**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Karla Regina Pereira

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DE LIGAS
METÁLICAS DE TITÂNIO PARA APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA**

São Carlos

2008

KARLA REGINA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DE LIGAS
METÁLICAS DE TITÂNIO PARA APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lauralice de Campos Franceschini Canale

São Carlos

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca –

Pereira, Karla Regina

Avaliação da biocompatibilidade “*in vitro*” e “*in vivo*” de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica / Karla Regina Pereira ; orientadora Lauralice de Campos Franceschini Canale. —

São Carlos, 2008.

81 p.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais) -- Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2008.

1. Biomateriais. 2. Biocompatibilidade “*in vitro*” e “*in vivo*”. 3. Hemocompatibilidade. 4. Citotoxicidade. 5. Toxicidade sistêmica. I. Título.

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DE LIGAS METÁLICAS DE TITÂNIO PARA APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA

ERRATAS

3.2 Ligas de Titânio

- p. 22, trocar na Figura 3.1 BCC por CCC e HCP por HC.

4.1 Amostras

- p. 34, trocar no texto, estrutura tipo α - β por: estrutura tipo β .

4.4 Teste de Citotoxicidade

- p. 40, trocar 3×10^{-5} por: 3×10^5 .

5.3 Teste de Toxicidade e Lavado Peritoneal

- p. 63, trocar no texto, Figura 36 por: Figura 5.20;
- p. 65, trocar na Figura 5.19, total de animais 30 por: total de animais 25.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karla Regina Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovado em: 07/03/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Lauralice de Campos Franceschini Canale

Instituição: EESC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

Instituição: EESC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Renata Dellalibera-Joviliano

Instituição: UNIARA

Assinatura

*Dedico esse trabalho especialmente a minha amada
mãe, por ser uma vitoriosa.*

*Também ao meu pai e minha irmã, por todo amor e
apoio*

Agradecimentos

À Deus, por olhar para mim e mesmo assim, me conceder fôlego de vida.

A Prof^a. Dr^a. Luralice de Campos Franceschini Canale, minha Orientadora, pela dedicação, paciência, por me entender e por ser tão amiga. Por sua orientação de forma ímpar, sem a qual esse trabalho não teria atingido o ideal traçado.

A Capes – que tornou financeiramente possível a realização deste trabalho;

Ao Programa Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais e em especial ao Departamento de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística da Universidade de São Paulo por ceder meu espaço de trabalho como pós-graduanda;

A Dr^a. Flávia Cardoso, da Universidade Estadual de Campinas, por ceder a liga metálica Ti-10Mo;

A Prof^a. Dr^a. Renata Dellalibera Joviliano, pela amizade, torcida e contribuição;

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa – Centro Universitário de Araraquara, por permitir a realização dos experimentos clínicos;

A Prof^a Dr^a Janice Perussi e ao Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química, pelas análises de citotoxicidade;

Ao Laboratório de Transformação de Fases, pelo uso dos microscópios ópticos, para as análises microscópicas realizadas neste trabalho;

Aos amigos Fausto, Danilo, Alan, Guilherme, Omar, Frederico, Maurício, Daniel, Ester, Cristina, Roberto, Rosamel, Elki, Luciana, Thaís, Raquel e André pelo companheirismo, risadas, churrascos, “choradeiras”, ...

Aos Técnicos Silvano, Eliezer e Pedro, do Departamento de Engenharia de Materiais, Aeronáutica e Automobilística, por me atenderem sempre que precisei;

A Técnica de Biotério Renata Muniz, a quem tenho muita gratidão, por cuidar dos animais tanto antes como após as inoculações dos extratos;

A Técnica Cláudia Bernal, pela disposição em realizar os ensaios de citotoxicidade e pela simpatia de sempre me atender e discutir a melhor forma para se realizar os ensaios;

Aos colegas pós-graduandos e aos professores da Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais;

E para finalizar, aos animais que cederam suas vidas para a realização desta pesquisa.

*“Os Teus olhos viram o meu corpo ainda informe,
e no Teu livro todas estas coisas foram escritas; as
quais iam sendo dia a dia formadas, quando nem
ainda uma delas havia”.*

Salmos 139 –v.16.

Resumo

A utilização de biomateriais para os mais diversos destinos no corpo humano, tem tido uma ascensão considerável nessas últimas décadas, devido a inúmeras necessidades, como por exemplo, assistência às pessoas com patologias ósseas, acidentes automotivos, estética bucal entre outras. Ainda assim, existe a necessidade de se desenvolver novos materiais de aplicação biomédica, melhorando suas propriedades e permitindo o aperfeiçoamento de dispositivos. A biocompatibilidade é parte integrante dos processos de validação destes materiais, onde testes *in vitro* e *in vivo* são realizados. Esse trabalho avaliou a biocompatibilidade de ligas de titânio através dos testes de: hemocompatibilidade, citotoxicidade, toxicidade sistêmica e lavado peritoneal feito em ratos, que entraram em contato com extratos originados do eletrólito: saliva artificial mais associações com fluoreto de sódio, após contato com as ligas metálicas de Ti-6Al-4V (parâmetro para os testes) e Ti- 10Mo (liga em teste).

A liga Ti-10Mo e seus extratos demonstraram um comportamento de biocompatibilidade, sugerindo uma possível aplicação para a odontologia.

Palavras-Chave: Biomateriais, Biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro*, Hemocompatibilidade, Citotoxicidade, Toxicidade sistêmica.

Abstract

Biomaterial applications have increased in the last decade, since bone diseases, injury from accidents have reached an increasing number of people. In dentistic, biomaterials have also large use as to estetic application as well to recuperate the function.

New biomaterials have been studied in order to get better mechanical properties allowing better performance of the biomedical device. Biocompatibility studies are part of the validation processes and *in vivo* testes and *in vitro* testes are carried out.

The present work evaluated biocompatibility of Ti alloys through: haemocompatibility, cytotoxicity, systemic toxicity and washed peritoneal tests. Those tests were performed in rats which were in contact with extracts made from artificial saline plus NaF (low concentrations) with Ti-6Al-4V alloy (control test) and Ti-10Mo (under test).

Alloy under test and its extracts shown biocompatible behavior suggesting for odontological applications.

Keywords: Biomaterials, Biocompatibility *in vivo* and *in vitro*, Haemocompatibility, Citotoxicity, Systemic toxicity.

Lista de Tabelas

Tabela 3.1	Comparação da densidade do Ti e suas ligas a outras ligas de uso biomédico.....	21
Tabela 3.2	Propriedades mecânicas do Ti e suas ligas.....	23
Tabela 4.1	Composição química das ligas Ti-6Al-4V e Ti-10Mo.....	34
Tabela 4.2	Fórmula da saliva artificial de Fusayama (g/l).....	38
Tabela 4.3	Extratos e seus componentes.....	39
Tabela 4.4	Índice de halo.....	44
Tabela 4.5	Grupos de animais com respectivos extratos de inoculação.....	45
Tabela 4.6	Possíveis reações causadas pelos extratos e controles aplicados intraperitonealmente – índice de toxicidade sistêmica.....	46
Tabela 4.7	Valor de referência de células no líquido peritoneal.....	48
Tabela 5.1	Valor de referência – sangue.....	49
Tabela 5.2	Média geral e desvio padrão do teste de hemocompatibilidade.....	50
Tabela 5.3	Resultado do índice do halo para o teste de citotoxicidade.....	59
Tabela 5.4	Peso dos animais e índices de toxicidade pós inoculação dos extratos.....	64
Tabela 5.5	Peso médio dos animais em seus respectivos grupos de ensaio.....	65
Tabela 5.6	Macroscopia do lavado peritoneal.....	66
Tabela 5.7	Contagem celular global do lavado peritoneal.....	67

Lista de Figuras

Figura 3.1	Parte do diagrama de fases da liga Ti-6Al-4V, demonstrando transformação da estrutura alfa e beta.....	22
Figura 3.2	Diagrama de fases do Ti com diferentes elementos de liga.....	22
Figura 3.3	Microestrutura de ligas de Ti: a) Liga α ; b) Liga α - β ; c) Liga β	23
Figura 3.4	Implantes: a) ortopédico; b) odontológico; c) fio ortodôntico.....	24
Figura 3.5	Camada passiva constituída por TiO ₂	25
Figura 4.1	Microestrutura do Ti-10Mo.....	35
Figura 4.2	Lâmina com esfregação sanguíneo.....	38
Figura 4.3	Cultura de células sendo incubadas.....	41
Figura 4.4	Momento que o meio “overlay” é adicionado à cultura celular.....	41
Figura 4.5	Cultura celular sendo emplacada.....	43
Figura 4.6	Leitor de ELISA BIO-RAD.....	43
Figura 4.7	Animais na gaiola de condicionamento.....	45
Figura 4.8	a) Tricotomia na região abdominal do rato; b) Animal pronto para aplicação intraperitoneal.....	46
Figura 4.9	Aplicação dos extratos intraperitoneal.....	47
Figura 5.1	Análise da morfologia celular do sangue em contato com a liga Ti-10Mo no momento 72 h: a) Leucócito; b) Hemácia.....	51
Figura 5.2	Análise da morfologia celular do sangue em contato com a liga Ti-6Al-4V no momento 72 h: a) Leucócito; b) Hemácia.....	52
Figura 5.3	Análise da morfologia celular do sangue controle (sem liga metálica) no momento 72 h: a) Leucócito; b) Hemácia.....	52
Figura 5.4	Gráfico comparativo da contagem celular global de leucócitos.....	54

Figura 5.5	Gráfico comparativo da contagem celular global de hemácias.....	54
Figura 5.6	Gráfico comparativo da dosagem de hemoglobina.....	55
Figura 5.7	Gráfico comparativo da dosagem de hematócrito.....	55
Figura 5.8	Gráfico comparativo da dosagem de VCM.....	56
Figura 5.9	Gráfico comparativo de HCM.....	56
Figura 5.10	Gráfico comparativo CHCM.....	57
Figura 5.11	Gráfico comparativo da contagem global de plaquetas.....	57
Figura 5.12	Gráfico comparativo do tempo de coagulação.....	58
Figura 5.13	Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar – controle positivo.....	59
Figura 5.14	Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar – controle negativo.....	60
Figura 5.15	Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar Liga Ti-10Mo.....	60
Figura 5.16	Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar Liga Ti-6Al-4V.....	61
Figura 5.17	Gráfico de citotoxicidade em linhagem celular CRL-1696.....	62
Figura 5.18	Índice porcentual da sobrevivência celular.....	62
Figura 5.19	Gráfico de comparação em números, dos animais que tiveram seus pesos aumentados, diminuídos ou mantidos.....	65
Figura 5.20	Gráfico de comparação do peso médio inicial e final dos grupos ensaiados.....	65

