in vivo* do cimento, o local do cimento *in vivo*, local do cimento em relação ao implante e ao osso. Os autores concluíram após as análises realizadas que a resistência à fratura não teve correlação com o tempo *in vivo* das amostras ou com o peso molecular do cimento. Isto sugere que o tempo *in vivo* possa não ser o fator limitante na integridade mecânica do cimento ósseo. Uma relação significativa e inversa foi achada entre porosidade e a resistência à fratura. Isto mostra que a porosidade é o fator mais importante dentro do comportamento mecânico do cimento ósseo durante o uso *in vivo*.

- **Cirurgias Neurológicas**

BENZEL et al. (1990), os autores realizaram 52 cranioplastias em 47 pacientes em um período de um ano. Foram encontradas infecções em duas cranioplastias e por isso foram removidas. A taxa de infecção para as cranioplastias realizadas utilizando o PMMA ficaram em torno de 3,8%. Estes pacientes fizeram cranioplastia bifrontal. Nenhuma das 43 cranioplastias de seio frontal foi infectada. Dez pacientes desta série de cirurgias fizeram tomografia computadorizada (TC). Constatou-se que pela TC se torna muito difícil o diagnóstico de infecções, embora somente por ela (TC) é que podem ser observadas pequenas mudanças, como ar epidural e inchaço do tecido mole, sendo o único indicador verdadeiramente seguro infecção.

- **Cirurgias de Plástica Reconstructiva (cranioplastia)**

VAANDRAGER et al. (1983), utilizaram o PMMA poroso autopolimerizável em cirurgias para o aumento do volume do crânio. O acrílico poroso, segundo os autores, combina a vantagem da cura se realizar no local do implante e ter uma porosidade semelhante a uma esponja. O PMMA utilizado é um acrílico disponível no mercado. O

agente porogênico utilizado neste estudo foi o CMC. A porosidade ficou em torno de 50% em volume, e a média do diâmetro dos poros foi de 700 μ m. Este experimento foi realizado em macacos. Após o implante ser colocado em osso trabecular os poros foram invadidos em 3 semanas e após 6 semanas não houve nenhum sinal de inflamação ou necrose. No quarto mês, a maioria dos poros foi preenchida com tecido calcificado. Após 1 ano de implante colocado, exames histológicos mostraram a invasão de tecido saudável calcificado do crânio até os músculos onde se uniram ao acrílico pelo crescimento do tecido conectivo. Os autores puderam concluir que pelos resultados obtidos em vários experimentos com animais, o material estudado pode ser utilizado na prática clínica. O uso do acrílico poroso em cirurgias crâniofaciais é recompensador na opinião dos autores. E por fim, os autores não recomendam que este material seja implantado em crianças muito jovens.

Em GOOL et al. (1985), a proposta deste artigo foi mostrar que a cranioplastia utilizando poli (metacrilato de metila) é uma boa alternativa com várias vantagens. Foram inseridas 45 implantes pré-fabricados para cirurgias de cranioplastia. Os defeitos cranianos principalmente foram causados por trauma, remoção de tumor e infecções secundárias de osso após operação intracranial. Muitos implantes foram removidos e trocados pelos pré fabricados. O maior período de observação dos implantes foi de 7 anos e o menor de 4 meses; a média foi de 39 meses. O tamanho dos defeitos variavam de 6 cm² a 175 cm². O paciente mais novo operado tinha 1 ano e o mais velho 74 anos. Não houve complicações no pós operatório. Dois implantes tiveram que ser removidos precocemente 1 ano após a inserção. Alguns dos pacientes tiveram um histórico de infecção crônica antes da cranioplastia com o PMMA ser realizada.

MULLEM et al. (1988a), estes autores foram os pioneiros ao utilizarem o PMMA poroso em uma formulação em que utilizavam como agente formador de poros o carboximetilcelulose (CMC). Neste trabalho os autores descrevem a modificação do tradicional cimento ósseo em PMMA poroso. Através de numerosos experimentos com animais o comportamento do PMMA poroso foi analisado e avaliado nos diversos ambientes biológicos. A avaliação histológica realizada deste trabalho revelou que os tecidos tanto o

tecido mole, quanto o tecido duro prontamente cresceram dentro dos poros neste material, sendo assim permitindo a fixação do implante ao tecido hospedeiro. Os autores relatam também que houve uma diminuição de alguns focos de inflamação com a permanência do implante, juntamente com a variação de números de células multinucleadas gigantes que foram encontradas ocasionalmente nos tecidos e ao redor dos implantes. Os autores relatam que quando o PMMA poroso é implantado em tecido mole comporta-se favoravelmente comparado aos implantes com o PMMA não poroso, isto se deve principalmente a imobilidade destes implantes e a ausência de formação ectópica do tecido duro. Os autores concluem que com os resultados de biocompatibilidade encontrados, o PMMA poroso é indicado e justifica seu uso em cirurgias plásticas reconstrutivas.

MULLEM et al. (1988b), os autores investigaram o crescimento de tecido duro e tecido mole no PMMA poroso *in situ*. Eles utilizaram tamanhos de poros diferentes que variaram de 120µm de diâmetro e foram classificados por eles como poros pequenos e 600µm de diâmetro e que foram classificados como poros grandes. Foi utilizado o CMC para criar uma porosidade interconectada. O material utilizado apresentou uma média que variava de 50-60% do volume em poros. Os implantes foram colocados no osso parietal e frontal de porcos. Após 2 dias e 26 semanas da inserção dos implantes as análises começaram a ser feitas. Inicialmente o CMC foi totalmente dissolvido, acompanhado pela primeira colonização de células nos implantes com poros grandes. Mais tarde foi observado o crescimento dos vasos sanguíneos acompanhado de tecido fibroso conectivo sadio. Por fim todos os poros foram preenchidos com o tecido conectivo. Na sexta semana de crescimento ósseo o implante já estava ancorado. Os autores concluem baseados no resultado deste estudo que o PMMA/CMC, apresentando uma média de poros de 300-1000µm pode ser considerado biocompatível nas aplicações clínicas.

BRUENS et al. (2003), os autores utilizaram o PMMA poroso desenvolvido por WIJN (1982). Os resultados foram avaliados durante um período de 20 anos após a colocação dos implantes. Cirurgias de aumento e de preenchimento de defeitos na região craniofacial, com

especial interesse em defeitos locais e crescimento de tecido ósseo foram o foco das investigações. Os autores avaliaram 14 pacientes após estes anos. A avaliação consistiu de um questionário, um exame físico e de tomografias computadorizadas (TC). Não foram encontrados efeitos locais que pudessem ser designados ao PMMA poroso. Vinte TC mostraram o aumento de osso nas próteses, provando a validade do material implantado. Os autores concluem que o material é prontamente aplicado ao uso clínico em cirurgias deste tipo.

WALKER et al. (2006), os autores utilizaram um material onde o PMMA se transforma em poroso através de uma técnica onde utilizam os íons Fe^{+3} para rapidamente formarem gel em uma reação com o ácido tricarboxílico (BTC). Este PMMA poroso foi utilizado como um liberador controlado de antibiótico. Este gel foi utilizado como modelo de macroporos em polímeros orgânicos. Os autores concluem através de dados obtidos que este material produzido por eles pode ser utilizado prontamente na liberação de fármacos.

MULLEM et al. (1989), por um período de 8 e 24 meses, estudaram as reações da hipoderme de porquinhos da Índia quando colocados implantes acrílicos sólidos e implantes acrílicos porosos (50% vol) e também quatro biópsias humanas de implantes acrílicos subcutâneos porosos foram estudadas com a ajuda de microscópio óptico. Os implantes sólidos foram encapsulados pelo tecido conjuntivo denso. A mobilidade do implante foi comprovada pela perda de 4 entre 36 dos implantes após 2 anos e foi considerada a explicação para a ocorrência de cartilagem ectópica e material mineralizado em alguns implantes sólidos após dois anos. Uma cápsula densa não foi evidenciada nos implantes porosos, ao invés disto, os tecidos conjuntivos vascularizados penetraram e preencheram os poros, ancorando o implante assim ao corpo. Nenhum destes implantes foi perdido. Os autores concluem que apesar da presença de algumas células multinucleadas gigantes, células inflamatórias espalhadas e alguns focos inflamatórios com ambos os materiais do implante, os materiais foram considerados bem-tolerados pelo corpo. A histologia da biópsia humana não diferiu significativamente dos implantes animais porosos.

GETTLEMAN et al. (1980), os autores confirmam a infiltração óssea em polímero poroso. Em investigações prévias, implantes de PMMA de vários graus de porosidade e resistência foram implantados nos ossos longos de babuínos por diferentes períodos de tempo para avaliarem a resposta histológica. Neste estudo os resultados foram avaliados por MEV. Foi observada uma invasão do tecido após 14 dias em direção as irregularidades da superfície e em direção aos poros dos implantes. O tamanho dos poros ficou em torno de 110µm. As análises confirmaram concentrações de cálcio nas áreas aonde há poros no qual se acredita ser infiltrado pelos tecidos duros; nenhum cálcio ficou aparente nas regiões remanescentes das amostras que continham material polimérico. Os autores confirmam as conclusões de prévios estudos que implantaram cilindros poliméricos fabricados com PMMA. Após a remoção dos implantes com 14 semanas, os tecidos foram analisados e foi encontrado osso.

- **Cirurgias Bucomaxilofaciais**

SCHWARTZ et al. (1973), utilizaram o PMMA em uma cirurgia do osso malar direito de um homem de 26 anos que o fraturou em um acidente de carro. Por causa de outras patologias decorridas do acidente o implante foi adiado por um período de quatro meses no qual houve tempo para a formação de um calo ósseo. O tratamento consistiu somente na restauração do contorno facial com uma prótese feita de PMMA. Esta prótese foi inserida por uma abertura intraoral para minimizar as cicatrizes externas. Os autores concluem que somente pela facilidade da utilização do PMMA e de suas características como um bom material aloplástico utilizado frequentemente em cranioplastias é que foi possível após este tempo corrigir com facilidade uma deformação óssea adiantada.

EHRLICH & AZAZ (1975), os autores tiveram o propósito de averiguar a efetividade de substituição imediata de dentes permanentes em homem por dentes artificiais construído de resina acrílica. Dez dentes extraídos foram imediatamente substituídos por dentes artificiais feitos de resina acrílica. Os implantes foram observados clinicamente e radiograficamente por sete anos. Dos dez implantes, seis foram removidos, e quatro ainda

estavam no local implantado até o momento deste relato. O aumento da profundidade aonde se encontra o implante, a retração de gengiva, a mobilidade e a perda de osso dos implantes que ainda estão em uso causarão o afrouxamento destes e eventualmente sua esfoliação. Sendo assim o valor prático dos implantes feitos de resina acrílica é questionável sendo um procedimento limitado. Investigações mais detalhadas a respeito deste material se fazem necessárias antes de seu uso clínico.

KAMEROS (1975), foram estudados 4 casos de artroplastia temporomandibular. Os pacientes foram previamente operados. Os autores concluem que a fácil manipulação e tolerância do tecido ao PMMA fizeram deste um excelente material para a artroplastia temporomandibular.

