

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PLACAS ÓSSEAS CORTICAIS BOVINA: AVALIAÇÕES
MECÂNICAS E MICROBIOLÓGICA APÓS CONSERVAÇÃO
EM DIFERENTES MEIOS

ALEGRE
ESPÍRITO SANTO – BRASIL
2010

EDSON VILELA DE MELO FILHO

PLACAS ÓSSEAS CORTICAIS BOVINA: AVALIAÇÕES
MECÂNICAS E MICROBIOLÓGICA APÓS CONSERVAÇÃO
EM DIFERENTES MEIOS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Veterinárias, linha de pesquisa
Cirurgia Experimental e Emergências
em Animais.

ALEGRE
ESPÍRITO SANTO – BRASIL
2010

Dedicado a:

Minha mãe Eliane, que distante, lutava pela vida durante a realização deste trabalho.

Minha esposa Liana, razão de tudo que faço.

Ao meu avô Luiz (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre “abrir uma janela” na hora certa.

A minha mãe Eliane Almeida, por sempre estar presente mesmo tão distante e diante de tantos obstáculos da vida.

A minha esposa Liana Mesquita Vilela, por ser sempre o motivo de tudo e a realização da minha vida. Viver ao seu lado sempre será meu objetivo maior.

Ao meu único irmão Dell’Ângelo Vilela e minhas sobrinhas Gabriella Vilela e Brenda Vilela; a minha cunhada Natália Mesquita e ao meu concunhado Marcelo Parente, que cuidaram da minha mãe, como médicos e “filhos”.

Aos meus avós (*in memoriam*) Maria e Luiz; minha tia Elena Almeida e meus tios Elvécio Almeida e Aécio Aleida (*in memoriam*); minhas primas e primos: Sanja e Susy Barbosa Alice Padilha, Leonardo Padilha, Gustavo Padilha e aos seus filhos.

Aos meus sogros Nadja e Rui Mesquita e minha cunhada Patrícia Mesquita.

A Miguel Barbosa, Graça Padilha, Eudes Tenório, Sérgio Roberto, Andresson.

A todos os demais familiares que contribuíram para minha educação.

A Universidade Federal do Espírito Santo e a FAPES pelas condições oferecidas para realização desse trabalho, assim como a Universidade Federal de Viçosa, ACECIL Vet, Probac do Brasil e a Cofril LTDA.

A minha orientadora Prof^a. Patrícia Maria Coletto Freitas, por ter confiado no meu trabalho, pelos ensinamentos profissionais e pessoais.

Ao Prof. Ricardo Marius Della Lúcia, por toda a educação e atenção.

Ao Prof. Fabiano Séllos Costa, por sua amizade ao longo desses anos.

A todos os demais professores e funcionários da UFES que contribuíram com esse trabalho, especialmente: ao Prof. Dr. Marcelo Resende Luz, a Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins; ao Médico Veterinário Paulo Sérgio Cruz de Andrade Júnior; ao Médico Veterinário André Gomes Lima; as secretárias Ligiane Bornela e Madalena Capucho; ao Prof. José Tarcísio da Silva Oliveira.

Aos colegas de mestrado: Ana Elisa Pato Salgado, Fernando Borges Miranda, Manuela Aleluia Drago, Livia Ramos e Natália Soares; aos alunos: Jamili Maria Suhel Mussi, Warley Gomes dos Santos e Aguinaldo Francisco Mendes Júnior.

Ao meu amigo Fernando Carlos Stocco.

Ao meu cão Frevo, por ser companheiro sempre.

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a resistência mecânica de placas ósseas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios, e a eficiência desses meios em inibir o crescimento de micro-organismos. Foram utilizadas 168 placas confeccionadas a partir de tíbia bovina e conservadas em glicerina a 98% (n=28), solução salina a 150% (n=28), solução de açúcar a 300% (n=28), líquido de Dakin (n=28), congeladas em N₂L a - 196°C (n=28), ou esterilizadas em óxido de etileno (n=28). Após reidratação em solução de cloreto de sódio a 0,9% por seis horas, estas foram submetidas a ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção. Foi realizada avaliação microbiológica das placas anterior e imediatamente após a reidratação, com ou sem adição de enrofloxacina a 0,5%. Não se observou diferença significativa ($P < 0,01$) da resistência ao ponto de ruptura entre as placas conservadas nos diferentes meios, congeladas-descongeladas ou esterilizadas. Micro-organismos foram isolados das placas conservadas em solução saturada de sal, açúcar, Dakin ou congeladas em N₂L, anterior e após a reidratação. Entretanto, após o uso da solução de cloreto de sódio 0,9% acrescida de enrofloxacina a 0,5%, não foram isolados micro-organismos. Portanto, placas de osso bovino, conservadas em solução saturada de açúcar ou sal, glicerina a 98%, solução de Dakin, congeladas em N₂L ou esterilizadas em óxido de etileno assemelham-se em relação à biomecânica, e a reidratação com solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de enrofloxacina a 0,5% inibe o crescimento microbiano.

Palavras-chave: implantes, enxertos, biomateriais, meios de conservação, ensaios mecânicos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the mechanical strength of bone plates yielded from bovine cortical bone, conserved in different solutions, and the efficiency of these solutions in the inhibition of microorganism's growth. 168 plates yielded from bovine tibiae were conserved in 98% glycerin (n=28), 150% saline solution (n=28), 300% sugar solution (n=28), Dakin solution (n=28), frozen in LN₂ at -196°C (n=28), or sterilized in ethylene oxide gas (n=28). After rehydrated in NaCl 0.9% solution for six hours, plates were subjected to tensile, compression, bending and twisting testing. Bone plates microbiological evaluation was carried out before and immediately after rehydration, with or without enrofloxacin 0.5% addition. There was no significant difference ($P<0.01$) on resistance to the rupture point in plates conserved in the different solutions, frozen-thawed or sterilized. Microorganisms were isolated from plates conserved in saturated salt solution, sugar saturated solution, Dakin solution or frozen in LN₂, before and after rehydration. However, after the use of NaCl 0.9% solution added enrofloxacin 0.5%, microorganisms were not isolated. Therefore, bovine bone plates conserved in sugar or salt saturated solution, 98% glycerin, Dakin solution, frozen in LN₂ or sterilized in ethylene oxide gas present similar biomechanical tests results, and NaCl 0.9% solution added enrofloxacin 0.5% rehydration inhibits microbial growth.

Keywords: implants, grafts, biomaterials, conservation solutions, mechanical testing.

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS/SÍMBOLOS

v.	volume
p.	página
cap.	capítulo
ed.	edição
et al.	e outros
ANOVA	análise de variância
LTDA	limitada
BHI	infusão de cérebro e coração
cm ²	centímetro quadrado
mm	milímetro
mL	mililitro
min	minuto
°C	grau centígrado
kgf	quilograma-força
T	tonelada
kg	quilograma
g	grama
%	por cento
+	positivo
-	negativo
x	vezes
=	igual
±	mais ou menos
N ₂ L	nitrogênio líquido
NaCl	cloreto de sódio

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Placas ósseas bovina e máquina universal de ensaios utilizados para a realização dos ensaios mecânicos destrutivos. A) Placa de osso bovino; B) Placa de osso usinada para o ensaio de tração; C) Corpo de prova (seta) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de tração; D) Corpo de prova (seta branca) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de compressão. Observa-se o suporte de madeira (seta vermelha) próximo a placa; E) Corpo de prova (seta) posicionado para ser submetido ao ensaio de flexão em três pontos; F) Corpo de prova (seta amarela) acoplado a um suporte de madeira (seta branca), preso a uma polia (seta verde) tracionada verticalmente por um barbante (seta vermelha) fixado a barra superior da máquina de ensaios para o ensaio de torção.....40

ANEXOS I

Figura 1 - Placa confeccionada a partir de osso cortical bovino.....55

Figura 2 - Corpo de prova sendo mensurado com auxílio de um paquímetro digital antes do ensaio mecânico.55

Figura 3 - Placa de osso usinada para teste de tração.....56

Figura 4 - Corpo de prova (seta) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de tração.....56

Figura 5 - Corpo de prova (seta branca) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de compressão. Observa-se o suporte de madeira (seta vermelha) próximo a placa.....57

Figura 6 - Corpo de prova (seta) posicionado para ser submetido ao ensaio de flexão em três pontos.	57
Figura 7 - Corpo de prova (seta amarela) acoplado a um suporte de madeira (seta branca), preso a uma polia (seta verde) tracionada verticalmente por um barbante (seta vermelha) fixado a barra superior da máquina de ensaios para ensaio de torção.....	58
Figura 8 - Representação dos valores médios da força ao ponto de ruptura, de ossos bovinos, conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos: A) de tração; B) de compressão; C) de flexão; D) de torção. Os tratamentos não diferem entre si ($P < 0,01$).....	59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Valores médios (kgf/cm^2) e desvios padrão de ossos bovinos conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção.39

ANEXOS II

Tabela 1 - Amostras obtidas a partir de placas ósseas bovinas conservadas por 45 dias em solução de cloreto de sódio 150% (GS), solução de açúcar 300% (GA), glicerina 98% (GG), Líquido de Dakin (GD), criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C e esterilizadas em óxido de etileno, para avaliação microbiológica qualitativa em tubos de ensaio contendo os meios de crescimento: BHI-caldo e tioglicolato.....60

Tabela 2 - Amostras obtidas a partir de placas ósseas bovinas conservadas em solução de cloreto de sódio 150% (GS), solução de açúcar 300% (GA), glicerina 98% (GG), Líquido de Dakin (GD), criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C e esterilizadas em óxido de etileno, após 45 dias de conservação e reidratadas por seis horas em solução de cloreto de sódio a 0,9% com e sem enrofloxacina [0,5%], para avaliação microbiológica quantitativa de micro-organismos em placas de Petri contendo os meio de crescimento: BHI-ágar em aerobiose e anaerobiose a 37°C , Sabouraud em temperatura ambiente e a 37°C61

Tabela 3 - Valores médios (kgf/cm^2) e desvios padrão de ossos bovinos conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção.62

Tabela 4 - Análise microbiológica das placas ósseas dos grupos: sal - GS, açúcar – GA, glicerina – GG, Dakin – GD, nitrogênio líquido – GN e óxido de etileno – GO, após período de preservação mínimo de 45 dias e lavagens, sucessivamente, com intervalos de 5 minutos, em três tubos tipo Falcon, estéreis, contendo 35 ml de solução de NaCl 0,9% e acondicionadas em tubos de ensaio contendo BHI caldo e tioglicolato.....62

Tabela 5 - Análise microbiológica das placas ósseas dos grupos: sal - GS, açúcar – GA, glicerina – GG, Dakin – GD, nitrogênio líquido – GN e óxido de etileno – GO, após reidratação em solução de NaCl 0,9% e em solução de enrofloxacino 0,5%, semeadas em placas de Petri contendo o meio BHI-ágar, mantido em condições de aerobiose a 37°C e em anaerobiose a 37°C e o meio Sabouraud mantido a 37°C e a temperatura ambiente.....63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Enxertos ósseos.....	15
2.2. Implantes	16
2.3. Biomecânica óssea	18
2.3.1. Ensaio mecânicos	19
2.4. Conservação de implantes.....	20
2.5. Reidratação dos implantes.....	24
CAPÍTULO 1	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÕES	35
FONTES DE AQUISIÇÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS I – Lista de figuras	55
ANEXOS II – Lista de tabelas	60

1. INTRODUÇÃO

A importância da qualidade do material empregado na fabricação de implantes metálicos de uso ortopédico vem crescendo à medida que fica evidente a relação entre a composição química do metal e a ocorrência de falha do implante (GREENE, 1985). Essa falha no emprego de implantes metálicos está relacionada à reação de rejeição no organismo receptor, interferências nas técnicas de acompanhamento pós-operatórias por imagem, e a promoção de restrição do crescimento ósseo fisiológico em pacientes jovens (PIETRZAK *et al.*, 1996). Além disso, segundo Böstman (1991), o efeito indesejável mais preocupante está relacionado ao desenvolvimento de osteopenia cortical induzida pelo estresse desses materiais no tecido ósseo. Assim, a busca de biomateriais alternativos ao metal para confeccionar implantes cirúrgicos, como os polímeros biodegradáveis, a cerâmica e os derivados do óleo da mamona vem crescendo (UHTHOFF; FINNEGAN, 1983; FISCHER-BRANDIES *et al.*, 1992).

Os biomateriais podem ser definidos como a combinação de duas ou mais substâncias de origens naturais ou sintéticas, que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos (SANTOS *et al.*, 1999; MORAES, 2002; RODRIGUEZ, 2004). Devem ser inertes, degradáveis ou absorvíveis, além de favorecer o crescimento ósseo por condução, e se possível, por indução. Estas características dependem das propriedades físicas e químicas do material, que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do tecido ósseo (FEHLBERG, 2001; MONCHAU *et al.*, 2002).

No campo de implantes absorvíveis, o osso bovino liofilizado e esterilizado aparece como uma alternativa viável na produção de parafusos ósseos (MORA, 2000; BENTO, 2003). Entretanto, aspectos estruturais, mecânicos e relativos à osteointegração e osteoindução são importantes tópicos de pesquisa a serem abrangidos previamente ao uso *in vivo* de implantes de osso (HAJE; VOLPON, 2006).

De acordo com Alvarenga (1992) e Mota *et al.* (2002), os meios de conservação utilizados para manter as próteses biológicas devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de micro-

organismos, além de conservar, ao máximo, a integridade celular, aumentar a resistência dos tecidos à tração e atuar por um período prolongado.