Lista de Abreviações

Al	Alumínio
ATCC-CRL-1696	Linhagem celular McCoy– fibroblasto de camundongo
C	Carbono
°C	Graus Celsius
ccc	Estrutura cristalina cúbica de corpo centrado
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl	Cloro
cm	Centímetro
Co	Cobalto
Cr	Cromo
DIUs	Dispositivos intra-uterinos
E	Módulo de elasticidade
F	Flúor
Fe	Ferro
ft	Fento-litro
G	Grama
g/dl	Grama por decilitro
gf	Grama-força
GPa	Giga-Pascal
H	Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
hc	Estrutura cristalina hexagonal compacta
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Ht	Hematócrito
HV	Dureza Vickers
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IM	Intramuscular
K	Potássio

Kg	Quilograma
MEM	Meio Mínimo de Eagle
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mo	Molibdênio
MPa	Mega-Pascal
MTT	(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
Nb	Nióbio
Ni	Níquel
nm	nanômetro
O	Oxigênio
P	Fósforo
PBS	Tampão Fosfato Alcalino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
pH	Pontencial hidrogênico
pg	Pico-grama
S	Enxofre
Ti	Titânio
USP	Universidade de São Paulo
V	Vanádio
VCM	Volume corpuscular médio
Zr	Zircônio
α	Alfa
β	Beta
μm	Micrômetro
σ máx (MPa)	Limite de resistência à tração
σ 0,2% (MPa)	Tensão de escoamento para 0,2%

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivo	16
3. Revisão Bibliográfica.....	17
3.1 Biomateriais e Biocompatibilidade	17
3.2 Ligas de Titânio	20
3.3 Testes de Biocompatibilidade: Hemocompatibilidade, Citotoxicidade e Toxicidade Sistêmica.....	26
3.3.1. Teste Hemocompatibilidade	27
3.3.2 Teste de Citotoxicidade	30
3.3.3 Teste de Toxicidade Sistêmica e Análise do Lavado Peritoneal	32
4. Materiais e Métodos	34
4.1 Amostras.....	34
4.2 Teste de Hemocompatibilidade	36
4.3 Preparo do veículo de extração para os testes: citotoxicidade e toxicidade sistêmica	38
4.4 Teste de Citotoxicidade	40
4.5 Teste de Toxicidade Sistêmica e Lavado Peritoneal.....	44
4.5.1 Coleta e análise do lavado peritoneal.....	47
4.6 Eutanásia	48
5. Resultados e Discussões.....	49
5.1 Teste de Hemocompatibilidade	49
5.2 Teste de Citotoxicidade	58

5.3 Teste de Toxicidade e Lavado Peritoneal	63
5.4 Síntese dos Resultados.....	67
6. Conclusões	69
7. Sugestões para trabalhos futuros	70
Referências	71
Apêndice I.....	76
Anexo A	7171
Anexo B.....	78
Anexo C	80

1. Introdução

O desenvolvimento de biomateriais (definido basicamente como materiais capazes de reconstituir ou substituir tecidos e funções corpóreas sem que reajam negativamente ao hospedeiro^[1]), mostra-se fundamentalmente importante, pois esse desenvolvimento prescreve uma melhoria no nível de vida de pessoas acometidas por traumas ou patologias, representando um aumento na expectativa de vida, na saúde em geral e no bem estar dessa população.

A utilização de biomateriais para os mais diversos destinos no corpo humano, tem tido uma ascensão considerável nessas últimas décadas, devido às modificações no ritmo do cotidiano dos mais diferentes indivíduos. Essas aplicações tornaram-se freqüentes, principalmente na forma de implantes ortopédicos e/ou odontológicos, onde a utilização de biomateriais pode ser atribuída ao próprio avanço tecnológico, uma vez que, acidentes envolvendo máquinas (sejam elas industriais ou automotoras), a prática de novos esportes radicais, patologias surgidas devido aos novos ritmos e pressões da vida moderna e até mesmo para fatores estéticos tem sido bem evidentes.

Para que um material seja definitivamente considerado como biomaterial, importantes ensaios são realizados, incluindo os de propriedades mecânicas, além dos diversos tipos de ensaios de biocompatibilidade.

O biomaterial terá que apresentar propriedades adequadas às funções que desempenhará, relacionadas ao local de inserção, deve também ser biocompatível não causando distúrbios locais ou sistêmicos ao organismo que está sendo implantado.

Nesse contexto, esse trabalho apresenta alguns dados referentes a ensaios de biocompatibilidade, com a intenção de sugerir a utilização da liga experimental Ti-10Mo como biomaterial

2. Objetivo

Esse trabalho objetiva avaliar a biocompatibilidade da liga experimental Ti-10 Mo com pretensão de aplicação odontológica. Como simulação mais próxima do contato ambiente bucal com o material, analisou-se extratos originados do eletrólito: saliva artificial mais associações com fluoreto de sódio, após contato com as ligas metálicas: Ti-6Al-4V (parâmetro para os testes) e Ti- 10Mo (liga em teste). Os ensaios foram embasados principalmente nas Normas Técnicas da *International Organization for Standardization (ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices)*. Os testes realizados *in vitro* – hemocompatibilidade, análise celular do lavado peritoneal seguiram recomendações das normas técnicas de análises clínicas e o de citotoxicidade da *ISO 10993 -5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. Os ensaios *in vivo*– toxicidade sistêmica seguiram a *ISO 10993-11 Tests for systemic toxicity*.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Biomateriais e Biocompatibilidade

No mundo todo, ligas metálicas têm sido usadas com sucesso como biomateriais em aplicações, por exemplo, nas áreas de ortopedia e odontologia. O uso de biomateriais e a busca de possibilidades em projetar novos destes, vêm crescendo, não somente na questão científica em que o mesmo está inserido, mas principalmente no que se referem às condições para a melhoria na qualidade de vida das pessoas que precisam clinicamente ser assistidas com esses dispositivos implantáveis.

Os biomateriais são embasados e classificados através de normas, que separam os tipos de materiais e dispositivos médicos nas seguintes classificações:

-dispositivos que não entram em contato com o paciente (não apresentadas pela norma ISO 10993);

-dispositivos com contato superficial – são aqueles que entram em contato com a pele íntegra (ex.: eletrodos e bandagens), mucosas intactas (ex.: próteses dentárias e DIUs) e superfícies rompidas ou comprometidas tais como as acometidas por úlceras e queimaduras;

-dispositivos de comunicação externa – são os dispositivos que entram em contato com a via sanguínea indiretamente (ex.: dutos para administração de soluções e de sangue), com tecido, osso ou sistema polpa/dentina (ex.: artroscópios e materiais dentários de preenchimento) e com sangue circulante (ex.: cateteres intravasculares e dialisadores);

-dispositivos de implantes – são os materiais que entram em contato direto com tecido/osso (ex.: implantes dentários e marcapassos) e sangue (ex.: válvulas cardíacas).^[2]

Para que um material atinja a especificidade adequada para implante, certos fatores devem ser seguidos. De modo geral deve-se ter um conhecimento de que a propriedade estrutural do material se identifique com o que se deseja projetar, a fase de produção, a tecnologia envolvida na mesma, que somados a outros fatores levarão a um produto final com seu uso correspondente.^[1]

A propriedade física do material para ser implantado não é o único quesito a ser observado, pois somente isso não garante a possibilidade de implante, mas com certeza é o que possibilita a próxima fase de aprovação, que é a verificação da biocompatibilidade. Neste processo o que se analisa é a aceitação do material dentro de um meio biológico, assegurando que a sua capacidade de funcionamento não gere distúrbios imunológicos ao implantado e também que o mesmo não atue negativamente sobre o dispositivo de modo que este venha a perder sua função.^[3,4]

A seleção de um material para ser destinado a implante deve iniciar com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão. Como essas propriedades são extremamente sensíveis às variações da estrutura do material em escala micrométrica ou nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento de como se correlacionam a microestrutura com as propriedades desejadas. A partir desse conhecimento, que é a base da Ciência dos Materiais, pode-se pensar em confeccionar um material, (escolher um que já esteja disponível comercialmente ou projetá-lo) para atender ao comportamento esperado.^[5] Também pesam na seleção de um material, fatores como: tecnologia envolvida na produção da matéria-prima e do componente, disponibilidade e custo dos insumos, entre outros, que influem no preço final da peça. A seleção do material é apenas uma das etapas que garantirá, ou não, o sucesso de todo um trabalho.^[6]

Porém, a caracterização por si só do material não habilita o seu uso como biocomponente,

mas pode e deve ser utilizada como uma pré-seleção de condições a serem testadas nas etapas seguintes. Assim, vencida esta fase, começam-se os testes laboratoriais *in vitro* e posteriormente *in vivo*, embasados por normas técnicas (principalmente o conjunto da ISO 10993) e éticas, de forma que, a aplicação dos testes *in vivo*, só serão realizados se primeiramente os resultados dos testes *in vitro* não apresentarem reações tóxicas e/ou lesivas. Caso isso ocorra, a possibilidade desse material ser utilizado como biomaterial torna-se questionável e muitas vezes, é descartada.

Além das avaliações de aceitação biológica (biocompatibilidade), o efeito mecânico deve ser levado em consideração, pois se a confecção de um componente metálico, por exemplo, for projetada de forma inadequada, pode sofrer desgaste e corrosão, gerando um quadro de reações sistêmicas, ocasionando necrose ou reabsorção do material, hipersensibilidade, toxicidade e até mesmo efeitos carcinogênicos.^[7] A biocompatibilidade é uma característica imprescindível no estudo dos materiais implantáveis, pois estes materiais devem atender a requisitos de funcionabilidade biológica para o qual foram projetados, sendo que eles como um todo ou partículas que por ventura venham a se desprender (por desgaste ou produto de corrosão), não devem reagir com os tecidos (salvo alguns materiais específicos onde tal propriedade seja requerida para que o processo de cura se estabeleça) e provocar o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias. Existem parâmetros de aceitação desses níveis, constantes em normas técnicas do gênero.^[8]

Com a intenção de melhorar suas propriedades, as ligas metálicas podem ter em sua composição vários elementos, o que acaba dificultando o processo de aceitação biológica, pois as possibilidades de indução às reações tóxicas acabam sendo maiores devido a sua complexidade e diversidade.^[9,10]

O tempo de vida dessas ligas no ambiente bucal é longo, principalmente nos caso de

próteses, mesmo no caso de fios ou bandas ortodônticas a exposição também é considerável, o que leva a uma preocupação em relação à biocompatibilidade desse material. ^[9-11] O meio bucal oferece condições propícias para que haja processo de biodegradação, desgaste e corrosão através da ação salivar, além da destruição físico-química causada pela mastigação dos alimentos, ação bacteriana, flutuações de temperatura e pH, liberação de ácidos contidos em alimentos e íons de ação corrosiva contidos em dentifrícios e enxagues bucais. ^[9,12, 13]

Dessa forma, normas técnicas foram instauradas para a análise de biocompatibilidade de novos materiais e dispositivos candidatos a biomateriais. Assim são feitos ensaios sugeridos por normas técnicas internacionais, tais como na *ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices*, onde os principais testes são: citotoxicidade, sensibilização, irritação, reatividade intracutânea, toxicidades sistêmicas aguda e sub-aguda, implantação e hemocompatibilidade^[14].

