

TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE DA LIGA TISIB: ESTUDO DA SENSIBILIDADE INTRACUTÂNEA, TOXICIDADE SISTÊMICA EM PEQUENOS ANIMAIS

Borges, R. A. O.¹; Duarte, J.²; Ramos, A. S.³; Paschoal, A. L.⁴

¹Curso de Graduação em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências da Saúde (FCS). Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12244-000. Fone: +55 12 3947 9999, Fax: +55 12 3947 9999
rborges@univap.br

^{2,3,4}Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120 Fax: +55 3947 1121

⁴Tecnologia de Materiais ,Núcleo de Ensino Tecnológico - NET, Instituto Superior de Ensino - ISE. Universidade de Araras Rua Maximiliano Baruto, 500 - Jardim Universitário CEP 13607-339, Araras - SP, Brasil.

Resumo

Com o desenvolvimento de novos materiais e o surgimento de padrões internacionais de desempenho exigidos aos biomateriais, novas temáticas foram incorporadas nesta sub-área de concentração. Assim, novos materiais para substituição de tecidos duros e moles estão sendo amplamente investigados. Para se aplicar um novo material, é necessário que este apresente certos aspectos de biocompatibilidade dependente do local aonde este material venha a ser implantado. Para este tipo de investigação deve-se seguir, atualmente, padrões internacionais, tais como os presentes na ASTM seção 13 e na ISO 10993, cujos testes são destinados a permitir uma avaliação do material em relação a sua interação com os sistemas biológicos. O Ti-Si-B desenvolvido no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D é uma boa alternativa de material para implantes ósseos devido aos seus componentes Si e B estarem presentes normalmente na composição óssea, ao contrário dos tóxicos Al e V presentes na liga Ti-6Al-4V. O presente trabalho apresenta os testes de biocompatibilidade da liga Ti-Si-B através dos ensaios de sensibilidade intracutânea realizadas em coelhos e toxicidade sistêmica realizada em camundongos, demonstrando, assim, sua não toxicidade e compatibilidade, colocando-o numa posição de possível candidato de ser utilizado em implantes.

Palavras- Chave: biomateriais, biocompatibilidade, ligas de titânio, silício, boro

Área de conhecimento: Engenharia

Introdução

Com o desenvolvimento de novos materiais e o surgimento de padrões internacionais de desempenho exigidos aos biomateriais, novas temáticas foram incorporadas nesta sub-área de concentração. Assim, não só materiais para substituição de tecidos duros são investigados, mas também biomateriais destinados à substituição de tecido mole.

Investigam-se também diversos aspectos do desempenho de materiais implantáveis, dentro do campo de estudo da biocompatibilidade, avaliando-se segundo os padrões internacionais da ASTM e ISO, a interação de materiais com os sistemas biológicos relacionados à estabilidade química, toxicidade sistêmica, efeitos de interface [1].

O biomaterial é definido como todo material utilizado para substituir todo ou em parte os sistemas biológicos. Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito de funcionabilidade para o qual foram projetados, provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos. Embora o conceito de funcionabilidade seja algo não muito preciso, é consenso que a funcionabilidade esteja associada à aplicação a que se destina [2]. Assim, pode-se ter biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos ou biorecobrimentos e, para uma dada aplicação costuma-se haver mais de um material e/ou processo de fabricação disponível.

Quando um implante é inserido em um corpo humano, dois principais aspectos devem ser considerados: a influência do meio fisiológico, que pode alterar a natureza e propriedades do material e o efeito do material do implante e de cada produto de degradação, nos fluídos e tecidos que envolvem o implante. A biocompatibilidade pode ser definida como estado de mútua existência entre o material e o ambiente fisiológico, de tal forma que ambos não produzam efeitos indesejáveis na outra parte [3].

Essa definição é bastante genérica, sendo necessário que a biocompatibilidade seja considerada no contexto da aplicação específica. De uma maneira geral, os principais requerimentos para qualquer tipo de aplicação de implantes permanentes são os seguintes: o material deve resistir ataques degradativos ou corrosivos por fluídos fisiológicos; não deve alterar a composição eletrolítica do tecido ou plasma; não deve interferir no mecanismo de defesa do organismo; não deve promover qualquer trauma sangüíneo; não deve modificar a natureza das proteínas do plasma ou conduzir a formação de carcinomas (tumores); os seus constituintes devem ser resistentes o suficiente para suportar as solicitações sem ocorrência de fadiga ou fratura catastrófica durante o tempo de vida estimado e o material deve ser capaz de ser formado na configuração desejada [4].