As quatro forças fisiológicas primárias que podem ser aferidas sobre o osso para definir sua resistência são a compressão axial, a tensão axial, a flexão e a torção (HULSE; HYMAN, 1998). Cada uma destas forças, isoladamente ou em conjunto, resulta em um padrão complexo de pressões e deformações internas no âmbito do osso. Souza (1974) classificou os ensaios mecânicos como destrutivos quando ocorrem a inutilização do material, como nos testes de tração, impacto, torção, compressão, flexão e fadiga; e não destrutivos, que incluem os testes ultrassonográficos e radiográficos. Contudo, métodos computacionais desenvolvidos originalmente para análise estrutural em engenharia têm sido utilizados em biomecânica óssea, devido fundamentalmente à necessidade clínica de determinação das tensões e deformações em ossos, e nos sistemas osso-implante submetidos a esforços mecânicos (HUISKES; CHAO, 1983; PRENDERGAST, 1997; BRUNSKI *et al.*, 2000).

Deste modo, objetivou-se com este estudo comparar por meio de ensaios mecânicos destrutivos (compressão, tração, flexão e torção) a resistência de placas confeccionadas a partir de osso bovino conservadas em diferentes meios; e avaliar a presença de micro-organismos nas placas ósseas, anterior e após a reidratação destas com solução de cloreto de sódio a 0,9% com e sem antibiótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Um dos principais anseios no tratamento das fraturas dos ossos longos é o retorno rápido da função do membro traumatizado (BRASIL, 2004). Segundo Piermattei e Flo (1999) e Fossum (2002), esse objetivo é alcançado com a osteossíntese dos segmentos fraturados e a conservação da vascularização no local da fratura. Além disso, a técnica utilizada para esta redução deve produzir fixação estável e permitir mobilização rápida dos movimentos dos segmentos ósseos fraturados, sendo isto proporcionado quando se utiliza uma fixação interna rígida. De forma geral, isto é promovido ao se utilizar placas ósseas metálicas, que podem ser inseridas para atuar como placa de compressão, neutralização ou apoio (PIERMATTEI; FLO, 1999; FOSSUM, 2002).

Os enxertos e implantes ósseos são amplamente utilizados em situações clínicas com perda de tecido ósseo. Sua aplicabilidade é vasta na cirurgia reconstrutiva, principalmente na área ortopédica, sendo empregados para o reparo decorrente de traumas, pseudoartroses, correção de deformidades, após ressecção tumoral e estímulo a osteogênese (WOOD; BISHOP, 2007).

2.1. Enxertos ósseos

Segundo Stevenson (1998), os enxertos são oriundos de tecido viável ou vivo, e devem proporcionar estabilidade mecânica, juntamente com estímulo para o crescimento de tecido ósseo no receptor, além de ser fonte de células osteogênicas e fatores indutivos.

Os enxertos ósseos são denominados de acordo com o seu local de origem e morfologia. Com relação a sua origem, os enxertos podem ser autógenos (tecido transplantado de um local para outro no mesmo animal), alógenos (tecido transferido entre dois animais pertencentes à mesma espécie) ou xenógenos (tecido transplantado de um animal para outro de espécie diferente) (MARTINEZ; WALKER, 1999). Podem constituir-se exclusivamente de osso trabecular, de osso cortical ou osso córtico-trabecular, ou de osso e cartilagem articular (osteocondral) (STEVENSON, 1998).

De acordo com Abrahams *et al.* (2000), os enxertos podem induzir a neoformação óssea por três mecanismos: osteogênese, osteoindução e

osteocondução. A osteogênese é caracterizada quando o próprio enxerto é suprido de células capazes de formação óssea (osteoblastos); a osteoindução é a capacidade do enxerto de estimular a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente (leito receptor) com neoformação óssea. Na osteocondução, células mesenquimais diferenciadas invadem o enxerto, promovendo a formação de cartilagem e em seguida a ossificação (RAGHOEBAR *et al.*, 2005). Entretanto, segundo Urist (1965), o enxerto ósseo conservado não atua como elemento osteogênico, pois o tratamento pode destruir todos os fatores biológicos que estimulam a neoformação óssea, principalmente representados pela proteína morfogenética óssea.

Assim, os primeiros enxertos foram utilizados com o objetivo de proporcionar suporte mecânico, função esta substituída com o desenvolvimento dos implantes metálicos (GIOSO *et al.*, 2002). Além disso, os enxertos proporcionam estabilidade mecânica (STEVENSON, 1998; GIOSO *et al.*, 2002) quando aplicados em grandes defeitos, resultantes de traumatismo ou da ressecção em blocos de osso neoplásico. Também promovem estabilização óssea por meio de fixação interna. Porém, segundo Stevenson (1998) e Gioso *et al.* (2002) passaram a ser importantes por funcionarem como suporte para crescimento de osso novo do hospedeiro (osteocondução), como fonte de células osteogênicas e fatores indutivos (osteoindução).

2.2. Implantes

Os Implantes estão relacionados com tecido não vivo, como osso cortical congelado ou material não biológico, como metal ou cerâmica. Atualmente, os implantes ortopédicos mais utilizados são placas e parafusos fabricados com metais como as ligas de titânio e aço inoxidável. Suas vantagens estão nas propriedades mecânicas, com grande resistência às diversas forças neles exercidas. Contudo, essas propriedades mecânicas são diferentes das propriedades mecânicas do osso e, após a consolidação da fratura, esse implante protege o osso das cargas normalmente impostas durante a movimentação e apoio dos membros (STEVENSON, 1998). Segundo Rumpel *et al.* (2006) e Liu e Wang (2007), essas cargas normais são necessárias à manutenção da densidade e contorno ósseos, e sem elas, o remodelamento ósseo é afetado, podendo levar a osteólise local e

consequente enfraquecimento ósseo, com possibilidade de novas fraturas. Além disso, possuem as desvantagens de promoverem tensão excessiva (UHTHOFF; FINNEGAN, 1983); corrosão (AGINS *et al.*, 1988) e acúmulo de metais nos tecidos (KIM *et al.*, 1997), devido à liberação lenta e progressiva de íons metálicos (debris). Também podem promover respostas inflamatórias contínuas e progressivas, neoplasias, como os osteossarcomas (KLEINER; SILVA, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005; RASSE *et al.*, 2007; SARGEANT; GOSWAMI, 2007). Outras desvantagens dos implantes metálicos incluem a interferência com algumas técnicas de diagnóstico por imagem, sua possibilidade de migração após implantação, e a sensibilidade ao calor ou frio (OLIVEIRA, 2005; SARGEANT; GOSWAMI, 2007). Uma alternativa de diminuir esses problemas é a remoção do implante após a consolidação óssea, o que envolve a realização de novo procedimento cirúrgico, com todos os seus inconvenientes, custos e possíveis complicações (WEILER *et al.*, 2000).

Assim, como relatado por Hovis e Bucholz (1997), os implantes bioabsorvíveis, comparativamente aos metálicos, proporcionam vantagens como promover menor reação adversa aos tecidos moles, além da ausência da necessidade de posterior remoção. Além disso, fornecem uma alternativa como material preenchedor de defeitos, proporcionando um arcabouço para o crescimento do tecido ósseo, com resistência e elasticidade próximas a do osso (RUMPEL *et al.*, 2006). De acordo com Dhillon *et al.* (2008), os implantes biodegradáveis têm evoluído ao longo das últimas quatro décadas a partir de folhas simples ou de filmes de polímeros, para o uso experimental, como pinos biodegradáveis, fios e placas para fixação interna das fraturas.

Padilha Filho *et al.* (2008a) utilizaram com sucesso fíbulas de cães conservadas em glicerina a 98%, como método de fixação intramedular em fraturas femorais distais em cães e gatos jovens. Os autores relataram que o tecido ósseo empregado na confecção dos pinos permitiu maior aderência entre o implante e o osso hospedeiro, impedindo a rotação entre os fragmentos. Já Gaiga (2002) empregou pinos confeccionados a partir de tíbia e fíbula caninas, conservados em glicerina a 98% ou mel, no tratamento de fraturas transversais umerais de pombos domésticos. O autor observou, em média, consolidação óssea aos 41 dias pós-cirurgia, com absorção completa do implante aos 180 dias de pós-operatório.

2.3. Biomecânica óssea

As propriedades mecânicas do osso são influenciadas por fatores como densidade, orientação das fibras colágenas, porosidade, conteúdo mineral (RHO *et al.*, 1998), anisotropia, temperatura, entre outros (DINGEE, 2005). Segundo Ashman (1989), os ossos são compostos pela fase mineral, representada pela hidroxiapatita, pelo colágeno e pela água. Algum tratamento que muda a natureza ou a composição relativa destes componentes pode mudar as propriedades. Além disso, podem sofrer interferência de tratamentos à que o osso foi submetido para sua conservação (secagem, congelamento, liofilização, irradiação gama, reidratação) ou ainda da metodologia experimental utilizada para medir suas propriedades mecânicas (DINGEE, 2005). De acordo com Del Carlo *et al.* (1999), a maioria dos métodos de conservação óssea exercem efeito deletério sobre a resistência mecânica.

Contudo, testes biomecânicos têm sido realizados em ossos, conservados ou não, visando analisar suas características estruturais, tal como estudaram Cornu *et al.* (2003) em ossos humanos liofilizados e esterilizados por irradiação gama. Assim, segundo Macedo *et al.* (1999), a análise da resistência de ossos conservados para a utilização futura como implante é de extrema importância, já que esse material deve proporcionar adequado suporte estrutural após implantado.

Do ponto de vista mecânico, o osso pode ser estudado como material (tecido ósseo) ou como estrutura intacta (por exemplo, o fêmur); ambos os estudos têm finalidades distintas (EVANS, 1976). Quando há interesse no conhecimento das propriedades do tecido, amostras são retiradas do osso e ensaiadas, assim, é possível caracterizar o tecido ósseo por meio da curva tensão-deformação. Além disso, os ensaios mecânicos podem determinar outras propriedades como módulo de elasticidade e cisalhamento, e limite de resistência de ruptura. Esses parâmetros são importantes, pois ajudam a caracterizar elementos biológicos ósseos de importância na absorção, transmissão e resistência a esforços físicos. Entretanto, há variação nesses parâmetros dependente do osso utilizado, da região do osso e das condições em que a amostra foi colhida, do tipo de tratamento de conservação, da espécie animal em estudo, entre outras (SEDLIN; HIRSCH, 1966). Essas variações, em parte, também advêm do fato de que o osso é material viscoelástico (COWIN, 1989), heterogêneo e anisotrópico (SEDLIN; HIRSCH, 1966; REILLY; BURSTEIN, 1974).

O osso cortical diafisário é um material composto basicamente por hidroxiapatita, uma cerâmica de alta resistência, que lhe confere rigidez. Também possui uma matriz composta basicamente por colágeno, uma proteína responsável por suas propriedades elásticas e plásticas. Sua estrutura não homogênea, a existência de trabeculados ósseos com arquitetura bem definida e a interposição de fluídos, conferem características de anisotropia e de viscoelasticidade (MEARS, 1979). Estas características fazem com que o osso apresente uma resistência adaptada às tensões pontuais, variáveis ao longo do tempo (idade, por exemplo), posição (localização anatômica) e às solicitações externas (frequência e intensidade de forças e nível de atividade) (ASHMAN, 1989; CAMARGO *et al.*, 2002).

2.3.1. Ensaio mecânicos

Os ensaios mecânicos utilizados frequentemente para determinação das propriedades mecânicas de osso cortical são de tração, compressão, flexão em três ou quatro pontos, torção, cisalhamento puro, fadiga e micro ou nano penetração (DINGEE, 2005).

O ensaio de tração é um dos métodos mais eficazes para medir as propriedades mecânicas do osso, visto que a força de tração é aplicada sem induzir a um momento fletor associado (COWIN, 2001). Neste ensaio, um corpo de prova do material requerido, de formato retangular ou circular, é submetido a uma deformação longitudinal (DINGEE, 2005). Segundo Cowin (2001), o corpo de prova de osso para o ensaio de tração deve ser projetado para que a maior parte da deformação ocorra na sua porção central. Além disso, o seu comprimento deve ser relativamente grande, e o processo de usinagem para sua fabricação deve ser efetuado cuidadosamente para evitar a formação de defeitos superficiais, que interferem no comportamento do material durante o ensaio.

O ensaio de compressão é comumente usado para testar as propriedades mecânicas dos ossos corticais e esponjosos, porém a falta de acurácia axial pode ocorrer se o corpo de prova não for preparado de forma simétrica, com suas bases paralelas (GIBSON *et al.*, 2008). Como descrito por Davis *et al.* (1982), o ensaio de compressão é o oposto ao de tração, quando se avalia a direção ou o sentido da aplicação da tensão. Deve-se realizar uma centralização adequada na máquina de

ensaio do corpo de prova, para que ocorra uma distribuição de tensão homogênea, evitando a flambagem do corpo de prova, comum em corpos de prova finos.

O ensaio de flexão pode ser realizado em três ou quatro pontos do corpo de prova. De acordo com Dingee (2005), a vantagem do ensaio em três pontos é a simplicidade. Porém, podem ser desenvolvidas cargas cisalhantes próximas à seção média do osso. Já no ensaio de flexão em quatro pontos desenvolve-se flexão pura entre as duas cargas superiores (cisalhamento nulo nesta região), sendo o volume de material exposto a esta prova maior que na flexão em três pontos (DINGEE, 2005). Como descrito por Reilly e Burstein (1975) e Dingee (2005), quando aplicada uma tensão de flexão num corpo de prova de osso cortical ou de outro material, desenvolve-se tensão de compressão entre sua linha neutra e sua superfície côncava, e tensão de tração entre sua linha neutra e sua superfície convexa.

O ensaio de torção consiste na aplicação de carga rotativa em um corpo de prova geralmente de geometria cilíndrica (DAVIS, *et al.*, 1982). Nos esforços de torção, a deformação angular provoca forças de cisalhamento, cuja tensão máxima ocorre no ponto mais distante do centro do eixo maior do osso. Observando uma seção transversal do osso, as forças de reação no mesmo, quando submetido à torção, têm o sentido oposto ao da força de torque aplicada (BURSTEIN *et al.*, 1972).

2.4. Conservação de implantes

Com a consolidação de várias técnicas utilizadas na preparação de enxertos ósseos para o armazenamento, a existência de diferenças significativas entre as mesmas passou a ser discutida (CONRAD *et al.*, 1993). Os vários meios e métodos de conservação de ossos corticais visam diminuir a antigenicidade das células do doador a serem implantadas no hospedeiro, além de manter um estoque acessível de osso disponível (STEVENSON, 1998). Além disso, segundo Alvarenga (1992), esses meios devem promover um aumento da resistência dos tecidos conservados.

