

Resposta do Tecido Conjuntivo de Camundongos ao Poliuretano Vegetal de Óleo de Mamona

Simone Di Salvo MASTRANTONIO^a, Lizeti Toledo de Oliveira RAMALHO^b

^a Estagiária e Bolsista do CNPq/PIBIC/1999-2000, Departamento de Morfologia Faculdade de Odontologia, UNESP 14801-903 Araraquara - SP

^b Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, UNESP 14801-903 Araraquara - SP

MASTRANTONIO, S.S.; RAMALHO, L.T.O. Mouse connective tissue reaction to polyurethane derived from castor oil. **Rev. Odontol. UNESP**, São Carlos, v. 32, n.1, p. 31-37, Jan/Jun 2003.

Resumo: Baseado no óleo de mamona *Ricinus communis*, foi desenvolvido um polímero poliuretano que tem sido utilizado com muito sucesso na medicina (ortopedia, cirurgia reparadora, confecção de próteses) e odontologia (restaurações, próteses, cirurgias estéticas e reparadoras na região maxilo-facial). Este trabalho teve por finalidade avaliar histologicamente a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos, nos períodos de 7, 20, 30 e 60 dias, após o implante de discos desse poliuretano vegetal sem e com carbonato de cálcio. Os dois materiais mostraram ser biocompatíveis com o tecido conjuntivo.

Palavras-chaves: Poliuretano; *Ricinus communis*; histocompatibilidade; tecido conjuntivo; camundongos.

Abstract: Based on *Ricinus communis* oil a new polyurethane was developed and it has been used with success in medicine (orthopedics, repair surgery, prostheses confection) and dentistry (dental restoration, prostheses, esthetic and repair maxillofacial surgeries). Twenty mice were utilized in order to analyse histologically the subcutaneous connective tissue reaction, in periods of 7, 20, 30 and 60 days, after the implant of this vegetable polyurethane with and without calcium carbonate. Both material showed biocompatibility with the connective tissue.

Keywords: Polyurethane; *Ricinus communis*; histocompatibility; connective tissue; mice.

Introdução

Nos últimos anos, têm sido constantes as pesquisas na busca de materiais que apresentem propriedades de biocompatibilidade com o organismo humano. Recentemente, o óleo de mamona *Ricinus communis*, que é utilizado desde a Antigüidade, gerou uma resina, desenvolvida no laboratório de Química da Universidade de São Paulo-São Carlos pelo Professor Gilberto Orivaldo Chierice. Essa resina vem sendo testada com grande sucesso em vários experimentos, como no preenchimento de falha óssea produzida no osso de coelho,¹² em implantes intra-articular e intra-ósseo em coelho¹⁵ e em implante na câmara anterior do olho de camundongo.²⁰

Tal resina, segundo seu idealizador, apresenta toxicidade zero, biocompatibilidade ótima, tempo de manipulação ide-

al, não libera gases, tampouco é exotérmica ao polimerizar-se, possui propriedades detergentes, bactericidas e fungicidas, aceita esterilização e colocação de parafusos, é biodegradável, pode sofrer incorporação de carbonato de cálcio com propósitos de remodelação óssea,¹⁴ é de fácil manuseio e pode ser utilizada nas diferentes fases de polimerização.⁶ Em forma de polímero, uma espécie de plástico mais refinado, a substância está sendo aplicada na reconstrução de tecidos e de partes ósseas danificadas por acidentes ou doenças.¹¹

Trabalhos recentes vêm demonstrando que esse polímero, quando implantado em falhas ósseas, pode receber no interior dos seus poros a invasão de vasos sanguíneos, o que promove o crescimento de células que vão recompon-

do o osso original em substituição ao polímero, ou seja, este vai sendo metabolizado e em seu lugar ocorre um crescimento ósseo.⁷

Esse polímero já foi utilizado com sucesso na confecção de próteses para pacientes com fraturas e tumores de coluna,¹⁷ no lugar do silicone em pacientes com câncer de próstata, na reconstrução de mandíbulas, na obturação de dentes perfurados¹¹ e sobre defeitos ósseos ao redor de implantes osseointegrados.¹ Além disso, existem pesquisas para utilizá-lo como um material restaurador que venha a reduzir a infiltração marginal e aumentar a retenção.³

O carbonato de cálcio incorporado à resina tem a função de estimular o crescimento ósseo quando implantado em recuperação óssea. Os excelentes resultados com esse polímero deixaram evidente a importância da incorporação do cálcio, na forma de carbonato, na matriz polimérica.⁷ As evidências mostraram que o carbonato de cálcio atua como um ativador de superfície na interface osso/polímero.¹⁴