O presente trabalho tem como finalidade realizar alguns dos testes “*in vivo*” normalizados pela ISO 10993 como parte do estudo de avaliação da biocompatibilidade da liga metálica de TiSiB. Esses estudos “*in vivo*” têm como objetivo avaliar a toxicidade sistêmica, a sensibilidade intracutânea aguda e posteriormente a osteointegração do implante ao osso desta liga correlacionando-o com suas propriedades estruturais e mecânicas.

Metodologia

A descrição a seguir está em acordo com as Normas ISO 10993, partes 10 e 12, ASTM F619-79 e *US Pharmacopeia (Biological Reactivity tests, in vivo)*. Como veículo de extração foram utilizadas duas soluções: salina fisiológica, e óleo de sésamo (gergelim), sendo estas, respectivamente as soluções polar (hidrossolúvel) e não-polar (lipossolúvel) para o teste de toxicidade sistêmica e sensibilidade intracutânea (*in vivo*).

A liga se apresenta na forma de um disco, tem 1cm de espessura, com um diâmetro de 1,5cm, foi esterilizado em autoclave. Esses discos foram colocados em frasco contendo 20ml de veículo de extração Salina fisiológica; em outro frasco, foram apenas colocados 20ml de salina fisiológica para ser utilizado como “branco” (controle). O mesmo

procedimento foi realizado para os veículos de extração não-polar. Os extratos e controles foram, então, colocados a 37°C, por aproximadamente 72 horas, sob agitação constante.

Nos testes de toxicidade sistêmica, foram utilizados 20 camundongos, machos, da raça *Swiss*, com peso corpóreo entre 31 e 55 gramas, separados em 4 grupos de 5 animais e tricotomizados em suas regiões abdominais 24 horas antes da inoculação. A inoculação intraperitoneal dos extratos e dos controles ocorreu na proporção de 50ml/Kg de peso corpóreo de animal (entre 1,5 e 2,0ml) [4,9,10,11].

Foram realizadas pesagens e observações quanto às reações adversas apresentadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, seguindo a Tabela 1.

Tabela 1 – Índice de toxicidade sistêmica. (ITS) -(adaptado da ISO 10993 parte 11 e ASTM F 750).

Resposta	Descrição	ITS
Normal	Animal não exhibe sintomas adversos	0
Leve	Animal exhibe sintomas adversos leves, mas notáveis de hipocinesia, dispnéia ou irritação abdominal.	1
Moderada	Animal exhibe evidência definitiva de hipocinesia, dispnéia, irritação abdominal, ptose ou diarreia (usualmente o peso corpóreo cai sensivelmente)	2
Severa	Animal exhibe prostração, cianose, tremores ou sintomas severos de dispnéia, irritação abdominal, ptose ou diarreia (perda extrema de peso corpóreo)	3
Morte	Animal morre	4

No teste de sensibilidade intracutânea, três coelhos machos, jovens, da raça *New Zealand White*, com peso entre 2,0 e 3,0kg, foram tricotomizados, em suas regiões dorsais, atingindo uma área suficiente dos dois lados da coluna para que as injeções de extratos e controles pudessem ser realizadas 24 horas após, como demonstrado no esquema da Figura 1 [4,5,7,8,10].

Seguindo as Normas ISO 10993 parte 10 e ASTM F 719, ministrou-se, por via intracutânea, 0,2ml de extrato polar em cinco regiões em apenas um dos lados do coelho, como demonstra a Figura 1. Similarmente, 0,2ml de solvente polar (controle) foi ministrado em cinco pontos abaixo, no mesmo lado da coluna para cada animal.

O procedimento foi repetido para os extratos e controles não-polares no outro lado da coluna para cada animal.

Após as inoculações, a aparência de cada local de aplicação nos tempos pré-determinados 24, 48 e 72 horas era observada.