GOODGER et al. (2005), os autores utilizaram o PMMA como um espaçador temporário de mandíbula. O material apresentou estabilidade funcional permitindo uma rápida cicatrização dos tecidos moles com uma mínima infecção. Os autores relataram que em todos os estudos de caso (3 casos) houve a formação de uma cápsula fibrosa ao redor do implante, mas também sem significância em relação a absorção óssea e com mínima evidência de tecido de granulação. Os autores concluem que a principal vantagem deste implante é para o paciente pela manutenção da estética facial, com pequena evidência de cicatriz na pele.

3 Materiais e Métodos

Foi idealizado a obtenção de corpos de prova, com núcleo denso e com superfície porosa em gradiente funcional, com aproximadamente 80% de porosidade na superfície decaindo para 0% de porosidade em uma espessura de aproximadamente 1,5 mm. Na parte porosa, é conceituado que os poros estejam o máximo possível interconectados com dimensão média entre 50µm a 400µm para crescimento celular e manutenção de vascularização, que a morfologia da porosidade seja oblonga ou arredondada para não concentrar tensão e garantir boas propriedades mecânicas e que suas superfícies sejam bioativas. Um corpo com estas características, uma vez implantado, é esperado que estabeleça um compromisso entre: propriedades mecânicas X irrigação sanguínea X biocompatibilidade.

Para este conteúdo foi elaborada uma seleção de materiais e técnicas de manufatura, disponíveis, economicamente aceitáveis, reprodutíveis e tecnicamente funcionais.

Corpos de prova específicos foram obtidos e analisados para cada caso estudado.

3.1 Materiais

Para este estudo foram selecionados materiais aloplásticos e materiais auxiliares de processo.

3.1.1 Materiais Aloplásticos

Os materiais aloplásticos são aqueles que fazem parte do implante e permanecem em contato físico com o tecido ósseo e meio fisiológico do hospedeiro.

- ✓ Componente matricial: Poli (metacrilato de metila) (PMMA) autopolimerizável.

O PMMA foi selecionado devido a sua extensa aplicação na área médica, ser biocompatível, não condutor térmico nem magnético, ser radiopaco, leve, rígido e relativo baixo valor monetário. O tipo autopolimerizável foi devido a sua facilidade de manufatura. Complementarmente tem boa disponibilidade no mercado, baixo módulo elástico (~ 4 GPa) embora, menor que o desejável (~17-25 GPa) que é o valor médio do osso cortical.

- ✓ Componente bioativo: Hidroxiapatita (HAp)

A hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ foi selecionada devido ao seu reconhecido potencial de osteoindução e reabsorção quando na forma de finos pós. Neste trabalho, a HAp foi estrategicamente posicionada de maneira a favorecer o crescimento ósseo e ao mesmo tempo não prejudicar demasiadamente as propriedades mecânicas do material.

- ✓ Mômero Metil Metacrilato (MMA)

O MMA faz a dissolução parcial (dependente do tempo de processo, quantidade e características do meio ambiente) das esferas de acrílico e promove o *cross link* (ligações entre as esferas).

3.1.2 Materiais Auxiliadores de Processo

Estes materiais são aqueles que participam do processo de manufatura dos implantes, mas não permanecem no implante ou não tem contato com o tecido ósseo nem com o meio fisiológico do hospedeiro.

✓ Sacarose: agente porogênico

A sacarose foi utilizada inicialmente por ser um agente orgânico e facilmente lixiviável em água, apresenta relativa baixa dissolução no MMA que permite manter sua integridade física durante a manufatura até a polimerização.

✓ Carboximetilcelulose (CMC): agente porogênico.

O CMC foi utilizado posteriormente e quando adicionado às quantidades apropriadas de água, adquire a forma de um gel e faz conexões com seus vizinhos adquirindo uma imagem semelhante a contas de um rosário. A baixa solubilidade no MMA, o qual estará em contato no processo de manufatura e a baixa interação permitiram que as ligações intergéis fossem mantidas durante a manipulação.

O carboximetilcelulose sódico (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, solúvel em água, apresenta capacidade de rápida absorção de água que em quantidade controlada se transforma em géis interconectados que definirão as dimensões, morfologia e quantidade dos poros.

A composição química do carboximetilcelulose sódico (CMC) é um éter de celulose obtido pela reação da celulose com hidróxido de sódio, originando a álcali-celulose (Figura 3.1). Da reação da álcali-celulose com monocloroacetato de sódio obtém-se o carboximetilcelulose sódico (CMC). A celulose é constituída de uma longa cadeia de unidades anidrogucose, sendo que cada unidade contém três grupos de hidroxilas terminais. Através da substituição do hidrogênio dessas hidroxilas por grupos carboximetil, obtém-se o carboximetilcelulose sódico (CMC).

Figura 3.1 – Estrutura química do CMC.

O carboximetilcelulose sódico (CMC) de grau purificado apresenta-se como um pó, com coloração de branco a creme, higroscópico, isenta de aglomerações, inodoro, insípido, possuindo uma ampla faixa de viscosidade, com ótima solubilidade em água fria ou quente. Nas concentrações nas quais é utilizado não interfere nas propriedades organolépticas do produto a ser adicionado; é fisiologicamente inerte, não é tóxico e não é agente sensibilizante. Devido a isso tem muitas aplicações em indústrias alimentícias e farmacêuticas. O carboximetilcelulose sódico (CMC) de grau técnico apresenta-se na forma de pó ou grânulos levemente amarelados (creme), com menor grau de pureza (tendo como impurezas os sais de formação).

✓ Água destilada e deionizada

A água destilada e deionizada foi utilizada como agente formador do gel (CMC) e também como solvente para a lixiviação da sacarose e do CMC.

3.2 Características dos Materiais Empregados

- ✓ acrílico comercial auto-polimerizável (PMMA) Vipi Flash (Laboratório Vipi), com diâmetro médio $15\mu\text{m}$, densidade $1,18\text{g/cm}^3$, peso molecular 9×10^4 , e a área da superfície específica igual a $1\text{ m}^2/\text{g}$;
- ✓ monômero Metil Metacrilato (MMA) Vipi Flash (Laboratório Vipi), pureza de 99,09%. O líquido MMA inclui 0,9% de dimetiltoluideno (DMT) e 0,1% de hidroquinona, um inibidor;
- ✓ hidroxiapatita (HAp) comercial Fluka do laboratório Sigma – Aldrich – 289396, o grau de pureza do pó cerâmico foi estabelecido em torno de 99,95% em peso; este material apresenta pureza que atende a norma ASTM 1185-03 (*Standard Specification for Composition of Hidroxiapatite for Surgical Implants*), os grãos consistem de formas irregulares e de partículas não porosas;
- ✓ sacarose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ comercial Synth (LABYNTH produtos para laboratórios Ltda);
- ✓ carboximetilcelulose (CMC) $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Na}_8\text{O}_{27}$ do laboratório Sigma - Aldrich – C 5678, com densidade $1,59\text{g/cm}^3$.

3.3 Formulações Estudadas e Manufatura

3.3.1 Porosidade com Sacarose como Agente Porogênico

A busca ideal seria o compromisso entre: o maior volume de poros, maior propriedade mecânica e maior interconectividade dos poros.

Inicialmente utilizou-se a sacarose como agente porogênico. Baseado na porosidade final planejou-se a formulação da Tabela 3.1, onde se tem pares de corpos com e sem HAp. A Tabela 3.1 também mostra a quantidade em peso de cada material e suas respectivas concentrações que foram utilizadas nas várias rotas de processamento da matriz porosa.

Tabela 3.1 – Quantidade dos materiais utilizados na manufatura da matriz porosa

Materiais	A		B		C		D		E		F		G		H	
Porosidade (%)	80		75		70		70		60		60		50		40	
	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)	Vol (%)	Peso (g)
PMMA	20	0,118	20	0,118	30	0,177	24	0,142	40	0,236	32	0,189	50	0,295	50	0,295
MMA	-	0,236	-	0,236	-	0,354	-	0,284	-	0,472	-	0,378	-	0,590	-	0,590
Sacarose	80	0,532	75	0,499	70	0,466	70	0,466	60	0,399	60	0,399	50	0,333	40	0,266
HAp	-	-	5	0,079	-	-	6	0,095	-	-	8	0,126	-	-	10	0,158
Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Manufatura da estrutura porosa à partir de sacarose como agente porogênico

A técnica de manufatura das matrizes porosas bioativas obtidas pela mistura de PMMA / HAp e sacarose como agente porogênico está representada pelo fluxograma ilustrado na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Diagrama de fluxo da metodologia utilizando sacarose

3.3.2 Porosidade com CMC como agente porogênico

Buscando pela otimização das propriedades mecânicas, melhoria do formato e tamanho dos poros e pela maior interconectividade entre os poros, elaborou-se as formulações mostradas na Tabela 3.2, agora utilizando o CMC na condição de gel como agente porogênico.

Tabela 3.2 – Quantidade dos materiais utilizados na manufatura da matriz porosa

Materiais	Implante A		Implante B		Implante C		Implante D	
Porosidade Total (%)	80		75		77.8		66.7	
PMMA	20% vol.	0,118g	20% vol.	0,118g	20%	0,118g	30%	0,177g
MMA	-----	0,236g	-----	0,236g	-----	0,236g	-----	0,354g
CMC	80% vol.	0,0287g	75% vol.	0,027g	77.8%	0,028g	66.7%	0,024g
Água	-----	0,382g	-----	0,358g	-----	0,371g	-----	0,318g
Hap	-----	-----	5% vol.	0,079g	2.2%	0,035g	3.3%	0,052g

- Manufatura da estrutura porosa à partir do CMC como agente porogênico

A técnica de manufatura das matrizes porosas bioativas obtidas pela mistura de PMMA / HAp e carboximetilcelulose como agente porogênico está representada pelo fluxograma ilustrado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Diagrama de Fluxo da metodologia utilizando CMC.

A Figura 3.4 ilustra o processo onde o CMC é eliminado e em seu lugar ficam os poros na matriz e também ilustra o processo de polimerização continuada em água aquecida.

Figura 3.4 - Ilustração da lixiviação do CMC

3.3.3 Estrutura com Gradiente Funcional

A manufatura desenvolvida neste trabalho é baseada no conceito de corpo denso-poroso com gradiente bioativo funcional (Figura 3.5). É composta de duas formulações, que dão origem a duas partes distintas formadoras da estrutura.

Figura 3.5 – Ilustração da estrutura de gradiente funcional

A primeira parte é denominada de parte porosa bioativa, e a segunda parte é denominada de parte densa. A parte porosa bioativa foi produzida pela mistura da HAp (4.1 peso %), PMMA (14.0 peso %), MMA (42.0 peso %), carboximetilcelulose (CMC) (1.9 peso %), e água (38.0 peso %). E a parte densa é preparada com a mistura de PMMA (33.3 peso %) e MMA (66.7 peso %).

O processo de manufatura envolve seis estágios.

No primeiro estágio processa-se a parte porosa bioativa. O PMMA em pó ($\varnothing$ 8.0 μ m) é misturado a HAp em pó e ao CMC em pó ($\varnothing$ equivalente 3.0 μ m); então a água é adicionada a mistura e neste estágio o CMC adquire a forma de gel formando uma rede tridimensional, finalmente o MMA é adicionado e o processo de polimerização é iniciado. O comportamento plástico do material permite que a mistura seja transferida para a superfície do molde manualmente, não excedendo 5 minutos.