O tecido conjuntivo subcutâneo de roedores presta-se aos testes de avaliação histológica de biocompatibilidade dos mais variados materiais empregados em odontologia, como esponja de poliuretano,⁵ membranas de colágeno,⁴ cimentos fotopolimerizáveis,¹³ resina resorcina-formaldeído.⁸

O objetivo de testar material em implante subcutâneo é avaliar a toxicidade *in vivo* daqueles materiais que se pretende ter em contato prolongado com o tecido subcutâneo¹⁰.

Spangberg¹⁹ considera que as reações do tecido conjuntivo a um dado material variam de acordo com o tipo de tecido, tamanho e endurecimento do material implantado, o período de observação após o implante e também com a severidade de infecção. Alguns desses fatores podem ser controlados observando-se as recomendações apresentadas pela Federation Dentaire International¹⁰, com o objetivo de padronizar a metodologia para a avaliação de reações teciduais. Assim, devem ser levadas em consideração a presença ou ausência de necrose e de inflamação, a intensidade e a extensão da inflamação e outras mudanças pertinentes, como a reabsorção do material.

Diante do exposto, fica clara a importância da avaliação da biocompatibilidade desse poliuretano vegetal com e sem carbonato de cálcio.

Material e método

Utilizamos porções iguais de uma ampola de polioli e uma ampola de endurecedor da resina poliuretana vegetal^{*a}, que foram colocadas em dois recipientes plásticos. Em somente um dos recipientes foram adicionados 50% de carbonato de cálcio. Essas substâncias foram misturadas com bastão de vidro até a completa homogeneização durante

3 minutos. As misturas devidamente identificadas foram colocadas em duas seringas de insulina. Após a polimerização completa, a seringa foi seccionada com uma lâmina em cortes transversais de 1 mm de espessura, retirando-se em seguida o plástico do tambor da seringa. Desse modo foram obtidos os discos de 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro a serem utilizados para o implante no tecido conjuntivo subcutâneo dos camundongos. A anti-sepsia dos discos foi feita colocando-se os mesmos em álcool 70°.

Foram utilizados 20 camundongos (*Mus musculus*) machos, com peso corporal médio de 35 gramas, os quais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% na dose de 0,4 ml/100 g de peso corporal injetado via intraperitoneal (Figura 1).

Após tricotomia na região dorsal^{*b} e anti-sepsia do campo operatório com detergente de mamona a 16%^{*c}, os animais foram posicionados em mesa operatória, tendo sido realizada uma incisão de aproximadamente 7 mm de comprimento e o tecido subcutâneo do dorso divulsionado lateralmente, formando duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão. No lado direito do animal, foi implantado um disco da resina vegetal derivada da mamona (*Ricinus communis*) e acrescida de carbonato de cálcio e, no lado esquerdo, um disco da resina sem carbonato de cálcio.

Após a cirurgia, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de seda^{*d} e novamente foi feita a anti-sepsia com detergente de mamona a 16%^{*c}. Todos os animais permaneceram em gaiolas individuais com ração e água à vontade até 4 horas antes do sacrifício.

Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico nos períodos de 7, 20, 30 e 60 dias após o implante. Os



Figura 1. Animal anestesiado e materiais utilizados.

*b Aparelho elétrico Wahl Chrome-Pro ajustable.

*c Poliquil Germ - Poliquil Araraquara - Polímeros Químicos Ltda.

*d Vicryl 4.0 - Ethicon - Johnson & Johnson.

*a Poliquil - Poliquil Araraquara - Polímeros Químicos Ltda.

fragmentos de tecido contendo os discos foram removidos e imediatamente imersos em formol neutro tamponado a 10%, permanecendo no fixador por 72 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em água por 24 horas, processados rotineiramente e incluídos em parafina². O material recebeu cortes de 6 mm³, foi corado com hematoxilina e eosina e analisado histologicamente em microscópio de luz^{3f}.

Resultado

Período de 7 dias após o implante no dorso

Disco de resina sem CaCO₃

Ocorreu inflamação com presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos em meio a grande quantidade de substância intercelular e edema, dando aspecto frouxo e fibrilar ao tecido conjuntivo (Figura 2). O tecido em contato com o disco mostrava fibroblastos, macrófagos e fibras colágenas finas paralelas ao disco (Figura 3).