3.2 Ligas de Titânio

Uma diversidade de ligas a base de titânio vem sendo estudadas e aplicadas em próteses metálicas implantáveis, pois demonstram grandes vantagens clínicas e pós-operatórias. O uso de titânio e suas ligas se deve, principalmente às suas propriedades estruturais e a excelente resistência a corrosão, principalmente em contato com meios agressivos como o ambiente fisiológico ^[15,16], além de possuir densidade menor, quando comparado a outras ligas metálicas de uso biomédico (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Comparação da densidade do Ti e suas ligas a outras ligas de uso biomédico. ^[17]

Ligas Metálicas	Densidade (g/cm ³)
Ti e suas ligas	4,5
Aço inoxidável 316	7,9
CoCrMo	8,3
CoNiCrMo	9,2
NiTi	6,7

O titânio torna-se mais resistente e com propriedades mecânicas variadas através de controles da composição e de técnicas de processamento termomecânicos.^[18] É um material que apresenta alotropia, onde até 882°C a estrutura é hexagonal compacta (hc/ α -Ti) e acima dessa temperatura, apresenta-se com a estrutura cúbica de corpo centrado (ccc/ β -Ti), como pode ser observado na Figura 3.1. Com base nas fases que podem se formar através dos elementos ligantes, as ligas de titânio agrupam-se em: ligas alfa, alfa-beta e beta. Exemplos de diferentes elementos de ligas e seus respectivos diagramas de fases são mostrados na Figura 3.2 e as propriedades mecânicas estão demonstradas na Tabela 3.2.^[19]

Ligas alfa (Figura 3.3-a): caracterizam-se por apresentarem boa soldabilidade, ductilidade, resistência a corrosão. Possuem elementos estabilizantes da fase α , como por exemplo o Al.^[17,18]

Ligas alfa-beta (Figura 3.3-b): sua resistência varia entre média e alta, são soldáveis e tratáveis termicamente e adequadas para conformação a quente.^[17,18]

Ligas beta (Figura 3.3-c): respondem bem a tratamentos térmicos, possuem alta resistência à fluência a médias temperaturas, apresentam excelente conformabilidade quando tratadas por solubilização e apresentam em sua composição elementos estabilizadores da fase β , como por exemplo o V e o Nb.^[17,18]

Figura 3.1 Parte do diagrama de fases da Ti-6Al-4V, demonstrando transformação da estrutura alfa (hc) e beta (ccc). ^[17]

Figura 3.2 Diagrama de fases do titânio com diferentes elementos de ligas. ^[20]

Figura 3.3 Microestrutura de ligas de Ti: a) Liga α ; b) Liga α - β ; c) β .^[17]

Tabela 3.2 Propriedades mecânicas do Titânio e suas ligas.^[19]

Ligas	E GPa	σ máx (MPa)	σ 0,2% (MPa)	% Alongamento
Alfa				
Ti	105	240-617	165-520	12-27
Alfa-beta				
Ti-6Al-4V	88-116	990-1184	789-1013	3-30
Ti-5Al-2,5Fe	110	943-1050	818-892	13-16
Ti-6Al-7Nb	108	99-1100	910-970	11-14
Beta				
Ti-13Nb-13Zr	79	550-1035	345-932	8-15
Ti-11,5Mo-6Zr-2Fe	74-85	1060-1100	1000-1060	18-22
Ti-15Mo-5Zr-3Al	15-113	882-1312	870-1284	11-20
Ti-15Mo-3Nb	79	1035	993	15

Devido à sua baixa resistência mecânica, o Ti puro não é usado para aplicações em dispositivos ósseos que são submetidos a grandes solicitações de carga, sendo que, nesses casos as ligas de Ti- β são as mais apropriadas. Em casos de implantes dentários ou para revestimento de outras ligas de Ti, o Ti puro é utilizado (Figura 3.4 a-c).^[19]

Figura 3.4 Implantes: a) ortopédico-liga de Ti; b) odontológico-Ti puro; c) fio ortodôntico-liga de Ti. ^[21,22]

Estudos mostram que a liga binária experimental β , Ti-10Mo, contendo de 6-20% em peso de Mo tem potencial para aplicação odontológica, pois as ligas β em comparação às ligas $\alpha + \beta$ exibem uma resistência a corrosão superior, principalmente em meios fisiológicos. ^[23, 24]

Essa resistência a corrosão é devido às características morfológicas, que dependem da superfície e do tratamento termoquímico do material e da formação espontânea de uma camada passiva de óxido na superfície do material, constituída por TiO_2 , devido ao contato implante e meio fisiológico, exemplificado na Figura 3.5. Entretanto a liga Ti-10Mo ainda não tem todos os seus estudos *in vivo* complementados, pois tem sido levantadas dúvidas relativas à sua capacidade de resistir à corrosão ocasionada por mudança na composição, gases dissolvidos (O_2 e CO_2), presença de microrganismos e fluidos corporais, além de que íons cloretos e fluoretos contidos em produtos de higiene oral que podem possibilitar um início de corrosão localizada. Esses problemas não estão relacionados somente a liga Ti-10Mo, mas em outras ligas de Ti também. ^[25-29]

Uma das ligas de maior utilização é a Ti-6Al-4V, com suas propriedades estruturais e de biocompatibilidade já bem conhecidas. ^[30,31] Entretanto, na liga Ti-6Al-4V mesmo após longos

períodos de implantação, foi demonstrado através de testes *in vivo* que, em meios fisiológicos, pode desestabilizar o filme óxido, liberando detritos metálicos de elementos que compõem essa liga, no caso, alumínio e/ou vanádio, levando a retirada do implante e, em alguns casos, problemas de má formação celular local, desenvolvimento de células tumorais, colocando assim a biocompatibilidade da liga em questionamento.^[30-32] O V é um elemento que apresenta uma alta citotoxicidade e, o acúmulo de Al no organismo está relacionado a distúrbios neurológicos. Esses problemas têm sido resolvidos com revestimento dos dispositivos utilizando biovidros e hidroxiapatitas sintéticas, que tem característica osseocondutora.^[32,33] Outra possibilidade tem sido a utilização de ligas de Ti com outros elementos como o Nb, o Mo e o Zr como substitutos daqueles elementos causadores de distúrbios. Assim, ligas como Ti-6Al-7Nb, Ti-5Al-2,5Fe, Ti-13Nb-13Zr, Ti-Mo entre outras, estão sendo desenvolvidas com a finalidade de utilização biomédica.^[16, 34,35]

Figura 3.5 Camada passiva constituída por TiO_2 , devido o contato implante e meio fisiológico.^[19]

3.3 Testes de Biocompatibilidade: Hemocompatibilidade, Citotoxicidade e Toxicidade Sistêmica

A *International Organization for Standardization* – ISO, juntamente com outros grupos desenvolveram um conjunto de normas, a ISO 10993, que apresentam as técnicas da avaliação biológica dos dispositivos médicos, desde sua fabricação, esterilização, resposta biológica local ou sistêmica, propriedades físicas, mecânicas entre outras.

A importância dos testes *in vitro* é evidente, pois além de demonstrarem, com segurança, a resposta celular frente ao material ou extrato do mesmo, são testes rápidos, de baixo custo e de padronização bem definida, além, de evitar ou diminuir, em números, o uso de animais. Os testes de toxicidade, por exemplo, são testes que ainda precisam ter um maior avanço quando comparados aos testes *in vitro*, principalmente para materiais de uso biomédico. ^[36]

Para os ensaios que necessitam além dos testes *in vitro*, testes *in vivo*, a norma ISO 10993-6 ^[37] ressalva, para os ensaios, o uso de camundongos, ratos e coelhos, pela facilidade de manuseio e similaridade em relação à resposta fisiológica humana frente aos dispositivos, implantes ou similares. Para os ensaios de citotoxicidade e toxicidade sistêmica por exemplo, as normas técnicas *ISO 10993-10* ^[38], *ISO 10993-12* ^[39], ditam a seleção e a preparação de amostras e extratos. Os materiais e dispositivos podem ter potenciais tóxicos e por isso, utilizam-se extratos confeccionados desses materiais para a realização dos testes. Em alguns testes pode haver a necessidade de utilizar o material em condições normais de uso, que poderá apresentar-se

na forma de fragmentos ou, ainda, utilizar nos testes o próprio dispositivo, como nos ensaios onde o material testado entra em contato direto com culturas celulares.

Os veículos de extração utilizados para a obtenção dos extratos podem ser, por exemplo, salina fisiológica, óleos vegetais, soluções com similaridade fisiológica (saliva artificial) entre outras. A utilização de extratos originados a partir de saliva artificial, para avaliação de ligas metálicas de aplicação odontológica é de grande importância, pois estudos demonstram que esses materiais podem sofrer biodegradação por entrarem em contato com a saliva entre outros componentes relacionados ao meio oral.^[9,11,13,40-44]

Nos ensaios de citotoxicidade a recomendação da norma é que sejam realizados a uma temperatura próxima da temperatura fisiológica humana (em torno de 36,5 °C) e com o tempo de 72 horas de experimentação.

Pelas normas outro requisito que necessita atenção é a proporção estabelecida entre espessura da amostra, área superficial de contato com a solução e quantidade de material a ser extraído. As normas técnicas também regem procedimentos para cada tipo ou condição de amostra.^[44]

3.3.1. Teste Hemocompatibilidade

As células sanguíneas são responsáveis por processos fisiológicos extremamente importantes à vida de um organismo humano. As hemácias são responsáveis pelo transporte de gases (O₂ e CO₂) através da hemoglobina e os leucócitos estão relacionados ao sistema de defesa do organismo, além das propriedades de coagulação relacionadas às plaquetas. Devido a essa importância é necessário se ter o controle sobre a interação dos materiais de implante quando em

contato direto ao sangue. Por isso, na avaliação da hemocompatibilidade, estão envolvidos testes laboratoriais utilizados em análises clínicas, capazes de identificar e quantificar alterações e/ou lise nas células sanguíneas, quando em contato direto ao material em teste.^[45]

No teste de hemocompatibilidade os processos desenvolvidos são:

-Leucograma: fornece informações referentes às células brancas, para poder avaliar possíveis alterações morfológicas;

-Eritrograma: fornece informações referentes às células vermelhas, através de vários métodos como a contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, cálculos dos índices hematimétricos e observações morfotintoriais.^[46,47]

Leucograma

Os leucócitos (glóbulos brancos) são diferenciados quanto a sua estrutura celular e também pela sua função, podendo ser classificado em duas categorias diferentes: A)leucócitos mononucleares (Monócitos, plasmócitos, linfócitos) e os B); leucócitos polimorfonucleares (Neutrófilos, eosinófilos, basófilos). Realizam funções de capacidade fagocitária importantes no organismo, que se manifestam de acordo com sua localização e ativação.^[46]

Eritrograma

As hemácias são avaliadas segundo as suas características morfotintoriais. Apresentam-se anucleadas, coram-se em rósea e apresenta região central mais clara, devido a sua forma bicôncava e tem em média 7,2 µm de diâmetro. É responsável pela troca de gases respiratórios (oxigênio e dióxido de carbono) do sistema fisiológico todo e, com fundamental importância para este processo, está a proteína transportadora de oxigênio, a hemoglobina.^[46]

Para analisar alterações é feito um esfregaço sanguíneo, que através de microscopia óptica, pode-se observar as alterações de: tamanho, cor, forma, inclusões, distribuição e artefatos.