No segundo estágio, a parte porosa bioativa é depositada manualmente dentro da superfície do molde, formando uma camada média de 1mm.

O terceiro estágio está relacionado com a estrutura de gradiente funcional que é obtida pela colocação imediata da parte densa através de espatulamento elevando a camada de gradiente para 1,5mm.

No quarto estágio, o molde é finalmente preenchido com a parte densa e fechado.

No quinto estágio o molde fechado é prensado isostaticamente, em autoclave ao ar, a 0.2 MPa durante 40 minutos.

No sexto estágio o molde é colocado em autoclave a 0,2 MPa em água fervente, por 40 minutos, para se completar a total polimerização e eliminação do MMA residual.

A Figura 3.6 ilustra uma seção de um corpo de prova processado de acordo com o processo de manufatura desenvolvido.

Figura 3.6 – Estrutura com gradiente funcional

3.3.4. Corpos de prova manufaturados

Para os ensaios *in vitro* foram manufaturados copos de prova no formato de pastilhas Ø6 x 2mm e foram formulados para 80% vol e 66,7% vol de poros.

Para os ensaios mecânicos, utilizou-se de corpos cilíndricos com dimensões Ø12,7mm X 25,4mm, segundo as normas ASTM D695-96.

Para os ensaios *in vivo* foram manufaturados corpos de prova com dimensões aproximadas de Ø 3mm X 2mm e com aproximadamente 80% de porosidade.

3.4. Ensaio Realizados

Para investigação do biomaterial os meios de testes *in vitro* e *in vivo* foram nesta ordem mandatórios na busca da caracterização da biocompatibilidade, incluindo

propriedades osteogênicas e osteointegração. Os testes mais comuns em um implantado ósseo são os histológicos, histomorfométricos, as microscopias eletrônicas e as investigações mecânicas. Estes testes fornecem uma caracterização satisfatória das propriedades osteogênicas e de osteointegração do material mostrando os potenciais de substituto ósseo.

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A macroestrutura, forma e distribuição dos poros das amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com 20nm de ouro em um metalizador BALSERS modelo SDC 050 e mantidas em dessecador até o momento de análise. Nesta análise, as superfícies fraturadas das amostras de PMMA poroso e PMMA poroso/HAp examinadas foram previamente metalizadas com uma fina camada de ouro e então rastreadas com um feixe de elétrons, que é refletido e coletado. A imagem obtida representa as características da superfície de fratura.

3.4.2 Análise Química por EDX ou EDS (Energy Dispersive X-ray)

A verificação da eficiência do processo de distribuição e incorporação da HAp à matriz de PMMA foi obtida pela análise química da superfície de fratura das amostras de PMMA poroso e PMMA poroso/HAp. Foram utilizados os recursos de EDX no Microscópio Eletrônico de Varredura. O microscópio utilizado foi LEO modelo 440 disponibilizado pelo CAQI – IQSC – USP.

3.4.3 Ensaio de Resistência Mecânica de Compressão

Os ensaios foram realizados em uma Máquina de ensaio Emic DL 10000 – Célula Trd 25 – disponibilizada pelo SMM – USP, no laboratório de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística. Durante os ensaios foi aplicada uma taxa de compressão de 6 mm/mim. Os testes de compressão foram desenvolvidos de acordo com a norma ASTM D695-91.

3.4.4. Ensaio *in vitro*

Os testes realizados *in vitro* objetivaram analisar a toxicidade dos materiais constituintes das amostras que neste ensaio tiveram a seguinte denominação: amostra de PMMA poroso e amostra de PMMA poroso/HAp. Os testes que seguiram foram de avaliação morfológica da interação célula-material. Todos os testes de cultura celular (*in vitro*) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia animal do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL) em Espírito Santo do Pinhal – SP. O processamento foi feito no Laboratório de Biomecânica Ortopédica na Faculdade de Medicina da UNICAMP – Campinas - SP e as análises morfológicas foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP – Campinas - SP. Os testes *in vitro* realizados consistiram em inocular o mesmo número de células nas diferentes amostras e posterior análise morfológica da interação célula-material.

- **Cultura Celular**

Foram utilizadas as células VERO, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida originários do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) obtidas originalmente junto ao Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo-SP. Estas células foram mantidas em meio Ham F-10 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO- USA) suplementado com

10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Nutricell, Campinas-SP-Brasil) a 37°C. As células VERO são uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (ISO, 1992, KIRKIPATRIC, 1992) e foram utilizadas para o desenvolvimento do Ensaio de Citotoxicidade Indireta e Direta. A Figura 3.7 ilustra uma amostra em contato com células em ensaios realizados *in vitro* e a Figura 3.8 ilustra o crescimento de células pelo biomaterial.

Figura 3.7 – Ilustração do ensaio de citotoxicidade direta.
Fonte: Autoria própria.

Figura 3.8 - Ilustração das células espalhadas pelo biomaterial.
Fonte: Desconhecida.

3.4.5 Ensaios *in vivo*

▪ Procedimento Cirúrgico Experimental

A metodologia cirúrgica utilizada neste trabalho experimental servirá de estudo para as possíveis modificações até que se chegue a um procedimento final. Estas mudanças envolvem principalmente o animal a ser utilizado para a colocação do implante, o tamanho do implante, o osso a ser operado e o procedimento cirúrgico propriamente dito.

• Estudo Piloto

O estudo piloto foi realizado com dois animais, sendo que em cada animal um procedimento cirúrgico diferente foi realizado para a colocação do implante. As principais características do estudo piloto serão descritas a seguir.

Colocação do implante na transversal

Foram utilizados 2 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) machos, adultos jovens com peso corporal de aproximadamente 300 gramas. Os animais dessa pesquisa foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), e mantidos durante o estudo no Biotério da Bioengenharia (EESC- USP).

Todo instrumental cirúrgico desse estudo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. As cirurgias foram realizadas em fluxo laminar, cujo local, foi previamente descontaminado com álcool 70°. Os animais foram anestesiados via intramuscular com Ketamina, na dose de 0,1 ml/100 gramas de peso corporal, associado com o relaxante muscular Cloridrato de Tiazina na dose de 0,01 ml/ 100 gramas de peso corporal. Foi

realizada depilação no local do fêmur de cada animal e, em seguida a anti-sepsia local com rifocina. O implante colocado nos animais foi previamente esterilizado com formalina.

Um defeito com dimensões aproximadas de $\varnothing$ 5.9 mm e de 2mm de profundidade foi confeccionado de modo que o implante fosse colocado na transversal (Figura 3.9 (a)), e o outro defeito foi confeccionado de modo que o implante fosse colocado longitudinalmente (Figura 3.9 (b)). Utilizou-se um micromotor em baixa rotação com uma broca de uso odontológico. Este tipo de motor é utilizado na tentativa de reduzir a necrose do tecido ósseo manipulado. Inicialmente foi escolhido o fêmur do rato pelo fato dele apresentar dimensões apropriadas para a colocação do implante cilíndrico ($\varnothing$ 5.9 mm e 2 mm de profundidade).

O animal foi posicionado em decúbito lateral para o ato cirúrgico. A área de trabalho não é irrigada com vasos de longo calibre. Fez-se uma incisão retilínea na face anterior do fêmur cerca de 3 cm. de extensão. O periósteo, incisado longitudinalmente, foi mantido aderente à musculatura adjacente, sendo afastado em bloco junto com ela, expondo, assim, o fêmur. A perfuração foi realizada atingindo-se a medula. Durante todo o procedimento, o local de incisão foi limpo e umedecido com soro fisiológico para manter a assepsia do local e diminuir o risco de necrose no osso. Após o defeito concluído de acordo com a necessidade de colocação do implante, o mesmo foi colocado com auxílio de uma pinça e posicionado manualmente. A Figura abaixo ilustra o fêmur dos animais com o defeito realizado na transversal (a), e em (b) com o defeito realizado de modo longitudinal.

Figura 3.9 - Ilustração dos defeitos realizados no fêmur.

Após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos em uma gaiola coletiva e conservados dentro das melhores condições de higiene possíveis até a data do sacrifício.

Foram realizadas radiografias dos fêmures operados imediatamente após a colocação do material e antes do sacrifício (Figura 3.10 (b)). Os dois animais foram sacrificados 45 dias após a cirurgia de implante.

Figura 3.10 - (a) Medidas do animal; (b) Radiografia do fêmur.

Figura 3.11 - (a) Fêmur fraturado; (b) Avulsão do implante e o implante na epiderme do animal.

Os resultados obtidos com o estudo piloto nos mostraram que os animais não suportaram o implante devido às suas dimensões. Houve uma fratura do fêmur (Figura 3.10 (a)) com conseqüente avulsão do implante (Figura 3.11 (b)). Sendo assim, para o procedimento cirúrgico final deste trabalho serão utilizados coelhos da raça Nova Zelândia.

■ Procedimento Cirúrgico Final

Foram comparados implantes de PMMA poroso com hidroxiapatita polimerizados *in situ* denominados **implantes controle** e implantes de PMMA poroso com hidroxiapatita pré polimerizados denominados **implantes teste**.

Realizou-se um estudo de caso com 10 animais, coelhos machos, albinos, de idade adulta e da linhagem Nova Zelândia com peso variando entre 2,600 e 3,200 Kg. Os implantes teste foram implantados no fêmur direito dos animais, e os implantes controle no fêmur esquerdo dos animais. Os 10 animais foram sacrificados com 45 dias.

Foram seguidos os princípios cirúrgicos de implante de biomateriais de acordo com (MENDENHALL, 1995). Todo o instrumental cirúrgico foi lavado e posteriormente esterilizado em estufa. Os implantes teste foram previamente esterilizados em óxido de etileno, enquanto que os implantes controle não puderam ser esterilizados, mas mantiveram-se as condições necessárias de higiene até o momento da utilização.

A indução anestésica foi feita mediante injeção intramuscular de uma mistura de Ketalar (cloridrato de cetamina – Parke Davis) e Rompum (cloridrato de xilidino-dihidrotiazina – Parke Davis) em doses proporcionais ao peso de cada animal. Após a perda de consciência foi feita a tricotomia do membro a ser operado e a limpeza com solução anti-séptica Rifocina (rifamicina SV sal sódico – Hoechst Marion Roussel). Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito lateral direito e esquerdo para o ato cirúrgico e, então, foi colocado o campo cirúrgico em volta da região a ser operada, garantindo a assepsia do local (Figura 3.12).

Figura 3.12 - (a) Assepsia do local a ser operado; (b) Colocação do campo cirúrgico.

As cirurgias para a colocação dos implantes foram realizadas com uma perfuração próxima ao trocânter maior do fêmur. Foi utilizado como parâmetro anatômico o trocânter maior do fêmur. Este local foi o preterido por apresentar alta resistência à fratura, ser de fácil acesso, apresentar pouca irrigação e pouca mobilidade.

Para fazer as perfurações foi utilizado um modular, modelo CIRURVETER (MG Ind. Médica Odontológica Ltda) acoplado a uma caneta odontológica, modelo Futura (Dent-Flex) com motor de alta rotação para cirurgias. O modular possui um tanque reservatório para o uso de água ou soro fisiológico para a refrigeração da caneta, a qual pode ser esterilizada em estufa até 135°C.