Disco de resina com CaCO₃

O tecido conjuntivo que rodeia o disco era formado por fibroblastos, macrófagos e células inflamatórias mononucleares. A substância intercelular era constituída por fibras colágenas finas aleatoriamente dispostas (Figura 4).

Período de 20 dias após o implante no dorso

Disco de resina sem CaCO₃

O tecido conjuntivo ao redor do disco mostrava-se frouxo e acentuada diminuição da resposta inflamatória foi observada aos 7 dias. Havia presença de fibroblastos e fibras colágenas formando cápsula conjuntiva (Figura 5).

Disco de resina com CaCO₃

Ocorreu diminuição do processo inflamatório anterior, porém ainda observa-se vários macrófagos e células inflamatórias mononucleares e aspecto frouxo devido ao edema. Alguns fibroblastos dispunham-se paralelamente à superfície do disco (Figura 6).

Período de 30 dias após o implante no dorso

Disco de resina sem CaCO₃

Junto ao disco observou-se-se formação de cápsula fibrosa mostrando fibroblastos e fibras colágenas orientados paralelamente ao disco. Havia ausência de inflamação (Figura 7).

Disco de resina com CaCO₃

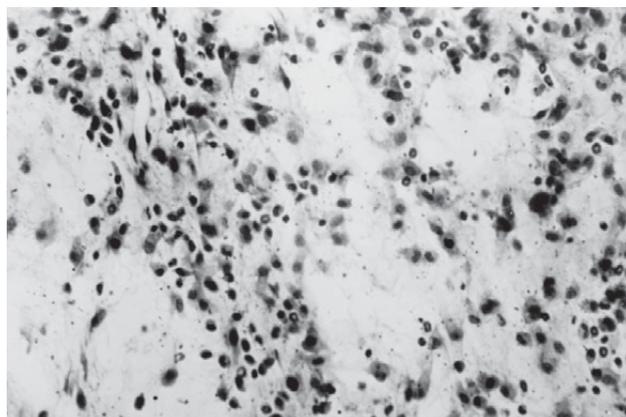


Figura 2. Disco de resina sem CaCO₃ aos 7 dias. Presença de células inflamatórias mononucleares e edema. HE 400x.

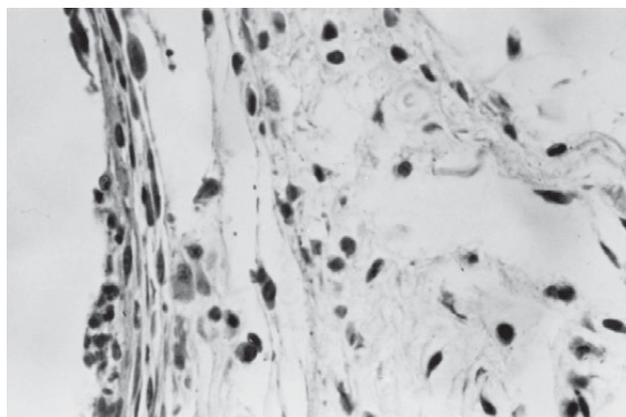


Figura 3. Disco de resina sem CaCO₃ aos 7 dias. Fibroblastos, fibras colágenas e macrófagos rodeando o disco esboçando início de formação de cápsula. HE 400x.

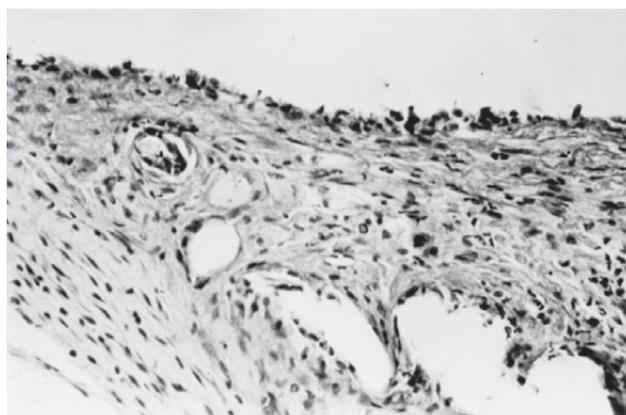


Figura 4. Disco de resina com CaCO₃ aos 7 dias. Presença de células inflamatórias mononucleares. Fibras colágenas aleatoriamente dispostas. HE 400x.