Hemoglobina

A função vital da hemácia é a troca de gases respiratórios, a hemoglobina, que é o principal constituinte do citoplasma da hemácia (respondendo por cerca de 90% do peso seco da célula madura) é a responsável por esse processo. A molécula de hemoglobina é grosseiramente esférica, com um diâmetro molecular médio de 6,4 nm.^[46]

Determinação do hematócrito

É utilizado para determinar a porcentagem de hemácias em relação ao sangue total.^[46,47]

Índices Hematimétricos

A análise dos índices hematimétricos compreende na determinação do tamanho e do teor de hemoglobina das hemácias que são calculados através dos valores da dosagem de hemoglobina, contagem global das hemácias e do hematócrito. Os índices hematimétricos compreendem:

-Volume Corpuscular Médio (V.C.M.): indica o volume médio de cada hemácia (tamanho) e sua unidade de medida é fentolitros (fl).^[46,47]

-Hemoglobina Corpuscular Média (H.C.M.): indica o conteúdo da hemoglobina em média de cada hemácia, sua unidade de medida é picogramas (pg).^[46,47]

-Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (C.H.C.M.): indica a concentração em média de hemoglobina das hemácias, sua unidade de medida é g/dl ou porcentagem. ^[46,47]

Plaquetas

As plaquetas são pequenos corpos incolores de refringência moderada, com forma esférica ou oval, apresenta em média um diâmetro de 2 a 4 μm . Apresentam 3 importantes propriedades físicas: adesividade, aglomeração e aglutinação, sendo assim extremamente importante para o momento de coagulação sanguínea. ^[46,47]

Tempo de Coagulação Sanguínea

A coagulação do sangue é dependente de fatores da coagulação e pode ser ativada por duas vias: via extrínseca (lesão ou trauma externo) e via intrínseca (lesão interna no vaso), estas vias convergem em uma via comum para ter a formação do tampão plaquetário – agregação plaquetária. ^[46,47]

3.3.2 *Teste de Citotoxicidade*

O principal objetivo do teste de citotoxicidade é identificar se o material ou dispositivo tem a capacidade em produzir efeitos letais ou subletais no meio biológico a nível celular e deve ser aplicado a todos os tipos de biomateriais. O teste de citotoxicidade pode ser realizado através de difusão em ágar e/ou por eluição.

No teste de difusão uma quantidade do material em teste, é colocada sobre uma camada de ágar que recobre uma monocamada confluyente de células, caso o material libere substâncias tóxicas, estas se difundem através da camada fina de ágar, matando ou rompendo células da monocamada confluyente e evidenciando um halo.

No teste de eluição, o extrato do material é adicionado em concentrações variadas em culturas celulares e a avaliação em geral, é realizada através da observação da inibição ou não do crescimento das mesmas através de incorporações de corantes vitais. ^[48]

O índice de sobrevivência celular é o parâmetro mais utilizado capaz de identificar níveis de toxicidade, através de corantes vitais como o vermelho de neutro, que é solúvel em água e tem passagem pela membrana celular concentrando-se nos lisossomos. Algumas substâncias são lesivas à membrana celular, o que resulta numa menor absorção do vermelho neutro pela célula, isso facilita a visualização das células vivas comparadas às mortas ou lesadas, através da cor da cultura celular que poderá ser mensurada. ^[36,49]

O teste de citotoxicidade é um teste rápido, padronizado, sensível e de baixo custo, capaz de informar se um material apresenta quantidades significantes de elementos tóxicos extraíveis e está padronizado nas normas ISO 10993-5. A sensibilidade do teste está no fato de que as culturas celulares permanecem viáveis em ambiente controlado e sem a presença dos mecanismos de defesa celular existente no sistema biológico.

3.3.3 Teste de Toxicidade Sistêmica e Análise do Lavado Peritoneal

A toxicidade sistêmica é analisada através dos possíveis efeitos que componentes químicos liberados por um material, podem vir a interagir com o organismo, desestabilizando ou não o funcionamento sistêmico geral ou certos órgãos-vitais (fígado, cérebro, intestino, rins), que podem estar distante do local de contato. O teste de toxicidade sistêmica aguda é determinado pelas normas *ISO 10993-11*^[50], com curta observação de tempo, originado após a administração de uma dose única e verificando os possíveis efeitos adversos. Para esse tipo de teste, as normas não são bem precisas em relação a protocolos para estudo da mesma, o que possibilita a aplicação de várias metodologias, publicadas em outras normas internacionais. Os animais mais utilizados para os testes de toxicidade sistêmica são os de pequeno porte (que facilitam o manuseio técnico e as acomodações em biotérios), como os camundongos albinos e ratos. As formas de aplicações dos extratos podem ser por via tópica, inalação intravenosa, intraperitoneal ou oral. A análise dos animais é estabelecida também pela norma ISO que classifica os efeitos adversos em agudo, subagudo, subcrônico e crônico e a esses dá uma numeração de 0 a 4, ressaltando que os efeitos agudos ocorrem dentro das primeiras 24 horas após a aplicação. Os resultados do teste estendem-se a uma observação, do comportamento dos animais, em intervalos pré-determinados durante um período de 72 horas contados a partir da aplicação única. Para o teste de toxicidade sistêmica, pode-se utilizar extratos de aplicação como: salina fisiológica, saliva artificial e óleos vegetais.

^[39] A interpretação desses resultados baseia-se nas diferenças apresentadas entre os grupos de testes e os controles. Nos testes de toxicidade, a administração do extrato é através da via intraperitoneal, devido a importância anato-fisiológica da cavidade e líquido peritoneal. Essa região é muito vascularizada e liga-se ao sistema fisiológico (ao qual está localizada) como um

todo. O peritônio é considerado um “verdadeiro órgão”, por ter funções próprias. Das suas características funcionais, as principais e que justificam sua utilização em testes *in vivo*, é que, a secreção do líquido peritoneal está entre as vísceras, realiza grande absorção e eliminação de substâncias para a circulação, e da circulação, para a cavidade peritoneal. Esta propriedade explica a utilização desse meio nos testes, pois se houver eliminação de toxinas do material/extrato em teste, haverá absorção a nível sistêmico^[51,52], o que será evidenciado através de observações tanto macroscópicas, quanto microscópicas nos animais e do material biológico dos mesmos. Outro fator importante para avaliação desse meio, é que o peritônio é muito sensível, qualquer tipo de anormalidade provoca dores intensas, pois o peritônio parietal é innervado pelos nervos da parede abdominal a ele adjacentes, fazendo com que as alterações que possam vir a ocorrer nas cobais sejam facilmente observadas. Em relação ao peritônio visceral, o estímulo de dor não é captável, pois não apresenta inervação para tal estímulo, embora, possa se conseguir observar sinais de distensão ou tração, que são difusamente sentidos.^[53]

Então, para os testes de biocompatibilidade, principalmente os que se referem a hemocompatibilidade, citotoxicidade e toxicidade sistêmica, são utilizadas as normas técnicas da *International Organization for Standardization (ISO 10993 - Biological evaluation of medical devices)*. Os testes realizados *in vitro* – hemocompatibilidade e o de citotoxicidade seguem a *ISO 10993 -5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. Os ensaios *in vivo* – toxicidade sistêmica seguem a *ISO 10993-11 Tests for systemic toxicity*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostras

Como amostras de teste para esse trabalho foram utilizadas:

-ligas metálicas Ti-10Mo e Ti-6Al-4V (obtidas de dispositivos ortopédicos comerciais), com diâmetro e pesos respectivos de 3 e 1,5 cm de diâmetro e 3 e 2 g. A superfície desses materiais foram lixadas com lixas: 220 – 320 - 600 – 1200 – 2000 e polidas com óxido de cromo e alumina – 0,3 μ m. Após esse procedimento o material foi limpo e em seguida esterilizado em calor seco a 180°C por 1 hora. A composição das ligas está especificada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Composição Química das ligas Ti-6Al-4V e Ti-10 Mo ^[20, 54]

	Al	V	Fe	O	N	H	Mo	Ti
Ti-6Al-4V	6,25	4,28	0,3	0,2	0,005	0,015	-	Bal
Ti-10Mo	0,005	-	0,120	0,140	0,008	-	10,28	Bal

A liga Ti-10Mo (liga em teste) tem o molibdênio como elemento estabilizante da fase β . A fotomicrografia da Figura 4.1 evidencia a estrutura do tipo α - β , com grãos grosseiros. Apresenta dureza 302 HV e módulo de elasticidade 96 GPa. Os ensaios de micro dureza Vickers foram realizados com carga de 200 gf aplicada por 15 segundos e o módulo de elasticidade foi determinado dinamicamente por ultra-som, utilizando-se transdutores longitudinal e transversal de diâmetro 6,35 mm. ^[55]

Figura 4.1 Microestrutura do Ti-10Mo com aumento de 500x.

[cortesia do laboratório de metalografia da EESC]

Para os ensaios de hemocompatibilidade, foram colhidas amostras sanguíneas de ratos. As amostras de sangue foram colhidas de animais adultos com peso maior e/ou igual de 250g. A coleta foi realizada através de exsanguinação.

Para a cultura celular, células da linhagem celular ATCC-CRL-1696 (McCoy-fibroblasto de camundongo)¹ foram semeadas em placas de Petri, estéreis e descartáveis (Corning) em meio de cultura celular Iscove's^{**} e incubadas em estufa a 37 ± 1 °C, com atmosfera controlada (5% de CO₂ e 95% de umidade) durante 48 horas.

Para a obtenção do lavado peritoneal foi realizada incisão cirúrgica abdominal nos animais através de técnicas convencionais e com devidos cuidados anestésicos.

Como esse trabalho tem como objetivo averiguar a biocompatibilidade da liga Ti-10Mo e compará-la à da liga Ti-6Al-4V, foram realizados testes *in vitro* (utilizando sangue animal) e testes *in vivo* e, por isso, houve a necessidade da aprovação dos protocolos utilizados, que foi

¹ Origem: Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Br.

^{**} Meio de Iscove modificados Dubelcco's – Sigma-Aldrich

submetido ao comitê de ética experimental em animais pela Universidade Federal de São Carlos (anexo A).

4.2 Teste de Hemocompatibilidade

Esses testes foram feitos com as recomendações da norma técnica ISO 10993-4 *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood*, e complementados com técnicas de análises laboratoriais (hemograma completo) estabelecidos pelo Laboratório de Hematologia Clínica da Santa Casa de Misericórdia – Uniara, com seus devidos valores de referências. Nesse ensaio foi avaliada a hemocompatibilidade das ligas metálicas a base de titânio, quando em contato direto com sangue de ratos num período de 72 horas.^[45]

Após os animais serem pesados, iniciou-se a coleta de sangue por exsanguinação. Os animais foram anestesiados com ketamina 10%, dose – 0,2 ml IM. Após estarem devidamente anestesiados, os animais foram colocados no suporte e em seguida feita uma incisão mediana abdominal, utilizando a pinça e a tesoura. Afastou-se as vísceras abdominais para a direita do animal, evidenciando a gordura retroperitoneal, atrás da qual localiza-se a artéria aorta. A aorta foi puncionada com seringa dotada da agulha 25 X 8, e após a extração, o sangue foi colocado em tubos de ensaio com anticoagulante, exceto o sangue que se destinava ao teste de tempo de coagulação. Cada rato adulto teve em média uma quantidade de sangue colhido de 10 ml que foi mantido durante todo o período de ensaio a temperatura de 36°C.