A solução saturada de cloreto de sódio a 150% (sal comercial) foi utilizada por Brun *et al.* (2002) e Freitas (2006) para conservação de pericárdio e peritônio de bovino, respectivamente. Os autores relataram que esse meio possui propriedade antisséptica, além de manter as características estruturais do tecido nela conservado. A ação antibacteriana e antifúngica da solução saturada de sal é

oriunda da diminuição da atividade de água que esta promove sobre o tecido, contudo, não foi descartada a possibilidade de que o iodo (presente no sal comercial) atue neste sentido (BRUN *et al.*, 2002). Reações do tipo corpo estranho ou eliminação do implante não foram detectadas por BRUN *et al.* (2002) após enxertarem pericárdio canino conservado em solução salina a 150% por 90 dias, na reparação do músculo reto abdominal de ratos, provavelmente devido esta solução possuir função anti-imunogênica.

A solução de açúcar a 300% foi utilizada com sucesso por Mazzanti *et al.* (2001) e Mazzanti *et al.* (2003) para conservação de músculo diafragmático canino. Os autores concluíram que o meio manteve aparentemente a resistência do implante e suas estruturas morfológicas, e que após a implantação teste tecido, não foram observados sinais de infecção, ou evidências de rejeição no local do implante. Segundo Centro Neto *et al.* (1997), a concentração do açúcar igual ou superior a 250% atua sobre a *Escherichia coli*, com ação bactericida *in vitro*. Além disso, de acordo com Prata e Fukuda (2001), essa solução aumenta a pressão osmótica, criando condições desfavoráveis à reprodução e crescimento de várias bactérias, fungos e leveduras. Rappeti (2006) utilizou implantes homólogos de costelas conservados em açúcar *in natura* e a 300% na reconstituição da parede torácica de gatos. O autor relatou que estes meios conservaram o tecido ósseo, sem induzir reações de rejeição no leito receptor, além de manter um nível de contaminação baixa dos implantes, o que não promoveu infecção no pós-operatório.

A glicerina a 98%, mantida em temperatura ambiente, apresenta como vantagem propriedade antisséptica, atuando como bactericida e fungicida (ALVARENGA, 1992; RANDI *et al.*, 2002), exceto contra formas esporuladas. Além disso, segundo Pigossi (1967), diminui a antigenicidade, preserva a textura e aumenta a resistência à tração do tecido nela conservado, sem alterar o grau de elasticidade. De acordo com Pigossi (1964) e Cavassani *et al.* (2001), a glicerina desidrata o tecido ósseo, substituindo a maior parte da água intracelular, sem alterar a concentração iônica das células, atuando como protetor da integridade celular e mantendo a função osteoindutora. Pinto Júnior *et al.* (1995) após utilizarem enxerto ósseo cortical autógeno conservado em glicerina a 98% em cães, não verificaram sinais de rejeição, sugerindo que este meio diminuiu a antigenicidade dos tecidos. Segundo Costa Neto *et al.* (1999), para não estimularem reação imunológica, as próteses biológicas devem permanecer conservadas neste meio por um período

mínimo de 30 dias. Período este, que de acordo com Krauspenhar (2003), é o suficiente para a eliminação de bactérias gram negativas. Contudo, de acordo com Gioso *et al.* (2002), a glicerina foi capaz de conservar o tecido ósseo por um prazo de nove anos de armazenamento, com mínimo crescimento microbiano. Amendola (2007) em estudo com diáfises femorais caninas verificou que 45,71% das amostras recém-coletadas apresentaram contaminação. Após 30 dias de conservação em glicerina a 98%, apenas 5,71% das amostras permaneceram contaminadas, demonstrando a ação bactericida da glicerina. Costa (1996), Del Carlo *et al.* (1999) e Del Carlo *et al.* (2007) relataram que ossos de cães conservados em glicerina demonstraram menor resistência quando comparado a ossos frescos. Já Padilha Filho *et al.* (2008a) utilizaram com sucesso fíbulas de cães conservadas em glicerina a 98% por um período mínimo de 30 dias, como método de fixação intramedular em fraturas femorais distais em cães e gatos jovens. Os autores relataram que o tecido ósseo empregado na confecção dos pinos permitiu maior aderência entre o implante e o osso hospedeiro, impedindo a rotação entre os fragmentos.

De acordo com Sampaio *et al.* (2009), o nitrogênio líquido e líquido de Dakin podem ser utilizados com segurança para conservação de osso de coelhos. Segundo estes autores, estes meios promoveram resistência superior quando se aplicou o teste de micro-tração, quando comparado à glicerina a 98%, e maior estabilidade quanto às características biomecânicas. Assim, os autores os indicaram para a utilização em bancos de ossos corticais, visto que apresentaram baixo custo operacional e facilidade na execução da técnica de preparo e conservação óssea. Além disso, Cunningham e Joseph (1980) concluíram em estudos *in vitro*, que o Líquido de Dakin possui característica bactericida, porém com meia-vida curta, quando a mesma é aquecida a 37°C. Contudo, Dakin (1915) recomendou armazenar este produto em vidro âmbar e conservá-lo em ambiente fresco e isento de luz. Pécora *et al.* (1987) observaram que ao armazenar este produto em vidro âmbar e em geladeira, ocorre diminuição de 25% do cloro contido na solução, após um período de 122 dias. Já, quando mantido à temperatura ambiente, essa diminuição foi de 69%.

O congelamento atualmente é o método de escolha para a conservação de enxertos, pois reduz o potencial imunogênico, preservando as propriedades biomecânicas e osteoindutivas do tecido ósseo, além de inibir o crescimento bacteriano e manter a integridade da matriz óssea (MANKIN *et al.*, 2005). Pelker *et*

al. (1984) relataram que em comparação ao osso fresco, os enxertos congelados a baixas temperaturas não têm suas propriedades biomecânicas afetadas. Segundo Moreau *et al.* (2000) e Hou *et al.* (2005), as temperaturas usadas na criopreservação do osso diminuem eficientemente a antigenicidade do tecido. Entretanto, de acordo com Schafer *et al.* (1976), o nitrogênio líquido, pode atuar como um veículo para a transmissão de vírus, bactérias e fungos resistentes a baixas temperaturas. SOUZA *et al.* (2006) ao avaliarem microbiologicamente sêmen de caprinos diluído em leite desnatado, utilizando penicilina e estreptomicina, gentamicina ou sem antibiótico, e criopreservados em nitrogênio líquido, verificaram que pós-descongelação, a bactéria do gênero *Staphylococcus sp.* estava presente na maioria das amostras.

Segundo Volpon e Costa (2000), ossos esterilizados em óxido de etileno são uma alternativa para a substituição do enxerto autógeno fresco; sendo viável para a constituição de banco de ossos. Em seu estudo, observaram que amostras de osso córtico-esponjoso do homem, quimicamente processados e esterilizados em óxido de etileno, e conservados em temperatura ambiente, apresentaram maior resistência ao teste de compressão, quando comparadas com amostras do mesmo osso no seu estado natural. Entretanto, Johnson e Stein (1988) após compararem enxertos autólogos frescos em fêmures de cães, com enxertos homólogos ósseos esterilizados pelo óxido de etileno, concluíram que os esterilizados e mantidos a temperatura de 22°C tornaram-se quebradiços. Além disso, relataram presença de fissuras ou lascas durante preparação dos enxertos. Também Haje *et al.* (2007), relataram que o processamento químico e uso do óxido de etileno como forma de esterilização de parafusos produzidos a partir de osso cortical bovino, promoveram amalgamação das fibras ósseas.

Hofmann *et al.* (2003) realizaram um estudo biomecânico, por meio de ensaios de flexão em três pontos, em pinos confeccionados a partir de osso cortical proveniente de tíbias bovinas, desengordurados com acetona e esterilizados com óxido de etileno, por autoclavagem e por radiação gama. Os autores descreveram que os ossos tratados com óxido de etileno apresentaram menor grau de rigidez, quando comparado ao osso fresco. O mecanismo de ação do óxido de etileno se dá pela alquilação de compostos no interior dos micro-organismos, principalmente a guanina e a adenina presente no DNA. Por esta razão, o óxido de etileno é extremamente eficiente na eliminação da maioria dos micro-organismos, seja na forma vegetativa ou de esporos. Durante o processo de esterilização, podem ser

formados subprodutos na presença de íons cloro (etileno cloridrina) ou de água (etileno glicol), tais compostos também são tóxicos e de difícil remoção (POSSARI, 2003).

2.5. Reidratação dos implantes

A reidratação do osso a ser implantado pode alterar o desempenho estrutural de um enxerto ósseo (AMENDOLA, 2007), podendo causar diminuição (KOMANDER, 1976), aumento (BURCHARDT *et al.*, 1978; SEDLIN; HIRSCH 1966) ou não alterar de forma significativa a resistência à compressão de corpos de prova (PELKER *et al.*, 1982; MALININ *et al.*, 1989). A reidratação de ossos foi recomendada por Melo *et al.* (1998) como forma de evitar que ossos conservados em glicerina 98% se tornassem quebradiços a manipulação e apresentassem microfissuras.

Assim, Cowin (2001) recomendou a imersão do osso em cloreto de sódio a 0,9% durante três horas, como forma de reidratar ossos liofilizados e submetidos à radiação gama, antes da implantação, justificando ser este tempo suficiente para que ocorra a reidratação do enxerto. Currey (1988) observou que o módulo de elasticidade, o deslocamento máximo e a ductilidade de osso cortical submetido à liofilização, foram recuperados após sua reidratação em solução salina durante três horas. Já Salbego e Raiser (2006), após avaliarem a resistência de diáfises femorais conservadas em glicerina 98% por 30 dias e submetidas a períodos de reidratação de uma, seis e 24 horas, ou não reidratadas; encontraram maior resistência a carga compressiva nos ossos submetidos à reidratação por seis horas. Além disso, Amendola (2007) em seus estudos verificou que diáfises femorais caninas conservadas em glicerina e reidratadas por seis horas, foram mais resistentes a forças compressivas que quando comparada a amostras à fresco.

De acordo com Conrad *et al.*, (1993), não ocorreu diferença com relação à força de compressão entre enxertos ósseos humanos liofilizados reidratados em solução de cloreto de sódio a 0,9% por 24 horas e enxertos congelados não reidratados. Também Macedo *et al.* (1999), após avaliarem a resistência à compressão *in vitro* de osso bovino congelado e de osso bovino liofilizado reidratado por 90 minutos, em uma máquina de compressão automatizada, não observaram diferença entre os grupos estudados, e também entre ossos hidratados e não

hidratados. Segundo Costa (1996), Del Carlo *et al.* (1999) e Del Carlo *et al.* (2007), uma medida adicional para reidratar ossos e prevenir contaminações após implantados, é a utilização de solução fisiológica estéril acrescida de antibiótico, antes da enxertia.

CAPÍTULO 1

Avaliação mecânica e microbiológica de placas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios

Artigo submetido à publicação no periódico Ciência Rural, sob número de registro
CR 3414/2010

Avaliação mecânica e microbiológica de placas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios

Evaluation of mechanical and microbiological plates made from bovine cortical bone, conserved in several means

Edson Vilela de Melo Filho^I, Ricardo Marius Della Lúcia^{II}, Ana Elisa Pato Salgado^I, Fernando Borges Miranda^I, Manuela Aleluia Drago^I, Marilda Onghero Taffarel^I, Liana Mesquita Vilela^{III}, Jamili Maria Suhet Mussi^I, Warley Gomes dos Santos^I, Marcos Santos Zanini^I, Patricia Maria Coletto Freitas^{IV*}

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a resistência mecânica de placas ósseas produzidas a partir de osso cortical bovino, conservadas em diferentes meios, e a eficiência desses meios em inibir o crescimento de micro-organismos. Foram utilizadas 168 placas confeccionadas a partir de tíbia bovina e conservadas em glicerina a 98% (n=28), solução salina a 150% (n=28), solução de açúcar a 300% (n=28), líquido de Dakin (n=28), congeladas em N₂L a - 196°C (n=28), ou esterilizadas em óxido de etileno (n=28). Após reidratação em solução de cloreto de sódio a 0,9% por seis horas, estas foram submetidas a ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção. Foi realizada avaliação microbiológica das placas anterior e imediatamente após a reidratação, com ou sem adição de enrofloxacina a 0,5%. Não se observou diferença significativa (P<0,01) da resistência ao ponto de ruptura entre as placas conservadas nos diferentes meios, congeladas-descongeladas ou esterilizadas. Micro-organismos foram isolados das placas conservadas em solução saturada de sal, açúcar, Dakin ou congeladas em N₂L, anterior e após a reidratação. Entretanto, após o uso da solução de cloreto de

^I Departamento de Medicina Veterinária (DMVET), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CEP. 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

^{II} Departamento de Engenharia Florestal - Laboratório de Propriedades da Madeira, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP. 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

^{III} Departamento de Medicina Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP. 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

^{IV} Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFES. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), Universidade Federal de Minas Gerais. CEP: 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil.*Autor para correspondência. E-mail: pcoletto@yahoo.com.br

sódio 0,9% acrescida de enrofloxacin a 0,5%, não foram isolados microorganismos. Portanto, placas de osso bovino, conservadas em solução saturada de açúcar ou sal, glicerina a 98%, solução de Dakin, congeladas em N₂L ou esterilizadas em óxido de etileno assemelham-se em relação à biomecânica, e a reidratação com solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de enrofloxacin a 0,5% inibe o crescimento microbiano.