^{2c} Micrótopo rotatório MICROM, tipo HM 325

^{3f} Microscópio óptico comum Zeiss, modelo JenaVal

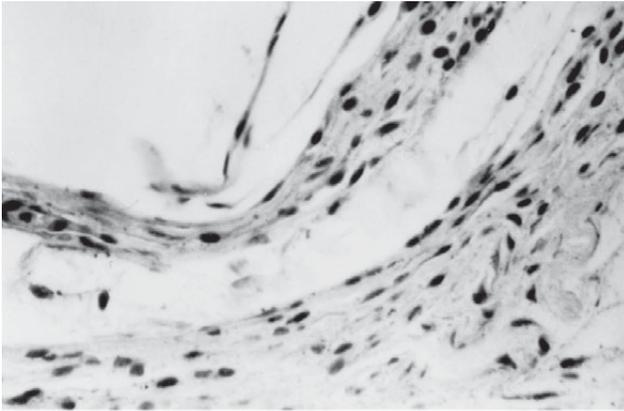


Figura 5. Disco de resina sem CaCO_3 aos 20 dias. Presença de fibroblastos e fibras colágenas formando cápsula ao redor do disco. HE 400x.



Figura 7. Disco de resina sem CaCO_3 aos 30 dias. Tecido conjuntivo frouxo sem inflamação e presença de cápsula fibrosa ao redor do disco. HE 250x.

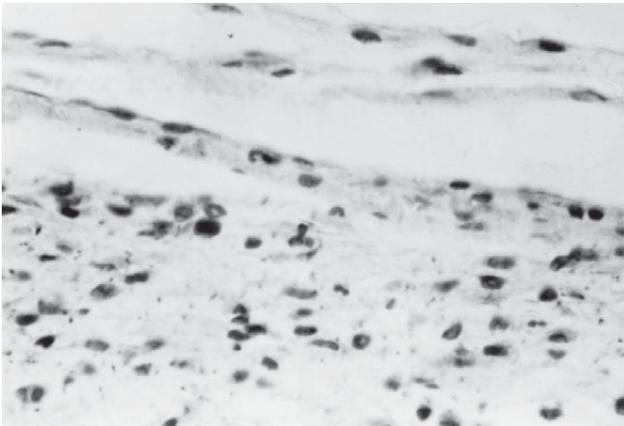


Figura 6. Disco de resina com CaCO_3 aos 20 dias. Tecido conjuntivo com poucas células inflamatórias mononucleares e edema. Somente alguns fibroblastos circundam o disco. HE 400x.



Figura 8. Disco de resina com CaCO_3 aos 30 dias. Tecido conjuntivo sem inflamação e formação de cápsula fibrosa ao redor do disco. HE 250x.

O tecido conjuntivo que rodeia o disco formava cápsula constituída por muitos fibroblastos e fibras colágenas. Havia ausência de inflamação (Figura 8).

Período de 60 dias após o implante no dorso

Disco de resina sem CaCO_3

Foi observada formação de cápsula delgada ao redor do disco, com fibroblastos e fibras colágenas orientados paralelamente ao disco. Havia presença de pequenos focos de hemorragia (Figura 9).

Disco de resina com CaCO_3

Havia ausência de cápsula fibrosa; o disco era circundado por tecido conjuntivo formado por fibroblastos, fibras colágenas delicadas, substância intercelular amorfa abundante e vasos sanguíneos congestionados (Fig. 10).

Discussão

A dificuldade em encontrar um material com as mesmas características biológicas do tecido vivo, o qual possa ser reconhecido pelo organismo como parte de sua estrutura e não como agressor, vem sendo um desafio para os pesquisadores da área de novos materiais¹¹. Para um material ser considerado biocompatível ele deve: não inteirar-se negativamente com o sistema de defesa do hospedeiro, não causar reação inflamatória nos tecidos vizinhos, não causar hemólise ou destruição das células sanguíneas¹² e não libe-



Figura 9. Disco de resina sem CaCO_3 aos 60 dias. Presença de cápsula fibrosa delgada ao redor do disco. HE 250x.

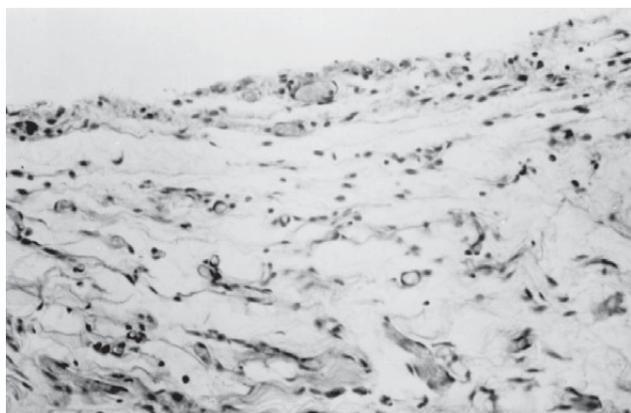


Figura 10. Disco de resina com CaCO_3 aos 60 dias. Tecido conjuntivo frouxo sem cápsula fibrosa ao redor do disco. HE 250x.

rar substâncias tóxicas¹⁶.