O sangue colhido foi dividido em:

Sangue 1) 5 ml de sangue com anticoagulante + Ti-10 Mo (liga teste)

Sangue 2) 5 ml de sangue com anticoagulante + Ti 6Al 4V (parâmetro/biomaterial)

Sangue 3) 5 ml de somente sangue com anticoagulante (normalidade)

As análises realizadas com as amostras foram:

- dosagem de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)), contagem global de hemácias, leucócitos, tempo de coagulação, plaquetas e confecção do esfregaço sanguíneo para análise morfológica;
- as análises permaneceram durante um período de 72 horas (sendo as análises realizadas no momento imediato da coleta e nos momentos 12h, 24h, 48h, 72h após coleta), exceto para o tempo de coagulação, que foi somente avaliado no momento imediato.
- as dosagens de hemoglobina, índices hematimétricos, contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, foram realizadas no aparelho *Coulter T-890*.

Para cada amostra foi confeccionado um esfregaço sanguíneo (depositado na superfície de lâminas para microscopia) corado com corante Leishman (formado por eosina e azul de metileno) para posteriormente realizar as observações celulares através de microscópio óptico. Como valores de referências, foram usados os valores dos testes da amostra como padrão de normalidade, onde o sangue somente entrou em contato com anticoagulante.

A técnica usada para leitura do esfregaço (Figura 4.2) é a utilizada em microscopia sanguínea, onde a área útil do esfregaço começa na cauda do mesmo e termina indo a direção à “cabeça”, onde encontram-se hemácias sobrepostas, para a leitura do esfregaço o método utilizado é o de “zig-zag”, conta-se primeiro as bordas do esfregaço e por último o centro do esfregaço.

Figura 4.2 Lâmina com esfregaço sanguíneo.

Para cada amostra de sangue foi feita a contagem global das células com a intenção de observar alterações em número das células em relação ao tempo que as mesmas ficaram em contato com as ligas metálicas. Determinou-se também como normalidade o sangue sem contato com ligas. Valores de referência utilizados estão demonstrados na Tabela 5.1.

Após cada contagem global foi realizado o esfregaço sanguíneo para observar microscopicamente (em objetiva de 1000 x) as alterações ocorridas pelo tempo de contato ligas-sangue.

4.3 Preparo do veículo de extração para os testes: citotoxicidade e toxicidade sistêmica

O veículo de extração utilizado foi saliva artificial fórmula de Fusayama ^[56] conforme demonstra a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Fórmula da saliva artificial de Fusayama (g/l).^[56]					
KCl	NaCl	CaCl ₂ .2H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Na ₂ S.9H ₂ O	Uréia
0,4	0,4	0,906	0,690	0,005	1

Para a confecção dos extratos seguiu-se a norma *ISO 10993-11* Tests for systemic toxicity, onde para cada 20ml de veículo de extração usou-se 2-4g de material.

Como esse experimento teve a intenção de demonstrar o comportamento de extratos a base de saliva artificial, simulando o ambiente bucal, foi adicionada à saliva artificial, frações de sais de NaF 0,1% (concentração encontrada em enxágües bucais e creme dental). A saliva artificial foi filtrada dentro da capela de fluxo laminar em instrumentos e recipientes esterilizados. Após filtrar a saliva artificial, adicionou-se à mesma, as amostras das ligas metálicas (também estéreis).

Então, os frascos contendo os veículos com e sem as amostras de ligas metálicas foram condicionados a 37 °C (± 2 °C) por 72 horas (± 2 h). Após este período, os extratos foram vertidos em frascos estéreis, para separar a liga metálica dos veículos de extração e estes foram armazenados até o momento de utilização. Esse procedimento também foi realizado dentro da capela de fluxo laminar.

Dividiu-se as amostras em 4 frascos estéreis, identificados na Tabela 4.3 abaixo:

Tabela 4.3 Extratos e seus componentes.	
Extrato	Componentes
A	saliva artificial pura
B	saliva artificial + NaF 0,1%
C	saliva artificial + NaF 0,1% + Ti-10Mo
D	saliva artificial + NaF 0,1% + Ti-6Al-4V

4.4 Teste de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade celular (teste por difusão em ágar e teste de eluição) foram realizados no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos-USP.

Para este teste seguiu-se a norma *ISO 10993-5*.^[57]

Realizou-se teste por difusão em ágar, onde uma quantidade do material em teste (ligas metálicas) foram colocadas sobre uma camada de ágar que recobre uma monocamada confluenta de células. Foi utilizada a linhagem celular ATCC-CRL-1696 (McCoy-fibroblasto de camundongo). A concentração celular é de 3×10^5 células/ml, que foram semeadas em placas de petri (15 x 60 mm), num volume de 5ml, sendo posteriormente incubadas por um período de 48 horas, com atmosfera úmida a 5% de CO₂ e temperatura de 37°C (Figura 4.3). Terminado o processo descrito acima, em capela de fluxo laminar, após crescimento da camada celular, foi desprezado o meio de cultura (Iscove's) e adicionado 5ml do meio "overlay" para cada placa de petri (Figura 4.4). O meio "overlay" é composto por partes iguais de mínimo de Eagle (MEM) e ágar a 1,8% com 0,01% de vermelho neutro. A temperatura de mistura do MEM e ágar foi a 44°C.

Quando o ágar estava praticamente solidificado foi adicionado em sua superfície as ligas de Ti-10Mo, Ti-6Al-4V. Consecutivamente as placas foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas.^[36] Caso haja liberação de toxinas, evidencia-se um halo devido a ruptura ou morte celular.

As amostras foram avaliadas em triplicata e, como controle positivo, foram adicionados sobre o mesmo tipo de ágar, fragmentos de látex e, para o controle negativo, foram utilizados fragmentos de filtro atóxico com tamanho médio de área superficial de 0,25 cm².

Figura 4.3 Cultura de células sendo incubadas.

Figura 4.4 Momento que o meio “overlay” é adicionado à cultura celular.

No teste de eluição, o extrato do material é adicionado em concentrações variadas em culturas celulares e a avaliação, em geral, é realizada através da observação da inibição ou não do

crescimento das mesmas através de incorporações de corantes vitais. Como método de comparação ao teste de difusão em ágar, foram adicionados excepcionalmente para o teste de eluição mais 2 tipos de extratos:

- Controle positivo - saliva artificial + fragmentos de látex ;
- Controle negativo - saliva artificial + filtro atóxico.

Neste teste foi utilizada a linhagem celular ATCC-CRL-1696 (McCoy-fibroblasto de camundongo), seguindo a norma ISO 10993-5, usou-se para esse teste os extratos originados (vide Tabela 4.3) das ligas metálicas em contato com a saliva artificial de Fusayama. A quantidade celular utilizada foi de 1×10^5 células/ml em meio Iscove's e em placas com 96 poços (Figura 4.5), após, foram incubadas a uma temperatura de 37°C com 5% de CO₂. Após um período de 24 horas o meio foi removido por aspiração e a monocamada de células foi lavada com PBS. Preparou-se os extratos nas seguintes concentrações: 100, 80, 65, 50, 30, 20, 10%. Após substituição do meio pelos extratos fracionados, as células foram incubadas em triplicata nos 96 poços por um período de 24 horas a 37°C com 5% de CO₂.^[58]

Terminado o tempo de incubação, as células foram tratadas com 3-(4,5 dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT), com a intenção de desenvolvimento de uma cor azul, pois esse método de contagem celular, baseia-se na redução do MTT (composto amarelo) a um produto formazan, que tem coloração violeta e que pode ser mensurado por absorbância até 570nm. A redução existente é devido as desidrogenases mitocondriais, somente presente nas células que continuaram vivas após o processo.^[58-60] Após um período de 3 horas de incubação, o meio com MTT é retirado e são adicionados 50µl de PBS com isopropanol na proporção de 1:1. Para leitura da placa em teste é utilizado o leitor de ELISA BIO-RAD em 550nm, demonstrado na Figura 4.6.

Figura 4.5 Cultura celular sendo emplacada.

Figura 4.6 Leitor de ELISA BIO-RAD.

A avaliação dos resultados do teste de citotoxicidade de difusão em ágar, é feita pela observação do índice do halo, que é representado pela área não corada pelo corante vital. Os índices, apresentados na Tabela 4.4, são numerados e é feita uma correlação, fornecendo o índice de resposta.

Tabela 4.4 Índice de halo (adaptado ^[57]).

Índice de halo	Descrição
0	nenhuma halo sob e ao redor da mostra
1	zona limitada sob a amostra
2	zona menor que 0,5 cm ao redor da amostra
3	zona entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra
4	zona maior que 1,0 cm sem envolver toda placa
5	zona que envolve toda placa

A apresentação dos resultados do teste de eluição dá-se através de gráficos de absorbância em função da concentração dos extratos dos materiais em teste.

4.5 Teste de Toxicidade Sistêmica e Lavado Peritoneal

O teste de toxicidade sistêmica foi normalizado pela ISO 10993 parte 11. ^[50] Tem como objetivo observar o potencial de toxicidade sistêmica dos extratos originados das ligas Ti-10Mo e Ti-6Al-4V e dos controles após inoculação intraperitoneal em ratos. A observação é macroscópica e considera as reações adversas que os animais possam vir a desenvolver após a inoculação num período de 72 horas. Os animais ficaram acondicionados e todos os procedimentos experimentais para este teste foram realizados no Biotério do Centro Universitário de Araraquara.

Para o teste foram utilizados 25 ratos - Wistar com peso médio de 245g, divididos em 5 grupos, sendo cada grupo com 5 animais. Os animais foram acondicionados em gaiolas próprias, com alimentação e água *ad libitum* conforme Figura 4.7.

Figura 4.7 Animais na gaiola de condicionamento.

Este teste avaliou sistemicamente a resposta do organismo dos animais frente ao extrato das ligas metálicas em teste e dos controles. Cada grupo específico entrou em contato com o seguinte inóculo, como segue Tabela 4.5 abaixo:

Tabela 4.5 Grupos de animais com respectivos extratos de inoculação.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Extrato A (Saliva artificial pura)	Extrato B (Saliva artificial + NaF 0,1%)	Extrato C -teste (Saliva artificial + NaF 0,1% + Ti-10Mo)	Extrato D- controle (Saliva artificial + NaF 0,1%+ Ti-6Al-4V)	Sem experimentação controle total

Após separação dos animais em grupos, realizou-se tricotomia abdominal e identificação em todos os animais (Figura 4.8 a) e b). Foi realizada a primeira pesagem (modelo de planilhas peso e observação - Anexo B), os animais foram pesados também nos momentos 24h, 48h e 72h pós inoculação.