Este equipamento permitiu a irrigação com soro fisiológico mantendo uma constante refrigeração no sítio cirúrgico. Foi também utilizada uma broca-serra para cortar o osso após o sacrifício.

Foi feita uma incisão retilínea na face lateral da coxa direita e da coxa esquerda (Figura 3.13 a), próximo ao trocânter maior do fêmur, de cerca de 3 cm de extensão. O perióstio foi incisado longitudinalmente e mantido aderente ao tecido tendinoso adjacente, sendo, este bloco afastado a fim de expor o osso do fêmur (Figura 3.13 b). A perfuração foi realizada perpendicularmente ao eixo longitudinal da diáfise do fêmur (Figura 3.14 a). Durante todo o procedimento, o local de incisão foi limpo e umedecido com soro fisiológico,

tomando os máximos cuidados com a limpeza e esterilização dos materiais em estufa e campo de trabalho. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas convencionais. No início da realização das perfurações foi aplicada uma injeção local intramuscular de Citocaína 3% com Felipressina (cloridrato de prilocaína com felipressina – 0,03 UI/ml – Innovatec).

As perfurações foram iniciadas com uma broca odontológica de 2 mm (Figura 3.14 a), logo após eram trocadas por uma trefina de 3 mm (Figura 3.14 b) utilizada em cirurgias de implante. Esta trefina determinava o tamanho final do defeito ósseo, tanto o diâmetro quanto a profundidade (aproximadamente $\varnothing$ 3 mm e 2 mm de profundidade).

Nas perfurações do fêmur direito foram colocados os implantes teste (Figura 3.15 a); nas perfurações do fêmur esquerdo foram colocados os implantes controle (Figura 3.15 b). O periósteo foi reposicionado e aponeurose e a pele foram suturadas com fios de náilon 4–0 por pontos separados.

Após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais dentro das melhores condições de higiene até a data do sacrifício com ração e água *ad libitum*. O sacrifício deu-se por meio de anestesia geral com Rompum (relaxante muscular) seguido de Ketalar (sedativo); estando o animal profundamente sedado, foi aplicado 1 ml de Zoletil 50 (Virbac) na cavidade cardíaca, monitorando o animal até o óbito.

a)

b)

Figura 3.13 – (a) Incisão retilínea (b) Exposição do osso.

a)

b)

Figura 3.14 – (a) Início com broca 2mm (b) Final com trefina 3mm .

a)

b)

Figura 3.15 – (a) Colocação do implante controle (lado direito) (b) Colocação do implante teste (lado esquerdo).

3.4.6 Rugosidade Superficial

A rugosidade superficial dos implantes depende do seu grau de acabamento obtido durante o processo de fabricação. Valores de rugosidade média de $100\mu\text{m}$, sob o ponto de vista mecânico, facilitam a distribuição de tensões. A rugosidade entre $100\mu\text{m}$ e 10 nanômetro encontra-se na faixa do tamanho das células e grandes moléculas e influenciam na interface biológica, bem como influenciam o campo eletromagnético local e podem alterar as forças de ligação de van der Waals. Rugosidades com escala atômica criam sítios de ligação química para diferentes moléculas. Assim, a adesão das células é influenciada pela rugosidade superficial com valores acima de nanômetro. Do ponto de vista fisiológico, a superfície rugosa em relação à superfície lisa oferece vantagem, uma vez que melhora a proliferação do osso (LIMA, 1995).

Os ensaios de rugosidade das amostras de PMMA poroso foram realizados em um rugosímetro portátil da marca Taylor Hobson, modelo: surtronic 3+ disponibilizado pelo laboratório de metrologia do LAMAFE/SEM da EESC – USP.

3.4.7 Porosimetria de Mercúrio

A porosimetria por injeção ou intrusão de mercúrio tem sido extensivamente utilizada como uma técnica experimental para se caracterizar vários aspectos dos materiais porosos e dos pós.

Porosimetria por intrusão de mercúrio é uma técnica que consiste em acondicionar uma amostra de material em uma câmara, envolvê-la com mercúrio, aplicar incrementos de pressão e medir o volume de mercúrio que penetrou na amostra.

A análise dos resultados do ensaio de porosimetria por intrusão de mercúrio possibilita obter informações indiretas sobre a permeabilidade, morfologia da porosidade e a resistência de determinados materiais (COOK, 1993).

Os resultados são expressos em gráficos cujas ordenadas são: o volume de mercúrio intrudido versus a pressão aplicada sobre o mercúrio. A partir da equação (A) de Washburn (1921) apud Cook é possível relacionar a pressão que causa a entrada do mercúrio na amostra com o tamanho do poro.

$$d = \frac{-4\gamma \cos \theta}{p} \quad (A)$$

Onde:

d = diâmetro equivalente do poro intrudido;

γ = tensão superficial do mercúrio;

θ = ângulo de contato entre o mercúrio e a parede do poro;

p = pressão aplicada no mercúrio.

Os ensaios de porosimetria por intrusão de mercúrio nas amostras de PMMA poroso foram realizados em um porosímetro de mercúrio, modelo: PORE SIZER - 9310 - MICROMERITICS - USA disponibilizado pelo GCCMC - Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos - laboratório de caracterização dos materiais – IFSC.

4 Resultados e Discussão

O desempenho das matrizes porosas manufaturadas em PMMA poroso e PMMA poroso/ HAp, foi avaliado quanto à resistência mecânica à compressão, ensaios *in vitro* (citotoxicidade) e ensaios *in vivo* (morfologia da interação célula-material).

4.1 Acrílico utilizado para a manufatura das matrizes

A Figura 4.1 (a) ilustra a fase em pó do PMMA. A Figura 4.1 (b) ilustra o pó de PMMA adicionado a hidroxiapatita. As partículas atraídas sobre as esferas do PMMA são observadas.

Figura 4.1 – MEV (a) Pó de PMMA não modificado aumento 500X e (b) o pó de PMMA modificado com HAp. As partículas de HAp são depositadas nas esferas de PMMA aumento 500X.

4.2 Corpos Porosos

4.2.1 Corpos porosos à partir de sacarose

As Figuras 4.2 à 4.4 mostram poros com cantos oblíquos, poros fechados e microporos. Estas características certamente promovem prejuízos nas propriedades

mecânicas e não favorecem a atividade biológica (quando fechados ou muito pequenos) e os cantos oblíquos não mimetizam a natureza do tecido trabecular. Outra desvantagem encontrada foi em relação à lixiviação da sacarose, que não apresentou sua remoção facilitada. Em algumas amostras após a fratura, constatou-se a presença de sacarose após o processo de lixiviação.

Figura 4.2 – (a) e (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e utilizando a sacarose como agente porogênico. Aumento 100X.

Figura 4.3 – (a) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e com a sacarose como agente porogênico. (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita em outro método de processamento. Poros menores e mais arredondados. Aumento de 200X.

Figura 4.4 – (a) e (b) Superfície fraturada do PMMA poroso modificado com hidroxiapatita e utilizando a sacarose como agente porogênico. Em (a) Aumento 100X; em (b) aumento 200X.

▪ Análise Química por EDX das Formulações Baseadas em Sacarose

A Figura 4.5 mostra o espectro de EDX de uma superfície fraturada da amostra de PMMA poroso misturado a HAp. Nestas amostras o agente porogênico utilizado foi sacarose. Ressaltam-se, ao observar a Figura 4.5, a presença de Oxigênio (75,12%), Fósforo (8,27%) e Cálcio (16,62 %), valores de percentual de elementos químicos presentes na hidroxiapatita excetuado o carbono. Esta análise foi realizada próxima a superfície de incorporação e mostra qualitativamente que houve a incorporação da hidroxiapatita na matriz de PMMA.

Figura 4.5 – Espectro da análise química da superfície exposta.

A Figura 4.6 mostra o mapeamento de EDX da amostra analisada. Nesta Figura verifica-se a presença de elementos exclusivos da hidroxiapatita como o fósforo e o cálcio.

Pela técnica de manufatura utilizada com sacarose constatou-se que a HAp estava presente também no interior da matriz, posição não interessante uma vez que, a HAp não exposta ao fluido fisiológico não tem condições de exercer sua função osteoindutiva.

Figura 4.6 – O mapeamento de EDX nas amostras de PMMA/Sacarose incorporado a HAp

4.2.2 Corpos Porosos à partir de CMC

A obtenção da estequiometria água x CMC (10g /20g) gerou uma estrutura parecida com um rosário pela interligação dos géis, a Figura 4.7 ilustra duas formas do CMC em microscopia óptica: (a) hidratada e (b) seca.

Figura 4.7 – (a) Imagem em microscópio óptico do CMC na forma de gel; (b) Imagem em microscópio óptico do CMC na forma seca, antes da hidratação.

Os corpos porosos obtidos pela técnica baseada no CMC estão representados pelas Fig. 4.8 à 4.10, as quais ilustram os resultados pelas imagens em MEV.

A Figura 4.8 ilustra a estrutura obtida, porém são observadas esferas de PMMA com a manutenção da sua forma esférica original que foi devido à relação PMMA/MMA, neste caso de 50% x 50% em peso. A rápida evaporação do MMA nesta quantidade (manipulado em ambiente de 25°C a 60% umidade relativa) diminui a eficiência de sua interação com a superfície das esferas.

a)

b)

Figura 4.8 – Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 50X.
(b) Aumento 100X.

Na Figura 4.9 a relação PMMA/MMA foi aumentada para 40x60 respectivamente quando observa-se a diminuição da integridade das esferas de acrílico. Melhoria da evolução das interconexões entre os poros também foi observada devido a melhor plasticidade da mistura e maior tempo de processo.

Figura 4.9 – Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 500X. (b) Aumento de 50X.

A Figura 4.10 ilustra uma superfície obtida com esta formulação. É observado a porosidade interconectada e aberta e a mimetização do tecido ósseo trabecular.

Figura 4.10 – (a) Superfície externa com porosidade aberta; aumento 200X.
(b) Superfície fraturada do PMMA poroso; aumento de 500X.

As Figuras 4.11 e 4.12 ilustram imagens da estrutura pelo emprego da relação PMMA/MMA igual a 33,3 x 66,7 respectivamente, manipulado em ambiente de 25°C a 60% umidade relativa. Observa-se uma estrutura mais semelhante às trabéculas ósseas, que foi considerada biomimética.

Figura 4.11 – Superfície fraturada do PMMA poroso (a) Aumento de 1470X. (b) Aumento de 800X.

Figura 4.12 – Superfície fraturada do PMMA poroso. (a) Aumento de 900X. (b) Aumento de 2500X.

▪ Análise Química por EDX das Formulações Baseadas em CMC

A Figura 4.13 mostra o mapeamento de EDX da amostra analisada. Nesta Figura verifica-se a presença de elementos exclusivos da hidroxiapatita como o fósforo e o cálcio.

Pela técnica de manufatura utilizada com o CMC também constatou-se que a HAp estava incorporada na matriz, novamente verificou-se a sua incorporação também no interior de partes densas, posição não interessante uma vez que, a HAp não exposta ao fluido fisiológico não tem condições de exercer sua função osteoindutiva. A Figura 4.14 apresenta o espectro da análise química da superfície exposta.