São vários os testes recomendados pela Federation Dentaire International¹⁰ como preliminares para avaliar a biocompatibilidade dos materiais odontológicos. Um tipo de teste é aquele em que os materiais são implantados no tecido conjuntivo do dorso de animais, método relativamente rápido para avaliar a toxicidade *in vivo* de um material.

Os testes de toxicidade *in vivo* de materiais destinados a um contato prolongado com o tecido subcutâneo devem ser examinados e avaliados quanto à presença ou ausência de necrose e de inflamação, à intensidade e extensão da inflamação e a outras alterações pertinentes como a reabsorção do material. A intensidade da resposta inflamatória é baseada no número, tipo e na localização das células inflamatórias.¹⁰

Nos últimos anos, novos materiais artificiais desenvolvidos para o uso biomédico, conhecidos como biomateriais,

vêm sendo testados com o intuito de avaliar as suas propriedades mais importantes, para a utilização em áreas multidisciplinares como a medicina, odontologia, biologia, química e engenharia.

A necessidade de se encontrar um biomaterial de baixo custo, totalmente nacional e que atendesse às especificações médicas levou o Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos/USP a testar a utilização da poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona como biomaterial.⁶

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a biocompatibilidade do poliuretano vegetal da mamona isolado ou acrescido de carbonato de cálcio quando em contato com o tecido conjuntivo de camundongos.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que esse poliuretano vegetal apresenta biocompatibilidade, pois somente no período inicial (7 dias) ocorreu discreta inflamação e também a presença de macrófagos. O período de 7 dias após a cirurgia caracteriza o chamado período de síntese, com deposição de ácido hialurônico e colágeno produzidos pelos fibroblastos, e representa a reposição das estruturas lesadas¹⁸. Após análise ao microscópio óptico, verificou-se que o disco de resina introduzido no tecido conjuntivo não provocou reação de incompatibilidade pelo fato de o organismo reagir com pequena intensidade e não o considerar como elemento estranho. O período de 7 dias que corresponde à fase de síntese das células, principalmente de fibroblastos, não se caracterizou de modo exuberante.

Nos períodos subseqüentes aos 20 dias, ocorreu desaparecimento da inflamação e formação de cápsula conjuntiva delicada constituída por poucas camadas de fibroblastos e fibras colágenas, dispostas paralelamente aos discos.

Neste trabalho, a reação provocada pelos discos de poliuretano derivado da resina de mamona foi enquadrada no nível 2,¹⁰ que se refere à presença de pequena reação tecidual, a qual está mais relacionada ao trauma cirúrgico do que às propriedades do material inserido no tecido conjuntivo.

Os resultados foram semelhantes aos dos estudos realizados por Costa et al.⁹, que analisaram a biocompatibilidade do polímero de poliuretano vegetal derivado do óleo de mamona (PVDOM) em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE), através de implantes, no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, de tubos de polietileno contendo os dois tipos de material. Nos primeiros períodos (7 e 15 dias), o PVDOM promoveu moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares, novos vasos sanguíneos e degradação colágena. Nos últimos períodos (30 e 60 dias), um tecido fibroso denso envolvia os tubos de polietileno, e, para ambos os materiais, o tecido conjuntivo adjacente apresentava características histológicas de normalidade.

Nossos resultados também foram semelhantes aos resultados observados por Vilarinho *et al.*²⁰, que estudaram o comportamento dos tecidos da câmara anterior do olho de camundongos ante a implantes de resina de poliuretano vegetal acrescida ou não de carbonato de cálcio e constataram a inocuidade do material, não observando a ocorrência de qualquer processo indicativo de rejeição à resina de poliuretano vegetal, nem tampouco de reabsorção ou substituição da mesma.

Conclusão

Com base em nossos resultados e de acordo com a metodologia empregada, podemos concluir que:

- a resina de mamona mostrou-se como um biomaterial bem aceito pelo tecido conjuntivo do dorso de camundongos;
- o acréscimo de carbonato de cálcio não modificou a compatibilidade do material.