Concluída a tricotomia e pesagem deu-se início a inoculação intraperitoneal dos extratos nos animais. A inoculação foi feita através de uma injeção na região da linha média abdominal. A dose de aplicação foi de 50 ml/Kg de peso corpóreo do animal (Figura 4.9).

Os animais foram observados a partir do momento de inoculação dos extratos, no momento 0h, 24h, 48h e 72h. As reações são avaliadas segundo Tabela 4.6

Tabela 4.6 Possíveis reações causadas pelos extratos e controles aplicados intraperitonealmente e respectivos valores para o nível sérico- índice de toxicidade sistêmica (adaptada ^[50])

Resposta	Descrição	Nível Sérico
Normal	Sem sintomas	0
Leve	Animal exhibe sintomas adversos leve, mas notáveis da hipocinesia, dispnéia ou irritação abdominal.	1
Moderada	Animal exhibe evidência definitiva de hipocinesia, dispnéia, irritação abdominal ou diarreia (usualmente o peso corpóreo cai entre 15 e 17 gramas.)	2
Severa	Animal exhibe prostração, cianose, tremores ou sintomas severos de dispnéia, irritação abdominal ou diarreia (perda extrema de peso corpóreo).	3
Morte	Animal morre	4

a)

b)

Figura 4.8 – a) Tricotomia na região abdominal do rato; b) Animal pronto para aplicação intraperitoneal.

Figura 4.9 Aplicação dos extratos na linha média abdominal (intraperitoneal) do rato.

Todos os resultados obtidos através das reações que os animais tiveram após inoculação dos extratos em teste (período de 72 horas) foram anotadas (segundo tabelas no Anexo B) e comparadas aos controles.

4.5.1 Coleta e análise do lavado peritoneal

Terminado o período de observação de 72 horas e feita a última pesagem, cada animal individualmente foi sedado e anestesiado. Para sedação e anestesia usou-se:

- sedativo analgésico - relaxante muscular ;
- ketamina 10% - anestésico.
- Dose – 0,2 ml IM.

Confirmado o estado de anestesia do animal, usando um bisturi de lâmina, foi feita uma incisão na linha média abdominal, objetivando a região peritoneal. Injetou-se 5ml de salina

fisiológica dentro da cavidade peritônio-abdominal e em seguida foi feita a aspiração do líquido. O líquido aspirado de cada animal foi analisado no aparelho *Coulter T-890*.

A intenção de analisar o lavado peritoneal é de verificar se houve, durante o tempo de contato do animal com o extrato, migração celular na área de inoculação. A contagem celular global do lavado peritoneal, sinaliza possível reação tóxica local ou sistêmica, gerando um processo inflamatório. Como valor de referência usou-se os indicativos da Tabela 4.7 abaixo e também a contagem celular global do Grupo 5, pois as cavidades peritoneais dos animais desse grupo não tiveram quaisquer tipos de extratos a elas inseridas.

Tabela 4.7 Valor referência de células no líquido peritoneal.

Células	Valores
Leucócitos	$\leq 300/\text{microlitro}$
Hemácias	nenhuma

4.6 Eutanásia

Após a coleta do lavado peritoneal realizou-se a eutanásia. Com os animais ainda anestesiados, fez-se uma ruptura no músculo diafragma, levando a uma parada cardio-respiratória do animal, ocasionando o sacrifício quase que instantâneo. Esta prática é utilizada e visa um sacrifício mais humanitário, com a intenção de minimizar o máximo possível de sofrimento ao animal. Todas as etapas desse trabalho, onde a presença do animal ou de fluidos do mesmo, foram utilizados, seguiu-se as recomendações das normas éticas para experimentação em animais, segundo protocolo ético, mostrado no anexo C.

5. Resultados e Discussões

5.1 Teste de Hemocompatibilidade

O teste de hemocompatibilidade teve como objetivo demonstrar o comportamento das células sanguíneas frente a contato direto com a liga metálica Ti-10Mo (teste). Como controle de normalidade foi utilizada uma amostra do sangue com a liga metálica Ti-6Al-4V (biomaterial) e uma amostra com sangue sem liga metálica. Os resultados foram avaliados através dos valores de referência, conforme indica a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Valores de Referências – sangue.

Analitos	Valores
Hemácias	4,3 - 6,0 milhões por mm ³
Leucócitos	47000 – 10000/ mm ³
Hemoglobina	12,6 – 17 g/dl
Hematócrito	44,4 – 54 g%
VCM	101,5 (+/- 5) fl
HCM	28 (+/- 2) pg
CHCM	27,6 (+/- 2) g/dl
Plaquetas	242000 - 400000
Tempo de Coagulação	6,3 - 15 minutos

As discussões dos resultados sobre hemocompatibilidade são embasadas nos resultados descritos na Tabela 5.2., na análise morfológica das células dos esfregaços das Figuras: 5.1 a 5.3 e nos dados dos gráficos (Figuras: 5.4 a 5.12).

Tabela 5.2 Média geral e desvio padrão do teste de hemocompatibilidade - 72 horas.

Analitos	Sangue + 10M0	Sangue + Ti6Al4V	Sangue (Controle)	Desvio Padrão
Leucócitos (Mil/ mm³)	4849	4910	4795	46,9
Hemácias (Milhões/mm³)	4,462	4,426	4,356	0,04
Hemoglobina (G/dl)	12,62	12,5	12,6	0,05
Hematócrito (G%)	44,5	44,38	44,46	0,04
VCM (Ftl)	101,56	101,56	101,58	0,009
HCM (Pg)	28,16	28,1	27,8	0,15
CHCM (G/dl)	28	28,1	27,8	0,12
Plaquetas (Mil)	240	238	242	1,7
Tempo Coagulação (Min.)	6,3	6,6	6,3	0,14

O valor de normalidade adotado para a contagem celular global de leucócitos foi o da amostra controle (somente sangue), sendo que a amostra do sangue com a liga Ti-6Al-4V é apenas para parâmetro. A Figura 5.4 demonstra que durante o período de 72 horas de análise, as amostras de sangue que estiveram em contato com a liga metálica Ti-10Mo e Ti-6Al-4V, não tiveram alterações consideráveis em seus leucócitos. Pode-se observar microscopicamente que, na morfologia das células contidas nos esfregaços sanguíneos da liga em teste Figura 5.1, não há qualquer tipo de deformação celular. Essa amostra é da última análise, ou seja, quando tinham decorrido 72 horas de contato do sangue com o material em teste e mesmo assim não apresentou deformidades. Como comparativo tem-se as fotomicrografias das células do sangue com Ti-6Al-4V e do sangue controle (Figuras: 5.2 e 5.3), que também são do momento 72 horas, confirmando que a estrutura celular mostrada na Figura 5.1 apresenta as mesmas características das citadas. Não há nenhum tipo de deformidade ou lesão que indique que o material interfira nas estruturas celulares em questão e a contagem celular global do sangue com a liga teste, está dentro do valor de normalidade (Tabela 5.1).

A quantidade de hemácias do sangue com a liga teste, observado durante o período total de experimentação, também permaneceu sem alterações significativas, quando comparadas às do

controle e à liga Ti-6Al-4V (biomaterial) conforme indica a Tabela 5.2. Não houve alteração significativa quando comparada a amostra do sangue controle. A fotomicrografia do esfregaço de sangue (Figura 5.1) demonstra que não há deformidade nas hemácias quando comparadas às micrografias das Figuras 5.2 e 5.3, ressaltando que a liga Ti-10Mo não age de forma agressiva quando em contato direto às hemácias (Figura 5.5), reafirmando os valores obtidos através da contagem global no aparelho *Coulter T-890*.

Figura 5.1 Análise da morfologia celular do sangue em contato com a liga Ti10-Mo no momento 72 horas: a) Leucócito; b) Hemácia.

Figura 5.2 Análise da morfologia celular do sangue em contato com a liga Ti-6Al-4V no momento 72 horas: a) Leucócito; b) Hemácia.

Figura 5.3 Análise da morfologia celular do sangue controle (sem liga metálica) no momento 72 horas: a) Leucócito; b) Hemácia.

Embasados nos valores apresentados na que Figura 5.6, não se observa alterações com significância para a dosagem de hemoglobina. Os resultados da Tabela 5.2 indicam que não há

lise celular ou perda considerável de hemoglobina. A dosagem do hematócrito, quando observada na Figura 5.7 informa que a porcentagem de hemácias no sangue total dosado manteve-se no período do teste, com uma porcentagem de 44,5%, e a dosagem do sangue controle esteve em torno de 44,46%.

O VCM quantifica o volume médio da hemácia. Esse volume médio de hemácias do sangue em contato com a liga teste, não tiveram alterações negativas em relação às do sangue controle (Figura 5.8). Pode-se observar conforme Tabela 5.2, que esses valores, quando comparados aos valores de controle médio dos ensaios, são resultados totalmente aceitáveis, pois estão dentro do valor de normalidade.

Não houve variação considerável do HCM (Figura 5.9) e CHCM das amostras testadas, quando comparadas ao controle e ao sangue com Ti-6Al-4V. Tanto o sangue com a liga Ti-10Mo como o com a liga Ti-6Al-4V, quando comparados entre si e ao controle, mantiveram-se dentro do mesmo padrão quantitativo para o CHCM, evidenciando que não houve alterações prejudiciais às células sanguíneas (hemácias) individualmente analisadas ou na sua concentração média, conforme Figura 5.10.

As plaquetas dosadas no sangue com a liga teste permaneceram dentro do limite de normalidade (Tabela 5.1). Houve uma diminuição das plaquetas do sangue com a liga Ti-6Al-4V que está relacionado ao aumento do tempo de coagulação do mesmo sangue observado na Figura 28, mas não são alterações que ultrapassam os valores do sangue controle. O tempo de coagulação demonstrado na Tabela 5.2, confirma o processo de coagulação do sangue em teste, demonstrando que o tempo de coagulação não foi afetado quando em contato com a liga Ti-10Mo, também observado e correlacionado à contagem das plaquetas conforme Figura 5.11.

Figura 5.4 Gráfico comparativo da contagem celular global de leucócitos.

Figura 5.5 Gráfico comparativo da contagem celular global de hemácias.

Figura 5.6 Gráfico comparativo da dosagem global de hemoglobina.

Figura 5.7 Gráfico comparativo da dosagem de hematócrito.

Figura 5.8 Gráfico comparativo da dosagem de VCM.

Figura 5.9 Gráfico comparativo de HCM.

Figura 5.10 Gráfico comparativo da dosagem de CHCM.

Figura 5.11 Gráfico comparativo da contagem global de plaquetas.

Figura 5.12 Gráfico comparativo do tempo de coagulação.

5.2 Teste de Citotoxicidade

O resultado do teste de difusão em ágar foi obtido através de análise macroscópica das placas, onde pode observar a formação ou não de halo. A formação de halo com cor clara ao redor da amostra testada, significa que houve processo de toxicidade, decorrido pelo material inserido ao meio celular. O halo pode ser observado somente quando há morte celular, pois somente assim, ocorre liberação do corante vermelho neutro, que foi incorporado pela células, resultando num aspecto transparente no local.

A toxicidade foi avaliada através do índice do halo formado (Tabela 4.4). Os resultados são demonstrados na Tabela 5.3 e Figuras: 5.13 a 5.16.

Tabela 5.3 Resultado do índice do halo para teste de citotoxicidade – difusão em ágar.

Amostra	Índice do halo	Diâmetro do halo (mm)
Controle Positivo	4	30,0
Controle Negativo	0	0,0
Ti-10Mo	0	0,0
Ti-6Al-4V	0	0,0

Figura 5.13 Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar - Controle Positivo.

Figura 5.14 Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar- Controle Negativo.

Figura 5.15 Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar- Liga Ti-10Mo.

Figura 5.16 Avaliação macroscópica do teste de difusão em ágar- Liga Ti-6Al-4V.

Como demonstra a Figura 5.15, o resultado do teste de difusão em ágar para a liga Ti-10Mo, não indica qualquer sinal de halo devido lesão celular. Indenticamente ficaram os ensaios controles Figura 5.14 e 5.16. Esse resultado é confirmado pela comparação ao controle positivo, pode-se observar um halo de 30,0 mm, o que coloca a amostra num índice de halo igual a 4 (Tabela 5.3 e Figura 5.13), identificando a morte celular local devido toxicidade do material (látex) inserido sob o ágar que recobre a camada de células.

Conforme demonstra a Figura 5.17, o ensaio de citotoxicidade através do processo de eluição, confirmou que o extrato C originado do contato da saliva artificial (com adições de NaF 0,1%) à liga metálica Ti-10Mo, independente da concentração que esteja, não causa toxicidade celular. A Figura 5.18 retrata o índice de sobrevivência celular das amostras, sendo que para o extrato C, o índice de sobrevivência final é igual a 42,2%, demonstrando que a liga Ti-10Mo quando em contato com a saliva artificial + NaF 0,1%, não libera componentes tóxicos. Foram utilizados como parâmetros, o controle negativo, positivo, o extrato B (somente saliva artificial com NaF 0,1%) e também o extrato D (saliva artificial + NaF 0,1% + Ti-6Al-4V. Como esperado, o controle positivo apresentou caráter de toxicidade sobre o meio celular, e conforme

sua concentração foi aumentando, mais evidente ficou seu teor de toxicidade, finalizando com um índice de sobrevivência celular igual a 9,8%, reafirmando que os outros extratos utilizados (especialmente o extrato C) não causam toxicidade celular.

Figura 5.17 Gráfico de citotoxicidade - Linhagem celular ATCC-CRL-1696.

Figura 5.18 Índice porcentual da Sobrevivência Celular – Linhagem celular ATCC-CRL-1696.

5.3 Teste de Toxicidade e Lavado Peritoneal

Após a inoculação dos extratos (via intraperitoneal), os animais foram pesados e iniciaram-se as observações das suas reações. A Tabela 5.4 demonstra os resultados de comparação entre os animais e os respectivos índices de observação após inoculação dos extratos (composição dos extratos, vide Tabela 4.3). Observou-se, que para o grupos 1 (inoculados com Extrato A) e o grupo 5 (sem inóculo), não houve nenhuma reação adversa notada em qualquer das observações, sendo considerada, portanto, como normalidade para os testes, ou seja, o grupo 1 é o controle para a inoculação da saliva artificial e o grupo 5 controle total do teste.

Segundo a Tabela 5.4, conclui que a adição de NaF 0,1% à saliva artificial, causa somente uma reação de nível sérico com índice igual a 1 – LEVE, que afetou 9 animais, o que corresponde a 36% dos animais totais do ensaio. Os animais com nível sérico de índice 1, tiveram seu restabelecimento a partir das 48 horas de experimentação, voltando a um nível sérico igual a 0. Para a avaliação geral dos grupos, o nível sérico é igual a 0 – NORMAL, com ganho de peso para 56% dos animais ensaiados (14 animais-Figura 5.19).

Conforme demonstrado na Figura 36 os animais do grupo 3 (extrato = saliva artificial + sais de NaF 0,1% + Liga Ti-10Mo) chegaram ao final das 72 horas de experimentação com ganho de peso, significando que o extrato inoculado não causou qualquer tipo de disfunção nos órgãos adjacentes à inoculação ou de nível sistêmico.

Os resultados observados em relação ao índice de toxicidade no grupo 2 (Tabela 5.4), demonstraram que o extrato B não causa toxicidade aos animais. Esses resultados certificam a utilização da saliva artificial + NaF0,1% como um controle para os extrato C e D, pois se os animais apresentassem alguma reação aos extratos (C e D), não seria pela presença de NaF 0,1%

e sim por outro motivo, como por exemplo, a presença das ligas em teste. O resultado obtido nos grupos 3 e 4, Tabela 5.5, também são semelhantes aos dos grupo 1 e 2, concluindo que o extrato C, obtido através da saliva artificial + NaF 0,1% em contato com a liga metálica Ti-10Mo, não causa toxicidade após ser absorvido por um sistema biológico, certificando que a liga então testada não libera componentes tóxicos ao meio ao qual foi condicionada nos ensaios.

Como controle total, os animais (grupo 5) sem qualquer tipo de inóculo na cavidade intraperitoneal, também foram observados e os resultados obtidos nesse grupo, validam as afirmações acima citadas, conforme demonstram as Tabela 5.4, 5.5 e Figura 5.20.

Tabela 5.4 Peso dos animais e índices de toxicidade pós inoculação dos extratos.

Tempo e animais	Grupo 1 Extrato A		Grupo 2 Extrato B		Grupo 3 Extrato C		Grupo 4 Extrato D		Grupo 5 Sem experimentação	
	Peso	Índice	Peso	Índice	Peso	Índice	Peso	Índice	Peso	Índice
0h										
1	238	0	242	0	254	0	243	0	244	0
2	245	0	256	1	264	1	256	0	261	0
3	258	0	263	0	249	0	250	0	260	0
4	243	0	249	0	263	0	261	0	244	0
5	261	0	261	0	248	0	253	0	247	0
24h										
1	237	0	242	0	254	0	242	1	245	0
2	245	0	254	0	263	1	254	1	261	0
3	258	0	263	0	250	0	251	0	263	0
4	241	0	250	0	262	0	262	0	246	0
5	259	0	261	0	246	0	254	0	248	0
48h										
1	238	0	242	1	255	0	242	0	246	0
2	245	0	255	0	264	1	256	0	261	0
3	259	0	262	1	253	0	252	0	264	0
4	240	0	252	0	263	0	263	0	247	0
5	262	0	261	0	245	1	252	0	247	0
72h										
1	240	0	243	0	255	0	244	0	247	0
2	244	0	255	0	263	0	257	0	260	0
3	260	0	261	0	254	0	253	0	263	0
4	241	0	253	0	263	0	262	0	247	0
5	261	0	261	0	246	0	253	0	248	0

Tabela 5.5 Peso médio dos animais em seus respectivos grupos de ensaio.

Animal	Grupo 1 Peso (g)		Grupo 2 Peso (g)		Grupo 3 Peso (g)		Grupo 4 Peso (g)		Grupo 5 Peso (g)	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final
1	238	240	242	243	254	255	243	244	244	247
2	245	244	256	255	264	263	256	257	261	260
3	258	260	263	261	249	254	250	253	260	263
4	243	241	249	253	263	263	261	262	244	247
5	261	261	261	261	248	246	253	253	247	248
Média (total)	249	249,2	254,2	254,6	255,6	256,2	252,6	253,8	251,2	253
Desvio padrão	8,9	9,2	7,7	6,6	6,0	6,3	6,0	5,9	7,6	7,0

Figura 5.19 Gráfico de comparação em número, dos animais que tiveram seus pesos, aumentados, diminuídos ou mantidos durante as 72 horas de experimento.

Figura 5.20 Gráfico de comparação do peso médio inicial e final dos grupos ensaiados.

Análise do Lavado Peritoneal

O resultado do teste sobre o lavado peritoneal foi obtido através de análise de contagem celular global no aparelho *Coulter T-890*.

As análises macroscópicas do lavado peritoneal de todas as amostras coletadas, foram negativas, pois não apresentaram turbidez e estavam inodoras. Essa observação indica que não houve processo inflamatório local devido aos extratos injetados (Tabela 5.6). Como confirmação de que não houve migração celular excessiva devido à reação dos extratos inoculados, usou-se a contagem celular global do lavado peritoneal, o controle utilizado foi o lavado obtido do Grupo 5 (sem inoculação de extrato) e os valores de referências (Tabela 4.7) .

Pode-se observar através da Tabela 5.7, a presença de raras hemácias na contagem celular dos lavados peritoneais de todos os grupos em teste. Essa presença celular é devido à incisão cirúrgica abdominal (com bisturi de lâmina) realizada para se fazer e coletar o lavado peritoneal. Como confirmação da presença celular não ser decorrente de processo inflamatório, devido a presença dos extratos, tem-se os resultados obtidos do controle total do ensaio (Grupo 5 - sem inóculo). A quantidade de leucócitos global do lavado em todos os grupos esteve dentro dos padrões de normalidade (vide Tabela 9).

Tabela 5.6 Macroscopia do lavado peritonel.

Macroscopia	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Turbidez	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa
Odor	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa

Tabela 5.7 Contagem celular global do lavado peritoneal.

Células/microlitro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Leucócitos	260	257	257	262	258
Hemácias	0,22	0,13	0,15	0,16	0,18

5.4 Síntese dos Resultados

No teste de hemocompatibilidade, onde a liga Ti-10Mo entrou em contato direto *in vitro*, com o sangue, demonstra que não houve lise celular, que os índices hematimétricos permaneceram dentro dos valores de normalidade para o tipo de amostra utilizada. Pode-se observar a integridade das hemácias e leucócitos nos esfregaços obtidos, deve-se levar em consideração, que as amostras já estavam a 72 horas fora do seu ambiente fisiológico.

O teste de citotoxicidade, onde a liga Ti-10Mo foi depositada a uma cultura de células (sendo que o limite entre as mesmas era apenas a camada de ágar) não indicou nenhum processo de morte celular, pois ao redor do material em teste não se formou halo, significando que a liga Ti-10 Mo não libera nenhum componente tóxico. O controle negativo usado foi o papel filtro atóxico e para o controle positivo, látex tóxico.

O índice de sobrevivência celular no teste de eluição, complementa os resultados do teste de difusão em ágar, pois para o extrato C (saliva artificial + NaF 0,1% + Ti-10Mo) cerca de 42% das células permaneceram vivas até o final do ensaio. Estes indicativos confirmam a possibilidade da liga Ti-10Mo entrar em contato com diferentes tipos celulares, seja como material propriamente dito ou derivados do mesmo.

No teste de toxicidade sistêmica, que também utilizou extrato da liga Ti-10Mo, aplicado intraperitonealmente em ratos, também demonstrou que o extrato quando inoculado não causa disfunções sistêmicas e/ou locais, nos animais. Os ratos mantiveram suas funções orgânicas normais, não apresentaram qualquer disfunção intestinal, não perderam motilidade ou reflexos, não apresentaram qualquer tipo de sinais na pele da região de inoculação, como cianose ou vermelhidão. Como podem ser observados nas Figuras 5.19 e 5.20, os animais ganharam peso até o final do ensaio, comprovando que o extrato inoculado não causou interferência negativa para o seu bem estar geral. Se a liga metálica em questão apresentasse quaisquer produtos extraíveis tóxicos, certamente a perda progressiva de peso nos animais seria notada, além de outros processos como imobilização do animal e até mesmo morte.

Os animais que tiveram reação de nível sérico com índice igual a 1 – LEVE, apresentaram restabelecimento, para um índice igual a 0, voltando a normalidade. A contagem celular global do lavado peritoneal, veio somente confirmar os resultados obtidos através das observações dos animais no teste de toxicidade sistêmica. A quantidade de células encontradas no lavado peritoneal, estavam dentro dos valores de referências aceitáveis e dos controles utilizados.

Não houve morte entre os animais ensaiados no período estipulado para os testes.

6. Conclusões

Os ensaios preliminares de biocompatibilidade, representados pelos testes de Hemocompatibilidade, Citotoxicidade, Toxicidade Sistêmica e Análise do Lavado Peritoneal, demonstraram que a liga metálica Ti-10Mo é um material com caráter biocompatível, pois não causa efeitos destrutivos quando em contato direto ao sangue, culturas celulares ou quando absorvidos sistemicamente.

O material (Ti-10Mo) em presença a meios agressivos como a saliva, seja pura ou fluoretada, não libera elementos tóxicos, podendo ser sugerida como candidata, para aplicação odontológica.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Fazer revestimento com biocerâmicas na liga Ti-10Mo e observar interação sobre a osteogênese.
- Implantar o material em ratas ovariectomizadas e realizar ultra-som (baixa intensidade) para observar o crescimento ósseo.
- Realizar estudo de biocompatibilidade, com células *in vitro* de fibroblastos e osteoblastos humanos.
- Fazer análise da superfície e das propriedades mecânicas do material após contato com diferentes fluidos biológicos.
- Observar a possibilidade da formação de biofilmes bacterianos na liga Ti-10Mo e fazer comparação com outras ligas já utilizadas em aplicação odontológica.

Referências

1. WILLIAMS, D. F. *Definitions in biomaterial: progress in biomedical engineering*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987.
2. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-2. *Guidance on selection of tests: biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1992.
3. PASCHOAL, A. L.; et. al. Análise de corrosão em aços inoxidáveis utilizados em implantes ortopédicos. In: CONGRESSO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS DO MERCOSUL, Joinville, 2002.
4. AZEVEDO, C. R. F.; HIPPERT, E. Análise de falhas de implantes cirúrgicos no Brasil: a necessidade de uma regulamentação adequada. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2000.
5. ENDERLE, J. D.; BLANCHARD, S. M.; BRONZINO, J. D. *Introduction to biomedical engineering*. San Diego: Academic Press, 2000.
6. SOARES, G. A. Biomateriais: *Classificação, seleção e avaliação*. Rio de Janeiro: EE e COPPE/UFRJ, 2000.
7. PASCHOAL, A.L., Avaliação da resistência à corrosão em meio fisiológico de metais revestidos com nitreto de titânio. 1998 Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.
8. RAVEL, R. *Laboratório clínico: aplicações dos dados laboratoriais*. 6.ed. Rio de Janeiro:. Editora Guanabara Koogan, 1997.
9. LYGRE, H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontology Scandinavian*, v. 60, p. 1-9. 2002.
10. WATAHA, J.C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 83, n. 2, p. 223-234, 2000.
11. WATAHA, J.C. et. al. Effect of pH on element release from dental casting alloys. *Journal of Prosthetic Dentistry*, v.80, n. 6, p. 691-8, 1998.
12. ALVES, A.P.R. et. al. A study on corrosion resistance of the Ti-10Mo experimental alloy after different processing methods. *Materials Science and Engineering*, v. 24, p. 693-696, 2004.

13. HUANG, H.H. Effect of chemical composition on the corrosion behavior of Ni-Cr-Mo dental casting alloys. *Journal Biomedical Materials Research*, v.60, p. 458-465, 2002.
14. LIMA, A. O. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.
15. BRONZINO, J. D. *The biomedical engineering – handbook*. 2. ed. Flórida: CRC Press, Springer & IEEE Press, 2000.
16. RAMOS, A. S.; COELHO, G. C.; SILVA, G. Produção de Ligas de Titânio do sistema Ti-Si-B visando aplicações em implantes ortopédicos e odontológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA 18, 2002, São José dos Campos. p.305-8.
17. PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. *Biomaterials: principles and applications*. New York: CRC Press, USA, 2000.
18. EESC IMPRESS. Fundição. *Fundição e Serviços*, v.2, n 41, p. 36, 43 e 44, 1996.
19. BROWN, S.A.; LEMONS, J. E. Medical applications of titanium and its alloys – the material and biological issues. *ASTM Publications Code Number (PCN): 04-012720-54*, USA, 1996.
20. HELSEN, JA; BREME, HJ. *Metals as biomaterials*. England : Wiley & Sons Ltd, 1998.
21. IMPLANTES: Ortopédico e Odontológico. Disponível em : <<http://www.ortopediatecniprax.com.ar/>> Acesso em : 14/01/07.
22. FIO ORTODÔNTICO. Disponível em: <<http://www.saudetrancoso.com.br>> Acesso em: 14/01/07.
23. HO, W. F.; JU, C. P.; CHERN LIN, J. H. Structure and properties of cast binary Ti-Mo alloys. *Biomaterials*, v. 20, 2115, 1999.
24. GHETTA, M.; KAMASHIMUDALI, U.; GOGIA, A. K. Effect of thermomechanical processing on evolution of various phases in Ti-Nb-Zr Alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 384, n. 1-2, p. 131, 2003.
25. SCULLY, J. C. *Treatise on materials science and technology*. New York: Academic Press, 1983, p. 103.
26. RAMIRES, I.; GUASTALDI, A. C. Estudo do biomaterial Ti-6Al-4V empregando-se técnicas eletroquímicas e XPS. *Química Nova*, v. 25-1, p. 10, 2005.
27. ZITTER, H.; PLENK, H. The Electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *Journal Biomedical Materials Research*, v. 21, p.881, 2004.

28. SEAH, K. H.; CHEN, X. A Comparasion between the corrosion characteristics of 316 stainless steel, solid titanium and porous titanium. *Corrosion Science*, v. 34 p.1841, 1993.
39. GAL, H. Y.; FOVET, Y.; ADIB-YADZI, M. About a synthetic saliva for *in vitro* studies. *Talanta*, v. 53-6, p. 1103, 2001.
30. RIE, K.T. Plasma surface treatment and PACVD on Ti alloys for surgical implants. *Surface and Coating Technology*, v.74-75, n.2, p. 973-80, 1995.
31. WANG, K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Material Science and Engineering*, v. 213, n.1-2, p.134-7, 1996.
32. YOKEL, R.A.; McNAMARA, P.J. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacol Toxicol*, v. 88, p. 159-167, 2001.
33. MATSUNO, H. et. al. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, v. 22, p. 1253-1262, 2001.
34. AMARAL, M. et. al. Densification route and mechanical properties of Si₃N₄-bioglass composites. *Biomaterials*, v. 23, p. 857-862, 2002.
35. HENCH, L. L. Bioceramics. *Journal American Ceramic Society*, v. 81-7, p.1705-28, 1998.
36. ROGERO, S. O., et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6, p. 317-320, 2003.
37. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-6 *Tests for local effects after implantation*, ISO, 1995.
38. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-10. *Tests for irritation and sensitization: biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1995.
39. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-12. *Sample preparation and reference materials, biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1995.
40. SYRJÄNEN, S. et. al. *In vitro* and *in vivo* biological responses to some dental alloys tested separately and in combinations. *Biomaterials*, v. 6, p. 169-176, 1985.
41. MJOR, I.; CHRISTENSEN, G.J. Assessment of local side effects of casting alloys. *Quintessence International*, v. 24, p. 343-51, 1993.
42. GEIS-GERSTOFER, J. In vitro corrosion measurements of dental alloys. *Journal of Dentistry*, v. 22, p. 247-251, 1994.

43. ANUSAVICE, K.J. *Materiais dentários de Phillips*. 11. ed. Rio de Janeiro : Editora Elsevier, 2005.
44. SYVERUD, M. Corrosion and biocompatibility testing of palladium alloy casting. *Dental Materials*, v. 17, p. 7-13. 2001.
45. PEREIRA, K. R. Hemocompatibilidade da liga candidata a biomaterial: Ti-Si B.. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
46. ZAGO, M.A., FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001, v. 1.
47. LEE, G.R., BITHELL, T. *Hematologia clínica*. São Paulo: editora Manole Ltda, 1998.
48. DAGUANO, J. K. M.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Revista Matéria*, v.12-1, p. 134-139, 2007.
49. CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*, v. 17, p.1259-1264, 1996.
50. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-11. *Tests for systemic toxicity: biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO,1992.
51. GOLDMAN, L.; BENNETT, C. *Tratado de medicina interna*. 21. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000, v.1.
52. LUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. *Patologia : bases patológicas das doenças*. 7. ed. São Paulo: Editora Elsevier Ltda., 2005.
53. CARDOSO, M.; RUBINSTEIN, E. *Peritônio*. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/mor/Anatmed/peritonio/>> Acesso em: 20/04/2007.
54. GONZÁLEZ, J.E.G. et. al. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 471 -2, p. 109-115, 1999.
55. CARDOSO, F. F. et. al. Resfriamento contínuo e envelhecimento de ligas Ti0Mo para aplicações biomédicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
56. FUSAYAMA,T.; KATAYORI, T.; NOMOTO, S. Corrosion of gold and amalgam placed in contact with each other. *Journal Dentistic Research*,v. 42, p.1183-1197, 1963.

57. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5. *Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. Biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1992.
58. MOAN, J.; RIMINGTON, C.; MALIK, Z. Y. Photoinduced degradation and mediation of Photofrin 11 in cells in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 47, p. 363–367, 1988.
59. TAYLOR, L.R.; PAPP, R.B.; POLLARD, B.D. *Instrumental methods for determining elements*, New York: VCH Published, 1994.
60. DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival –modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. *Journal of Immunological Methods*, v.89, p.271, 1986.

*Apêndice I**I. Planilha de acompanhamento dos ratos teste toxicidade sistêmica.*

Tabela I. Acompanhamento do rato ____ grupo ____.					
Tempo	Peso	Cianose	Mobilidade	Alimentação	Demais reações
0h					
24h					
48h					
72h					

Anexo A

A1. Aprovação do Projeto de Trabalho pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa com Experimentação em Animais da Universidade Federal de São Carlos.

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 N°. 039/2007

Protocolo n°. 040/2007

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 14ª. Reunião, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Avaliação da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de ligas metálicas de titânio para aplicação odontológica”, elaborado por Karla Regina Pereira. Projeto aprovado.

São Carlos, 3 de outubro de 2007.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Anexo C

C.1 Princípios Éticos na Experimentação Animal – Universidade Federal de São Carlos.

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.