Figura 4.13 – O mapeamento de EDX nas amostras de PMMA/CMC incorporado a HAp

Figura 4.14 - Espectro da análise química da superfície exposta

4.3. Resultados do Ensaio de Compressão

A Tabela 4.1 mostra os resultados dos ensaios de compressão que foram feitos nos corpos de prova densos (somente PMMA), nos corpos de prova poroso à partir do CMC, nos corpos de prova poroso à partir do CMC com a incorporação da HAp, corpo de prova com gradiente funcional com HAp na fase porosa.

Tabela 4.1 - Resultados do Ensaio de Compressão

Resistência Máxima à Compressão (Kgf) dos Corpos de Prova		
Corpos de Prova	Tensão Média (MPa)	Deformação até o Limite Resistência Máx. à Compressão □ (%)
PMMA Denso	101,5	9,1
PMMA Poroso (80 vol %)	17,7	45,3
PMMA Poroso_HAp (66.7 vol%)	77,4	17,1
PMMA com estrut. Gradiente Funcional com fase porosa de 80 vol%	49,8 ± 2,27	7,2 ± 0,52

Observa-se que o PMMA denso apresentou resistência a compressão média de 101,5 MPa, menor que valores de resistência média encontrada no osso humano compacto citada Yang et al (2001) entre 130 a 180 MPa e, maior que o osso esponjoso com valores de resistência à compressão entre 4 a 12 MPa. Quando feito poroso em 80 vol% o valor médio

diminui consideravelmente para 17,7 MPa, e quando adicionado de hidroxiapatita a 66,7 vol% de vazios houve uma diminuição não tão expressiva para 77,4 MPa. No ensaio do corpo com estrutura funcional obteve-se uma média de 49,8 MPa com a camada porosa a 80 vol% houve uma redução significativa (~50%) comparada com o PMMA denso porém muito superior ao totalmente poroso a 80 vol%.

Se for idealizado um modelo do corpo de prova com uma camada porosa a 80 vol%, de diâmetro 12,7 e espessura 1,5 e um tarugo interno de diâmetro 9,7mm e neles aplicar as tensões obtidas para os corpos totalmente porosos e totalmente denso apresentadas na Tabela 4.1 deveria-se obter 67,5 MPa, maior que o encontrado 49,8 MPa somado ao fato de que o colapso se iniciou a 7,2 % de deformação antes do observado para o corpo denso, sugere-se que a porosidade externa forneceu trincas superficiais para a propagação de trincas na região densa.

Os valores encontrados para peças manufaturada a mão mostram que há importância em projetar peças com estrutura de gradiente funcional onde é combinada a alta porosidade adicionada de hidroxiapatita com núcleo denso. O valor aparentemente 50% inferior pode ser otimizado se a relação: espessura do implante / espessura média da camada porosa for maior e a aplicação da camada porosa for mecanizada.

4.4. Testes de Toxicidade

- Ensaio de Citotoxicidade Indireta

Para a avaliação da Citotoxicidade Indireta as amostras a serem estudadas (PMMA poroso e PMMA poroso/ HAp) foram incubadas em meio Ham F-10 com 10% de soro fetal bovino à 37°C na proporção de 0,2g/ml de meio Ham F-10 por 48 horas, segundo normas

internacionais (ISO 1992, KIRKIPATRIC, 1992). O objetivo é a extração de possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras.

Após a obtenção do substrato para testes, uma suspensão celular na concentração de 1×10^5 células/ml foi inoculada em placas de 24 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C. Após este período de cultivo, o meio de cultura presente na placa foi trocado pelos meios obtidos com extratos das amostras de PMMA poroso e PMMA poroso/HAp e então as células foram cultivadas nestas condições por um período de mais 24 horas a 37°C. Foi utilizado como controle positivo (+) de toxicidade uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 3% de fenol e como controle negativo (-) de toxicidade o extrato de poliestireno. Decorrido o período de cultivo de 24 horas foram feitas imagens das células vivas em contraste de fase utilizando microscópio invertido Olympus IX-50 e foram também contadas em microscopia invertida, sem qualquer fixação. Foram contados 3 campos aleatórios por poço e estabelecida a média para cada poço. O número de poços contados foi igual a 6. A análise estatística foi feita pelo teste *One Way Anova*, com nível de significância de 0.05%.

- Ensaio de Citotoxicidade Direta

Este ensaio visa a observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direto das mesmas com o material estudado. Para avaliação da citotoxicidade direta, células VERO foram cultivadas diretamente sobre as amostras de PMMA poroso e PMMA poroso/HAp em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37° C por 24h. Novamente, foi utilizado como controle positivo (+) de toxicidade uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 3% de fenol e como controle negativo (-) de toxicidade o extrato de poliestireno. Após as 24h de incubação, foram feitas imagens das células vivas em microscópio invertido Olympus IX-50 e também foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram contados 3 campos aleatórios por poço e estabelecida a média

para cada poço. O número de poços contatos foi igual a 6. A análise estatística foi feita pelo teste *One Way Anova*, com nível de significância de 0.05%.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram fixadas com Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 2 horas. Após lavagem em tampão, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de álcool. As amostras foram secas em ponto crítico (Balzers CPD030) e recobertas por ouro em *sputtering* (Balzers SCD050). As observações foram feitas utilizando-se o microscópio JEOL JSM-5800 LV.

As Figuras 4.15 a 4.19 ilustram os resultados dos ensaios *in vitro* através das imagens realizadas em MEV denominadas amostra **01** e que correspondem ao PMMA poroso/HAp.

As Figuras 4.20 a 4.23 ilustram os resultados dos ensaios *in vitro* através das imagens realizadas em MEV denominadas amostra **02** correspondentes ao PMMA poroso.

Amostras 01

Figura 4.15 - Amostra 01(a) Aumento 750 X e Amostra 01 (b) Aumento de 1000X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. Observe células alongadas e bem espalhadas sobre o substrato.

Figura 4.16 - Amostra 01(a) Aumento 1500X. Amostra 01 (b) Aumento de 1500X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. Novamente, se observa células bem espalhadas, indicando boa interação com a superfície de crescimento.

Figura 4.17 - Amostra 01(a) Aumento 1000 X e Amostra 01 (b) Aumento de 1500X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. O padrão se mantém com células bem espalhadas sobre o material.

Figura 4.18 - Amostra 01(a) Aumento 1000 X e Amostra 01 (b) Aumento de 250X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero.

Figura 4.19 - Amostra 01(a) Aumento 150 X e Amostra 01 (b) Aumento de 250X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero.

■ Amostras 02

Figura 4.20 - Amostra 02(a) Aumento 500 X e Amostra 02(b) Aumento de 1500X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. Observamos células bem espalhadas sobre o material. A superfície celular aparece bastante lisa.

Figura 4.21 - Amostra 02(a) Aumento 500 X e Amostra 02 (b) Aumento de 500X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. Novamente, observamos células bem espalhadas no material. Interessante ressaltar que nos poros as células parecem não interagir com toda a superfície de contato.

Figura 4.22 - Amostra 02(a) Aumento 1500 X e Amostra 02 (b) Aumento de 250X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero. Células bem espalhadas e de morfologia levemente alongadas são vista, principalmente em (a).

Figura 4.23 - Amostra 02. Aumento 500 X. O círculo em vermelho assinala o local aonde houve o crescimento de células Vero.

- **Resultados Quantitativos e Qualitativos das Amostras**

A Figura 4.24 mostra os dados referentes a análise qualitativa para a toxicidade indireta e direta. Podemos observar que as células que cresceram em contato com as amostras na situação controle negativo (Figura 4.24 A) apresentaram-se bastante achatadas e espalhadas sobre o substrato. Observamos células com a cromatina frouxa e nucléolo evidente, indicando grande atividade celular. Por outro lado, as células presentes com contato com as amostras do controle positivo de toxicidade (Figura 4.24 B) mostram sinais de morte celular, com retração citoplasmática e morfologia arredondada. Alguns vacúolos podem ser visualizados. Alguns fragmentos celulares podem ser vistos a deriva no meio de cultura, indicando fragmentação das células.

As amostras incubadas com os extratos das diferenças estudadas apresentaram um padrão morfológico muito semelhante ao observado no controle negativo e bastante diferente do controle positivo, indicando não toxicidade das amostras (Figuras 4.24 C e 4.24 D, respectivamente).

Quanto a toxicidade direta, pode-se observar que as células cultivadas na presença das amostras de PMMA poroso e PMMA poroso/HAp (Figuras 4.24 E e 4.24 F, respectivamente), se encontravam bem espalhadas e alongadas. Em ambos os casos observamos células com nucléolo evidente e cromatina descondensada. Uma vez mais, os dados qualitativos apontam para não toxicidade.

Figura 4.24 - Toxicidade indireta e direta das amostras de PMMA. Análise qualitativa. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) células que cresceram em contato com o extrato da amostra PMMA poroso; D) células que cresceram em contato com o extrato da amostra PMMA/HAp; E) células que cresceram em contato direto com as amostras de PMMA poroso; F) células que cresceram em contato direto com as amostras de PMMA/HAp. As sombras nas Figuras E e F correspondem as amostras. Aumento de 100X para todas as imagens.

A Figura 4.25 mostra a avaliação quantitativa dos ensaios de toxicidade. Observamos que as amostras incubadas com fenol apresentaram um número de células significativamente diferente frente às demais amostras. As populações que foram cultivadas na presença dos extratos das amostras porosas de PMMA ou em contato direto com os mesmos não foram significativamente diferentes do controle negativo de toxicidade.

Nossos resultados indicam que as diferentes amostras PMMA poroso/HAp e PMMA poroso não apresentam toxicidade direta ou indireta.

Figura 4.25 - Toxicidade indireta e direta das amostras de PMMA. Análise quantitativa. A) Controle negativo; B) Controle positivo; C) células que cresceram em contato com o extrato da amostra PMMA poroso; D) células que cresceram em contato com o extrato da amostra PMMA poroso/HAp; E) células que cresceram em contato direto com as amostras de PMMA poroso/HAp; F) células que cresceram em contato direto com as amostras de PMMA poroso. A população B foi considerada significativamente diferente das demais amostras (0.05%).

4.5. Ensaios *in vivo*

4.5.1 Métodos de avaliação

- Microscopia Luz Comum (MLC)/ Análise Histológica

Após 45 dias os animais foram sacrificados por meio de anestesia geral com Rompum (relaxante muscular) seguido de Ketalar (sedativo); estando o animal profundamente sedado, foi aplicado 1 ml de Zoletil 50 (Virbac) na cavidade cardíaca.