Agradecimento

Os autores manifestam seus agradecimentos ao CNPq, patrocinador da Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/1999/2000) e aos técnicos do Laboratório de Histologia, Luis Antonio Potenza e Pedro Sérgio Simões, pelo processamento histológico e pelos cuidados com os animais.

Referências

1. AZEVEDO, P. E. S. et al. Uso da membrana de polímero de mamona em regeneração óssea guiada em defeitos ao redor de implantes osseointegrado. **Rev. Bras. Implant.**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 6, p.8-12, nov./dez. 1997.
2. BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4thed. New York: Churchill, Livingstone, 1996. 766 p.
3. BRONZI, E.S.; SAAD, J.R.C.; MOTISUKI, C. Estudo in vitro da resistência ao teste de cisalhamento de restaurações do polímero vegetal (óleo de mamona) com sistemas de adesão e cimento de ionômero de vidro. **Odonto 2000 – Odontol. Séc. XXI**, Araraquara, v.3, n.1, p.30-36, jan./jun. 1999.
4. CANSIAN, D. C. J. et al. Avaliação de membranas de colágeno com diferentes períodos de cross-linkage. Estudo histológico em subcutâneo do rato. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.21, p.181-190, jan./dez. 1992.
5. CARVALHO, A.C.P. et al. Implante de poliuretano em tecido conjuntivo subcutâneo. Estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, Araçatuba, v. 5, n. 1/2, p.63-67, jan./dez. 1976.
6. CHIERICE, G. O. **Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas de óleo de mamona**. São Carlos: USP, 1994.
7. CLARO NETO, S. **Caracterizações físico-química de um poliuretano derivado de óleo de mamona utilizado para implantes ósseos**. 1997. 127 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
8. COSTA, C. A. S.; MERZEL, J. Compatibilidade biológica da resina resorcina-formaldeído: avaliação histológica de seus efeitos em tecido subcutâneo de ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.23, n.1, p.29-36, jan./jun. 1994.
9. COSTA, C.A.S. et al. Biocompatibilidade do polímero de poliuretano vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. **Odonto 2000 -Odontol. Séc. XXI**, Araraquara, v.1, n.1, p.44-48, jan./jun. 1997.
10. FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE, COMMISSION ON DENTAL MATERIALS, INSTRUMENTS, EQUIPMENT AND THERAPEUTICS. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int. Dent. J.**, London, v. 30, n. 2, p. 140-187, June 1980.
11. GONRING, D. Mamona: a nova descoberta da medicina na forma de polímero, está sendo usada na reconstrução de tecidos e de partes ósseas danificadas em acidentes ou doenças. *A Gazeta*, Vitória, 6 jul. 1998. Medicina, p. 16.
12. IGNÁCIO, H. **Utilização do cimento derivado do polímero de mamona no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em coelhos**. 1995. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ortopedia e Traumatologia) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.
13. JACOBOWITZ, M. et al. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de cimentos fotopolimerizáveis (Cavilite e Dycal vlc). **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.21, p.25-35, jan./dez. 1992.
14. KHARMANDAYAN, P. Estudo da interface de contato entre osso e implantes de poliuretano com e sem carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e **eletrônica de varredura, em coelhos**. 1997. 203 f. Tese (Doutorado em Ortopedia e Traumatologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.
15. OHARA, G. H. et al. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortop. Bras.**, São Paulo, v.3, n.2, p.62-68, abr./jun. 1995.
16. ROSLINDO, N.C. et al. Biocompatibilidade da resina poliuretano vegetal e germes dentários in vitro. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v. 26, n.2, p.265-274, jul./

- dez. 1997.
17. SILVA, N.M. Óleo de mamona é usado em cirurgia da coluna. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 mar. 1996. Ciência e Tecnologia, p. 16.
 18. SIQUEIRA JR., J.F.; DANTAS, C.J.S. **Inflamação - aspectos biodinâmicos das respostas inflamatória e imunológica**. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 1996.
 19. SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 7. Reactions of bony tissue to implanted root canal filling material in guineapigs. **Odontol. Tidsk.**, Stockholm, v.77, n. 2, p.133-159, Apr. 1969.
 20. VILARINHO, R. H.; HETEM, S.; RAMALHO, L. T. O. Implante de resina de poliuretano vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. **Odonto 2000 – Odontol. Séc XXI**, Araraquara, v.1, n. 1, p.25-29, jan./dez. 1996.