Palavras-chave: implantes, enxertos, biomateriais, meios de conservação, ensaios mecânicos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the mechanical strength of bone plates yielded from bovine cortical bone, conserved in different solutions, and the efficiency of these solutions in the inhibition of microorganism's growth. 168 plates yielded from bovine tibiae were conserved in 98% glycerin (n=28), 150% saline solution (n=28), 300% sugar solution (n=28), Dakin solution (n=28), frozen in LN₂ at -196°C (n=28), or sterilized in ethylene oxide gas (n=28). After rehydrated in NaCl 0.9% solution for six hours, plates were subjected to tensile, compression, bending and twisting testing. Bone plates microbiological evaluation was carried out before and immediately after rehydration, with or without enrofloxacin 0.5% addition. There was no significant difference (P<0.01) on resistance to the rupture point in plates conserved in the different solutions, frozen-thawed or sterilized. Microorganisms were isolated from plates conserved in saturated salt solution, sugar saturated solution, Dakin solution or frozen in LN₂, before and after rehydration. However, after the use of NaCl 0.9% solution added enrofloxacin 0.5%, microorganisms were not isolated. Therefore, bovine bone plates conserved in sugar or salt saturated solution, 98% glycerin, Dakin solution, frozen in LN₂ or sterilized in ethylene oxide gas present similar biomechanical tests results, and NaCl 0.9% solution added enrofloxacin 0.5% rehydration inhibits microbial growth.

Keywords: implants, grafts, biomaterials, conservation solutions, mechanical testing.

INTRODUÇÃO

A busca por biomateriais alternativos ao metal para confeccionar implantes cirúrgicos, como os polímeros biodegradáveis, a cerâmica e os derivados do óleo da mamona, vem ocorrendo devido alguns metais utilizados na confecção de próteses ortopédicas causarem problemas de biocompatibilidade, osteointegração e possuírem módulo de elasticidade acima do ideal (FISCHER-BRANDIES et al., 1992). Assim, o emprego de materiais produzidos a partir de osso bovino tem sido proposto na confecção de implantes como pinos, placas e parafusos, por poderem promover as mesmas funções de um enxerto ósseo, ou seja, serem osteoindutores e osteocondutores (STEVENSON, 1998).

Para a conservação destes biomateriais tem sido utilizado diversas substâncias, que de acordo com MOTA et al. (2002), devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de micro-organismos, além de preservar, ao máximo, a integridade celular e aumentar a resistência dos tecidos à tração.

Objetivou-se com esse estudo avaliar a resistência mecânica ao ponto de ruptura de placas produzidas a partir osso cortical bovino, conservadas em glicerina a 98%, solução salina a 150%; solução de açúcar a 300%, líquido de Dakin, nitrogênio líquido e esterilizadas em óxido de etileno, bem como a eficiência desses meios de conservação relacionados a inibição de micro-organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas para este estudo 168 placas, produzidas a partir de amostras de tíbias bovinas frescas, da porção médio-diafisária (sentido longitudinal), oriundas de abatedouro comercial, coletadas de forma não asséptica. O transporte das tíbias do local da coleta para o local de usinagem das placas foi realizado em sacos plásticos num intervalo de cerca de uma hora e o processo de produção das placas durou cerca de três horas, não havendo refrigeração do material nessas etapas. As placas foram padronizadas com as seguintes dimensões: $6,0 \pm 0,4$ cm de comprimento, $0,6 \pm 0,1$ cm de largura e $0,3 \pm 0,1$ cm de espessura (Figura 1A). Após usinagem, foram higienizadas em uma cuba contendo solução de cloreto de sódio a 0,9% e distribuídas em seis grupos de igual número, onde foram conservadas, a

saber: 1) Grupo Sal (GS) (n=28) – em recipiente de vidro estéril contendo 600mL de solução saturada de sal comercial^(a), na proporção de 1,5g de sal para 1,0mL de água destilada; 2) Grupo Açúcar (GA) (n=28) – em recipiente de vidro estéril contendo 600mL de solução saturada de açúcar comercial^(b), na proporção de 3,0g de açúcar comercial para 1,0mL de água destilada; 3) Grupo Glicerina (GG) (n=28) – em recipiente de vidro estéril contendo 600mL de glicerina 98%^(c); 4) Grupo Dakin (GD) (n=28) – em recipiente de vidro estéril contendo 600mL de líquido de Dakin^(d); 5) Grupo Nitrogênio Líquido (GN) (n=28) – em botijão criogênico contendo nitrogênio líquido à -196°C; 6) Grupo Óxido de Etileno (GO) (n=28) – esterilizadas em óxido de etileno^(e) e conservadas em temperatura ambiente em embalagem asséptica.

Após o período de conservação de 45 dias, as placas foram submetidas a ensaios mecânicos destrutivos: tração, compressão, flexão e torção. Para cada um dos quatro tipos de ensaios mecânicos, utilizaram-se seis placas de osso bovino (corpos de prova) de cada grupo, previamente reidratadas por um período de seis horas em solução de cloreto de sódio a 0,9%, na proporção de 40mL de solução por placa. Anteriormente a cada ensaio, os corpos de prova foram mensurados em todas as suas dimensões com auxílio de um paquímetro digital.

Para os ensaios biomecânicos, utilizou-se uma máquina universal de ensaios^(f), eletromecânica, digital, com capacidade de 10T, com sistema computadorizado de aquisição, análise e saída de dados. Nos ensaios avaliou-se a força máxima ao ponto de ruptura, definida como a força necessária para romper totalmente o corpo de prova, expressa em Quilograma-força (kgf) ou um de seus múltiplos. A leitura dos valores das forças aplicadas foi realizada por meio do uso de célula de carga e a determinação das deformações realizada pelo deslocamento das barras do equipamento, as quais foram conectadas por um sistema de aquisição de dados controlados por computador, o qual permitiu o controle automatizado do sistema responsável pela coleta de dados e derivação das propriedades.

Para os ensaios de tração, utilizou-se uma célula de carga de 10T a uma velocidade constante de 1mm/min. Os corpos de prova foram usinados seguindo um padrão normatizado para este tipo de ensaio (Figura 1B). As extremidades dos corpos de prova foram fixadas às garras do equipamento no sentido longitudinal (Figura 1C). Os ensaios de compressão foram realizados com uma célula de carga de 10T e uma velocidade de 0,5mm/min. Os corpos de prova foram serrados tendo seu comprimento reduzido para $2,0 \pm 0,2$ cm. As barras de compressão do

equipamento foram alinhadas para impor carregamento uniaxial na tentativa de eliminar os riscos de flambagem (Figura 1D). Os ensaios de flexão foram realizados em três pontos de apoio com uma célula de carga de 10T a uma velocidade de 0,5mm/min. Os corpos de prova foram colocados em plano horizontal, sendo apoiados em dois pontos sobre um suporte de ferro acoplado a barra inferior do equipamento. O terceiro ponto foi fixado à barra superior do equipamento (Figura 1E). O ensaio de torção foi realizado com auxílio de um suporte de madeira preso a barra inferior da máquina. Este suporte era constituído por dois pontos de fixação para encaixe do corpo de prova horizontalmente, sendo um fixo e outro móvel. O móvel foi preso a uma polia, fixada por um barbante e preso a barra superior da máquina (Figura 1F). Ao movimentar a barra superior da máquina de forma ascendente, a polia girava, realizando a rotação no corpo de prova. Utilizou-se para isso uma célula de carga de 250kg e uma velocidade de 15mm/min.

Para a análise microbiológica qualitativa, duas placas ósseas foram removidas de cada meio conservante, de forma asséptica, no interior de capela de fluxo laminar. As placas foram lavadas, sucessivamente, com intervalos de 5 minutos, em três tubos tipo Falcon, estéreis, contendo 35mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a terceira lavagem, uma placa óssea foi colocada em um tubo de ensaio com tampa contendo tioglicolato, e outra em tubo de ensaio com tampa contendo BHI caldo (*Brain Heart Infusion* – Infusão de cérebro e coração). Foram realizadas leituras a cada seis horas durante 48 horas, para verificar a ausência ou presença de turvação dos meios de crescimento, correspondente a ausência ou presença de micro-organismos, respectivamente. Para análise microbiológica quantitativa, removeu-se, no interior da capela de fluxo laminar, duas placas ósseas de cada meio conservante, sendo, para cada grupo, uma acondicionada em recipiente individual de vidro, estéril, com tampa, contendo 100mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e a outra na mesma solução acrescida de antibiótico (enrofloxacina a 0,5%⁽⁹⁾) de igual volume, as quais haviam permanecido durante seis horas para reidratação. Após, 100 microlitros da solução utilizada para reidratação foram espalhados com auxílio de alças de Drigalsky em quatro placas de Petri, contendo: 1) BHI Ágar e cultivada em aerobiose em estufa a 37°C; 2) BHI Ágar e cultivada em anaerobiose em estufa a 37°C; 3) Ágar Sabouraud e cultivada a temperatura ambiente; 4) Ágar Sabouraud e cultivada em estufa a 37°C. Foram realizadas leituras a cada 24 horas; durante 48 horas nas placas de Petri contendo

BHI Ágar; e a cada 24 horas, durante 14 dias nas placas de Petri contendo Ágar Sabouraud.

Para a análise estatística, as variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Quando apresentaram significância no nível de 1%, foram realizados os testes de Duncan ou de Tuckey, conforme a instabilidade da variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se avaliar o ponto de ruptura óssea ao aplicar o ensaio de torção, não se observou diferença significativa ($P < 0,01$) entre os grupos (solução saturada de sal, solução saturada de açúcar, glicerina a 98%, líquido de Dakin, nitrogênio líquido e esterilização por óxido de etileno) (Tabela 1). Também não se encontrou, nos ossos conservados, nenhum tipo de microfissura, como o relatado por MELO et al. (1998), após conservarem osso de cão em glicerina a 98%, e por HAJE et al. (2007) após esterilização por óxido de etileno de parafusos de osso bovino. Este fato provavelmente ocorreu neste estudo devido à reidratação dos ossos antes da avaliação biomecânica, pois de acordo com SALBEGO & RAISER (2006), esse procedimento pode fazer com que ossos conservados voltem a apresentar características mecânicas semelhantes às de ossos frescos. Além disso, a padronização da coleta com relação à região óssea (porção médio-diafisária) contribuiu para diminuir as diferenças nos parâmetros ósseos, como o de cisalhamento. Já que segundo COWIN (1989), esse fator promove influência nos ensaios mecânicos, pois o osso é material visco elástico heterogêneo e anisotrópico.

Nos ensaios de compressão não foram encontradas diferença significativa entre os grupos ($P < 0,01$) (Tabela 1). Diferentemente do observado por VOLPON & COSTA (2000), que relataram maior resistência ao teste de compressão de osso córtico-esponjoso do homem esterilizados em óxido de etileno, quando comparado ao osso conservado sob congelamento em freezer a -14°C . Também DEL CARLO et al. (2007) relataram que ossos de cães conservados em glicerina apresentam menor resistência a compressão. Provavelmente a reidratação pelo tempo de seis horas antes do referido teste, em todos os grupos, tenha proporcionado aos ossos conservados em óxido de etileno e glicerina um aumento na resistência de compressão, tornando-os semelhantes estatisticamente aos demais grupos. Além

disso, o procedimento cauteloso no preparo dos corpos de prova, juntamente com o alinhamento das barras de compressão, como recomendado por GIBSON et al. (2008), nos momentos dos testes, aumentou a acurácia axial, pois contribuiu para uma distribuição homogênea da tensão.

Com relação ao ensaio de flexão, não se observou neste estudo diferença entre os grupos ($P < 0,01$) (Tabela 1), verificando assim grau de rigidez óssea semelhante após conservação nos meios estudados. Discordando dos achados de HOFMANN et al. (2003), os quais após estudarem pinos confeccionados a partir de ossos corticais de tíbias bovinas, e esterilizados com óxido de etileno, autoclavagem e radiação gama, verificaram que os tratados com óxido de etileno apresentaram diminuição no grau de rigidez. O resultado deste estudo ocorreu provavelmente pelo fato dos meios conservantes atuarem de forma similar nas propriedades mecânicas do osso, ou seja, na sua fase mineral, mas especificamente na água. Assim, supõe-se que a glicerina a 98%, a solução saturada de sal e açúcar, e a esterilização por óxido de etileno desidrataram o osso, promovendo um efeito protetor nas fibras ósseas. Em adição, o procedimento de se confeccionar o corpo de prova no sentido longitudinal, colaborou para se obter um resultado padronizado.

Nos ensaios de tração, não foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os tratamentos. Esse resultado discorda do relatado por SAMPAIO et al. (2009), que após avaliar a força de micro-tração de ossos corticais de coelhos, verificaram que ossos conservados em nitrogênio líquido e líquido de Dakin apresentaram-se superior neste teste com relação aos conservados em glicerina a 98%. Entretanto, neste estudo os ossos foram hidratados, diferentemente do estudo de SAMPAIO et al. (2009), o que justificou os resultados encontrados, pois de acordo com CURREY (1988), a reidratação dos ossos restaura o módulo de elasticidade destes.

Na avaliação microbiológica, verificou-se a presença de *Staphylococcus sp* nas placas ósseas conservadas em solução saturada de sal (GS) anteriormente e após a reidratação em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Entretanto, após reidratar as mesmas com solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de antibiótico enrofloxacina a 0,5%, não se verificou a presença desses micro-organismos. Concordando com o descrito por FREITAS (2006), que não observou sinal de bactérias ou infecção após enxertar peritônio bovino conservado em solução saturada de sal e reidratado em solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de

enrofloxacin, em tendão calcâneo de coelhos. A presença de bactérias encontrada nas placas conservadas em solução de sal provavelmente foi decorrente da contaminação do osso durante a coleta e principalmente a usinagem.

Na avaliação microbiológica das placas conservadas em açúcar a 300% (GA), encontrou-se presença de fungo anterior e após a reidratação com solução de cloreto de sódio. Entretanto, após a reidratação com solução acrescida de antibiótico, não foram observados mais esses micro-organismos. Segundo PRATA et al. (2001), essa solução promove o aumento da pressão osmótica do meio, criando condições desfavoráveis à reprodução e crescimento de várias bactérias, fungos e leveduras. A presença de fungo nas placas deste estudo possivelmente foi decorrente do excesso de manuseio aplicado sobre elas, anteriormente a sua colocação no meio conservante.

Com relação às placas ósseas conservadas em glicerina (GG), observou-se presença de *Bacillus spp* e *Coccus spp* antes da reidratação. Concordando com o relatado por RANDI et al. (2002), que descreveram que a glicerina apresenta propriedade antisséptica, atuando como bactericida e fungicida, exceto contra formas esporuladas. Entretanto, após a reidratação das placas sem antibiótico e com antibiótico, não se notou a presença destes micro-organismos. Isto se deveu provavelmente ao uso da solução de cloreto de sódio a 0,9%, que promoveu a diluição da amostra retirada do meio conservante, juntamente com a baixa quantidade deste micro-organismo no meio. Pois de acordo com AMENDOLA (2007), a glicerina diminui de forma significativa a quantidade de micro-organismos em amostras contaminadas.

As placas ósseas do grupo Dakin (GD) apresentaram presença de *Staphylococcus sp.* antes e após a reidratação com solução de cloreto de sódio a 0,9% sem antibiótico, mas não observou-se micro-organismos naquelas reidratadas com a mesma solução acrescida de enrofloxacin. O crescimento desse micro-organismo deveu-se ao fato dos ossos terem sido conservados no Dakin em temperatura ambiente. Pois de acordo com CUNNINGHAM et al. (1980) e PÉCORA et al. (1987), a solução de Dakin é bactericida, porém sua meia-vida é curta, quando a mesma é aquecida a 37°C ou armazenada em temperatura ambiente, devido ao fato de ocorrer diminuição da concentração de cloro no produto.

Não observou-se presença de micro-organismos nas placas ósseas conservadas em nitrogênio líquido (GN) e reidratadas com solução de cloreto de

sódio 0,9 acrescida de enrofloxacina. Porém observou-se presença de *Staphylococcus sp.* antes e após a reidratação sem antibiótico, concordando com os achados de SOUZA et al. (2006), ao avaliarem microbiologicamente sêmen de caprinos criopreservados em nitrogênio líquido, os quais verificaram que pós-descongelamento, a bactéria do gênero *Staphylococcus spp* estava presente na maioria das amostras. Isto provavelmente deveu-se ao fato da coleta e usinagem das placas ósseas terem sido realizadas de forma não asséptica, e o nitrogênio líquido não ter sido eficiente como meio bactericida.

As análises microbiológicas antes e após a reidratação dos ossos conservados esterilizados em óxido de etileno (GO), não revelaram a presença de micro-organismos. Este resultado deveu-se a eficiência do processo de esterilização por este agente, pois de acordo com POSSARI (2003), o óxido de etileno causa alquilação de compostos no interior dos micro-organismos, principalmente a guanina e a adenina presente no DNA.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que: ossos de bovinos conservados nos meios de solução saturada de açúcar e sal, glicerina a 98%, óxido de etileno, Dakin e nitrogênio líquido, após reidratação em solução de cloreto de sódio a 0,9% por seis horas, assemelham-se em relação à biomecânica; e a reidratação com solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de enrofloxacina a 0,5% é eficaz no controle de micro-organismos.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- (a) Sal Cisne, Refinaria Nacional de Sal S.A. Cabo Frio, RJ.
- (b) Açúcar Refinado União, Usina União e Indústria S.A. Recife, PE.
- (c) Glicerina, Labsynth Produtos Químicos para Laboratório LTDA. Diadema, SP.
- (d) Líquido de Dakin, Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA. Ibiporã, PR.
- (e) Acecil Vet Esterilização de Produtos Veterinários LTDA. Campinas, SP.
- (f) Máquina Universal de Ensaio - Contenco Indústria e Comércio LTDA. Belo Horizonte, MG.
- (g) Baytril 10%, Bayer. São Paulo, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENDOLA, G. F. Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel. 2007. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

COWIN, S. C. "The mechanical properties of cortical bone tissue". *In: Bone Mechanics*, Boca Raton, CRC Press, 1989. p. 97-127.

CUNNINGHAM, W. T.; et al. 5W. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 50, n, 6, p. 569-71, 1980. doi:10.1016/0030-4220(80)90443-0.

CURREY, J. D. The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. **Journal of biomechanics**, Great Britain, v. 21, n.5, p. 439-441, 1988.

DEL CARLO, R. J.; et al. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não à células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, p. 204-215, 2007. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/revista/volumes/vol14_n2/Revista%20v14n02_2007_66_77.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2010.

FISCHER-BRANDIES, E.; et al. Zum Nacheis von Titan im Organismus bei temporärer Alloplastik. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 47, p. 526-528, 1992.

FREITAS, P. M. C. **Eletroacupuntura no reparo do tendão calcâneo comum em coelhos após enxertia com peritônio bovino**. 2006. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GIBSON, T. W. G.; et al. The biomechanical properties of the feline femur. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 21, p. 1-6, 2008. Disponível em: <<http://www.schattauer.de/en/magazine/subject-areas/journals-a-z/vcot/contents/archive/issue/132/manuscript/9487.html>> Acesso em: 21 mar. 2010. doi: 10.3415/VCOT-07-08-0077.

HAJE, D. P.; et al. Efeitos do processamento químico, da esterilização em óxido de etileno e da usinagem em parafusos de osso bovino: estudo com microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42(4), p. 120-4, 2007. Disponível em: <http://www.rbo.org.br/pdf/abr_2007_06.pdf>. Acesso em: 24 fev.

2010.

HOFMANN, C.; SCHADEL-HOPFNER, M.; BERNS, T.; SITTER, H.; GOTZEN, L. Influence of processing and sterilization on the mechanical properties of pins made from bovine cortical bone. **Der Unfallchirurg**, v. 6, n. 106, p. 478-82, 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/xcmb84x6rh4ymgvm/>>. Acesso em: 13 fev. 2010. doi: 10.1007/s00113-003-0611-z.

MELO, E. G.; et al. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tíbia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 385-394, 1998.

MOTA, F. C. D.; et al. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 13-17, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962002000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 fev. 2010. doi: 10.1590/S1413-95962002000100002.

PRATA, L. F; FUKUDA, R, T. **Fundamentos de higiene e inspeção de carnes**. Jaboticabal: Funep. 2001, 349p.

PÉCORA, J. D.; et al. Estudo sobre o "shelf-life" da solução de Dakin. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 4-7, 1987. Disponível em: <<http://www.forp.usp.br/restauradora/Trabalhos/shelf.html>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

POSSARI, J. F. **Esterilização por óxido de etileno**. 1ª Ed. São Paulo: Iátria, 2003. 136p.

RANDI, F. E.; BRACCIALLI, C. S.; SILVEIRA P. R. Aplicabilidade e métodos de conservação de próteses biológicas. **Unimar Ciências**, v. 11, n. 1-2, p. 39-44, 2002.

SALBEGO, F. Z. RAISER, A. G. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. *In*: Congresso do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 7., 2006, Santos, SP. **Anais...** Belo Horizonte: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, supl., p. 77-78, 2006.

SAMPAIO, R. S.; et al. Variação da força de resistência à micro-tração de fragmentos de ossos corticais preservados em diversos meios e a fresco: estudo experimental em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 345-352, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

736X2009000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 fev. 2010. doi: 10.1590/S0100-736X2009000400012.

SOUZA, A. F.; et al . Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, 2006. Disponível em: <http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962006000300006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 07 Abr 2010.

STEVENSON, S. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap. 127, p. 1014–1030.

VOLPON, J. B.; DA COSTA, R. M. P. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 35, p. 219-224, 2000. Disponível em: <http://www.rbo.org.br/pdf/2000_jun_or09.pdf> Acesso em: 24 fev. 2010.

Tabela 1 - Valores médios (kgf/cm^2) e desvios padrão de ossos bovinos conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção.

	TRAÇÃO	COMPRESSÃO	FLEXÃO	TORÇÃO
GS	1047,3 \pm 201,9 ^a	899,9 \pm 137,3 ^b	2125,5 \pm 224,8 ^c	875,4 \pm 114,1 ^d
GA	1304,7 \pm 158,8 ^a	954,4 \pm 127,7 ^b	2227,8 \pm 202,0 ^c	979,7 \pm 148,8 ^d
GG	1131,6 \pm 210,2 ^a	1025,3 \pm 169,5 ^b	2142,1 \pm 216,8 ^c	819,3 \pm 145,8 ^d
GD	1062,0 \pm 368,5 ^a	848,9 \pm 161,2 ^b	1916,4 \pm 143,5 ^c	891,4 \pm 37,6 ^d
GN	1144,8 \pm 65,4 ^a	836,4 \pm 102,1 ^b	2033,1 \pm 154,2 ^c	899,2 \pm 88,5 ^d
GO	926,2 \pm 170,0 ^a	846,8 \pm 121,5 ^b	1940,1 \pm 171,0 ^c	839,9 \pm 154,1 ^d

Médias e desvio padrão seguidos de letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ($P < 0,01$).

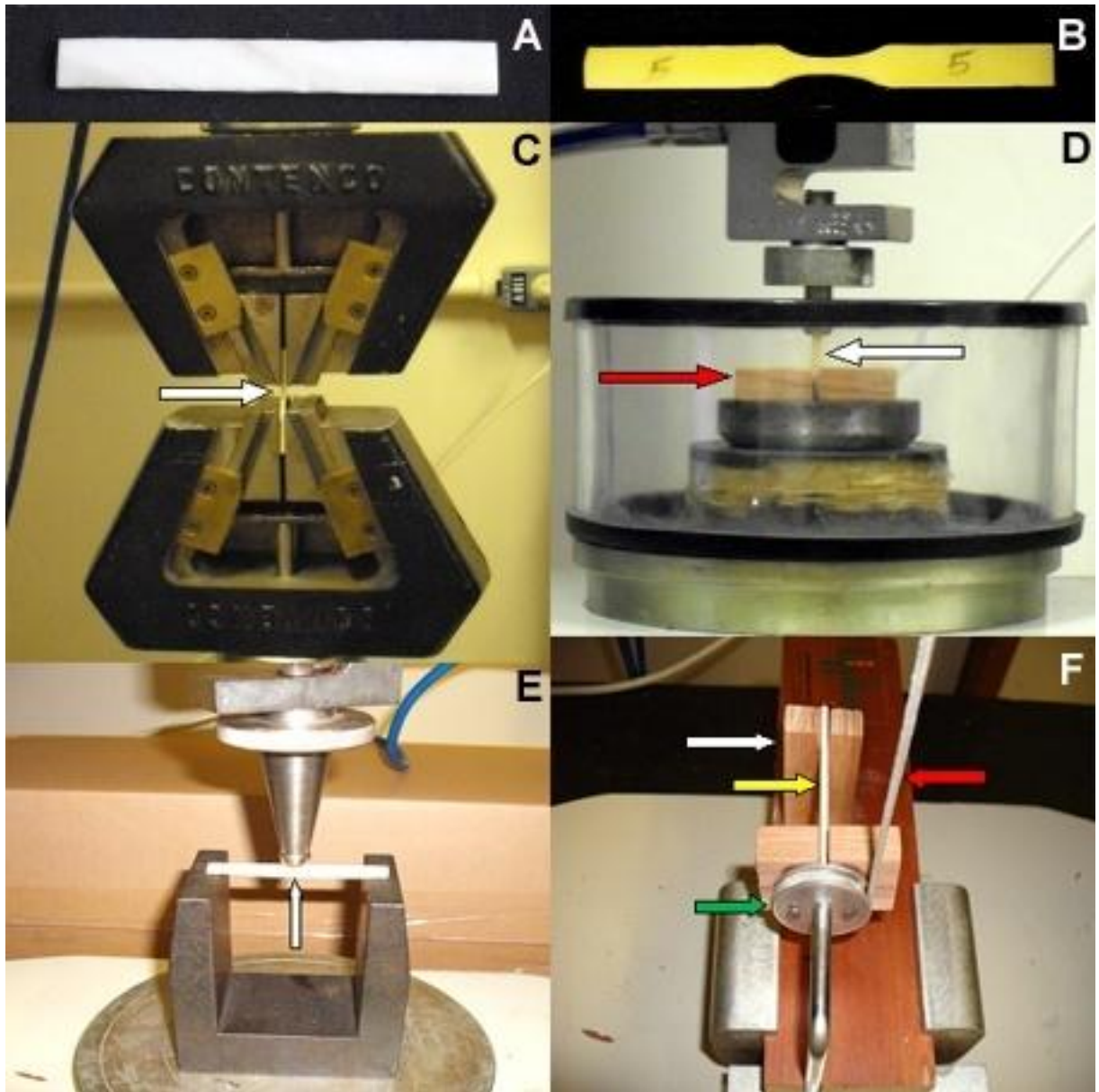


Figura 1 - Placas ósseas bovina e máquina universal de ensaios utilizados para a realização dos ensaios mecânicos destrutivos. A) Placa de osso bovino; B) Placa de osso usinada para o ensaio de tração; C) Corpo de prova (seta) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de tração; D) Corpo de prova (seta branca) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de compressão. Observa-se o suporte de madeira (seta vermelha) próximo a placa; E) Corpo de prova (seta) posicionado para ser submetido ao ensaio de flexão em três pontos; F) Corpo de prova (seta amarela) acoplado a um suporte de madeira (seta branca), preso a uma polia (seta verde) tracionada verticalmente por um barbante (seta vermelha) fixado a barra superior da máquina de ensaios para o ensaio de torção.

3. CONCLUSÕES GERAIS

1. Placas confeccionadas a partir de osso cortical de tíbia bovina e conservadas por um período mínimo de quarenta e cinco dias em: solução salina a 150%, solução de açúcar a 300%, glicerina a 98%, líquido de Dakin, nitrogênio líquido e esterilizadas em óxido de etileno possuem a mesma resistência ao ponto de ruptura quando reidratadas em solução de cloreto de sódio a 0,9% por seis horas;
2. O óxido de etileno é o meio mais efetivo para esterilização das placas ósseas;
3. As placas ósseas reidratadas em solução de cloreto de sódio a 0,9% após conservação em glicerina a 98%, não apresentam crescimento de bactérias ou fungos;
4. A reidratação em solução contendo enrofloxacina a 0,5% elimina os microorganismos presentes nas placas conservadas em solução salina a 150%, açúcar 300%, Dakin e nitrogênio líquido.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, J. J.; HAYT, M. W.; ROCK, R. Sinus lift procedure os the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. **American Journal Roentgenology**, v. 174, p. 1289-1292, 2000.

AGINS, H. J.; ALCOCK, N. W.; BANSAL, M.; SALVATI, E. A.; WILSON, P. D.; PELLICCI, P. M.; BULLOUGH, P. G. Metallic wear in failed titanium alloy total hip replacements: A histological and quantative analysis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 70, p. 347-56, 1988.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R.; BAPTISTA, L. C.; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNESP - Universidade Estadual Paulista, cap. 2, p. 33-42, 1992.

AMENDOLA, G. F. **Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel**. 2007. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

ASHMAN, R. B. Experimental techniques. In: COWIN, S. C. **Bone Mechanics**. Florida: CRC - Boca Raton, 1989, p. 75–96.

BENTO, D. B. **Análise de resistência mecânica em implantes de osso - um enfoque numérico e experimental**. 2003. 173f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina-SC.

BÖSTMAN, O. Absorbable implants for the fixation of fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.73, n.1, p.148-153, 1991.

BRASIL, F. B. J. **Desenvolvimento e emprego de placa tubular com garras em fraturas de rádio e ulna de cães miniatura**. 2004. Tese (Doutorado) - Faculdade

de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L.; DREIMEIER, D. CONTESINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S. T. L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos wistar. **Ciência Rural**, v. 32, p. 1019-1025, 2002.

BRUNSKI, J. B., PUELO, P. A., NANCY, A. Biomaterials and Biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, p. 15-46, 2000.

BURCHARDT, H.; JONES, H.; GLOWCSEWSKIE, F.; RUDNER, C.; ENNEKING, W. F. Freeze-dried allogeneic segmental cortical-bone grafts in dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 60, n. 8, p. 1082-1090, 1978.

BURSTEIN, A. H.; CURREY, J.; FRANKEL, V. H.; HEIPLE, K. G.; LUNSETH, P.; VESSELY, J. C. The effect of screw holes. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 54, p. 1143-1156, 1972.

CAMARGO, O. P. MARTINS, P.; ANDRADE, R. M.; DURAN, C. E. P.; CROCI, A. T.; LEIVAS, T. P.; PEREIRA, C. A. M.; BOLLIGER NETO, R. Análise comparativa da resistência de fêmures de cães após a confecção de janelas ósseas circular e quadrada. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 41-7, 2002.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; PADILHA FILHO, J. G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%: estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, 2001.

CENTERO NETO, A. A.; PAES, J. L. L.; CARVALHO, R. G.; PANTOJA, A.; HOMOBONO, I. R.; COUTO JÚNIOR, P. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *Escherichia coli*. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.24, n.3, p.151-154, 1997.

CONRAD, E. U.; ERICKSEN, D. P.; TENSER, A. F.; STRONG, D. M.; MACKENZIE, A. P. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 290, p. 279-284, 1993.

CORNU, O.; BAVADEKAR, A.; GODTS, B.; VAN TOMME, J.; DELLOYE, C.; BANSE, X. Impaction bone grafting with freeze-dried irradiated bone. Part II. Changes in stiffness and compactness of morselized grafts: Experiments in cadavers. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 553-8, 2003.

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, 1999.

COSTA, J. L. O. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placa e parafusos de aço inoxidável da série 304. Estudo experimental em cães (*Canis familiaris*)**. 1996. 100f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

COWIN, S. C. **Bone Mechanics Handbook**, 2. ed. Boca Raton, 2001.

COWIN, S. C. The mechanical properties of cortical bone tissue. In: **Bone Mechanics**, Boca Raton, CRC Press, 1989. p. 97-127.

CUNNINGHAM, W. T.; JOSEPH, S. W. 5W. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 50, n. 6, p. 569-71. Dec. 1980.

CURREY, J. D. The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. **Journal of Biomechanics**, Great Britain, v. 21, n.5, p. 439-441, 1988.

DAKIN, H. D. On the use certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. **British Medical Journal**, v. 28, n. 2, p. 318-20, 1915.

DAVIS, H. E.; TROXELL, G. E.; HAUCK, G. F. The Testing of Engineering Materials. 4 ed. McGraw-Hill College. New York, 1982, 478p.

DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R.; VILORIA, M. I. V.; SOUZA, T. D.; MAIA FILHO, A. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 121-26, 1999.

DEL CARLO, R. J.; PINHEIRO, L. C. P.; MONTEIRO, B. S.; SILVA, P. S. A.; VIANA, V. W. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não à células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, p.204-215, 2007.

DHILLON, M. S.; PRABHAKAR, S.; PRASANNA, C. Preliminary experience with biodegradable implants for fracture fixation. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 42, p. 319-22, 2008.

DINGEE, F. **Análise da influência dos tratamentos de Liofilização, esterilização e rehidratação nas propriedades mecânicas do osso cortical bovino**. 2005. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Materiais) - Curso de Graduação em Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

EVANS, F. G. Mechanical properties and histology of cortical bone from younger and older men. **Anatomical Record**, v. 185: p. 1-12, 1976.

FEHLBERG, A. F. **Hidroxiapatita sintética na regeneração da falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea em cães**. 2001. 42f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FISCHER-BRANDIES, E.; ZEINTL, W.; SCHRAMEL, P.; BENNER, K. U. Zum Nacheis von Titan im Organismus bei temporärer Alloplastik. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 47, p. 526-528, 1992.

FOSSUM, T. W. Cirurgia de Pequenos Animais. Roca: São Paulo, 2002, p. 892-917.

FREITAS, P. M. C. **Eletroacupuntura no reparo do tendão calcâneo comum em coelhos após enxertia com peritônio bovino**. 2006. 92f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GAIGA, L. H. **Osteossíntese de úmero por xenoenxerto ósseo preservado em glicerina a 98% ou mel em pombos domésticos (*Columba livia*)**. 2002. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

GIBSON, T. W. G.; MOENS, N. M. M.; RUNCIMAN, R. J.; HOLMBERG, D. L.; MONTEITH, G. M. The biomechanical properties of the feline femur. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 21, p. 1-6, 2008.

GIOSSO, M. A.; BENITES, N. R.; KAMPF, G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 17, n. 4, p. 242-246, 2002.

GREENE N. D. "Corrosion of surgical implant alloys: a few basic ideas". In: FRAKER A. C.; GRIFFIN C. D.: Corrosion and degradation of implant materials: Second Symposium, Philadelphia, **American Society for Testing Materials**, p. 5-10, 1985.

HAJE, D. P.; THOMAZINI, J. A.; VOLPON, J. B. Efeitos do processamento químico, da esterilização em óxido de etileno e da usinagem em parafusos de osso bovino: estudo com microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 4, p. 120-4, 2007.

HAJE, D. P.; VOLPON, J. B. Desenvolvimento de parafusos de osso bovino: método de usinagem e estudo metrológico com projetor de perfil. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 87-91, 2006.

HOFMANN, C.; SCHADEL-HOPFNER, M.; BERNS, T.; SITTER, H.; GOTZEN, L. Influence of processing and sterilization on the mechanical properties of pins made from bovine cortical bone. **Der Unfallchirurg**, v. 6, n. 106, p. 478-82, 2003.

HOU, C. H.; YANG, R. S; HOU, S. M. Hospital-based allogenic bone bank-10-year experience. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 41-5, 2005.

HOVIS, W. D.; BUCHOLZ, R. W. Polyglycolide bioabsorbable screws in the treatment of ankle fractures. **Foot & Ankle International**, v.18, n.3, p.128-131, 1997.

HUISKES, R., CHAO, E. Y. S. A survey of finite element analysis in orthopedic biomechanics: the first decade. **Journal of Biomechanics**, p. 385-409, 1983.

HULSE, D.; HYMAN, B. Biologia e biomecânica das fraturas. In:_____. SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998, v. 2, cap. 120, p. 1893-1984.

JOHNSON, A. L.; STEIN, L. E. Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 101-5, 1988.

KIM, Y. K.; YEO, H. H.; LIM, S. C. Tissue response to titanium plates: A transmitted electron microscopic study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, p. 322-6, 1997.

KLEINER, J. A.; SILVA, E. G. Tumores ósseos em pequenos animais. **Revista Medvep**, v. 1, p. 21-33, 2003.

KRAUSPENHAR, L. C. **Viabilidade Bacteriana no Meio de Conservação Glicerina 98% do tendão Calcâneo Comum**. 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

KOMANDER, A. Influence of preservation on some mechanical properties of human haversian bone. **Materia Medica Polona**, v. 8, p. 13, 1976.

LIU, Y.; WANG, M. Developing a composite material for bone tissue repair. **Current Applied Physics**, v. 7, n. 5, p. 547-554, 2007.

MACEDO, C. A. S.; GALIA, C. R.; SILVA, A. L. B.; CÉSAR, P. C.; SANCHES, P. R. S.; DUARTE, L. S.; MULLER, L. M. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 4, n. 9/10, 1999.

MANKIN, H. J.; HORNICEK, F. J.; RASKIN, K. A. Infection in massive bone allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 432, p. 210-6, 2005.

MALININ, T.; LATTA, L.; MILNE, E.; SAITOH, S.; WINTER, R.; FLORES, A.; BUCK, B. Effects of Freeze-drying on the Femoral Strength and Notch Sensitivity of Human Femoral Diaphysis. **Orthopaedic Research Society**, 35th Annual Meeting, Las Vegas, Nevada, 6-9 Feb, 1989.

MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.29, n.5, p.1207-1218, 1999.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; SILVA, A. F.; FARIA, R. X.; ALVES, A. S.; GONÇALVES, G. F.; STEDILE, R.; BRAGA, F. A. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para reparação de grande defeito no diafragma de cão. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 277-283, 2001.

MAZZANTI, A.; RAISER, A. G.; PIPPI, N. L.; ALVES, A. S.; FARIA, R. X.; ALIEVI, M. M.; BRAGA, F. A.; SALBEGO, F. Z. Hernioplastia diafragmática em cão com pericárdio bovino conservado em solução supersaturada de açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 677-684, 2003.

MEARS, D. C. The tissues of the musculoskeletal system; In: **Materials and orthopaedic surgery**, Baltimore, Williams & Wilkins, 1979, p. 762.

MELO E. G.; REZENDE C. M. F.; BORGES A. P. B.; NOBREGA P. I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 385-394, 1998.

MONCHAU, F.; LEFÈVRE, A.; DESCAMPS, M.; BELQUIN-MYRDYCZ, A.; LAFFARGUE, P.; HILDEBRAND, H. F. *In vitro* studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, calcium carbonate. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 26, p. 143-152, 2002.

MORA, F. R. **Fabricação de Implantes Ortopédicos a Partir de Usinagem de Osso Humano**, 2000. 249f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MORAES, P. C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

MOREAU, F. M.; GALLOIS, Y.; BASLÉ, M. F.; CHAPPARD, D. Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v. 21, p. 369-76, 2000.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; BELLETTI, M. E. FREITAS, P. M. C.; MASTRANTONIO, E. C.; SHIMIZU, B. J.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 13-17, 2002.

OLIVEIRA, P. M. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de matriz polimérica de PHB reforçados com HAP-91[®]**. 2005. 148f. Dissertação (Mestrado

em Engenharia de materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

PADILHA FILHO, J. G.; EIMANTAS, G. C.; DE SOUZA, S. F. Osteossíntese femoral distal em cães e gatos jovens com fíbula de cão conservada em glicerina a 98%. **Veterinária Notícias**, v. 14, n. 1, p. 49-55, 2008a.

PADILHA FILHO, J. G.; PENHA, L. H. C.; SOUZA, S. F. Uso do enxerto ósseo cortical bovino conservado em glicerina a 98% na osteotomia femoral em gatos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1071-1078, 2008b.

PÉCORA, J. D.; MURGEL, C. A. F.; SAVIOLI, R. N.; COSTA, W. F.; VANSAN, L. P. Estudo sobre o "shelf-life" da solução de Dakin. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 4-7, 1987.

PELKER, R. R.; FRIEDLAENDER, G. E.; MARLHAM, T. C.; PANJABI, M. M.; MOEN, C. J. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 1, n. 4, p. 405-11, 1984.

PELKER, R. R.; MARKHAM, T.; FRIEDLANDER, G. E.; MOEN, C.; PANJABI, M. The effects of preservation on allograft strength. *Transactions Orthopaedic Research Society*, n. 7, p. 283-289, 1982.

PEREIRA, A. P. M.; GONDIM, D. G. A.; GOMES JÚNIOR, E. C.; FREIRE FILHO, F. W. V. Remoção de miniplacas e parafusos na região buco-maxilo-facial: revisão de literatura. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 5, n. 3, p. 17-26, 2005.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais**. 3 ed. Manole: São Paulo, 1999, p. 301-321.

PIETRZAK, W. S.; SARVER, D.; VERSTYNNEN, M. Bioresorbable implants – practical considerations. **Bone**, v. 19, suppl. 1, p. 109S-119S, 1996.

PIGOSSI, N. **Glicerina na conservação de duramáter. Estudo experimental.** 1967. 83f. Tese (Livre docência em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental em cães.** 1964. 37f. Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

PINTO JÚNIOR, H. S.; ALVARENGA, J.; IWASAKI, M. Banco de ossos: coleta, preservação e implante em cães. **A Hora Veterinária**, v. 15, p. 33-37, 1995.

POSSARI, J. F. **Esterilização por óxido de etileno.** 1ª Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2003.

PRENDERGAST, P. J. Finite element models in tissue mechanics and orthopedic implant design. **Clinical Biomechanics**, p. 343-366, 1997.

PRATA, L. F; FUKUDA, R, T. **Fundamentos de higiene e inspeção de carnes.** Jaboticabal, UNESP. 2001, 326p.

RAGHOEBAR, G. M.; SCHORTINGVIS, J.; LIEM, R. S.; RUBEN, J. L.; VAN DER WAL, J. E. VISSINK, A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, p. 349-356, 2005.

RANDI, F. E.; BRACCIALLI, C. S.; SILVEIRA P. R. Aplicabilidade e métodos de conservação de próteses biológicas. **Unimar Ciências**, v. 11, n. 1-2, p. 39-44, 2002.

RAPPETI, J. C. S.; **Homoimplante de costela conservada em solução supersaturada de açúcar a 300% ou em açúcar in natura na reconstituição experimental de costelas em gatos (*felis catus*).** 2006. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS.

RASSE, M.; MOSER, D.; ZAHL, C.; GERLACH, K. L.; ECKELT, U.; LOUKOTA, R. Resorbable poly (D,L) lactide plates and screws for osteosynthesis of condylar neck fractures in sheep. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, p. 35-40, 2007.

REILLY, D. T.; BURSTEIN, A. H. The mechanical properties of cortical bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 56, p. 1001-1022, 1974.

REILLY, D. T.; BURSTEIN, A. H. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. **Journal of Biomechanics**, v. 8, p. 393-405, 1975.

RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, K.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, p. 92-102, 1998.

RODRIGUEZ, A. I. R. **Avaliação da reconstituição óssea do radio de cadelas submetidas ou não a ovariosalpingohisterectomia, utilizando hidroxiapatita com alandronato e hidroxiapatita com colágeno (avaliações densitométricas e radiográficas)**. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite boné graft substitutes *in vivo*. **Folia Morphologica**, v. 65, n. 1, p 43-48, 2006.

SALBEGO, F. Z. RAISER, A. G. Teste de resistência biomecânica de implantes ósseos corticais conservados em glicerina a 98% e submetidos a diferentes tempos de reidratação. In: Congresso do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 7., 2006, Santos, SP. **Anais...** Belo Horizonte: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 58, supl., p. 77-78, 2006.

SAMPAIO, R. S.; LACERDA, M. S.; OLIVEIRA, P. C. L.; PANETO, J. C. C.; BITTAR, E. R.; BORGES, G. A.; CAMACHO, G. M. M.; BRAGA, E. M. Variação da força de resistência à microtração de fragmentos de ossos corticais preservados em diversos

meios e a fresco: estudo experimental em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 345-352, 2009.

SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, L. C.; RIGO, E. C.; CARRODEGUAS, R. G.; BOSCHI, A. O.; DE ARRUDA, A. C. Influence of polymeric additives on the mechanical properties of α -tricalcium phosphate cement. **Bone**, v. 25, n. 2, p. 99-102, 1999.

SARGEANT, A.; GOSWAMI, T. Hip Implants-Paper VI-Ion concentrations. **Material and Design**, v. 28, p. 155-171, 2007.

SCHAFER, T.; EVERETT, J.; SILVER, G.; CAME, P. Biohazard: Virus-contaminated liquid nitrogen. **Science**, v. 191, p. 24-26. 1976.

SEDLIN, E. D.; HIRSCH, C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 37, p. 29-48, 1966.

SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; COLETO, Z. F.; MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G.; LEÃO, A. E. D. S.; SOBRINHO, E. S. N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, 2006.

SOUZA, S. A. **Ensaio mecânicos de materiais metálicos**. São Paulo: Edgar Blücher, 1974. 235p.

STEVENSON, S. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. cap. 127, p. 1014-1030.

UHTHOFF, H. K.; FINNEGAN, M. The effects of metal plates on post-traumatic remodeling and bone mass. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, p. 66-71, 1983.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, n. 3698, v.150, p.893-899, 1965.

VOLPON, J. B.; DA COSTA, R. M. P. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 35, p. 219-224, 2000.

WEIGEL, P. J. Bone grafting. In: BOJRAB, J. M. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. cap. 98. p. 678-85.

WEILER, A.; HOFFMAN, R. F. G.; STÄHELIN, A. C.; HELLING, A. J.; SÜDKAMP, N. S. Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Surgery**, v. 16, n. 3, p 305-321, 2000.

WOOD, M. B.; BISHOP, A. T. Massive bone defects of the upper limb: reconstruction by vascularized bone transfer. **Hand Clinics**, v.23, n.1, p. 49-56, 2007.

ANEXOS I – Lista de figuras

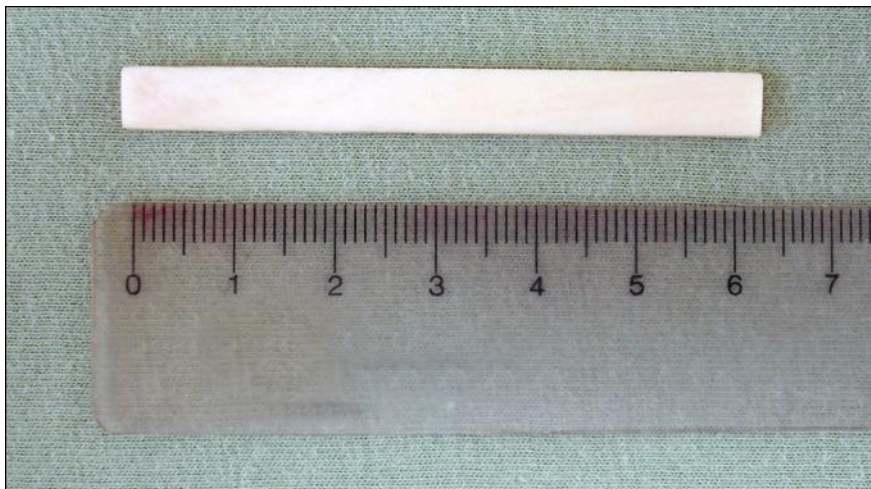


Figura 1 - Placa confeccionada a partir de osso cortical bovino.

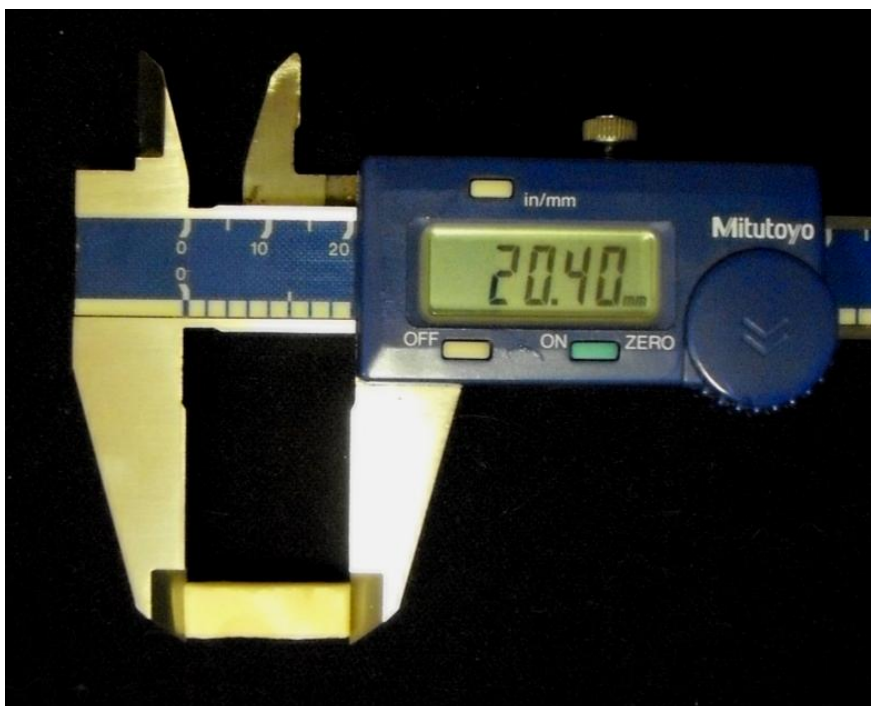


Figura 2 - Corpo de prova sendo mensurado com auxílio de um paquímetro digital antes do ensaio mecânico.

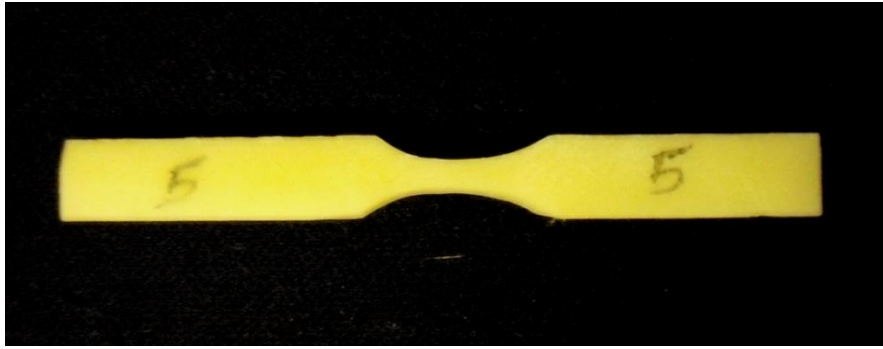


Figura 3 - Placa de osso usinada para teste de tração.

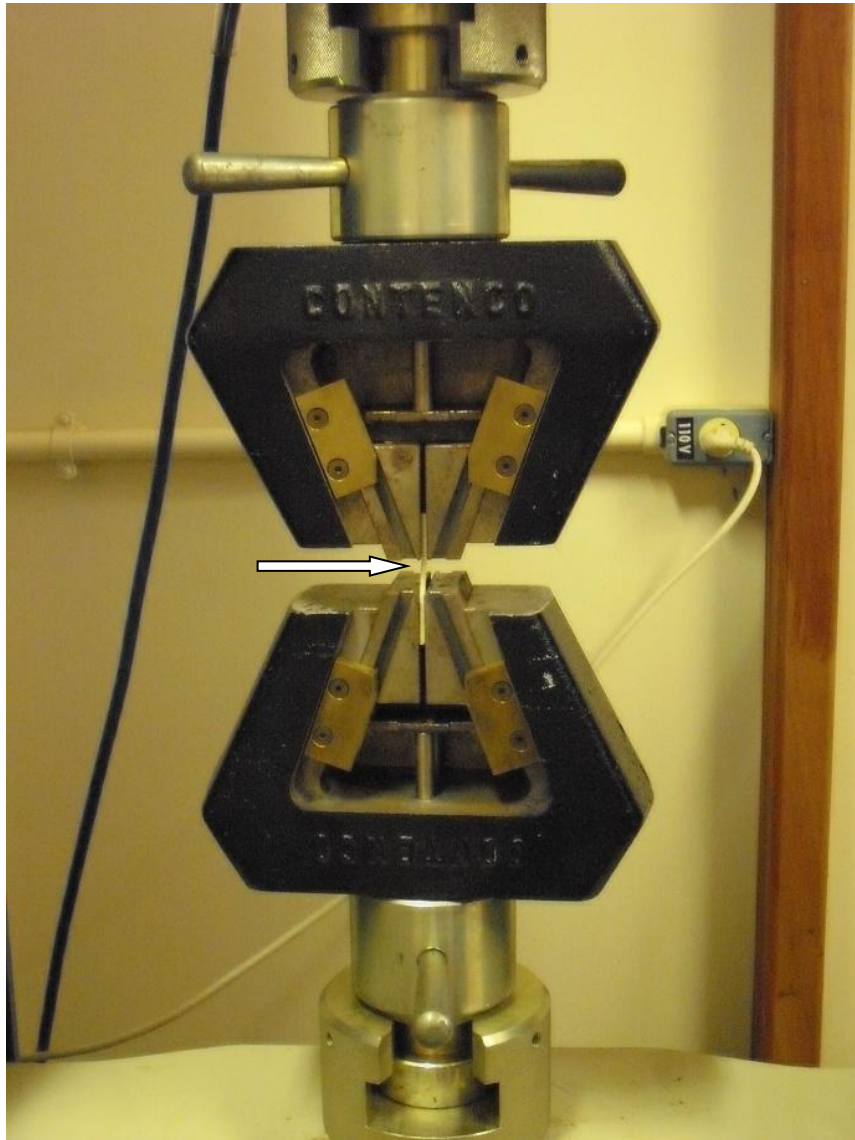


Figura 4 - Corpo de prova (seta) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de tração.

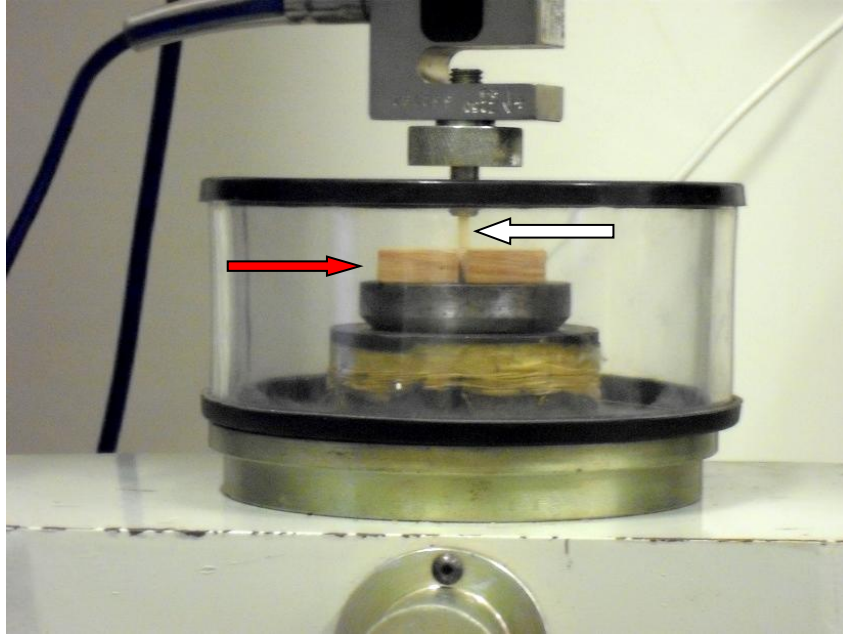


Figura 5 - Corpo de prova (seta branca) fixado as garras para ser submetido ao ensaio de compressão. Observa-se o suporte de madeira (seta vermelha) próximo a placa.



Figura 6 - Corpo de prova (seta) posicionado para ser submetido ao ensaio de flexão em três pontos.

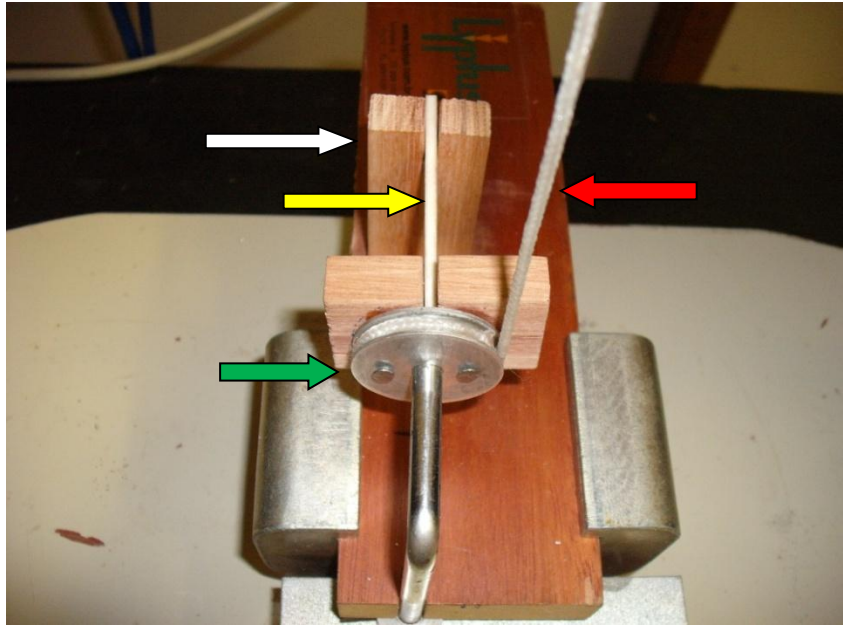


Figura 7 - Corpo de prova (seta amarela) acoplado a um suporte de madeira (seta branca), preso a uma polia (seta verde) tracionada verticalmente por um barbante (seta vermelha) fixado a barra superior da máquina de ensaios para ensaio de torção.

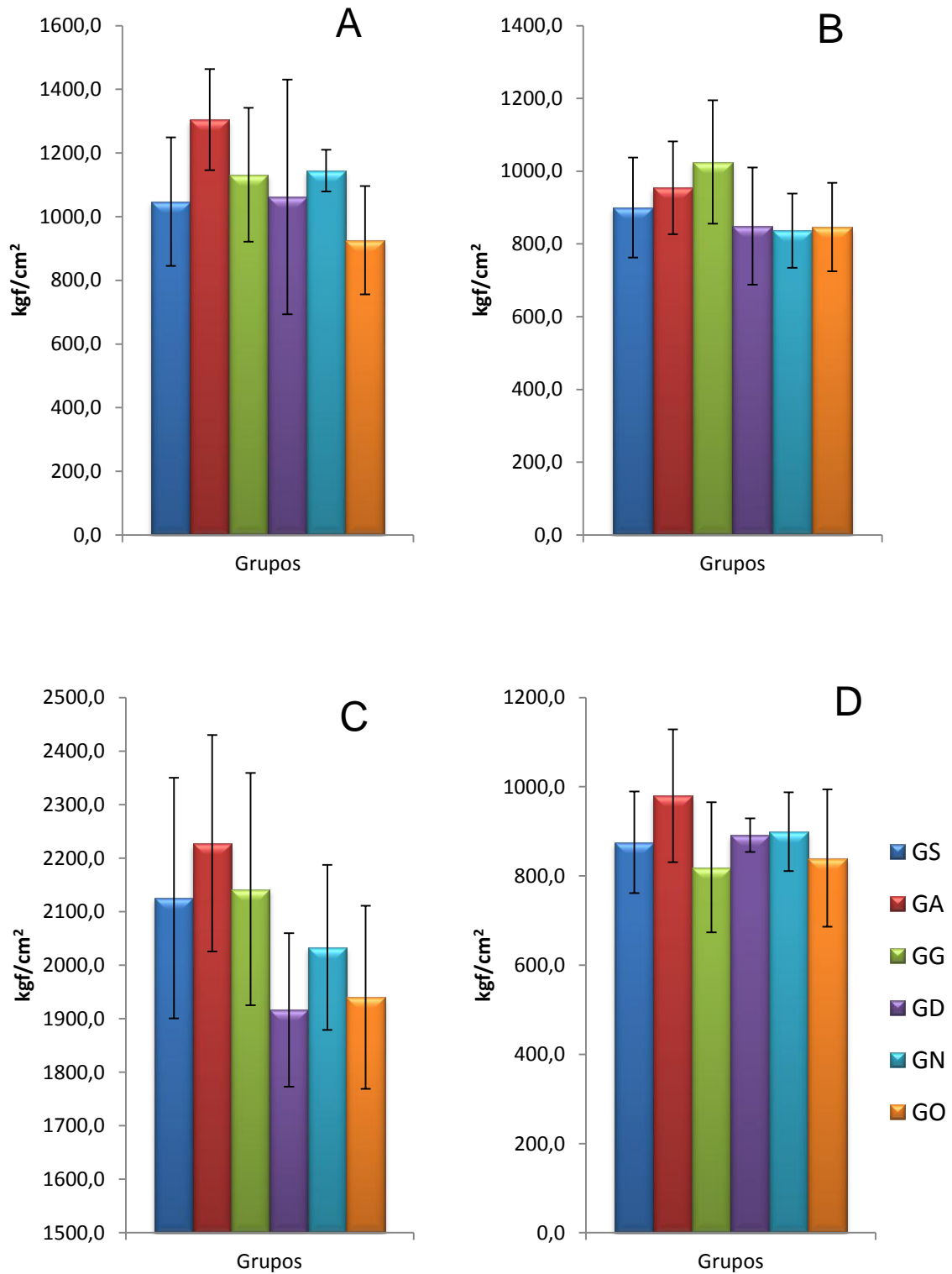


Figura 8 - Representação dos valores médios da força ao ponto de ruptura, de ossos bovinos, conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos: A) de tração; B) de compressão; C) de flexão; D) de torção. Os tratamentos não diferem entre si ($P < 0,01$).

ANEXOS II – Lista de tabelas

Tabela 1 - Amostras obtidas a partir de placas ósseas bovinas conservadas por 45 dias em solução de cloreto de sódio 150% (GS), solução de açúcar 300% (GA), glicerina 98% (GG), Líquido de Dakin (GD), criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C e esterilizadas em óxido de etileno, para avaliação microbiológica qualitativa em tubos de ensaio contendo os meios de crescimento: BHI-caldo e tioglicolato.

Meios de crescimento	
BHI Caldo	Tioglicolato
GA-BHICA	GA-TIOG
GS-BHICA	GS-TIOG
GG-BHICA	GG-TIOG
GD-BHICA	GD-TIOG
GN-BHICA	GN-TIOG
GO-BHICA	GO-TIOG

BHICA – *“Brain Heart Infusion”*
caldo
TIOG - tioglicolato

Tabela 2 - Amostras obtidas a partir de placas ósseas bovinas conservadas em solução de cloreto de sódio 150% (GS), solução de açúcar 300% (GA), glicerina 98% (GG), Líquido de Dakin (GD), criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C e esterilizadas em óxido de etileno, após 45 dias de conservação e reidratadas por seis horas em solução de cloreto de sódio a 0,9% com e sem enrofloxacina [0,5%], para avaliação microbiológica quantitativa de micro-organismos em placas de Petri contendo os meio de crescimento: BHI-ágar em aerobiose e anaerobiose a 37°C, Sabouraud em temperatura ambiente e a 37°C.

ÁGAR-BHI AEROBIOSE 37°C	ÁGAR-BHI ANAEROBIOSE 37°C	SABOURAUD Temperatura ambiente	SABOURAUD 37°C
GA-BHI-AE-C/ANT	GA-BHI-AN-C/ANT	GA-SAB-TA-C/ANT	GA-SAB-37-C/ANT
GS-BHI-AE-C/ANT	GS-BHI-AN-C/ANT	GS-SAB-TA-C/ANT	GS-SAB-37-C/ANT
GG-BHI-AE-C/ANT	GG-BHI-AN-C/ANT	GG-SAB-TA-C/ANT	GG-SAB-37-C/ANT
GD-BHI-AE-C/ANT	GD-BHI-AN-C/ANT	GD-SAB-TA-C/ANT	GD-SAB-37-C/ANT
GN-BHI-AE-C/ANT	GN-BHI-AN-C/ANT	GN-SAB-TA-C/ANT	GN-SAB-37-C/ANT
GO-BHI-AE-C/ANT	GO-BHI-AN-C/ANT	GO-SAB-TA-C/ANT	GO-SAB-37-C/ANT
GA-BHI-AE-S/ANT	GA-BHI-AN-S/ANT	GA-SAB-TA-S/ANT	GA-SAB-37-S/ANT
GS-BHI-AE-S/ANT	GS-BHI-AN-S/ANT	GS-SAB-TA-S/ANT	GS-SAB-37-S/ANT
GG-BHI-AE-S/ANT	GG-BHI-AN-S/ANT	GG-SAB-TA-S/ANT	GG-SAB-37-S/ANT
GD-BHI-AE-S/ANT	GD-BHI-AN-S/ANT	GD-SAB-TA-S/ANT	GD-SAB-37-S/ANT
GN-BHI-AE-S/ANT	GN-BHI-AN-S/ANT	GN-SAB-TA-S/ANT	GN-SAB-37-S/ANT
GO-BHI-AE-S/ANT	GO-BHI-AN-S/ANT	GO-SAB-TA-S/ANT	GO-SAB-37-S/ANT

BHI-AE-C/ANT - Ágar-BHI em aerobiose a 37°C com antibiótico.

BHI-AE-S/ANT - Ágar-BHI em aerobiose a 37°C sem antibiótico.

BHI-NA-C/ANT - Ágar-BHI em anaerobiose a 37°C com antibiótico.

BHI-NA-S/ANT - Ágar-BHI em anaerobiose a 37°C sem antibiótico.

SAB-TA-C/ANT – Sabouraud em temperatura ambiente com antibiótico.

SAB-TA-S/ANT – Sabouraud em temperatura ambiente sem antibiótico.

SAB-37-C/ANT – Sabouraud a 37°C com antibiótico.

SAB-37-S/ANT – Sabouraud A 37°C sem antibiótico.

Tabela 3 - Valores médios (kgf/cm^2) e desvios padrão de ossos bovinos conservados em solução saturada de sal (GS) e açúcar (GA), glicerina (GG), Dakin (GD), nitrogênio líquido (GN) e óxido de etileno (GO), submetidos aos ensaios mecânicos de tração, compressão, flexão e torção.

	TRAÇÃO	COMPRESSÃO	FLEXÃO	TORÇÃO
GS	1047,3 \pm 201,9 ^a	899,9 \pm 137,3 ^b	2125,5 \pm 224,8 ^c	875,4 \pm 114,1 ^d
GA	1304,7 \pm 158,8 ^a	954,4 \pm 127,7 ^b	2227,8 \pm 202,0 ^c	979,7 \pm 148,8 ^d
GG	1131,6 \pm 210,2 ^a	1025,3 \pm 169,5 ^b	2142,1 \pm 216,8 ^c	819,3 \pm 145,8 ^d
GD	1062,0 \pm 368,5 ^a	848,9 \pm 161,2 ^b	1916,4 \pm 143,5 ^c	891,4 \pm 37,6 ^d
GN	1144,8 \pm 65,4 ^a	836,4 \pm 102,1 ^b	2033,1 \pm 154,2 ^c	899,2 \pm 88,5 ^d
GO	926,2 \pm 170,0 ^a	846,8 \pm 121,5 ^b	1940,1 \pm 171,0 ^c	839,9 \pm 154,1 ^d

Médias e desvio padrão seguidas de letras minúsculas na mesma coluna não diferem entre si ($P < 0,01$).

Tabela 4 - Análise microbiológica das placas ósseas dos grupos: sal - GS, açúcar - GA, glicerina - GG, Dakin - GD, nitrogênio líquido - GN e óxido de etileno - GO, após período de preservação mínimo de 45 dias e lavagens, sucessivamente, com intervalos de 5 minutos, em três tubos tipo Falcon, estéreis, contendo 35 ml de solução de NaCl 0,9% e acondicionadas em tubos de ensaio contendo BHI caldo e tioglicolato.

MEIO	GS	GA	GG	GD	GN	GO
BHI caldo	+	+	+	+	+	-
Tioglicolato	+	+	+	+	+	-

(+) Turvação do meio = presença de micro-organismos;

(-) Meio inalterado = ausência de micro-organismos;

BHI Infusão de cérebro e coração.

Tabela 5 - Análise microbiológica das placas ósseas dos grupos: sal - GS, açúcar – GA, glicerina – GG, Dakin – GD, nitrogênio líquido – GN e óxido de etileno – GO, após reidratação em solução de NaCl 0,9%, sem e com antibiótico enrofloxacina a 0,5%, semeadas em placas de Petri contendo o meio BHI-ágar, mantido em condições de aerobiose a 37°C e em anaerobiose a 37°C e o meio Sabouraud mantido a 37°C e a temperatura ambiente.

	GS	GA	GG	GD	GN	GO
NaCl 0,9%						
BHI-ágar em aerobiose a 37°C	+	-	-	+	+	-
BHI-ágar em anaerobiose a 37°C	-	-	-	+	+	-
Sabouraud a 37°C	-	-	-	-	-	-
Sabouraud a temperatura ambiente	-	+	-	-	-	-
NaCl 0,9% + ENROFLOXACINA 0,5%						
BHI-ágar em aerobiose a 37°C	-	-	-	-	-	-
BHI-ágar em anaerobiose a 37°C	-	-	-	-	-	-
Sabouraud a 37°C	-	-	-	-	-	-
Sabouraud a temperatura ambiente	-	-	-	-	-	-

(+) Presença de micro-organismos;

(-) Ausência de micro-organismos.

BHI Infusão de cérebro e coração.