O fêmur de cada animal foi removido e em seguida foram removidos os tecidos moles. O osso foi então cortado em um tamanho de cerca de 3 a 4 cm para colocação na solução fixadora. As amostras permaneceram 5 dias na solução fixadora e depois 30 dias na mistura de soluções desmineralizadoras, renovadas de 3 em 3 dias. Foi utilizado como fixador o formol de Lillie 10%, tamponado em pH 7.2, composto por: 100 ml de formol puro, 900 ml de H₂O deionizada, 6,5 g de Na₂HPO₄ e 4,0 g de NaH₂PO₄ H₂O. Como solução desmineralizadora foi utilizada a mistura (50 a 50%) das seguintes soluções em água destilada: ácido fórmico a 50% e nitrato de sódio a 20%. Após a desmineralização as amostras de tecido ósseo foram submetidas aos processos de desidratação (pré diafanização), diafanização e, então, foram colocados em parafina (blocos) para a realização dos cortes. Foram confeccionados dois tipos de cortes longitudinais sendo uns para a análise histológica por microscopia de luz comum (MLC) e, outros com maior espessura para ser observado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a análise por MLC foram feitos cortes semi-seriados longitudinais de 0,7 µm de espessura que foram, posteriormente, desparafinizados com xilol, preparados para a hidratação em banhos em concentrações decrescentes de álcool, e hidratados em água destilada. Prontos para o processo de coloração, uma parte dos cortes foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e outra com tricômico de Masson, MICHALANY (1980). As colorações foram feitas alternadamente segundo a seqüência dos cortes para posterior análise. Os cortes foram analisados e fotografados no microscópio (Olympus BX 51)

acoplado à câmera digital (Olympus DP71-12,5 MPixel) do laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Buscou-se assim, evidências de biocompatibilidade ou rejeição do material em relação ao osso e, por consequência, o caráter de interação do material utilizado com o hospedeiro.

- **Quantificação de Crescimento de Tecido Ósseo Neo Formado**

Abaixo se faz uma comparação em relação à quantidade de tecido ósseo neo formado entre o fêmur direito (implante teste) e o fêmur esquerdo (implante controle) do animal, que respectivamente receberam diferentes tipos de manufatura do material implantado. O fêmur direito do animal recebeu o implante de PMMA pré polimerizado; o fêmur esquerdo do animal recebeu o implante de PMMA polimerizado no local (*in situ*).

As Figuras 4.26 e 4.27 correspondem respectivamente ao fêmur direito e ao fêmur esquerdo. A marcação que aparece nas imagens foi feita para determinar o crescimento de tecido ósseo neo formado ao redor do implante. O programa utilizado para a mensuração do crescimento de tecidos foi o *Image Pro Express* - 6.0 da Olympus. A medida linear de formação óssea encontrada no lado esquerdo foi de 1741,915 μm , corresponde ao crescimento do tecido ósseo neo formado em direção ao implante. E respectivamente, a medida linear de formação óssea encontrada no lado direito foi de 752,8122 μm , corresponde ao crescimento do tecido ósseo neo formado em direção ao implante. O que podemos sugerir como conclusão, é que devido ao fato de no fêmur direito ter sido colocado o implante pré polimerizado, deu-se um crescimento menor quando comparado ao fêmur esquerdo onde o PMMA foi polimerizado no local. Isto indica que houve uma facilitação de crescimento de células ósseas onde o material apresentou uma menor resistência, quando comparado ao outro tipo de colocação de implante.

Figura 4.26 - Marcação feita para determinar o crescimento de tecido ósseo neo formado. Medida linear de formação óssea foi de 752,8122 μm (implante teste)

Figura 4.27 - Marcação feita para determinar o crescimento de tecido ósseo neo formado. Medida linear de formação óssea foi de 1741,915 μm (implante controle).

As Figuras 4.28 à 4.32 ilustram os resultados histológicos através das imagens realizadas em microscopia de luz.

- **Fêmur Direito (implante teste)**

Neste caso foi observado que houve formação óssea ao redor do canal medular, osso este, rico em osteócitos e inúmeros canal de Havers, organizados ou não e vasos sanguíneos. Osteoblastos no endóstio são observados e uma reação inflamatória insignificante também foi observada. (Figuras 4.28 e 4.29).

- **Fêmur esquerdo (implante controle)**

Neste caso observou-se o tecido ósseo rico em osteócitos e vasos sanguíneos, também foi possível a observação do preenchimento e/ou contorno do canal medular de forma organizada ou não; observam-se espaços medulares com poucas células inflamatórias (Figuras 4.30, 4.31 e 4.32). Também foi observado neste grupo, um animal com reação inflamatória de grau discreto a moderado, onde observaram-se células inflamatórias com predomínio de células mononucleares, principalmente linfócitos e de células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos.

Figura 4.28 – (a) Osso neoformado (O) com inúmeros osteócitos (setas) e ricamente vascularizado (V) contornando o canal medular, onde se observam restos de material (M) no seu interior. Lado direito, H.E. 68,5X; (b) Em maior aumento, observa-se no interior do osso neoformado (O) inúmeros osteócitos, fibras colágenas e vasos sanguíneos; a medula (m) se apresenta com reação inflamatória insignificante, com poucas células inflamatórias (setas), com predomínio de neutrófilos e linfócitos. Observam-se também restos de material (M). Lado direito, H.E. 176X.

Figura 4.29 (a) Em maior aumento, junto ao osso neoformado (O), canal de Havers (h) inúmeros osteócitos (seta amarela), vasos (v), osteoblastos (setas preta) e medula óssea (m). Lado direito, H.E.344X; (b) Observa-se uma ponte óssea de osso neoformado (O) entre o osso que envolve o canal medular; no interior do canal medular, a medula (m) e ainda se observam restos de material (M). Lado direito, H.E.68,5X.

Figura 4.30 (a) Observa-se osso neoformado (O) ocupando quase totalmente a área onde estava o implante, onde se observam inúmeros osteócitos e vasos sangüíneos (setas) no interior da matriz óssea e espaços vasculares com tecido medular (m). Lado esquerdo, H.E. 68,5X; (b) Em maior aumento, observa-se diferentes direções do tecido ósseo, uma contornando o espaço ocupado pelo implante no interior do canal medular (seta) e outro, mais externo, tecido mais maduro. Lado esquerdo, H.E. 176X.

Figura 4.31 - O material (M) ainda está presente no interior do canal medular, junto ao tecido medular (m) se degradando. Áreas de osso neoformado (O) rodeiam a área do implante. Lado esquerdo, H.E. 68,5X; (b) Em maior aumento, observa-se restos de material (M) próximo ao tecido medular (m) com reação inflamatória insignificante e osso (O) se formando no interior do canal medular. Lado esquerdo, H.E. 176X.

Figura 4.32 - Neste animal observou-se uma reação inflamatória discreta para moderada, com predomínio de células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (linfócitos) e áreas de formação óssea, no interior do canal medular. Lado esquerdo, H.E. 176X.

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os cortes para a análise por MEV tiveram uma espessura que variou de 20 μm a 22 μm e foram realizados após a fixação, desmineralização, desidratação explicadas no item anterior. Os cortes foram desparafinizados nas lâminas de vidro usando banhos de xilol, xilol e álcool absoluto, álcool 90°, álcool 70° e vários banhos de água destilada. Tal procedimento foi adotado para eliminar reagentes externos ao osso que pudessem colocar em dúvida os resultados destas análises. Os cortes foram então, secos em estufa a 57° C e colados sobre fita de carbono dupla face no suporte para análise por MEV.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com

20nm de ouro em um metalizador BALSERS modelo SDC 050 e mantidas em dessecador até o momento de análise.

As imagens correspondem ao implante teste (Lado direito) e foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 4.33 - MEV (A) Visão panorâmica do implante mostrando a área de contato (material/osso) bem integrada; (B) maior aumento da interface de contato entre osso e implante; (C) presença de tecido mole na porção interna dos poros; (D) presença de tecido ligado a estrutura porosa sugerindo ser tecido em mineralização; (E) material semelhante a restos de tecido granuloso, sugerindo tecido mole em mineralização; (F) presença de material filamentososo sobre o tecido granuloso sugerindo a ocorrência de fibras proteicas e conseqüente formação de colágeno.

As imagens correspondem ao implante controle (Lado esquerdo) e foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 4.34 - MEV(A) Imagem do implante em contato com o osso receptor; (B) Imagem mostra que o tecido e o implante parecem possuir uma consistência única sugerindo a formação de osso ao redor do implante, pois o tecido mole seria um fragmento na separação da amostra para o estudo em MEV; (C) presença de áreas não preenchidas com tecido (poros abertos); (D) presença de tecido granuloso sobre a amostra sugerindo a ocorrência de mineralização; (E) Imagem semelhante a anterior com poros abertos e a presença de uma camada fina de tecido; (F) a imagem sugere a presença de tecido fibroso ao centro e um tecido mais consistente ao redor, sugerindo possíveis pontos de mineralização.

4.6 Line Scan

A Figura 4.35 ilustra uma imagem de uma secção da região implantada no fêmur direito do animal com 45 dias de sacrifício, em (a) ilustra uma parte da amostra que foi cortada aproximadamente no centro do material implantado. É possível também observar nesta imagem que o implante apresenta-se bem osteointegrado ao osso, onde não se observa um limite visível na interface entre o osso e o material implantado. Em (b) este mesmo material foi analisado pelo MEV para maior confiabilidade de resultados de osteointegração. Na imagem pela microscopia também não se observa visivelmente uma interface entre o tecido ósseo e o implante, sugerindo novamente uma boa osteointegração.

Figura 4.35 - Em (a) imagem digital; em (b) a imagem em MEV; o círculo delimita a região do implante osteointegrado; e a seta vermelha indica onde ocorre a interface entre implante e osso.

Uma análise complementar do material implantado no fêmur foi cortada em *dicing* com disco metálico de 0,5mm de espessura (dente de serra) seguida de desbaste em lixa de SiC malha # 600 mesh, e submetida a ensaio por difração de raio-X no MEV pelo recurso *EDS-Line Scan*. Foi traçada uma linha de 4mm de comprimento onde é observado a presença de Fósforo (P) e Cálcio (Ca) ao longo desta linha. A extensão da linha inicia-se no osso neo formado, atravessa a amostra implantada e termina no osso neo formado, atravessando duas interfaces. Traçando paralelas virtuais a linha amarela, linhas tracejadas vermelhas, observa-se a variação do teor de Ca e P ao longo de toda esta linha, poros

visualmente preenchidos comprovam a presença de Ca e P (círculo tracejado vermelho) e na interface dos poros (elipse tracejada vermelho) constata-se a ausência destes materiais. Na semicircunferência em contato com o osso trabecular é verificado a formação óssea quase que totalmente preenchida em profundidade próxima à 1mm.

Figura 4.36 – Difratoograma de raio-X por EDS-Line Scan

4.7 Rugosidade Superficial

As amostras de PMMA poroso foram avaliadas quanto a sua rugosidade média (Ra) de superfície. O teste foi realizado em 3 amostras de PMMA poroso, em cinco áreas diferentes, resultando no número de dados de $n=15$.

A Ra é o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média dentro do comprimento de medição (*Cut off* = 25mm), sendo o valor considerado como a média de rugosidade da superfície presente nos implantes porosos.

O valor médio de rugosidade encontrado nas amostras foi de 9.96 μm . Nota-se que este valor está dentro do valor considerado ideal em se tratando de rugosidade de superfície de materiais destinados a implantes ósseos.

Tabela 4.2 – Resultados dos ensaios de rugosidade superficial

Implante	Ra μm (média)	Rt μm (total)	Ry μm (Máxima)	Rq μm (Mínima)
PMMA Poroso	9,96	103	96,3	14

4.8 Porosimetria de Mercúrio

Uma das formas de apresentação dos resultados do ensaio por intrusão de mercúrio é mostrada pela Tabela 4.3 e pela Figura 4.37 onde são apresentados os dados do ensaio de porosimetria por intrusão de mercúrio para a amostra de PMMA poroso a 80 vol%.