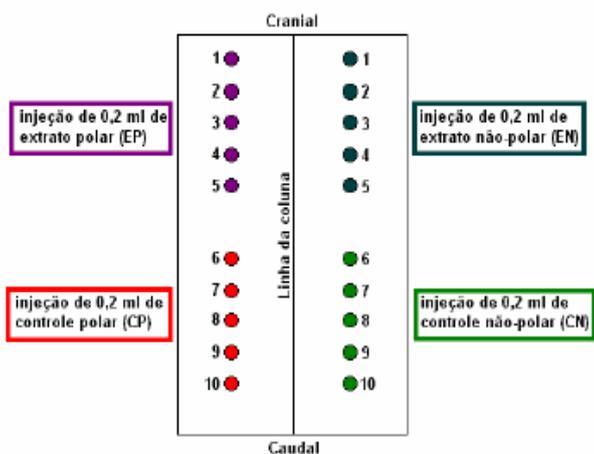


Figura 1 – Esquema da aplicação dos extratos e controles para o teste de Sensibilidade Intracutânea [4].

A reação do tecido é graduada por eritema e edema, de acordo com o sistema de classificação da Tabela 2, para cada injeção e a cada intervalo de tempo. Os resultados foram então registrados em uma planilha montada para cada animal, conforme a Tabela 3. Deste ponto, determina-se a Contagem de Irritação Primária (CIP), onde são somadas as contagens de irritação do eritema e edema juntos, mas separadamente para cada extrato-teste a cada tempo específico. Divide-se essa soma pelo número de observações (ou seja, por 9, sendo este o número de observações entre 24, 48 e 72 horas). Subtrai-se a contagem obtida dos reagentes controles daquela obtida com os extratos do material.

Tabela 2 – Índices de reações (edema e eritema) (adaptado de ISO 10993 parte 10 e ASTM F719).

Reação	Numérico
Eritema e formação de escara	
Sem eritema	0
Muito leve (pouco perceptível)	1
Definido	2
Moderado	3
Severo (Vermelho-beterraba ou formação de escara antes do eritema)	4
Edema	
Sem edema	0
Leve (pouco perceptível)	1
Definido (extremidades da área bem definidas por aumento)	2
Moderado (aumento de aproximadamente 1mm)	3
Severo (aumento > 1mm, estendendo além da área de exposição)	4
Contagem possível para a irritação	8

Tabela 3 – Exemplo de planilha utilizada para (CIP). EP = Extrato Polar; ENP = Extrato Não Polar; CP = Controle Polar; CNP = Controle Não Polar [4].

	EP		ENP		SP		SNP			
	Erit.	Ede.	Erit.	Ede.	Erit.	Ede.	Erit.	Ede.		
24H	1	a	A	b	B	6	c	C	d	D
	2	a	A	b	B	7	c	C	d	D
	3	a	A	b	B	8	c	C	d	D
	4	a	A	b	B	9	c	C	d	D
	5	a	A	b	B	10	c	C	d	D
48H	1	a	A	b	B	6	c	C	d	D
	2	a	A	b	B	7	c	C	d	D
	3	a	A	b	B	8	c	C	d	D
	4	a	A	b	B	9	c	C	d	D
	5	a	A	b	B	10	c	C	d	D
72H	1	a	A	b	B	6	c	C	d	D
	2	a	A	b	B	7	c	C	d	D
	3	a	A	b	B	8	c	C	d	D
	4	a	A	b	B	9	c	C	d	D
	5	a	A	b	B	10	c	C	d	D
Total + 15	15a	15A	15b	15B	15c	15C	15d	15D	15E	15F
	S	T	U	V	W	X	Y	Z		
Soma	Eritemas dos extratos S + U = α					Eritema dos solventes W + Y = δ				
	Edemas dos extratos T + V = β					Edema dos solventes X + Z = γ				
	Erit. + Edem. extratos $\alpha + \beta = \Delta$					Erit.+Edem. solventes $\delta + \gamma = \Gamma$				
Subtração Extr. - Sol.	Contagem de Irritação Primária Animal 1 = $\Delta - \Gamma = CIP_1$									

Para se obter o Índice de Irritação Primária (IIP), deve-se somar as contagens dos outros animais ensaiados e dividir pelo número de animais, tem-se então:

$$IIP = \frac{(CIP1 + CIP2 + CIP3)}{3} \quad (1)$$

O resultado de IIP deve ser comparado com a Tabela 5, de onde o resultado final é tirado.

Tabela 4 – Índices de Irritação Primária.