Tabela 4.3 – Resultados do ensaio de porosimetria

Dados do ensaio de porosimetria	
Volume total de mercúrio utilizado no ensaio	1.3397mL/g
Área total de poro	0.042 m ² /g
Diâmetro médio dos poros (volume)	131,2 μm
Diâmetro médio dos poros (área)	127,2 μm
Diâmetro médio dos poros (4V/A)	128 μm
Massa específica	1,19 g/cm ³
Massa aparente	0,04 g/cm ³
Porosidade	93 %

Figura 4.37. Representação gráfica do ensaio de porosimetria por intrusão de mercúrio para o PMMA poroso – diâmetro dos poros (μm) versus volume de mercúrio acumulado (ml/g).

Observa-se que o diâmetro médio dos poros está próximo a $150\ \mu\text{m}$ e que a porosidade total da amostra foi de 93 % maior que o projetado para 80 vol%. A maioria dos poros esteve compreendida entre a faixa de $70\ \mu\text{m} \leq \Phi \leq 250\ \mu\text{m}$. Entretanto as imagens mostradas pelas Figuras 4.8 e 4.9 ilustram poros com dimensões até $600\ \mu\text{m}$, entretanto a técnica de porosimetria fornece dimensões para poros esféricos equivalentes.

5. Conclusões

O projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita foi obtido e validado com sucesso através da metodologia empregada e dos resultados obtidos.

Ensaio *in vitro* mostraram que o PMMA quando adicionado de hidroxiapatita não manifestou reações de toxicidade e ainda promoveu o crescimento e o espalhamento celular.

A manufatura para obtenção de corpos porosos tendo como agente porogênico o CMC apresentou-se muito satisfatório, obteve-se pela técnica de intrusão de mercúrio valores de porosidade de até 93 vol% com diâmetro médio de 130 μm até 250 μm . Já a técnica de imagens obtidas pelo MEV complementa a análise identificando dimensões (orientadas) de porosidade próximas a 600 μm com poros oblongos, interconectados e de estrutura semelhante à trabecular, mimetizando a estrutura óssea trabecular. A literatura pesquisada recomenda porosidade entre 50 - 400 μm .

O implante de corpos porosos *in vivo* analisados por histologia e MEV-EDS apresentou forte osteointegração com neoformação e intra-crescimento ósseo. Com sacrifício de 45 dias a análise histológica mostrou neoformação óssea de até 1,7mm de profundidade no implante e o MEV-EDS mostrou preenchimento quase que total dos poros em profundidade no implante de até 1mm na região de interface.

Quanto a comparação entre o implante teste e o implante controle, os resultados sugeriram que tanto um tipo de implante quanto o outro apresentaram características muito semelhante não havendo um diferencial que sugerisse por optar por um tipo ou pelo outro, a não ser pelas características favoráveis já apresentadas anteriormente pela opção do implante pré-polimerizado.

Na manufatura observou-se uma distribuição uniforme da hidroxiapatita, distribuída na porosidade, superfície dos poros, porém parte da HAp ficou no interior do acrílico

contribuindo para uma perda de propriedades mecânicas e o aumento do custo pelo consumo de HAp, pois esta inoculada perde a sua função de osteoindução pois ficam inacessíveis pelo fluido fisiológico. Também no processo de lixiviação do CMC parte da HAp acaba sendo removida e perdida

Os corpos obtidos pela manufatura baseada na sacarose como agente porogênico, embora fornecesse corpos com alta porosidade e boa resistência mecânica, entre outras qualidades, deixou a desejar em se tratando da morfologia dos poros. Quando o CMC foi utilizado e comparado à sacarose estas características se mostraram muito superior.

Os ensaios mecânicos de compressão mostraram que o PMMA denso é o que mais se aproxima do tecido ósseo cortical, 101 MPa. Frente a 130 – 180 MPa da literatura. O Módulo elástico de 3 GPa é muito inferior a faixa de 17 – 25 GPa encontrada para ossos corticais. Quando manufaturado com poros os valores de resistência à compressão tiveram perdas expressivas (~18 MPa), o projeto conceito de estrutura com gradiente funcional pode garantir no corpo de prova melhora considerável nos valores de resistência à compressão (~50MPa) mas com possibilidade de melhorias na manufatura como a mecanização para garantir melhor homogeneidade na manutenção da espessura de projeto e otimização da espessura da camada porosa em gradiente funcional, onde é verificado pelo trabalho espessura máxima total não superior a 1mm.

Quanto à comparação entre o implante teste e o implante controle os resultados sugerem que tanto o implante teste como o implante controle apresentaram características muito semelhantes.

PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Melhorar a resistência mecânica do material, através da introdução de materiais de reforço estrutural como de fibras de carbono;
- ❖ Quantificar valores de penetração do tecido ósseo na estrutura porosa do implante em gradiente funcional;
- ❖ Realizar ensaios mecânicos *Push in* e *Push out*;
- ❖ Estudar as quantidades ótimas de hidroxiapatita adicionada na camada porosa;
- ❖ Estudar o efeito da adição de biovidros com acelerador do processo de osteointegração;
- ❖ Analisar a qualidade do osso neoformado;
- ❖ Avaliar técnicas de infiltração e fixação dos materiais bioativos após confecção dos corpos.

6. Referências bibliográficas

ACIDUMAN, A.; BELEN, D. (2007). **The earliest document regarding the history of cranioplasty from the Ottomam era.** Surgical Neurology, v.68, p.349-353.

ARCOS, D.; RANGEL, C. V.; REGI, M. V. (2001). **Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system.** Biomaterials, v.22, p.701-708.

ARTICO, M.; FERRANTE, L.; PASTORE, F. S.; RAMUNDO, E. O.; CANTARELLI, D.; SCOPELLITI, D.; IANNETTI, G. (2003). **Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature.** Surg Neurol, v.60, p.71-9.

ANUSAVICE, K. J. (1998). **Materiais dentários**, Editora Guanabara koogan, Ed.10, Rio de Janeiro.

BENZEL, E. C.; THAMMAVARAM, K.; KESTERSON, L. (1990). **The Diagnosis of Infections associated with acrylic cranioplasties.** Neuroradiology, v.32, p.151-153.

BERUTO, D. T.; MEZZASALMA, S. A.; CAPURRO, M.; BOTTER, R.; CIRILLO, P. (2000). **Use of α -tricalcium phosphate (TCP) as powders and as an aqueous dispersion to modify processing, microstructure, and mechanical properties of polymethylmethacrylate (PMMA) bone cements and to produce bone-substitute compounds.** J. Biomed Mater Res, v.49, p.498-505.

BRUENS, M. L.; PIETERMAN, H.; WIJN, J. R.; VAANDRAGER, J. M. (2003). **Porous Polymethylmethacrylate as Bone Substitute in the Craniofacial Area.** The journal of craniofacial surgery. v.14, p.63-68.

BUCHOLZ, R. W.; CARLTON, A.; HOLMES, R. E. (1987). **Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes.** Orthop. Clin. North Am., v.18, n.2, p.323-324.

CALIXTO, R. F. E. (2001). **Implante de um Floculado de Resina Derivada do óleo de Mamona (Ricinus Communis) em Alvéolo de Rato Imediatamente após a Extração Dental. Avaliações Histológica e Histométrica da Biocompatibilidade e da Cronologia de Reparo Ósseo;** Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Dissertação de Mestrado.

CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A.; SILVEIRA, C. B.; BINI, R. A. (2005). **Biomateriais à base de Na_2O - CaO - SiO_2 - P_2O_5 preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade.** Cerâmica, v.51, p.274-279.

CHIARINI, L.; FIGURELLI, S.; POLLASTRI, G.; TORCIA, E.; FERRARI, F.; ALBANESE, M.; NOCINI, P. F. (2004). **Cranioplasty Using Acrylic Material: a New Technical Procedure**; Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery v.32, p. 5-9.

COOK, R.; HOVER, K. C. (1993). **Mercury porosimetry of cement-based materials and associated correction factors**. ACI Materials Journal. [S.l.], v.90, n.2, p.152-161, March/April.

DALBY, M. J.; SILVIO, L. D.; HARPER, E.J.; BONFIELD, W. (2001). **Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement**. Biomaterials, v.22, p.1739-1747.

DALBY, M. J.; SILVIO, L. D.; HARPERB, E. J.; BONFIELD, W. (2002 (a)). **Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response**. Biomaterials, v.23, p.569–576.

DALBY, M. J.; SILVIO, L. D.; HARPERB, E. J.; BONFIELD, W. (2002 (b)). ***In vitro* adhesion and biocompatibility of osteoblast-like cells to poly(methylmethacrylate) and poly(ethylmethacrylate) bone cements**. J. Materials Science: materials in medicine, v.13, p.311-314.

DAY, S. M., OSTRUM, R. F., CHAO E. Y. S., RUBIN, C. T., ARO, H. T., EINHORN, T. A. (2000). **Bone injury, regeneration, and repair**: Orthopaedic basic science. Chicago, AAOS, p.p. 371-399.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. (2000). **The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance**. Science, v.289, p. 1501-1504.

DUMBACH, J.; RODEMER, H.; SPITZER, W. J.; STEINHAUSER, E. W. (1994). **Mandibular reconstruction with cancellous bone, hydroxyapatite and titanium mesh**. J Cranio-Max-Fac Surg, 22: 151-155.

EUFINGER, H.; SAYLOR, B. (2001). **Computer-assisted prefabrication of individual craniofacial implants**, AORN Journal, v. 74, n. 5.

EHRlich, J.; AZAZ, B. (1975). **Immediate implantation of acrylic resin teeth into human tooth sockets**. J. Prosthet. Dent., v.33, p.205-209.

FILIPCZAK, K.; JANIK, I.; KOZICKI, M.; ULANSKI, P.; ROSIAK, J. M.; PAJEWSKI, L. A.; OLKOWSKI, R.; WOZNIAC, P.; CHROSCICKA, A.; LEWANDOWSKA, M. S. (2005). **Porous polymeric scaffolds for bone regeneration**. e- Polymers, n.11.

FINI, M.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N. N.; TORRICELLI, P.; BOTTER, R.; BERUTO, D.; GIARDINO, R. (2002). **A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and α -tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation.** *Biomaterials*. v.23, p.4523-4531.

FUKADA, E.; YASUDA, I. (1964). **Piezoelectric effect in collagen.** *J. Applied Physics*, v.2, p.3.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. (2003). **Tratado de histologia.** 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.456.

GETTLEMAN, L.; NATHANSON, D. (1980). **Confirmation of Bone Ingrowth into Porous PMMA Materials.** *J. Dent. Res.* v.59, p.139.

GIORDANO, V.; GIORDANO, M.; KNACKFUSS, I. G. (2003). **Perspectivas na Consolidação das Fraturas;** AOT – Arquivos em Ortopedia e Traumatologia, Ano1, Fascículo 1

GOODGER, N. M.; WANG, J.; SMAGALSKI, G. W.; HEPWORTH, B. (2005). **Methylmethacrylate as a Space Maintainer in Mandibular Reconstruction.** *J Oral Maxillofac Surg.* v.63, p.1048-1051.

GOSAIN, A. K. (2003). **Biomaterials in Facial Reconstruction;** *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 9, n. 1, p. 23-30.

GOTO, K.; TAMURA, J.; SHINZATO, S.; FUJIBAYASHI, S.; HASHIMOTO, M.; KAWASHITA, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. (2005). **Bioactive bone cements containing nano-sized titania particles for use as bone substitutes.** *Biomaterials*, v.26, p.6496-6505.