Resposta por Categorias	Contagem média (IIP)*
Negligenciável	0 a 0,4
Leve	0,5 a 1,9
Moderado	2,0 a 4,9
Severo	5 a 8

Resultados

Para os testes de toxicidade sistêmica, a comparação foi realizada através da observação dos efeitos provocados pelo veículo de extração nos grupos polar e não-polar. Para os grupos inoculados com veículos de extração polar (salina fisiológica) houve uma pequena redução no peso nas primeiras 24 horas, sem efeitos adversos, voltando a aumentar nas contagens 48 e 72 horas, sendo considerado, seguindo a Tabela 2, como normal. Para os animais inoculados com veículos de extração não-polar (óleo de sésamo), uma reação leve se apresentou nas primeiras observações (0 hora), voltando a ser normal nas contagens 24, 48 e 72 horas, com gradativo aumento de peso. Comparando-se as medidas de

peso inicial (antes da inoculação) e final (72 horas) observou-se que 90% dos camundongos ganharam peso acima do inicial, 10% se mantiveram abaixo do peso inicial, porém com uma variação mínima. Como resultado, 75% apresentaram um índice normal e 25% apresentaram um índice leve. Tais resultados preliminares demonstraram que outros testes de biocompatibilidade podem ser realizados com a liga Ti-Si-B dando continuidade com a proposta de utilizá-la como biomaterial, já que não apresentou a liberação de componentes de sua composição neste ensaio com os animais. Além disso, os testes de sensibilidade intracutânea, realizados com os extratos/controles de extração polar e não polar, apresentaram como CIP os valores demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da Contagem de Irritação Primária.

Animal	Contagem de Irritação Primária
1	0,0
2	- 0,13
3	- 0,60

Por fim, o IIP apresentou uma taxa de - 0,24, que comparado com a Tabela 4, significa uma resposta irritativa negligenciável. Números negativos como resposta, indicam que os controles forneceram resposta irritativa maior que as dos extratos, sendo isso normal e citado nas normas (principalmente para os veículos não-polares).

Discussão e Conclusões

Nos ensaios de toxicidade sistêmica (camundongos) e de sensibilidade intracutânea (coelhos), nenhuma reação de toxicidade provocada pela liga Ti-Si-B foi evidenciada.

Observações de 192 horas depois na inoculação dos extratos/controles de extração não revelaram nenhuma reação, demonstrando que, para os testes escolhidos, esta liga não libera resíduos de sua composição ou de seu processamento, sendo, portanto, não tóxico, compatível e possível candidato de ser utilizado em implantes, devido à propriedade de minerais benéfica como coadjuvante as placas de osteossíntese na reabilitação de ossos lesados.

Estudos futuros são necessários para viabilizar o uso desta liga, tais como, osteointegração do implante, estudo histológico e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e outros ensaios preconizados pelas normas ASTM e ISO 10993.

Referências

- [1] Disponível em: <http://www.eesc.usp.br/bioeng/biomateriais.php>
Acesso: 25/04/2005
- [2] Disponível em: http://www.metalmat.ufrj.br/pos_biomateriais.php
Acesso: 25/04/2005
- [3] Disponível em: <http://www.biomecanica.com.br/biosteo/biocompatibilidade.htm#>
Acesso: 25/04/2005
- [4] Paschoal, AL (2003). Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo. São Carlos, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [5] Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit (1992), Designation: F 749 – 87, ASTM -American Society For Testing And Materials, Ed 13.01 - Medical Devices, p. 261 – 262.
- [6] Standard Practice for Extraction of Medical Plastics (1992), Designation: F 619 – 79; ASTM - American Society For Testing And Materials, Ed 13.01 - Medical Devices, p. 172 – 175.
- [7] Standard Practice for Testing Biomaterials in Rabbits for Primary Skin Irritation (1992), Designation: F 719 – 81, ASTM – American Society For Testing And Materials, Ed 13.01 - Medical Devices, p. 238 – 239.
- [8] Tests for irritation and sensitization (1992), Parte 10, International Organization for Standardization – ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices.
- [9] Tests for systemic toxicity (1992), Parte 11, International Organization for Standardization – ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices.
- [10] Biological Tests (1995), Pharmacopeia of the The United States of America, XXIII, Rockville, part 2, p. 1697-1703.
- [11] Standard Practice for Evaluating Material Extracts by Systemics Injection in the Mouse (1992), Designation: F 750 – 87, ASTM – American Society For Testing And Materials, Ed 13.01 - Medical Devices, p. 263 – 265.