GUIRRO, R. R. J. (1995). **O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos.** Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos.

HELSEN, J. A.; BREME, H. J. (1998). **Metals as Biomaterials.** John Wiley & Sons Ltd, p.510.

HERNANDEZ, A. L. M.; SANTOS, C. V.; ICAZA, M.; CASTANO, V. M. (2005). **Mechanical properties evaluation of new composites with protein biofibers reinforcing poly (methyl methacrylate).** *Polymer*, v.46, p. 8233–8238.

ISO 10993-5 | 1992. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.**

JONES, A. C.; ARNS, C. H.; SHEPPARD, A. P.; HUTMACHER, D. W.; MILTHORPE, B. K.; KNACKSTEDT, M. A. (2007). **Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT.** Biomaterials, v.28, p.2491-2504

KAMEROS, J.; HIMMELFARB, R. (1975). **Treatment of temporomandibular joint ankylosis with methyl methacrylate interpositional arthroplasty: report of four cases.** J. Oral Surgery, v. 33, p.282-287.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. (2005). **Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.** Biomaterials, v.26, p.5474-5491.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. (1999). **Histologia e embriologia oral: texto – atlas de correlações clínicas.** 1º ed. São Paulo: Panamericana, p.381.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R; ALVES, O. L. (2000). **Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.** Química nova, 23(4).

KIM, S. B.; KIM, Y. J.; YOON, T. L.; PARK, S. A.; CHO, I. H.; KIM, E. J.; KIM, I. A.; SHIN, J. W. (2004). **The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement.** Biomaterials, v.25, p.5715-5723.

KIRKPATRICK C. J. (1992). **Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*.** Regulatory Affairs, v. 4, p. 13-32.

KIENAPFEL, H.; SPREY, C.; WILKE, A.; GRISS, P. (1999). **Implant fixation by bone ingrowth.** The Journal of arthroplasty. v.14, n.3, p.355-368.

KUBOKI Y. (1998). **BMP-induced osteogenesis on the surface of hidroxiapatite with geometrically feasible and non feasible structures: topology of osteogenesis.** J. Biomed. Mater. Res. v. 39, n. 2, p. 190-9.

KUEHN, K. D.; EGE, W.; GOPP, U. (2005). **Acrylic bone cements: composition and properties.** Orthop Clin N Am v. 36, p. 17 – 28.

KÜHN, K. D. (2000). **Bone cements. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials,** Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

KOKUBO, T. (1991). **Bioactive glass ceramics properties and applications.** Biomaterials, v.12, p.155-63.

LE GEROS, R. Z. (1993). **Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics**. Clinical Materials, v.14, p. 64-88.

LEON Y LEON C. A. (1998). **New perspectives in mercury porosimetry**. Adv. Colloid Interface Sci.; 76-77, 341 – 72.

LIMA, J. H. C. (1995). **Tratamento e caracterização da superfície de implantes osseointegrados**. Revista Brasileira de Implantodontia, p.21-25.

LU, J. X.; HUANG, Z. W.; TROPANO, P.; D'ORVAL, B. C.; REMUSAT, M.; DEJOU, J.; PROUST, J-P.; POITOUT, D. (2002). **Human Biological Reactions at the Interface Between Bone Tissue and Polymethylmethacrylate Cement**; Journal Of Materials Science: Materials In Medicine, v.13, p. 803-809.

MALMONGE, S. M.; ZAVAGLIA, C. A. C.; SANTOS, A. R. Jr.; WADA, M. L. F. (1999). **Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo *in vitro***; Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 15, n. 1-2, p. 49-54.

MENDENHALL, H. V. (1995). **Surgical principles of biomaterial implantation**, In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials*, v.1, WISE, D. et al, United States of America, Marcel Dekker, Inc.

MEYER, U.; RUNTE, C.; DIRKSEN, D.; STAMM, T.; FILLIES, T.; JOOS, U.; WIESMANN, H. P. (2003). **Image-based Biomimetic Approach to Design and Fabrication of Tissue Engineered Bone**; International Congress Series, (1256); p. 726-732.

MICHALANY, J. (1980) **Técnica histológica em anatomia patológica – com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**, São Paulo Editora Pedagógica e Universitária.

MOREIRA, A. S. B. (2000). **Estudo da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos.

MOURSI, A. M.; WINNARD, A. V.; WINNARD, P. L.; LANNUTTI, J. J.; SEGHI, R. R. (2002). **Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate - hidroxyapatite composite**. Biomaterials, v.23, p.133-144.

MULLEN, P. J. Van.; WIJN, J. R.; VAANDRAGER, J. M. (1988 (a)). **Porous Acrylic cement: Evaluation of a novel implant material**. Annals of Plastic Surgery, v.21, p.576-582.

MULLEN, P. J. Van.; WIJN, J. R. (1998 (b)). **Bone and soft connective tissue response to porous acrylic implants**. Journal of cranio-maxilo-facial surgery, v.16, p.99-109.

MULLEN, P. J. Van; VAANDRAGER, J. M.; NICOLAI, J. P. A.; WIJN, J. R. (1998). **Implantation of porous acrylic cement in soft tissues: an animal and human biopsy histological study.** Biomaterials, v.11, p.299-304.

OHGAKI, M.; YAMASHITA, K. (2003). **Preparation of Polymethylmethacrylate-Reinforced Functionally Graded Hydroxyapatite Composites.** J. Am. Ceram. Soc, v.86, p. 1440-1442.

OONISH, H. (1991). **Orthopedics applications of hydroxyapatite.** Biomaterials, v.12, n.3, p.171-178.

ONO, I.; TATESHITA, T.; SATOU, M.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, M.; KODAMA, N. (1999). **Treatment of large complex cranial bone defects by using hydroxyapatite ceramic implants.** Plast Reconstr Surg, 104: 339–349.

ORÉFICE, R. L.; SILVA, P. E. J. (2001). **Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli (Metacrilato de Metila).** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 11, n. 3, p. 109 -115.

OTSUKI, B.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. (2006). **Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants.** Biomaterials, v.27, n.35, p.5892-900.

PASCHOAL, A. L. (2003). **Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezoelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo.** Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos/ Instituto de Física de São Carlos/ Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos.

PRETEL, H. (2005). **Ação de biomateriais e laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

RICHTER, H.; BOYNE, P. J. (1989). **New concepts in facial bone healing and grafting procedures.** J. Oral Surg. v.27, p.557-559.

RIESA, M. D.; YOUNG, E.; MARASHI, L.; GOLDSTEIN, P.; HETHERINGTON, A.; PETRIE, T.; PRUITT, L. (2006). **In vivo behavior of acrylic bone cement in total hip arthroplasty.** Biomaterials, v.27, p. 256–261.

RODRIGUES, M. E. S. (2003). **Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão.** Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos.

ROSSI, J. D. M. B. A.; COSTA, R. C.; LEIVAS, T. P. (1993). **Avaliação mecânica de compósitos de hidroxiapatita-poli (metacrilato de metila)**. Rev Bras Ortop, v. 28, n. 03.

SANAN, A.; HAINES, S. (1997). **Repairing holes in the head: a history of cranioplasty**. Neurosurgery, v.40, n.3, p.588-603.

SANTOS, L. A. (2002). **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para o uso na área médico-odontológica**. Tese (Doutorado). Universidade de Campinas, Unicamp, Campinas.

SCHWARTZ, A. B.; KAUFMAN, P.; GLUCK, M. (1973). **Intraoral implantation of methyl methacrylate for the restoration of facial contour in old fractures of the malar complex**. J. Oral Surgery, v.31, p.763-766.

SCHOENAERS, J.; LIU, Y.L.; GROOT, K.; WIJN, J. R.; SCHEPERS, E. (2000). **Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep**. Journal of materials science: materials in medicine, v. 11, p. 711-717.

SERBETCI, K.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, N. (2004). **Thermal and mechanical properties of hydroxyapatite impregnated acrylic bone cements**. Polymer Testing, v.23, p.145-155.

SHARMA, C. P. (2001). **Blood-Compatible Materials: A perspective**; Journal of Biomaterials Applications, v. 15, p. 359-381.

SHAND, J. M.; HEGGIE, A. A. C.; HOLMES, A. D.; HOLMES, W. (2002). **Allogenic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit**. Int. J. Oral Maxillofac. Surg, v.31, p.525-531.

SHINZATO, S.; KOBAYASHI, M.; MOUSA, W. F.; KAMIMURA, M.; NEO, M.; KITAMURA, Y.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. (2000). **Bioactive polymethylmethacrylate-based bone cement: comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties**. J Biomed Mater Res, v.51, p.258-272.

TAGA, R. (2000). **Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de osseobond e biohapatita e membrana absorvível de cortical óssea bovina**. JBE, Curitiba, ano 1, n.1, p.18-87.

TEN CATE, A. R. (2001). **Histologia bucal**. Desenvolvimento, estrutura e função. 5° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.439.

USCHIDA, A.; ARAKI, N.; SHINTO, Y.; YOSHIKAWA, H.; KURISAKI, E.; ONO, K. (1990). **The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery**. J. Bone Joint Surg., v.72 p. 298-302.

VAANDRAGER, J. M.; MULLEM, P. J. V.; WIJN, J. R. (1983). **Porous acrylic cement for the correction of craniofacial deformities and repair of defects, animal experimentation and two years of clinical application**. Biomaterials. v.4, p.128-130.

VALLO, C. L.; MONTEMARTINI, P. E.; FANOVICH, M. A.; LOPEZ, J. M. P.; CUADRADO, T. R. (1999). **Polymethylmethacrylate - Based bone cement modified with hydroxyapatite**. Biomed. Mater Res (Appl Biomater), v. 48, p.150-158.

VAN GOOL, A. V. (1985). **Preformed Polymethylmethacrylate Cranioplasties: Report of 45 Cases**. J. max. Facial. Surg. v.13, p. 2-8.

WALKER, G.; S. L. JAMES, S. L.; DUNNE, N.; BUCHANAN, F. (2006). **Adsorption of gentamicin on porous pmma formed by metal-organic polymer gelation**. Bioengineering In Ireland Conference, January 27-28, Clybaun Hotel, Galway.

YANG, S. (2001). **The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors**. Tissue engineering, v.7, n-6, p. 679-89.

WIEICKI, Z. S. A.; WALA, D.; ROSIEK, G. (2000). **Mechanical features of biocomposites containing porous corundum grains**. Journal of Materials Processing Technology, v.106, p. 136-140.

WILLIAMS, D. F. (1986). **Progress in biomaterial engineering: 4 Definition in Biomaterials**. Proceedings of a consensus conference of the European society for biomaterials, England.

Disponível em: <http://www.ama-cmeonline.com>. Acesso em: 15 março de 2008.

Disponível em: <http://www3.umdj.edu/histsweb/lab4/bone/bonecells.html>. Acesso em: 5 jun. 2008

ANEXO

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer 047/2007

Protocolo nº. 020/2007

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 15ª. Reunião, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Análises IN VIVO da bioatividade de um scaffold composto de Polimetilmetacrilato (PMMA) e Hidroxipatita (HAp)”, elaborado por Thais Helena Samed e Souza.

Conclusão: Projeto Aprovado

São Carlos, 22 de novembro de 2007.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal