

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E INFORMÁTICA
INDUSTRIAL

LEANDRO ZEN KARAM

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR PARA MENSURAÇÃO DE
DEFORMAÇÕES MECÂNICAS EM TECIDOS ÓSSEOS**

TESE

Curitiba
2015

LEANDRO ZEN KARAM

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Doutor em Ciências” – Área de concentração Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski

Coorientador: Prof. Dr. Jean C. Cardozo da Silva

CURITIBA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

K18d
2015 Karam, Leandro Zen
Desenvolvimento de um biosensor para mensuração de
deformações mecânicas em tecidos ósseos / Leandro Zen Karam.-
2015.
95 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática
Industrial, Curitiba, 2015.
Bibliografia: f. 88-95.

1. Biossensores. 2. Redes de Bragg. 3. Fibras ópticas.
4. Ossos. 5. Deformações (Mecânica) - Medição. 6. Esterilização.
7. Desinfecção e desinfetantes. 8. Materiais biomédicos - Testes.
9. Métodos de simulação. 10. Engenharia biomédica. 11. Engenharia
Elétrica - Teses. I. Kalinowski, Hypolito José, orient. II.
Silva, Jean Carlos Cardozo, coorient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em
Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD 22 -- 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Título da Tese Nº. 114

Desenvolvimento de um Biosensor para Mensuração de Deformações em Tecidos Ósseos.

por

Leandro Zen Karam

Orientador: Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski

Esta tese foi apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 13:30h do dia 21 de maio de 2015. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos doutores:

Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski
(UTFPR)

Prof. Dr. Osnara Maria Mongruel
(UEPG)

Prof. Dr. Christiano Santos Rocha Pitta
(IFPR)

Prof. Dr. Ana Paula Gebert de Oliveira Franco
(UTFPR)

Prof. Dr. Ilda Abe
(UTFPR)

Visto da Coordenação:

Prof. Emilio Carlos Gomes Wille, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

A meu avô, Armando Holocheski, por todo o incentivo, desde meu primeiro microscópio.

AGRADECIMENTOS

Com toda certeza, estes parágrafos não serão suficientes para agradecer todas as pessoas que fizeram parte deste processo de crescimento e construção, desde já peço perdão a todos os que não estão presentes nestas palavras, mas que com certeza estão presentes em meus pensamentos e tem minha gratidão.

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, principalmente a meu orientador, Professor Hypolito José Kalinowski, pelo exemplo de pesquisador, pela confiança e valiosos ensinamentos.

Agradeço ao grupo de pesquisas em dispositivos fotônicos e aplicações – DIFOTON, principalmente aos meus companheiros de laboratório Ismael Chiamenti, Rodolfo Patyk, Valmir Oliveira e Ísis Conselvan (*in memoriam*) que participaram do dia a dia deste processo.

Agradeço a Christino Pitta, Vinícius Pegorini e André Di Renzo pelo auxílio e colaboração durante todos os experimentos em Pato Branco – PR.

Agradeço a Ana Paula Gebert de Oliveira Franco, pela amizade, pelo companheirismo e principalmente por toda a ajuda.

Agradeço aos meus pais Nedson Marcondes Karam e Ema Maria Zen Karam por terem se esforçado por uma vida para poder me dar a educação que tenho. A minha irmã, Amanda Zen Karam, por estar desde sempre ao meu lado me incentivando.

Agradeço aos meus avós, Altiva Karam Holocheski e Armando Holocheski por todo o incentivo, apoio e carinho.

Agradeço a meus amigos, por sempre estarem presentes.

Agradeço especialmente a minha esposa, Gislaine Cristine Letenski, por estar ao meu lado e aceitar trilhar a vida junto a mim. Por me ajudar a ser uma pessoa melhor, acreditar nos meus sonhos e fazer deles seus também.

“O mundo não é um mar de rosas; é um lugar sujo, um lugar cruel, que não quer saber o quanto você é durão. Vai botar você de joelhos e você vai ficar de joelhos para sempre se você deixar. Você, eu, ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer.

Agora se você sabe do teu valor, então vá atrás do que você merece, mas tem que estar preparado para apanhar. E nada de apontar dedos, dizer que você não consegue por causa dele ou dela, ou de quem quer que seja. Só covardes fazem isso e você não é covarde, você é melhor que isso.”

Rocky Balboa

RESUMO

KARAM, Leandro Z.. Desenvolvimento de um biosensor para mensuração de deformações mecânicas em tecidos ósseos. 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2015.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um biosensor, utilizando redes de Bragg em fibras ópticas, capaz de mensurar deformações em tecido ósseo. Inicialmente foram realizados testes de esterilização e desinfecção com sensores, após o processo completo, os sensores foram testados quanto a sua sensibilidade. Com isso os métodos de esterilização e desinfecção autoclave, óxido etileno, hipoclorito de sódio, cloramina T e ácido peracético, foram eficazes para eliminação e ou inativação dos microrganismos, sem que haja alterações no comportamento das FBGs. Com isso definem-se métodos aplicáveis para possíveis estudos, onde fibras ópticas foram implantadas em animais *in vivo* para estudos de comportamento metabólico com a presença de materiais inorgânicos. Na continuidade dos trabalhos foram realizados testes de compatibilidade de fibras ópticas inseridas no tecido subcutâneo de ratos. Baseado na análise descritiva dos cortes histológicos pode-se concluir que as fibras ópticas sem revestimento e com revestimento foram biocompatíveis quando implantadas em subcutâneo de ratos. Sendo assim, foi possível contemplar o desenvolvimento de um sensor baseado em redes de Bragg em fibras ópticas para implantação direta no tecido ósseo. Posteriormente foram realizados testes-piloto para o desenvolvimento da metodologia de construção e implante no desenvolvimento de biosensores. Com todo o trabalho feito até à data, o desenvolvimento e construção de um biosensor que foi implantado *in vivo* foi possível. O biossensor foi fixado na região mandibular de um bovino quatro meses de idade. Uma semana após a implantação, os animais receberam diferentes tipos de alimentos e foi monitorizada durante a ingestão de alimentos. Com as deformações medidas foi possível a análise dos diferentes padrões mastigatórios e diferentes magnitudes de força e frequência mastigatória que o animal desempenhada durante o processo de mastigação.

Palavras-chave: Redes de Bragg em fibras, esterilização, desinfecção, *in vivo*, biosensor.

ABSTRACT

KARAM, Leandro Z.. Development of a biosensor for measurement of mechanical deformations in bone tissue. 2015. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2015.

This study aims to develop a biosensor using Bragg gratings in optical fibers, capable of measuring deformation in bone tissue for this took a lot of work. Initially sterilization and disinfection with sensors tests were performed after the entire process, the sensors were tested for their sensitivity. In the same study methods of sterilization and disinfection have been tested to assess its efficiency. Thus methods of sterilization and disinfection autoclave, ethylene oxide, sodium hypochlorite, chloramine T and peracetic acid were effective for removing or inactivating microorganisms and, without changes in the behavior of the FBGs. With this set up methods applicable for possible studies, where optical fibers are implanted in *in vivo* animal studies metabolic behavior in the presence of inorganic materials. Continuing the work was carried out optical fiber compatibility tests inserted in the subcutaneous tissue of rats. Based on the descriptive analysis of histological sections can be concluded that the optical fiber uncoated and coated were biocompatible when implanted in rat subcutaneous tissue. Thus it is possible to contemplate the development of a sensor based on Bragg gratings in optical fibers for direct implantation into the bone tissue. Following on from the work were carried out pilot tests for development of construction methodology and implant in biosensor development. With all the work done to date, the development and construction of a biosensor that was implanted *in vivo* was possible. The biosensor was fixed in the mandibular region of a bull four months old. A week after implantation, the animal received different types of food and was monitored during the intake of foods. With the deformations measured parse the different masticatory patterns and different magnitudes of force and masticatory frequency that the animal developed during the chewing process completing the objectives of this study.

Keywords: Optical fiber Bragg grating sensors, sterilization, disinfection, *in vivo*, biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático de espectros da rede de Bragg (Othonos, 1999).....	20
Figura 2 – Espectro em reflexão de uma rede de Bragg padrão utilizada como sensor no trabalho	31
Figura 3 – Fotografia das soluções salinas contendo células de bactérias <i>E. Coli</i> (primeiro tubo do lado esquerdo), <i>S. Aureus</i> , <i>E. Coli</i> com <i>S. Aureus</i> (último tudo do lado direito)	33
Figura 4 – Fotografia de redes de Bragg em fibra ótica imersas em um meio de cultura BHI	35
Figura 5 – Apresentação dos resultados dos processos de esterilização e desinfecção de fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> e <i>E. Coli</i>	36
Figura 6 – MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por autoclave.	38
Figura 7 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por radiação UV.	39
Figura 8 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por Óxido Etileno.	40
Figura 9 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por Hipoclorito de Sódio	41
Figura 10 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por Cloramina T.	43
Figura 11 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E. Coli</i> (B) após esterilização por Ácido Peracético.	44
Figura 12 – Gráfico apresentando o espectro da rede da FBG pré e pós esterilização por UV	45
Figura 13 – Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 7 dias do implante (fibra com revestimento de PMMA) A) Aumento de 100X B) Aumento de 200X C) Aumento de 300X e D) Aumento de 400X	50
Figura 14 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 7 dias do implante (fibra sem revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X.	51

Figura 15 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 30 dias do implante (fibra com revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X.	52
Figura 16 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 30 dias do implante (fibra sem revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X.	52
Figura 17 – Rede de Bragg em fibra ótica fixada na região entre o ligamento periodontal e o osso alveolar	55
Figura 18 – Desenho esquemático do sistema de aplicação de cargas.....	56
Figura 19 - Gráfico demonstrando as deformações no LPD em função do carregamento aplicado longitudinalmente no dente.....	59
Figura 20 – Gráfico que apresenta a resposta do sensor a partir de carregamentos na região do LPD.....	60
Figura 21 – Figura demonstrando o local da incisão bem como o processo de passagem do cabo ótico até o local instrumentado.	63
Figura 22 – Gráfico demonstrando a alteração do comprimento de onda do sensor a partir dos movimentos mastigatórios na mandíbula de bovino.	64
Figura 23 – Gráfico das deformações geradas em movimentos mastigatórios em relação ao tempo	65
Figura 24 – Figura esquemática representando a instrumentação do bovino e a disposição do sistema de aquisição de dados.	68
Figura 25 – Placa de titânio cirúrgico fornecida pela empresa NEOORTHO® (foto ilustrativa retirada do catálogo da empresa).....	69
Figura 26 – Cânula de cateter de silicone implantável fornecido pela empresa IBEG®	70
Figura 27 – Parafusos de fixação fornecidos pela empresa NEOORTHO® (foto ilustrativa retirada do catálogo da empresa).....	72
Figura 28 – Gráficos da alteração do comprimento de onda em relação ao tempo para os diferentes alimentos e padrões mastigatórios. (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação.....	75

Figura 29 - Gráficos de alteração do comprimento de onda refletido em função da mastigação de ração em 1s e a alteração em um ciclo de mastigação seguido do ajuste com o valor médio da alteração do sinal. (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação	78
Figura 30 - - Figura que compara os gráficos das FFT do processo de mastigação de alimentos fornecidos ao animal e ruminação com o intervalo de 6s de amostras, sendo: (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação	80
Figura 31 - - Figura que compara os gráficos das FFT do processo de mastigação de alimentos fornecidos ao animal e ruminação com o intervalo de 1s de amostras, sendo: (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação	81
Figura 32 – Histograma completo da frequência de incidência (número de amostras) de alteração do comprimento de onda durante toda a aquisição do sinal.....	83

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	16
1.2	ESTRUTURA DA TESE	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	REDES DE BRAGG EM FIBRA ÓTICA	18
2.2	ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO	21
2.3	OSSOS	23
2.4	BIOSSENSORES E SENSORES BASEADOS EM FBG COM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	26
2.5	CONTROLE DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL E MANEJO DE PASTAGENS	30
3	PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO APLICADOS A REDES DE BRAGG EM FIBRA ÓTICA CONTAMINADAS	31
3.1	METODOLOGIA DE CONTAMINAÇÃO DE FIBRAS ÓTICAS	32
3.2	MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO	34
3.3	MÉTODO DE AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO	35
3.4	ANÁLISE DE TURBIDEZ EM SOLUÇÕES CONTAMINADAS E ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	36
3.5	CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO	46
4	AVALIAÇÃO DE BIOCOMPADIBILIDADE DE FIBRAS ÓTICAS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS	47
4.1	IMPLANTE DE FIBRAS ÓTICAS NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS	47
4.2	ANÁLISE DE RESPOSTA DO TECIDO SUBCUTÂNEO AO IMPLANTE DE FIBRAS ÓTICAS	48
4.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS APÓS IMPLANTE DE FIBRA ÓTICA	49
4.4	CONCLUSÕES DO ESTUDO	53
5	INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE SUÍNOS <i>EX VIVO</i>	54
5.1	INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO DO LPD DE SUÍNOS <i>EX VIVO</i>	54
5.2	APLICAÇÃO DE CARREGAMENTOS EM DENTES DE SUÍNOS <i>EX VIVO</i>	56
5.3	ANÁLISE DAS DEFORMAÇÕES MEDIDAS NA REGIÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE PORCOS <i>EX VIVO</i>	57
5.4	CONCLUSÕES DO ESTUDO	61
6	INSTRUMENTAÇÃO DA MANDÍBULA DE BOVINOS <i>EX VIVO</i>	62
6.1	METODOLOGIA DE INSTRUMENTAÇÕES DE MANDÍBULA DE BOVINOS <i>EX VIVO</i>	62
6.2	MEDIÇÃO DE DEFORMAÇÕES NA SUPERFÍCIE ÓSSEA DE BOVINOS DURANTE A MOVIMENTAÇÃO MANDIBULAR	64

6.3	CONCLUSÕES DO ESTUDO	66
7	INTRUMENTAÇÃO E MEDIÇÃO DE DEFORMAÇÕES ÓSSEAS <i>IN VIVO</i>	67
7.1	INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO MANDIBULAR DE BOVINO <i>IN VIVO</i>	67
7.1.1	CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR	68
7.1.2	PROCESSO CIRÚRGICO	71
7.1.3	FIXAÇÃO DO BIOSENSOR	72
7.2	ANÁLISE DE DEFORMAÇÕES DURANTE O PROCESSO MASTIGATÓRIO	73
7.3	CONCLUSÕES DO ESTUDO	84
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS	85
8.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
8.2	TRABALHOS FUTUROS	87

1 INTRODUÇÃO

A maturação dos tecidos humanos ocorre em torno dos 21 anos de idade, a partir deste momento o tecido é sintetizado pelo processo de reabsorção óssea e simultaneamente é regenerado pelo processo de osteogênese, o somatório destes dois processos é o que as ciências biológicas chamam de processo de remodelação óssea.

O processo de remodelação óssea é uma contínua relação entre os níveis de diferenciação celular de matriz óssea por reabsorção ou formação de um novo tecido, considerando um tecido musculoesquelético de um ser humano adulto em condição de homeostase (propriedade dos seres vivos em regular o seu ambiente interno, de modo a manter uma condição estável para manutenção da vida).

Todos os ossos do corpo humano sofrem o processo de remodelação, entretanto, os níveis de atividade e de carga e descarga de deformações mecânicas interferem diretamente na velocidade do processo. Desta forma, ossos longos e com atividade mecânica intensa sofrem um processo mais acelerado de remodelação do que ossos chatos ou com perfil laminar.

Alguns tratamentos realizados por profissionais das ciências da saúde se utilizam dos processos de reabsorção óssea e da formação de novos tecidos para readequar o tecido ósseo de maneira que melhor desempenhe suas funções mecânicas, estruturais e fisiológicas. Atualmente médicos, fisioterapeutas e odontólogos utilizam os conceitos da biomecânica para programar tratamentos e processos de reparo de lesões, fraturas e movimentações ortodônticas.

Na medicina, algumas áreas como a traumatologia, ortopedia e a medicina esportiva têm investigado a interferência da atividade física na formação do tecido ósseo (Fehling, *et al*, 1995). Na odontologia as pesquisas vão ainda mais além, graças às demandas criadas por áreas como a ortodontia e a implantodontia. No processo de movimentação ortodôntica, percebe-se que há um empirismo por parte dos clínicos no momento da aplicação das forças necessárias para a movimentação dentária. Vários trabalhos vêm sendo realizados para investigar as implicações dos carregamentos nos tecidos adjacentes aos dentes (Cattaneo, Dalstra, & Melsen, 2009).

Tendo como base as capacidades de medição das redes de Bragg, é possível correlacionar as demandas industriais e clínicas das áreas correlacionadas as ciências da saúde.

Clinicamente é sabido que os principais e mais determinantes fatores para o processo de reparo de uma fratura são a rigidez do dispositivo utilizado para a fixação da fratura, a configuração da fratura, a eficiência do processo de redução da fratura e a quantidade e o tipo da deformação na região fraturada ditada por atividades funcionais e carregamentos aplicados no local (Aro & Chao, 1993). Com isso pode-se estabelecer que o fator primordial para as melhores condições de reparo de um processo de fratura óssea é o ambiente mecânico ao qual o foco da fratura será submetido durante o processo de reparo (Goodship & Kenwright, 1985).

Mesmo com a vasta gama de referenciais teóricos tratando do tema á décadas, ainda não existem estudos que determinem a condição ótima para o processo de reparo de fraturas. Existem, sim, trabalhos que utilizam como método de avaliação, métodos diagnósticos por imagem. A utilização de tais métodos é com certeza fundamental para a avaliação dos resultados finais, entretanto tais métodos não são capazes de mensurar as reais deformações as quais os tecidos são submetidos no ambiente *in vivo*.

Com a evolução da mecânica computacional trabalhos vêm sendo desenvolvidos para simular o ambiente *in vivo* e predizer o comportamento celular local a fim de otimizar o processo de reparo das fraturas. Entretanto, existem problemas metodológicos relacionados a implementação do infinito número de variáveis as quais o tecido ósseo está sujeito durante o processo de reparo (Soni et al., 2008).

Para que seja possível a simulação numérica estudos se utilizam de constantes que generalizam as variáveis biológicas locais para que seja possível a estimativa matemática do comportamento celular local (Epari *et al*, 2006).

As redes de Bragg em fibras são estruturas periódicas de modulação de índice de refração no núcleo da fibra ótica, ao longo do eixo de propagação da luz, e têm como característica principal refletir parte da potência ótica que se propaga pela fibra, em comprimentos de onda próximos ao de Bragg. Tais redes permitem selecionar a banda estreita de comprimentos de onda de uma banda larga que tenham sido acoplados à fibra, direcionando-o para algum outro componente particular do sistema óptico. Assim, a monitoração do comprimento de onda central da banda refletida pode trazer informações sobre o meio externo à fibra, como por exemplo, temperatura, tensão mecânica e vibração, ou então direcionar informações que estejam codificadas nesses comprimentos de onda para um sistema de comunicação ótica (Othonos & Kalli, 1999).

As de redes de Bragg em fibra ótica tem tido aplicações nas áreas biomédicas desde o final do século passado, principalmente pela capacidade de detecção a alterações térmicas e de deformações mecânicas. Exemplos dos primeiros trabalhos com a utilização da FBG foi a pesquisa de Rao, 1998, que criou um termômetro para ser utilizado dentro de equipamentos de ressonância magnética nuclear (pela necessidade do equipamento ser imune a campos eletromagnéticos (Rao et al., 1998a). Nos anos seguintes surgiram novas pesquisas com diferentes aplicações como por exemplo a aferição de temperatura no interior dos rins de pequenos animais (D J Webb et al., 2000), a aferição da pressão na região plantar dos pés de pacientes diabéticos (Hao et al., 2003), assim como alguns trabalhos para monitoramentos de forças de contração durante a cura de cimentos odontológicos (Milczewski et al., 2006; Ottevaere et al., 2005; Ottevaere et al., 2001).

As aplicações biomecânicas surgiram quase simultaneamente, com as pesquisas que desenvolveram um sensor de movimentos da caixa torácica durante os movimentos de inspiração e expiração, a aplicação do sensor era para que caso não houvesse a movimentação torácica, seria emitido um sinal elétrico para estimular o nervo frênico e assim gerar um potencial contrátil no músculo, reestabelecendo as funções respiratórias do paciente (Wehrle, et al., 2001).

Outras aplicações biomecânicas surgiram, principalmente relacionadas a mensuração de deformações em superfícies de próteses e órteses, assim como no interior de espaços com a presença de cimentos ósseos para consolidação de implantes ortopédicos (Al-Fakih et al., 2012).

Neste campo a utilização de redes de Bragg em fibra ótica é comum, principalmente na aplicação para a validação de modelos matemáticos a partir da comparação dos resultados *in vitro* com as simulações numéricas (Karam et al., 2009).

No cenário ideal haveria um paralelo entre técnicas de instrumentação minimamente invasivas (que obteriam resultados fidedignos sem que houvesse interferência direta na atividade metabólica do local instrumentado) e técnicas de modelagem computacional que se utilizassem de constantes não lineares que tenham valores definidos por métodos de aferição confiáveis, bem como variáveis biológicas.

A partir do momento em que simulações numéricas de tecidos biológicos forem devidamente validadas, será possível a utilização destes métodos para a otimização e teste de

técnicas de tratamento sem que seja necessária a utilização de animais e testes piloto em humanos.

O cenário atual das pesquisas com a utilização de redes de Bragg em fibra ótica encaminhou-se para o desenvolvimento de técnicas de instrumentação que possibilite a aplicação do sensoriamento em estruturas *in vivo*.

Na tentativa de instrumentação de estruturas *in vivo* diversos autores realizaram ensaios *in vitro* a fim de testar metodologias de instrumentação e até mesmo validar modelos matemáticos existentes, como é o caso de Roriz, 2011 e Demminson, 2008 que trabalharam na instrumentação de uma coluna vertebral previamente congelada e Talaia, 2007 que trabalhou com fêmur sintético (Dennison et al., 2008; Dennison et al., 2008; Dennison et al., 2008; Roriz et al., 2011a; Talaia et al., 2007). Outros autores trabalham na tentativa de realizar ensaios que possam fundamentar e comprovar que possíveis aplicações de fibras óticas não trariam qualquer malefício ao animal, desde que ensaio fosse realizado dentro de determinados padrões metodológicos, como é o caso de Karam, 2011 que estudou as possibilidades de esterilização e desinfecção de redes de Bragg sem que houvessem problemas gerados no funcionamento do sensor (Karam et al., 2012). Já Carvalho, 2011 realizou um ensaio de cultura celular de células osteoblásticas na superfície de fibras óticas, os resultados foram muito promissores, já que houve crescimento celular em todo o ambiente, inclusive sobre a fibra ótica.

1.1 OBJETIVOS

Durante o presente trabalho foi analisado o comportamento das redes de Bragg em fibra ótica após processos de esterilização, desinfecção e implante das mesmas em tecido epitelial de ratos, a fim de garantir a viabilidade de estudos desta magnitude em experimentos *in vivo*. Foi descrito a execução de um projeto piloto onde foram instrumentadas uma caveira e uma mandíbula de um novilho *ex vivo* para aprimoramento da técnica de instrumentação. Foi desenvolvido biosensor de aplicação na região mandibular de um bovino, que tem como objetivo o estudo da viabilidade da aplicação *in vivo* para o monitoramento das deformações ósseas durante o processo de mastigação.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho está organizado em oito capítulos, que foram realizados de forma progressiva, fazendo todos os testes necessários para a construção e implantação de um biosensor. No Capítulo 2 apresenta-se uma revisão da literatura, a qual servirá como base para o desenvolvimento do estudo. Cada um dos capítulos a seguir apresenta estrutura com metodologia, resultados, discussões e conclusões, devido a grande variedade de testes e experimentos necessários para desenvolvimento completo da tese. O Capítulo 3 descreve em detalhes o desenvolvimento da metodologia de esterilização e desinfecção de fibras óticas, utilizada em todos os trabalhos subsequentes. No Capítulo 4 relatam-se os métodos e resultados obtidos após o implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos. No Capítulo 5 será apresentado um estudo preliminar onde foram implantadas redes de Bragg em fibra ótica na região do ligamento periodontal de porcos *ex vivo*. No Capítulo 6 apresenta-se o estudo piloto para a instrumentação *in vivo*, neste estudo uma mandíbula de um novilho *ex vivo* foi instrumentada com o objetivo de mensurar as deformações no tecido ósseo. No Capítulo 7 será apresentada a metodologia e os resultados da criação de um Biosensor para monitoramento de deformações mecânicas no tecido ósseo. O Capítulo 8 apresenta as conclusões do trabalho e as propostas de trabalhos futuros.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção são descritos os trabalhos de outros autores correlatos ao estudo, incluindo redes de Bragg em fibra ótica, a estrutura e tipos de ossos, principais características dos tipos de tecido ósseo, diferentes processos de esterilização e sensores de Bragg em fibra ótica, Biosensores e suas aplicações médicas e médico veterinárias.

2.1 REDES DE BRAGG EM FIBRA ÓTICA

Técnicas de ensaios experimentais têm sido utilizadas de forma intensa em aplicações biomecânicas, medindo carregamentos, tensões e deformações em estruturas ósseas. Os métodos mais convencionais de análise de tensões e deslocamentos de superfícies utilizam técnicas fotoelásticas, *strain gauges* e outros sensores mecânicos e elétricos. Essas técnicas de medição podem ser muito precisas e sensíveis, porém geram informações a respeito de limitadas regiões da estrutura.

A tecnologia e as aplicações de fibras óticas têm progredido rapidamente na última década. Sensores de fibra ótica são caracterizados por uma alta sensibilidade quando comparados a outras modalidades de sensores. Eles apresentam algumas vantagens interessantes como: o formato compacto, a versatilidade da sua geometria e a viabilidade econômica (Othonos, 1997).

As fibras óticas e os dispositivos óticos tiveram uma grande evolução, a partir da metade do século passado, com estudos direcionados apenas à área de comunicações. Mas foi sem dúvida com a descoberta da fotossensibilidade por Hill e seus colaboradores em 1978 (Hill et al. 1978), que a aplicação das fibras óticas como sensores foi impulsionada.

A gravação das redes de Bragg em fibra ótica está baseada na propriedade de se alterar o índice de refração do núcleo por meio da absorção ótica de luz ultra-violeta (UV). A fotossensibilidade permite a produção de estruturas periódicas, obtidas através da alteração permanente do índice de refração do núcleo. A modulação periódica do índice de refração atua como filtro seletivo de comprimentos de onda que satisfazem à condição de Bragg, obtendo-se assim as redes de Bragg (Hill et al., 1978).

As redes de Bragg apresentam também inúmeras vantagens, como sensores, uma vez que oferecem todas as propriedades intrínsecas das fibras óticas como imunidade a

interferências eletromagnéticas, dimensão reduzida, baixo peso, flexibilidade e possibilidade de sensoriamento remoto (Othonos e Kalli, 1999). Desta forma podem ser empregadas como sensores em áreas que envolvem materiais, estruturas civis e biomédicas (Yun-Jiang et al., 1997; Baldini e Mignani, 2002).

Na experiência de Hill, a luz de um laser árgon era acoplada com uma fibra de sílica dopada com germânio. Foi verificado que na extremidade oposta da fibra surgia um padrão de interferência, formado por uma onda luminosa estacionária no interior do núcleo da mesma. Verificou-se ainda que nos pontos de máxima intensidade havia a alteração permanente e periódica do índice de refração do núcleo da fibra. A esta propriedade, que algumas fibras apresentam após a exposição à radiação ultravioleta, deu-se o nome de fotossensibilidade. A rede periódica gravada chama-se rede de Bragg (FBG - Fibre Bragg Gratings) (Hill et al, 1978).

A gravação de redes de Bragg em fibras óticas é possível através de algumas técnicas conhecidas, dentre as quais se utilizou a técnica direta com máscara de fase. Esse método emprega elementos óticos difrativos (máscaras de fase) para modular espacialmente o feixe de radiação ultra violeta (UV) de gravação (Kashyap, 1999). A máscara de fase reduz sensivelmente a complexidade do sistema de gravação das redes de Bragg. A simplicidade em operar com apenas um elemento ótico garante um método que apresenta robustez e estabilidade.

Quando radiação de uma fonte ótica é lançada no núcleo da fibra, vai ocorrer reflexão em uma banda estreita de comprimento de onda. O espectro refletido obtido é centrado próximo ao comprimento de onda de Bragg, como mostrado na figura 1.

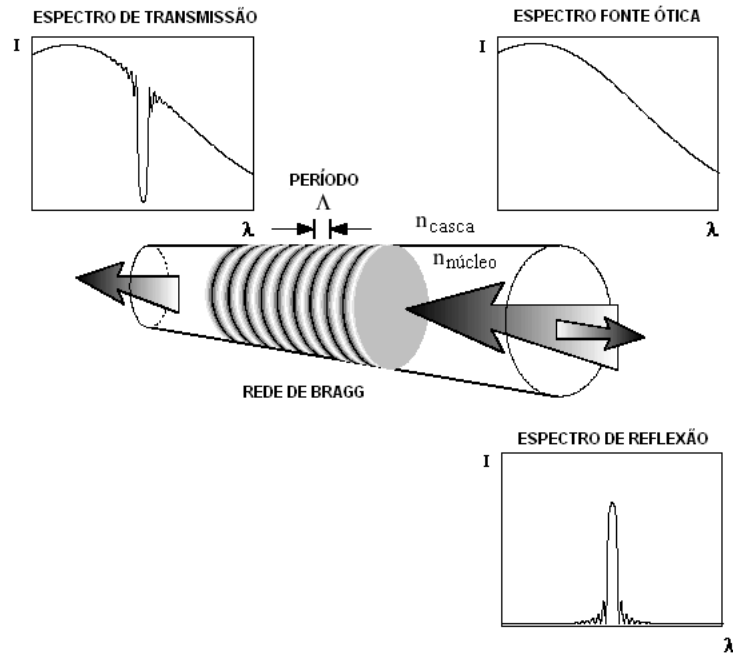


Figura 1 – Desenho esquemático de espectros da rede de Bragg (Othonos, 1999)

O princípio básico de funcionamento dos sensores baseados em redes de Bragg consiste na medição do deslocamento espectral do comprimento de onda de Bragg, λ_B , quando esta é sujeita a ação de perturbações externas, como deformações e alterações térmicas locais (Kersey et al, 1997), sendo regido pela equação (Hill & Fujii, 1978):

$$\Delta\lambda_B = 2\left(\Lambda \frac{\partial n_{eff}}{\partial l} + n_{eff} \frac{\partial \Lambda}{\partial l}\right)\Delta l + 2\left(\Lambda \frac{\partial n_{eff}}{\partial T} + n_{eff} \frac{\partial \Lambda}{\partial T}\right)\Delta T \quad (1)$$

A primeira parcela corresponde ao efeito da deformação da FBG, que gera mudança do espaçamento da rede (periodicidade espacial, Λ) e a variação fotoelástica induzida no índice de refração efetivo da fibra, n_{eff} . A segunda parcela corresponde ao deslocamento do comprimento de onda de Bragg devido à expansão térmica que ocorre pela variação do espaçamento dos planos de alteração do índice de refração da rede e à alteração do índice de refração pelo efeito fototérmico (Hill & Fujii, 1978).

O presente trabalho faz uso de FBG, utilizadas como sensores em fibra óptica aplicados em mandíbulas suínas e bovinas *ex vivo*, para medidas de deformações na superfície a partir de carregamentos submetidos. Em paralelo foram realizados testes dos sensores submetidos a processos de esterilização e desinfecção para averiguar qualquer alteração no funcionamento

do sensor antes e depois dos processos. O trabalho culmina com o desenvolvimento e teste piloto de um biosensor capaz de ser implantado *in vivo* e que monitore as deformações geradas no tecido ósseo durante o processo de mastigação de um bovino com diferentes tipos de alimentos.

2.2 ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO

A esterilização é uma das etapas mais importantes de um programa de controle de infecção. É definida como a destruição ou remoção de todas as formas de vida microbiana, sendo elas, bactérias, vírus, fungos e esporos. Ela pode ser realizada por meio de processos físicos, químicos ou por meio de soluções químicas.

No presente estudo foram utilizados dois meios de esterilização físicos, como a autoclave e a radiação ultravioleta e um processo químico por meio da utilização do óxido de etileno.

A autoclave é um meio de esterilização seguro e, portanto, um método consagrado na área médica. Apresenta um ciclo de esterilização mais curto, que varia de acordo com a temperatura utilizada. Esse meio permite a esterilização de materiais de diferentes composições, materiais termo sensíveis. O calor úmido apresenta boa capacidade de penetração destruindo os microrganismos por coagulação e desnaturação irreversíveis de suas enzimas e proteínas estruturais. Suas vantagens são não ser tóxico e apresentar ação esporicida (Everall et al., 1978; Palenik et al., 1999; Sweet, 1971; Zheng et al., 1997).

A radiação ultravioleta é um meio de esterilização de radiação ionizante, (utilizando “luz fria”) na emissão de raios ultravioleta. A radiação ultravioleta age em superfícies diretamente sobre o DNA e RNA, alterando a estrutura das moléculas e provocando danos aos processos de manutenção e divisão celular (Denis et al., 2010; Halfmann et al., 2007; Schmitz & Draeger, 1986; Yagi et al., 2007). Em função do tempo de exposição esses danos normalmente levam os microrganismos à morte. Para a realização do método são utilizadas lâmpadas com comprimento de onda de 900 a 3800 Å, sendo a zona mais letal em torno de 2600 Å. Neste comprimento de onda as bases purínicas e pirimídicas constituintes do DNA celular absorvem a radiação ultravioleta, o que provoca mutações letais ou modificações

químicas irreversíveis, tais como, a dimerização da timina. Isso impede a replicação do DNA provocando eliminação da célula bacteriana. Uma das desvantagens do método é a penetração da luz UV, que torna o método mais eficiente somente para a superfície de estruturas expostas ao processo.

O óxido de etileno é um éter cíclico que se apresenta na forma de um gás incolor à temperatura ambiente. É inflamável quando em concentrações iguais ou superiores a 3% no ar. Esse método de esterilização é muito utilizado para produtos médicos-hospitalares que não podem ser expostos ao calor ou agentes esterilizantes líquidos. É regulamentado na legislação brasileira pela Portaria nº 482/99 e resolução nº 30/06 da ANVISA. É um poderoso agente esterilizante com ação bactericida, esporicida, fungicida e virulicida, efeito este pela capacidade de interferir na síntese protéica. A ação letal é atribuída à alquilação (reação de substituição de H por radicais C_nH_{2n+1} dos grupos sulfidril (SH^-) e hidroxil (HO^-), existentes em proteínas, ácidos nucleicos, peptídeos, aminoácidos e enzimas). Admite-se que reaja principalmente com os ácidos nucleicos, impedindo a síntese de proteínas específicas e a sua reprodução age por alcalinização de proteínas, DNA e RNA (Brown & Fuerst, 1963; Dadd, Stewart, & Town, 1983).

A desinfecção, ou descontaminação, é o procedimento utilizado para a destruição de microrganismos patogênicos na forma vegetativa, sem que haja a eliminação dos esporos. No presente estudo foram utilizadas substâncias químicas de desinfecção como o hipoclorito de sódio, a cloraminaT e o ácido peracético. Estas são recomendadas somente para aqueles materiais que não podem ser esterilizados por calor ou óxido de etileno.

O hipoclorito de sódio apresenta ação germicida por meio de HOCl e $-OCl$ que penetram no interior da célula microbiana. O $-OCl$ ionizado apresenta pobre atividade germicida devido a sua incapacidade de se difundir através da membrana plasmática microbiana, exercendo ionização somente na parte externa da célula. O HOCl pode penetrar na camada dupla lipídea da membrana plasmática por difusão passiva devido a sua neutralidade elétrica. O HOCL pode atacar a célula microbiana tanto na sua porção externa quanto interna, portanto ele é responsável pelo potencial germicida do hipoclorito de sódio. O efeito primário do HOCL é a indução dos grupamentos sulfídricos de enzimas essenciais e antioxidantes à oxidação. Acredita-se que estes produtos agem por inibição de algumas reações enzimáticas-chave dentro das células, por desnaturação de proteína e por inativação

do ácido nucléico (Albrich, McCarthy, & Hurst, 1981; Buijtelts & Petit, 2005; Yeboah-Manu et al., 2004).

A cloramina T tem sido muito utilizada como desinfetante na área médica por quase um século. Tem recomendado a utilização de 0,5% de cloramina T para desinfecção de dentes que serão utilizados em estudos que envolvem adesão. Segundo Dawson et al. (2007), a cloraminaT hidratada é instável e libera clorina na água por substituição nucleofílica formando íon hipoclorito, processo que é acelerado na presença de material orgânico. Por esse motivo, em seu estudo da utilização de cloramina T na desinfecção da dentina, afirma que quanto menor a quantidade de matéria orgânica, melhor é o efeito de desinfecção do produto. Ainda adverte sobre a redução da cloramina T em para-tolueno-sulfonamida (PTSA) na presença ou ausência de material orgânico. O PTSA é um metabólito inativo, portanto evidencia a importância de se preparar a solução somente no momento de sua utilização (Fleisher et al., 1991; Mahnel, 1977; Postma et al., 2012; Rolland et al., 2007).

O ácido peracético apresenta ação desinfetante por meio da oxidação e atua na parede celular, alterando sua permeabilidade, e no interior da célula danificando o sistema enzimático, causando a desnaturação de proteínas e conseqüentemente, destruindo o microrganismo. Desta forma, tem sido utilizado para desinfetar biomateriais na inativação eficaz de uma variedade de vírus, atua como agente antisséptico local e inativa esporos e micoplasmas (Chassot, Poisl, & Samuel, 2006; Grand et al., 2010; Majcher, Bernard, & Sattar, 2008; Wood et al., 2011).

No presente trabalho foram descritos os métodos de esterilização e desinfecção explanados acima para compreender seu funcionamento e testar a possível interferência dos métodos utilizados com as redes de Bragg em fibra ótica.

2.3 OSSOS

O osso intacto, no corpo dos vertebrados, funciona como estrutura e suporte, protegendo órgãos importantes e possibilitando o funcionamento do aparelho locomotor. Uma característica mecânica importante é a sua rigidez (o osso deforma somente devido a carregamentos) e resistência (o osso tolera altos carregamentos sem fraturar ou fissurar).

Todos os processos biológicos que ocorrem com o sistema músculo-esquelético são de grande complexidade pois fatores hormonais, juntamente com variações da pressão local sobre as membranas celulares, ativam ou inibem a formação ou desaparecimento de tecidos. O nosso organismo tem uma incrível capacidade de regeneração esquelética que aparece quando ocorre algum dano ou fratura no sistema ósseo. A idéia de que a regeneração esquelética ou a remodelagem óssea são afetadas pelos carregamentos mecânicos que lhe são impostos foi discutida já no final do século XIX por Roux, 1881 e Wolf, 1892 (Huiskes, 2000).

Com a evolução das técnicas de controle dos processos celulares diversas teorias e técnicas clínicas sofreram modificações para otimizar seus processos. A mecanobiologia estuda como as condições físicas ou mecânicas regulam os processos biológicos (Carter et al., 1998). Desta forma pode-se melhor entender como processos de regeneração esquelética ocorrem. O processos de reparo de uma fratura óssea podem ser divididos em três partes:

1. A proliferação do tecido pluripotencial que pode se diferenciar em cartilagem, osso, ou tecido fibroso, sendo que nesta fase, além dos fatores biológicos, percebem-se alterações também pelo ambiente mecânico, muito embora este processo não seja claro.
2. A ossificação endocondral da cartilagem formada no local da fratura. Neste momento nota-se que o processo não é tão alterado pelo estímulo mecânico, porém a velocidade da ossificação pode ser influenciada pelo carregamento mecânico.
3. Na consolidação secundária aborda a remodelação intramembranosa e endocondral do osso formado e está intimamente relacionado ao carregamento mecânico da mesma maneira do desenvolvimento ósseo e adaptação funcional.

Funcionalmente podemos classificar processos de reparo de fratura, da mesma forma que se trabalha no caso da movimentação ortodôntica, onde o processo é induzido pela formação de micro fraturas a partir de estímulos mecânicos gerados pelas forças aplicadas pelo sistema.

No nível tecidual, a diferenciação celular pode ser induzida pelo estímulo mecânico, tensões e deformações fornecem estímulos para a matriz. Com base em testes físicos de propriedades mecânicas e aproximações de carregamento tissular, padrões de diferenciação celular podem ser relacionados com padrões carregamento mecânico.

Nos tecidos ósseos, reconhecem-se dois componentes macro-estruturais: o osso cortical e o osso trabecular. Ambos têm a mesma composição, porém possuem densidades diferentes. O osso cortical forma 80% do esqueleto, sendo reponsável por toda a parte externa de diversos ossos, principalmente no caso dos ossos longos. Possui porosidade considerada baixa (algo em torno de 10%), é rígido e suporta um valor razoável de tensão antes de fraturar quando submetido a um carregamento. O osso trabecular compõe 20% do esqueleto e é uma estrutura altamente porosa (em torno de 50 - 90%). É formado por numerosas e pequenas (aproximadamente 100µm de espessura) trabéculas interconectadas com um grande espaçamento entre elas, que tendem a se orientar ao longo da direção da tensão principal em adaptação ao carregamento externo, sendo capaz de suportar alongamentos e deformações antes de fraturar quando submetido a um carregamento (García, 2002).

O tecido ósseo é formado por células rodeadas por uma matriz extracelular que por sua vez é formada principalmente por derivados de cálcio. As células têm formas, tamanhos e comportamentos diferenciados a partir de suas funções para o desenvolvimento do mesmo. Para facilitar o entendimento a respeito do tema é interessante a separação das células do tecido ósseo em dois grupos com funções distintas. Quanto a suas localizações sabe-se que osteoblastos e osteoclastos recobrem o tecido ósseo, e osteócitos são encontrados dentro da matriz extracelular.

Osteoblastos são responsáveis pela formação de novo tecido ósseo a partir da secreção da componente orgânica da matriz óssea. Por outro lado osteoclastos sintetizam o tecido ósseo, sendo que fatores hormonais e de crescimento, assim como estímulos mecânicos são os principais determinantes na ativação das mesmas. Quando os osteoclastos são estimulados, as células até então mononucleares se proliferam até que consigam formar grandes osteoclastos multinucleados. Quando maduros os osteoclastos eliminam tanto componentes orgânicas quanto inorgânicas do tecido ósseo, a partir de um processo eficiente onde diminui-se o pH de 7 para 4, e desta forma dissolve o mineral e degrada boa parte da matriz orgânica, permite então que o tecido ósseo antigo seja substituído por o tecido em formação (Huiskes et al., 2000).

Fisiologicamente, sabe-se que os ossos têm um comportamento cíclico de aposição e reabsorção do tecido. As capacidades adaptativas do tecido ósseo foram descritas primeiramente por pesquisadores no século XIX, onde destacam-se Roux, 1881 e Wolf, 1892. Nestes primeiros estudos, o osso foi considerado uma estrutura capaz de adaptar-se a

condições de carregamento externo. Desta maneira, o conceito de adaptação mecânica do osso diz que um estímulo mecânico pode provocar crescimento ou redução do tecido ósseo, enquanto a falta de estímulo pode levar a sua reabsorção. Atualmente sabe-se que a diferença entre o volume de osso formado e reabsorvido é descrito por ρ (osso produzido – osso reabsorvido), expressado por Frost, 1987. O valor de ρ é uma função dos níveis de tensão que atuam no osso. Um valor de ρ positivo indica aumento de massa óssea, enquanto um valor de ρ negativo indica reabsorção do osso (Frost, 2004).

Baseando-se nas magnitudes das deformações transmitidas mecanicamente até determinadas regiões do tecido, Frost propôs um critério para descrever o processo de remodelação óssea. A teoria mecanostática de Frost propõe quatro níveis de deformações que descrevem as tendências de comportamento do tecido ósseo a partir dos estímulos mecânicos. A aplicação dos conhecimentos que cercam as teorias que relacionam o comportamento do tecido biológico com os níveis de deformação presentes no tecido podem ser utilizados em áreas das ciências biológicas como a Odontologia, Fisioterapia, Medicina e Educação Física.

A tabela a seguir descreve os níveis de deformações mecânicas propostas por Frost, para aplicações clínicas dos conceitos apresentados na teoria mecanostática:

Quadro 1 – Quadro demonstrando a relação do comportamento do tecido ósseo em função da força aplicada e transmitida até a região em estudo (Frost, 2004).

Resposta em Relação aos Carregamentos	Deformação	Pressão
Desuso Ósseo	50-100 $\mu\epsilon$	1-2 MPa
Desenvolvimento de Tecido Ósseo	1000-1500 $\mu\epsilon$	20 MPa
Micro Fratura	3000 $\mu\epsilon$	60 MPa
Fratura Imediata	25.000 $\mu\epsilon$	120 MPa

2.4 BIOSENSORES E SENSORES BASEADOS EM FBG COM APLICAÇÕES BIOMEDICAS

As aplicações de biosensores são fundamentais para o desenvolvimento contínuo das ciências médicas. Não há outra maneira, se não a aferição de todo e qualquer sinal emitido

pelo organismo para que haja um monitoramento e comparação com padrões previamente estabelecidos para que seja possível o diagnóstico e acompanhamento de quadros clínicos e padrões fisiológicos e/ou patológicos.

Em geral, biosensores vêm sendo desenvolvidos e implementados desde o século passado. A evolução das tecnologias que envolvem os diagnósticos por imagem, os exames laboratoriais e a microscopia geraram um grande desenvolvimento das ciências correlatas a partir das descobertas que vieram seguidas da implantação em larga escala das tecnologias.

Há uma infinidade de aplicações e possibilidades no campo dos biosensores, em teoria qualquer comportamento celular é passível de monitoração de alguma forma, desde que, não haja comprometimento e/ou interferência no processo fisiológico pela simples presença do sensor no local.

Nas últimas décadas, as FBGs têm demonstrado um grande potencial para aplicações no campo da biomecânica e engenharia de reabilitação, devido às suas vantagens de destaque, tais como as pequenas dimensões, biocompatibilidade, inércia química, imunidade à interferência eletromagnética (EMI) e capacidade de multiplexação (Dennison et al., 2008; Mihailov, 2012). Estas características tornam FBGs adequados para o corpo humano de modo que eles podem ser utilizados para a medição *in vivo* (Tiwari et al., 2011). As redes de Bragg podem ser utilizadas para a detecção de tensão mecânica nos ossos, mapeamento de pressão nas articulações, estresse em discos intervertebrais, deformação da parede torácica, forças induzidas por tendões e ligamentos, ângulos entre os segmentos do corpo durante a marcha, e muitos outros em biomecânica odontológica. No entanto, a sua utilização no campo da biomecânica e aplicações de reabilitação é muito recente e sua praticidade para implementação em larga escala ainda não foi completamente estabelecida (Al-Fakih et al., 2012; Mishra et al., 2011).

Estudos de implantes dentários e tecidos de suporte são um tema importante na biomecânica e clínica odontológica. Tjin et al., 2001 relataram a primeira aplicação de sensores FBG para controlar a força e a temperatura como uma função do tempo em contenção ortodôntica usados por pacientes que sofrem de apneia do sono.

Carvalho et al., 2006 estudaram como a mandíbula se comporta sob cargas estáticas e de impacto que atuam sobre implantes dentários. Os sensores FBG e SG (*strain gauge*) padrão foram colados diretamente na superfície de uma mandíbula de cadáver humano, para medir a tensão óssea. Para além de uma excelente correlação entre os dois tipos de sensores, o

sensor FBG foi considerado mais preciso na previsão de transferência de carga a partir do implante no osso. Como os dispositivos não-condutores, sensores FBG podem oferecer novas aplicações, pois é tecnicamente complexo para usar SG em metais condutores (Carvalho et al., 2006).

No estudo de Milczewski et al., 2006 descreve-se um procedimento experimental para monitorar as cargas aplicadas através de um dispositivo ortodôntico utilizando sensores FBG. O dispositivo experimental é constituído por um suporte metálico (do tipo Typodont) que contém elementos dentários artificiais. Um sensor FBG em fibra de alta birrefringência (HiBi) foi colocado entre o acessório ortodôntico (Edgewise Standart 0.022", 4mmx5mm) e o dente. Os resultados demonstram a adequabilidade do sensor para a aquisição de dados sobre as forças exercidas num dente induzidas pelas cargas colocadas no dispositivo ortodôntico.

Em outra pesquisa de Milczewski et al., 2012 o objetivo foi mostrar a possibilidade de utilizar sensores FBG para instrumentar partes de uma maxila artificial e medir a tensão interna transmitida pelos aparelhos ortodônticos e ortopédicos para os dentes e para o osso adjacente. Os sensores detectaram que as forças ortodônticas não foram transmitidas para a superfície da maxila. Essa informação é importante para elucidar e correlacionar os efeitos indesejáveis como a absorção da raiz do dente e dor local durante o tratamento ortodôntico.

Alguns estudos têm relatado o uso de sensores FBG para monitorar o processo de cura dos cimentos resinosos odontológicos (Alberto et al., 2011; Milczewski et al., 2006; Ottevaere et al., 2005; Ottevaere et al., 2001; Franco et al., 2012; Pulido et al., 2014). Na experiência de Tiwari et al., 2011 foi estudado a capacidade de absorção de cargas em protetores bucais.

Um estudo semelhante aos de cimentos resinosos odontológicos contribuiu para confirmar que os sensores FBG tem melhor aplicabilidade que o padrão, tornando-os adequados para utilização em ensaios pré-clínicos de próteses e implantes ortopédicos (Ramos et al., 2006).

Ren et al., 2007 utilizaram o sensor FBG para monitorar tensões de tendões e ligamentos de cadáveres em diferentes posturas e na locomoção.

Fresvig et al., 2008 avaliaram a utilização de sensores FBG para detectar a deformação no osso fêmur de cadáver humano em condições in vitro, foi demonstrado que os sensores FBG podem ser utilizados como uma ferramenta para medir a tensão óssea através da realização de medições tanto em um tubo acrílico quanto em uma amostra extraída de diáfise femoral humana. Foram utilizados quatro sensores de fibra óptica e quatro SG, intercalados a

cada 45 ° em torno da circunferência. Não foram encontradas diferenças significativas entre os SG e FBG, nem nas medidas de tubo de acrílico, nem nas amostras de osso. FBG são portanto bem adequados para as medições dinâmicas da tensão no osso *in vitro* e deve também ser adequado para utilização no osso *in vivo*.

No estudo de Dennison et al., 2008 foi utilizada uma unidade funcional da coluna que consistia de duas vértebras separadas por um disco intervertebral (DIV) com seus ligamentos intactos extraída de um cadáver de porco para medição de deformações no DIV após aplicação de cargas que variaram de 0 a 500N. O sensor FBG foi inserido no DIV com um agulha de modo que ficasse o mais próximo do núcleo do disco. O mesmo procedimento foi repetido com SG. Concluiu-se que medidas de pressão do disco intervertebral realizados usando o FBG também mostram excelente repetibilidade e concordância com os resultados obtidos utilizando o sensor strain-gauge. Roriz et al., 2011, também introduziram um sensor FBG no disco intervertebral da coluna vertebral de um cadáver de porco para mensuração da deformação do DIV após compressão axial.

Em um estudo realizado por Carvalho et al., 2011, resultados mostraram que as células osteoblásticas foram capazes de aderir e proliferar sobre a fibra com ou sem revestimento de proteção, apresentando excelente citocompatibilidade osteoblástica e a FBG manteve a integridade física assim como sua funcionalidade, o que indica que há um grande campo de estudo a ser explorado.

No estudo de Karam, Milczewski, & Kalinowski, 2012 o sensor FBG foi aplicado no ligamento periodontal em uma mandíbula de porco logo após o abate para monitorar as propriedades mecânicas e físicas do ligamento em resposta à carga. Os carregamentos foram aplicados a partir de um durômetro, verticalmente ao dente, assim como as forças mastigatórias. Com o estudo foi possível compreender dificuldades relacionadas a adesão do sensor ao tecido.

Em outro estudo de Karam et al., 2014 o sensor foi fixado à tuberosidade massetérica de um bovino *ex vivo* utilizando condições cirúrgicas normais, a fim de determinar padrões mastigatórios, e principalmente compreender melhor possíveis regiões de concentração de deformações ósseas. Mesmo tendo em conta a experiência realizada em condições *ex vivo*, o estudo teve como principal ganho o aperfeiçoamento metodológico para um futuro estudo onde a aplicação fosse realizada *in vivo*.

2.5 CONTROLE DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL E MANEJO DE PASTAGENS

O estudo do comportamento alimentar animal tem como um dos seus objetivos avaliar a qualidade da alimentação e selecionar a melhor pastagem no que diz respeito principalmente ao ganho de peso e/ou melhoria de outros índices zootécnicos (Silva et al., 2009).

Ao pensar de forma mais global sobre o problema, compreende-se que além de poder monitorar o consumo de alimentos e determinar sua produtividade, pode-se compreender hábitos e impactos sobre o ecossistema, além de ter controle sobre a rotina animal e poder compreender mais sobre as melhores condições no que diz respeito a saúde e bem estar animal (Clapham et al., 2011).

As técnicas de monitoramento dos hábitos alimentares de animais de pastejo iniciaram com estudos de observação indireta, onde eram analisadas as quantidades de material ingerido e a quantidade de material excretado após o processo digestivo (Cordova et al., 1978). O primeiro método direto de monitoramento utilizava de sensores mecânicos na mandíbula do animal, que avaliavam o movimento mandibular (Chambers, Hodgson, & Milne, 1981).

No início da década de 1990, surgiram as primeiras pesquisas com a utilização de técnicas de gravações acústicas para identificar padrões de comportamentos de ruminantes em pastagens (Laca, Ungar, & Demment, 1994; Laca et al., 1992). Na década seguinte diversos autores (Galli et al., 2006; Galli et al., 2011; Griffiths et al., 2006; Ungar & Rutter, 2006) utilizaram das técnicas de gravações acústicas de forma sincronizada com a gravação de vídeos e desta forma comparar e definir padrões acústicos relacionados ao tipo de alimento ingerido pelo animal. Entretanto, dois problemas se destacam, sendo eles a grande presença de ruídos acústicos e a necessidade de classificação manual, que pode ser uma atividade exaustiva e lenta.

A fim de diminuir a necessidade de trabalho manual, (Wosniak et al., 2012) utilizaram de um sensor FBG para medir a deformação em uma caveira de um caprino. Após a instrumentação foram realizados testes com a utilização de diferentes alimentos e materiais, com o objetivo de juntar o maior número possível de informações a cerca das deformações geradas no tecido ósseo e com isso poder alimentar uma base de dados que serviria de treinamento para redes neurais que depois foram utilizadas para identificação de padrões e automatizar a classificação dos dados obtidos (Wosniak et al., 2012).

3 PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO APLICADOS A REDES DE BRAGG EM FIBRA ÓTICA CONTAMINADAS

Para o desenvolvimento do presente trabalho utilizou-se de fibras óticas monomodo padrão Draktel® (ESMF) para utilização em telecomunicações, com 125 μ m de diâmetro. Não foi realizado nenhum processo para aumento da fotossensibilidade.

Dentre os vários métodos para gravação de redes de Bragg em fibra ótica, utilizou-se o método de iluminação direta sob máscara de fase. No processo de gravação o laser utilizado foi um Excímero (KrF) com comprimento de onda central em 248nm, pulsos de 5ns, ajustado para uma energia de pulso de 7mJ e taxa de repetição de 250Hz. Utilizou-se uma íris com abertura de aproximadamente 3mm, definindo-se o comprimento da rede de Bragg em aproximadamente 3mm.

Os sensores foram gravados nas mesmas condições e optou-se por padronizar a amplitude refletida pelas redes de Bragg em aproximadamente 20dBm.

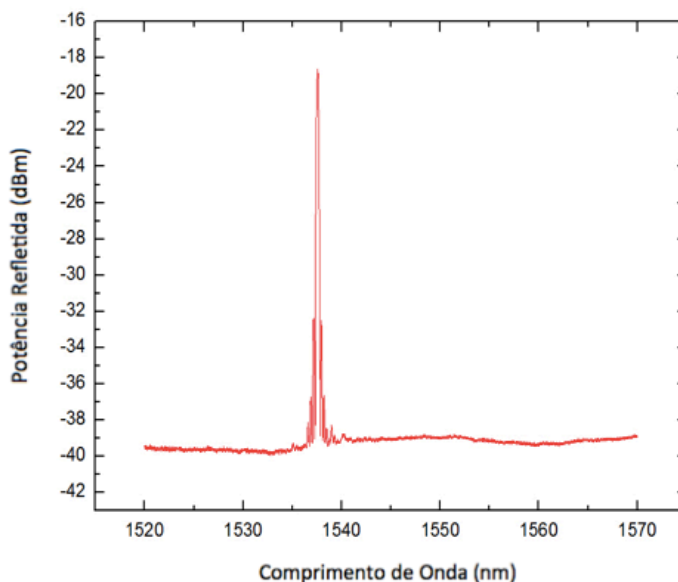


Figura 2 – Espectro em reflexão de uma rede de Bragg padrão utilizada como sensor no trabalho

Para todos os estudos relacionados a este trabalho, foram utilizadas redes de Bragg em fibras óticas gravadas desta mesma forma, com o mesmo padrão. Variações relacionadas ao comprimento de onda central do sensor são apresentadas devido a utilização de diferentes máscaras de fase. Já pequenas diferenças de amplitude ($\pm 5\text{dBm}$) do sinal refletido podem ser geradas por pequenos problemas de acoplamento ótico.

A sensibilidade das FBG para deformações mecânicas é, tipicamente, $1\text{pm}/\mu\epsilon$, valor utilizado para conversão de leituras de comprimento de onda para deformação.

No que diz respeito aos processos de descontaminação, as perspectivas de estudo do presente trabalho fizeram com que fosse necessário um estudo preliminar de comportamento das redes de Bragg em fibra ótica submetidas a processos de esterilização e desinfecção.

Para que estudos *in vivo* sejam pensados e desenvolvidos, é necessário que haja certeza de que todo o material que será implantado no animal esteja esterilizado e desinfetado, desta forma optou-se por estudar a eficiência dos principais métodos de esterilização e desinfecção bem como o comportamento do sensor antes e depois das condições específicas de cada método.

3.1 METODOLOGIA DE CONTAMINAÇÃO DE FIBRAS ÓTICAS

Aleatoriamente, 210 amostras de fibra ótica foram preparadas. Cada amostra apresentava 2cm de comprimento, com sua primeira metade descascada. Para o desenvolvimento da pesquisa foram selecionadas duas bactérias (*E.Coli* e *S.Aureus*) devido a concentração das mesmas nas mãos e cavidade oral de humanos. Sendo estas contaminantes em potencial.

Todas as amostras foram randomicamente separadas em sete grupos de acordo com o processo de desinfecção e esterilização ao qual iria ser submetido; a partir deste ponto, cada grupo foi dividido em três subgrupos como detalhado na tabela abaixo:

Quadro 2 - Divisão das amostras de fibras óticas de acordo com o método utilizado e os agentes biológicos aos quais foram expostos.

Grupos	Métodos de Esterilização e Desinfecção	Subgrupos		
		1.1 <i>E. coli</i>	1.2 <i>S. aureus</i>	1.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
1	Controle	1.1 <i>E. coli</i>	1.2 <i>S. aureus</i>	1.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
2	Autoclave	2.1 <i>E. coli</i>	2.2 <i>S. aureus</i>	2.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
3	Óxido Etileno	3.1 <i>E. coli</i>	3.2 <i>S. aureus</i>	3.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
4	Hipoclorito de Sódio	4.1 <i>E. coli</i>	4.2 <i>S. aureus</i>	4.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
5	Cloramina T	5.1 <i>E. coli</i>	5.2 <i>S. aureus</i>	5.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
6	Ácido Peracético	6.1 <i>E. coli</i>	6.2 <i>S. aureus</i>	6.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>
7	Radiação Ultra-Violeta	7.1 <i>E. coli</i>	7.2 <i>S. aureus</i>	7.3 <i>E.coli</i> + <i>S. aureus</i>

Após a separação de todos os grupos em seus respectivos tubos de ensaio, todas as amostras foram contaminadas por imersão em uma solução salina, as quais continham 10⁵ a 10⁸ células por mL (0,5 na escala de McFarland), conforme a figura 3. Todas as amostras foram mantidas em estufa para cultivo, com temperatura controlada em 37°C por um tempo de 72 horas.

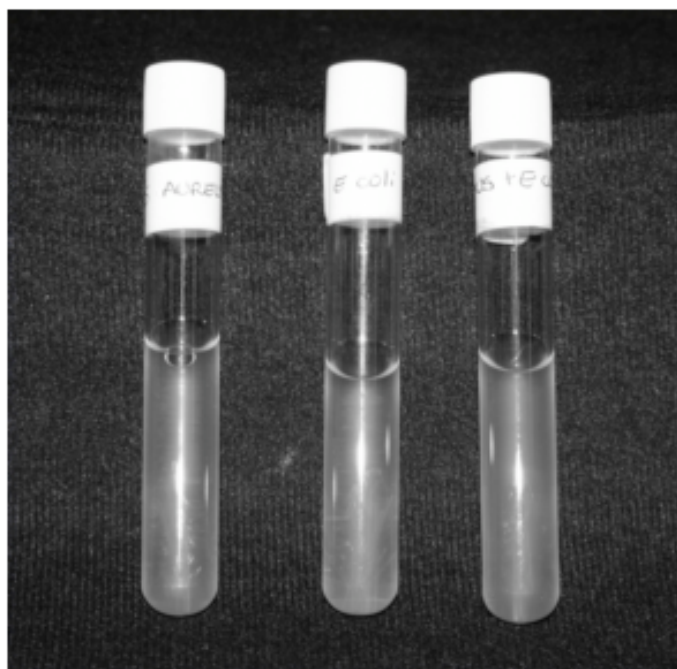


Figura 3 – Fotografia das soluções salinas contendo células de bactérias *E. Coli* (primeiro tubo do lado esquerdo), *S. Aureus*, *E. Coli* com *S. Aureus* (último tubo do lado direito)

3.2 METODOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO

Após o término do tempo do processo de cultivo celular, onde as fibras óticas foram devidamente expostas e contaminadas, as amostras foram submetidas a processos de esterilização e desinfecção, onde foram divididas em grupos para cada método:

- Grupo 1 – Grupo controle: As fibras não foram submetidas a nenhum processo de desinfecção ou esterilização;
- Grupo 2 - Autoclave: Esterilização em uma temperatura de 132 à 135°C por 30 minutos em grau cirúrgico;
- Grupo 3 – Óxido Etileno: Esterilização em solução de óxido etileno de 550 à 750mg/L por 180 minutos em grau cirúrgico;
- Grupo 4 – Hipoclorito de Sódio: Desinfecção por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio 5,25% por 20 minutos em temperatura ambiente;
- Grupo 5 – Cloramina T: Desinfecção por imersão em solução de cloramina T por 20 minutos em temperatura ambiente.
- Grupo 6 – Ácido Peracético: Desinfecção por imersão em ácido peracético por 20 minutos em temperatura ambiente;
- Grupo 7 – Radiação Ultra Violeta: Esterilização em uma câmara de radiação ultra violeta de 500W por 20 minutos com exposição direta em uma placa de petri aberta.

Após a realização de todos os processos de esterilização e desinfecção, cinco fibras foram removidas dos tubos de ensaio, lavadas com uma solução salina e colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura (BHI), conforme a figura 4.



Figura 4 – Fotografia de redes de Bragg em fibra ótica imersas em um meio de cultura BHI

Todos os tubos foram agitados, individualmente, por um minuto e deixados em repouso por 48 horas em uma estufa com temperatura controlada em 37°C para que fosse possível a reprodução de qualquer unidade celular presente no meio de cultura.

3.3 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO E DESINFECÇÃO

Após o final do período de 48 horas, os tubos que apresentaram turbidez no líquido do interior do tubo de ensaio, foram considerados positivos para a presença de bactérias, desta forma o processo de esterilização e desinfecção foi ineficiente. Caso o tubo esteja cristalino, não apresentando turbidez, o resultado será negativo, considerando o processo de esterilização ou desinfecção eficiente.

Após a análise de turbidez, dois espécimes de cada subgrupo foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação visual da ação de cada meio de esterilização e desinfecção sobre as fibras óticas utilizadas e divididas nos diferentes grupos do presente estudo.

Os espécimes contaminados e submetidos aos diferentes meios de esterilização e desinfecção foram montados no suporte metálico, metalizados com liga de ouro e observados em MEV (Shimadzu, SSX-550). Foram realizadas imagens das porções das fibras óticas com cobertura polimérica, sem cobertura polimérica e da interface entre elas. Primeiramente foi

obtida uma imagem da interface entre as porções com e sem cobertura polimérica de cada fibra ótica com aumento de 270x. Posteriormente, selecionou-se a porção com e sem cobertura polimérica das fibras óticas e obteve-se outras duas imagens de maior aumento (2400x).

3.4 ANÁLISE DE TURBIDEZ EM SOLUÇÕES CONTAMINADAS E ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após 48 horas na estufa para cultivo celular, os tubos de ensaio foram removidos e colocados lado a lado em uma superfície escura para que fossem analisados os resultados de forma comparativa.

Desta forma, os resultados demonstraram que os grupos 2, 3, 4, 5 e 6 revelaram eficiência na inativação de *E. coli*, *S. aureus* e da associação entre as duas espécies bacterianas como demonstrado na figura 5, a seguir.

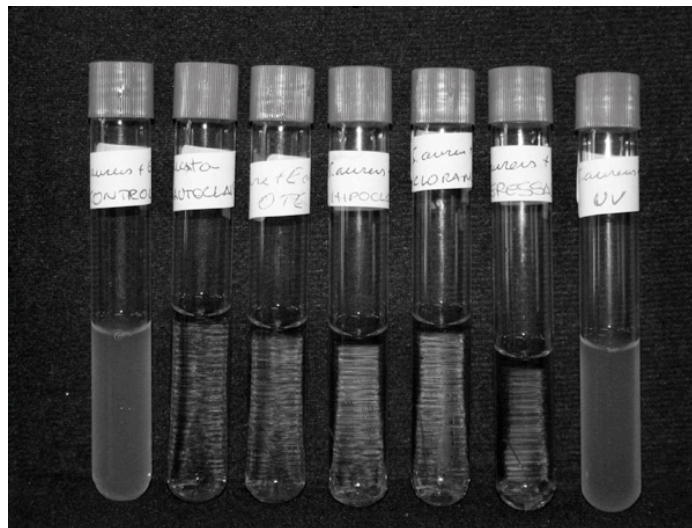


Figura 5 – Apresentação dos resultados dos processos de esterilização e desinfecção de fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* e *E. Coli*.

Como pode-se perceber na figura 5, o grupo 7 apresentou turbidez, o que significa que o método não apresentou resultado eficaz na eliminação (quando o microrganismo é eliminado por meio de explosão celular, que é comum em ataques químicos) e inativação (quando as

cadeias peptídicas da sequência de DNA sofrem quebras e perdem a capacidade de reprodução) dos microrganismos estudados. Sendo assim, conclui-se que o método de esterilização por meio de radiação ultravioleta não apresentou efetividade na eliminação e/ou inativação dos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*.

Para complementar os experimentos descritos acima, foram obtidas imagens em MEV para verificar a presença de microrganismos na superfície das fibras óticas analisadas, vale salientar que os resultados do estudo de turbidez e do estudo com MEV são complementares, uma vez que em diversos métodos, mesmo que haja a presença de microrganismos, eles podem estar inativos, o que não compromete nenhum resultado apresentado anteriormente.

O primeiro método com amostras analisadas com MEV, foi a autoclave. A autoclave, apresenta características positivas para o uso na prática clínica, principalmente relacionadas aos custos de aquisição, manutenção e utilização, por isso é presença constante em consultórios odontológicos, hospitais e centros de saúde. Quanto a eficiência do processo de esterilização e desinfecção, o método apresentou resultados positivos no que se refere à eliminação e inativação dos microrganismos estudados garantindo um nível adequado de esterilidade.

No que diz respeito as fibras óticas submetidas ao processo de autoclave, que foram analisadas por meio de MEV, percebe-se claramente (Figura 6) a presença de microrganismos, porém os mesmos estão inativos, graças às altas temperaturas e pressão aos quais são submetidos. As condições de temperatura e pressão são capazes de gerar a quebra das cadeias peptídicas da sequência de DNA, impedindo a reprodução mesmo que em um meio de cultura com condições nutritivas e térmicas adequadas.

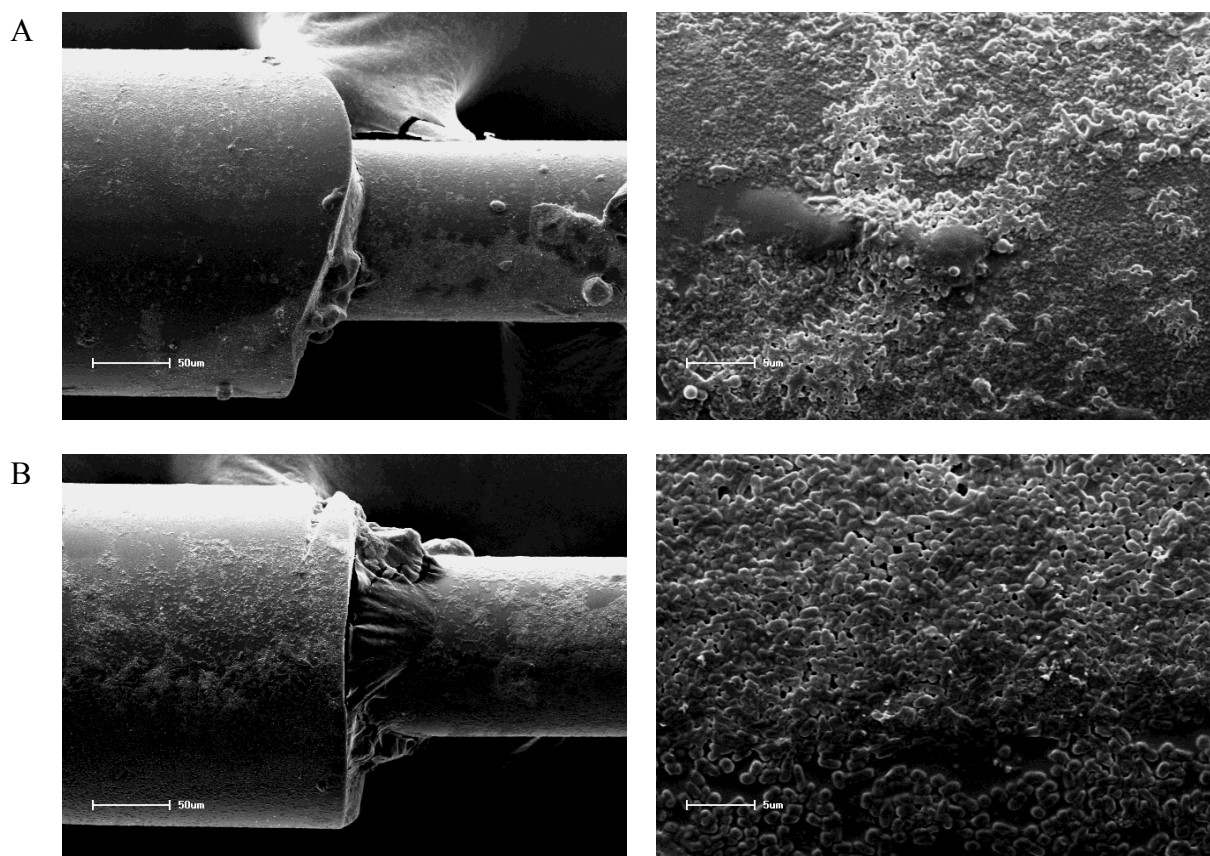


Figura 6 – MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por autoclave.

O segundo método analisado por meio de MEV foi o método de iluminação UV, o qual em teoria, seria capaz de gerar um processo de esterilização e desinfecção a partir da exposição da amostra a radiação UV concentrada.

Apesar da utilização de esterilização via iluminação UV ter sido proibida na área médica em 1992 no Brasil, por meio da Portaria nº 930/92 do Ministério da Saúde, foi testada a eficiência do processo para validar a literatura e para analisar possível resposta negativa que este processo de esterilização poderia gerar em relação ao funcionamento das redes de Bragg. Nos ensaios de turbidez este método foi reprovado, comprovou-se por meio do presente estudo sua ineficiência na eliminação ou inativação de microrganismos como a *E. coli* e *S. aureus*.

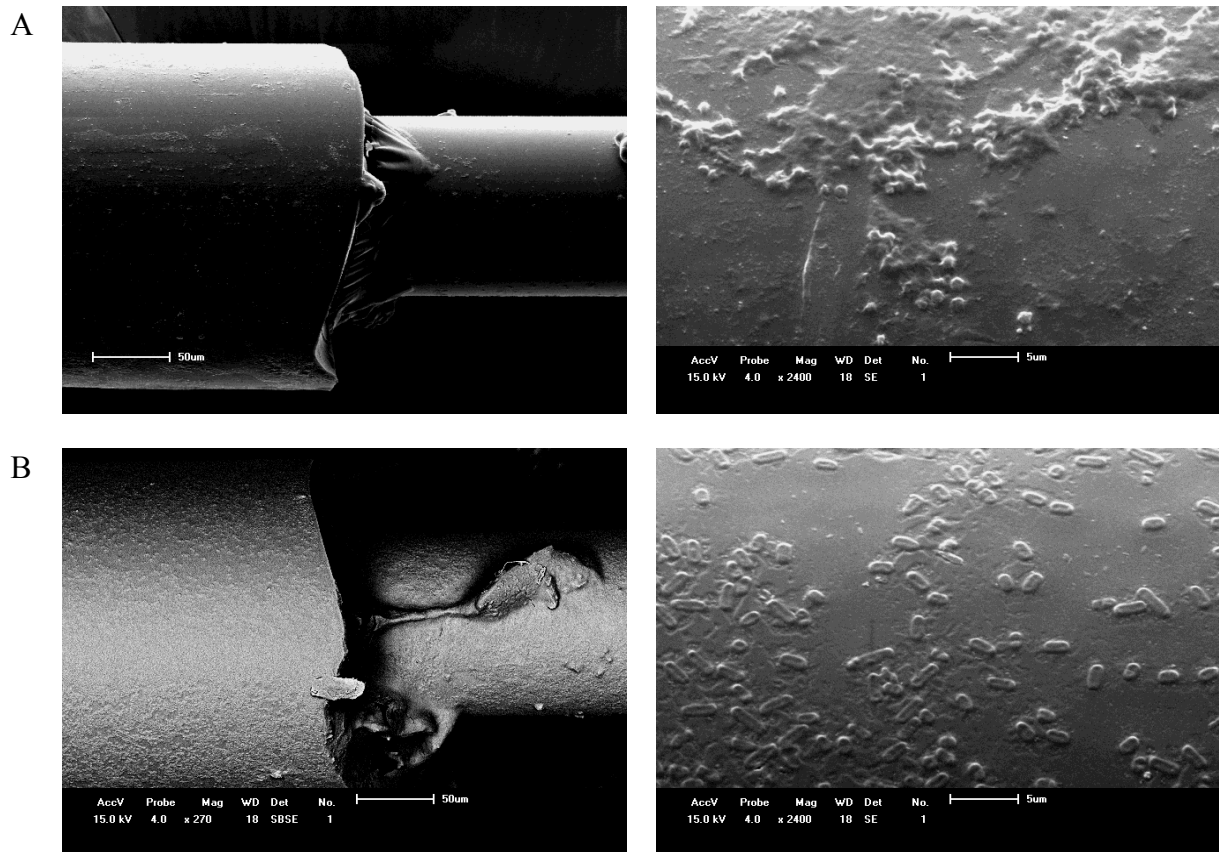


Figura 7 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por radiação UV.

Na figura 7, pode-se perceber que há a presença de microrganismos, os mesmos estavam presentes na superfície da fibra ótica e da mesma forma foram capazes de se reproduzir a ponto de gerar turbidez no tubo de ensaio utilizado nos testes preliminares.

O próximo método a ter suas amostras analisadas foi o óxido de etileno, que apresenta uma alta reatividade, explicada pela sua alta energia de combustão, somada com sua alta difusibilidade. Sendo essas suas principais características que garantem um processo eficaz de inativação dos microrganismos, características confirmadas nos resultados do presente estudo de turbidez com bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

A letalidade da esterilização com óxido de etileno depende de 4 parâmetros: (1) concentração, (2) tempo de exposição, (3) temperatura e (4) humidade. O aumento da concentração de óxido de etileno dentro de certos limites resulta em extensão da inativação microbiana e diminuição do tempo de exposição (Dinsmore, 1969).

Uma das principais desvantagens desse gás é que ele é altamente tóxico quando inalado ou ingerido. Além disso, existem estudos que observaram resíduos secundários potencialmente tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em equipamentos médicos esterilizados, limites esses, que hoje são regulamentados pela ISO 10993-7, 1995. Por esse motivo, métodos de aeração dos equipamentos médicos após a esterilização com óxido de etileno são requeridos e carecem de um maior número de estudos (Carraway & Ghosh, 2006; Hallowell, Murphy, & Mangiaracine, 1975; Kurze et al., 1977; Manius, 1984; Seyfert, Biehl, & Schenk, 2002)

Devido aos riscos inerentes da sua utilização o seu emprego é recomendado na esterilização de produtos médicos-hospitalares delicados, cuja exposição ao calor úmido sob pressão possa acarretar danos. Atualmente a utilização do óxido de etileno apresenta mínimos riscos pessoais desde que seguidas a risca as normas da *Occupational Safety and Health Administration EO*.

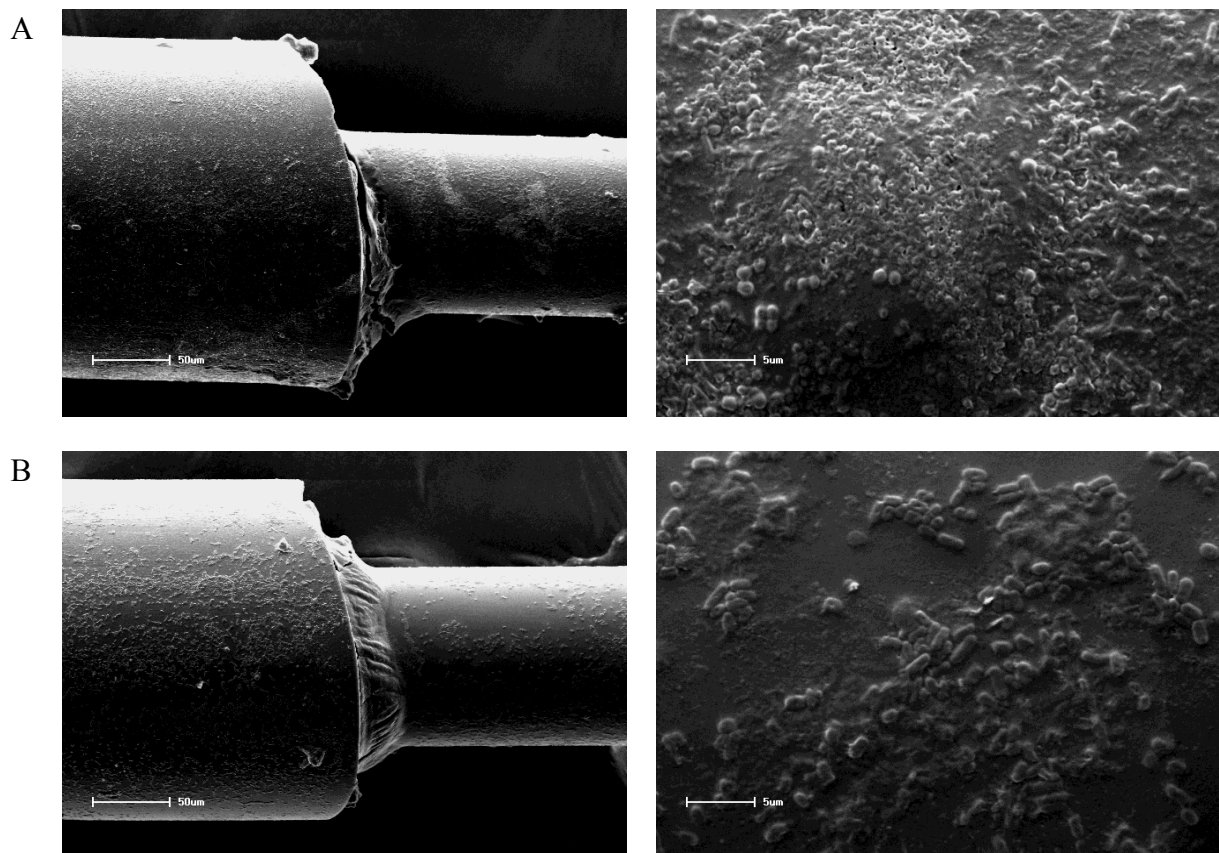


Figura 8 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por Óxido Etileno.

A figura 8 apresenta as imagens decorrentes da MEV das fibras óticas submetidas aos processos de esterilização e desinfecção por óxido de etileno, as mesmas apresentam a presença de microrganismos, entretanto estes estavam inativos graças a eficiência do processo, confirmada pelo ensaio de turbidez.

Dando sequência aos testes realizados nas amostras do estudo, foi realizada análise das fibras óticas expostas a solução de hipoclorito de sódio. Este método se trata de um ataque químico aos microrganismos, capaz de corroer a parede celular dos mesmos.

A ausência de turbidez detectada nos frascos contendo os sensores de Bragg contaminados com *E. coli*, *S. aureus* e mista confirmaram a efetividade do hipoclorito de sódio 5,25% na eliminação e inativação dos microrganismos.

Por se tratar de um ataque químico com propriedades lesivas a parede celular, havia a dúvida do comportamento dos microrganismos, e como seria o resultado de uma possível MEV nas amostras, que foi realizada posteriormente.

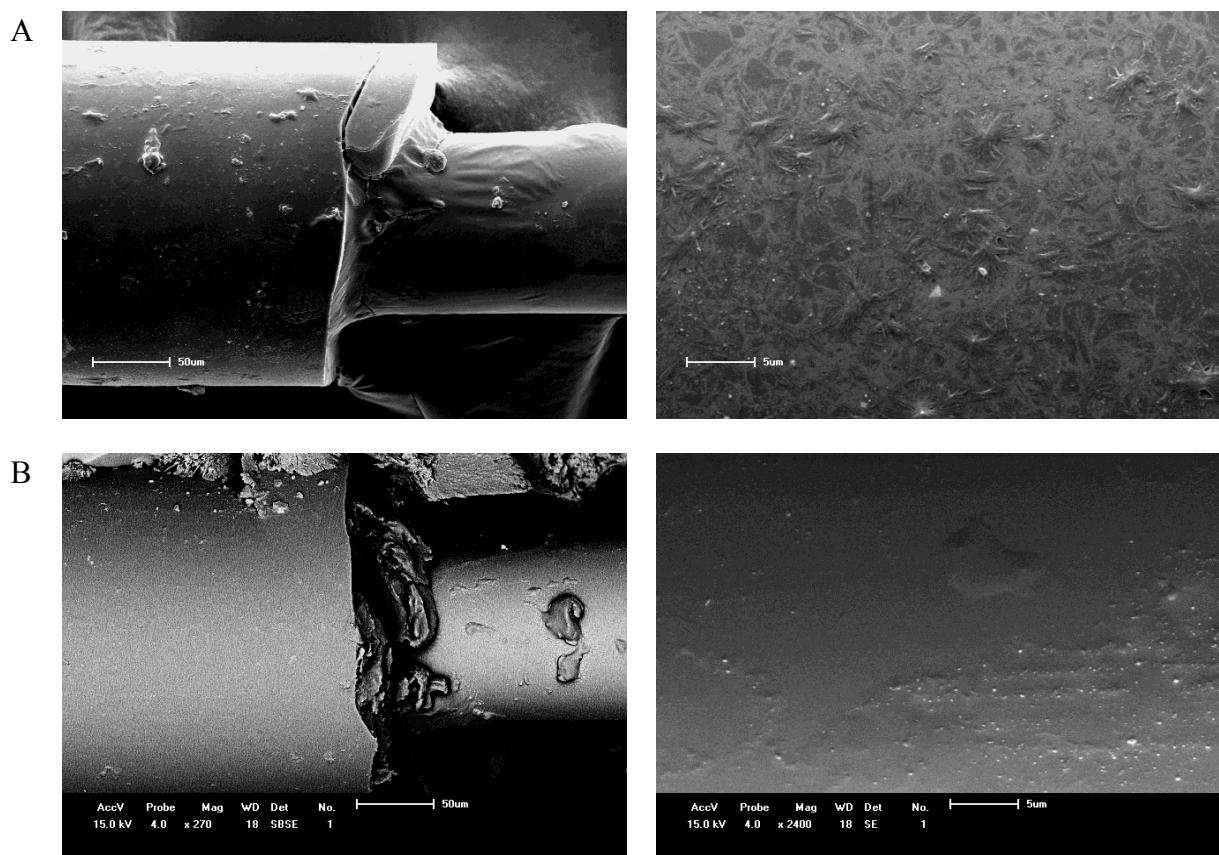


Figura 9 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por Hipoclorito de Sódio

A figura 9 apresenta uma MEV de fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* e *E. Coli* após esterilização e desinfecção por contato direto com hipoclorito de sódio a 5,25%. Como imaginado, na imagem não se apresentam microrganismos, já que os mesmos tiveram suas paredes celulares rompidas quimicamente, por este motivo, houve eficiência no processo de esterilização, impedindo que houvesse proliferação dos microorganismos.

Dando sequência ao estudo foram analisadas amostras de fibras óticas contaminadas expostas a solução de Cloramina T.

O objetivo da cloramina T é a desinfecção de superfícies de fibras óticas que foram contaminadas com bactérias por meio do contato manual, sem que haja a presença de matéria orgânica, como sangue e tecidos, visando um melhor comportamento da solução (como entendido na revisão da literatura do tema). Os resultados demonstraram que a cloramina T apresentou eficiência na inativação de *E. coli*, *S. aureus* e da associação entre as duas espécies bacterianas após análise do ensaio de turbidez.

Como apresentado na revisão da literatura, a utilização de cloramina T na desinfecção, deve-se a quanto menor a quantidade de matéria orgânica, melhor é o efeito de desinfecção do produto, desta forma percebe-se que o escopo do trabalho condiz com o perfil de ação do método, justificando-se assim a eficiência da cloramina T no processo proposto.

Considerando que a Cloramina T é um método de desinfecção e que atua na inativação do microrganismo, impedindo o uso da sua capacidade reprodutiva, era esperado que na MEV fosse observado a presença dos microrganismos, que foi confirmada pela figura 10.

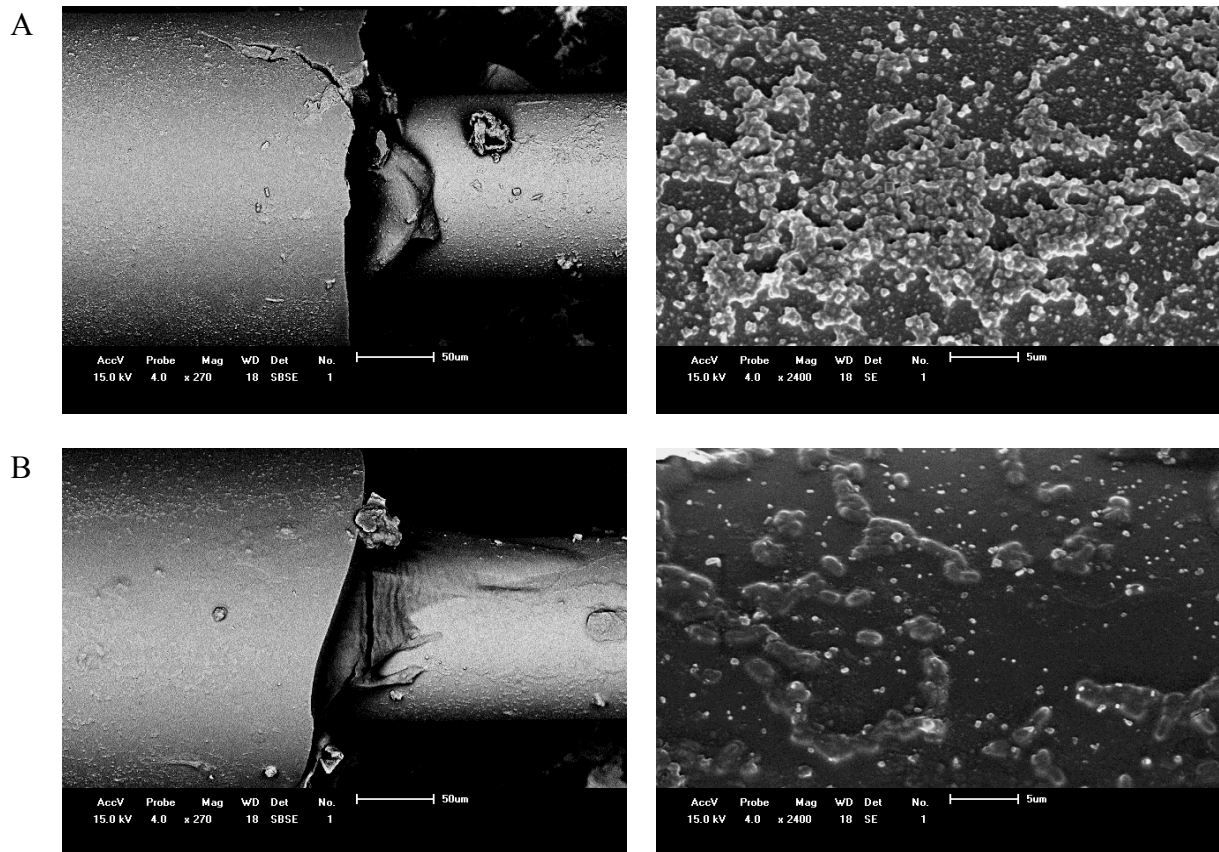


Figura 10 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por Cloramina T.

Na continuidade do trabalho, foram analisadas amostras submetidas a presença do ácido peracético, que mostrou-se efetivo na eliminação dos microrganismos estudados (que apresentou resultados positivos a esterilização e desinfecção nos ensaios de turbidez para ambas as bactérias), principalmente quando se trata do microrganismo *S. Aureus* nas análises de MEV.

Pode-se perceber ao visualizar a figura 11, que a fibra ótica contaminada com o microrganismo não apresentou número de células significativo. No caso da presença do microrganismo *E. Coli*, apesar do número de células elas demonstraram inatividade no ensaio de turbidez. As diferentes características dos dois microrganismos justifica a diferente resposta ao mesmo método de desinfecção. O ácido peracético atua na oxidação da parede celular, alterando sua permeabilidade, no interior da célula danificando o sistema enzimático, causando a desnaturação de proteínas e conseqüentemente, destruindo o microrganismo. Os resultados foram satisfatórios quando comparados MEV e os ensaios de turbidez no cultivo dos microrganismos.

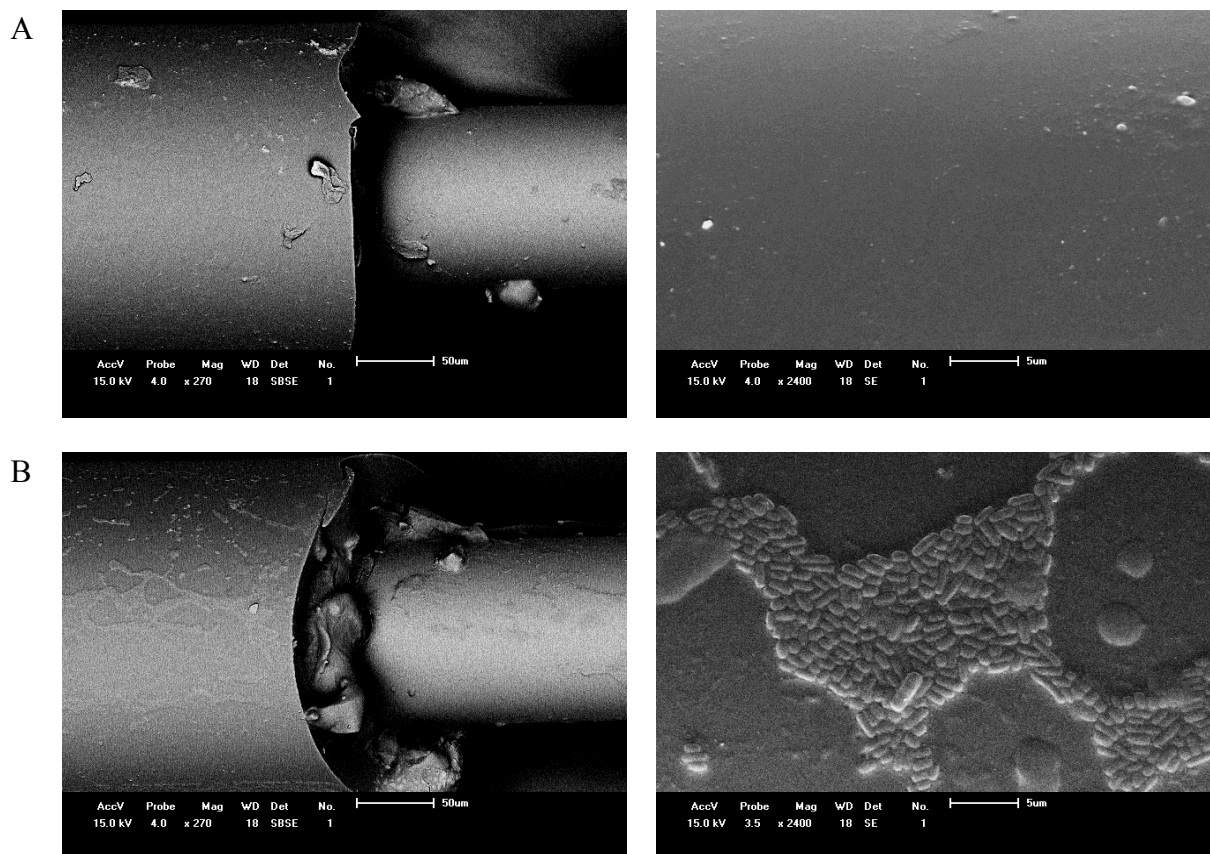


Figura 11 - MEV demonstrando fibras óticas contaminadas com *S. Aureus* (A) e *E. Coli* (B) após esterilização por Ácido Peracético.

Para averiguar o comportamento das FBGs nos períodos pré e pós esterilização ou desinfecção, foram analisados os espectros completos dos sensores na faixa de 1520 a 1570nm.

Utilizou-se 5 amostras de FBG padrão gravadas em fibra ótica comercial de aplicação em telecomunicações para cada um dos métodos de esterilização e desinfecção, todas foram analisadas individualmente e comparadas antes e depois dos processos as quais foram submetidas.

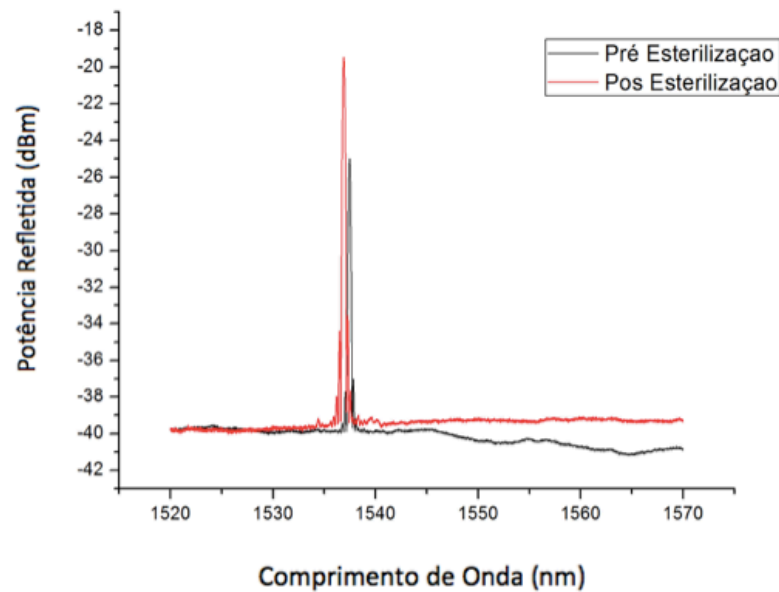


Figura 12 – Gráfico apresentando o espectro da rede da FBG pré e pós esterilização por UV

Conforme apresentado na figura 12, a FBG submetida a esterilização por iluminação UV apresentou um deslocamento de 25pm no pico do comprimento de onda refletido pela FBG, não tendo alterado o comportamento do sensor. Vale ressaltar que no período em que foram realizados os testes, o laboratório do grupo de Dispositivos Fotônicos e Aplicações da UTFPR não tinha condições de controle térmico tão eficientes quanto as atuais, e levando em consideração que os testes foram realizados com 2 meses de intervalo entre eles, pode-se considerar que alterações térmicas foram responsáveis pelo fenômeno alteração do comprimento de onda refletido pela FBG.

Percebe-se uma alteração na potência refletida pela FBG que pode ser gerada por um possível “escurecimento” do vidro devido a uma mudança do centro de cor induzida pela iluminação UV, o que pode explicar o motivo pelo qual a linha de basal não é plana. Da mesma forma, problemas de acoplamento ótico ou emendas na fibra podem gerar alterações de espectro que não estão relacionadas a alterações na própria FBG.

Optou-se por apresentar somente um dos espectros para ilustrar melhor os resultados, já que todas amostras tiveram comportamentos similares.

3.5 CONCLUSÕES DO EXPERIMENTO

A partir dos estudos do capítulo 3, pode-se concluir que os métodos de esterilização e desinfecção autoclave, óxido etileno, hipoclorito de sódio, cloramina T e ácido peracético, foram eficazes para eliminação e ou inativação dos microrganismos, sem que haja alterações no comportamento das FBGs.

Com isso definem-se métodos aplicáveis para possíveis estudos, onde fibras óticas serão implantadas em animais *in vivo* para estudos de comportamento metabólico com a presença de materiais inorgânicos.

Levando em consideração os custos para esterilização com todos os métodos, a utilização de autoclaves se mostra a mais viável, graças a sua presença maciça no ambiente médico hospitalar.

Os próximos passos da pesquisa são a produção de mais FBGs, como descrito no início do capítulo, e a submissão das mesmas a processos de esterilização e desinfecção por meio de autoclaves para que os mesmos sejam testados *in vivo*, mesmo que sem sensoriamento, com o intuito de entender melhor a resposta do organismo à presença da fibra ótica.

4 AVALIAÇÃO DE BIOCAMPADIBILIDADE DE FIBRAS ÓTICAS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Após todos os testes necessários para assegurar que as FBGs poderiam ser esterilizadas e desinfetadas sem que houvessem danos ao comportamento do sensor, tornou-se necessário realizar testes adequados para comprovar que a instrumentação de animais com a utilização de fibras óticas não seria lesiva ao animal.

Para realização dos testes foi planejado um estudo onde seria realizado o implante de fibras óticas recobertas com polimetil-metacrilato (PMMA), e fibras óticas sem revestimento (diretamente a sílica no tecido animal) no tecido subcutâneo de ratos.

Os resultados positivos do estudo poderiam contribuir para o desenvolvimento de um sensor que pudesse ser implantado diretamente no tecido ósseo animal. Para o estudo foi optado pela utilização de ratos, devido ao baixo custo e possibilidade de realizar o estudo com um volume amostral relevante.

4.1 IMPLANTE DE FIBRAS ÓTICAS NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Para a avaliação da biocompatibilidade das fibras óticas, foram utilizados 12 ratos (*Norvegicus albinos* Wistar), machos, com idade variando entre 2 a 3 meses e peso corporal entre 160 e 250g, procedentes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os animais foram mantidos em condições de saúde satisfatória, recebendo alimentação adequada (Nuvilab®, Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo – Brasil) e água *ad libitum*. O estudo foi iniciado após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa tendo protocolo número 06327/2011.

Inicialmente os ratos foram pesados, identificados e divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=6) por grupo): Grupo 1: fibra ótica sem revestimento; Grupo 2: fibra ótica com revestimento. Nesse modelo experimental cada animal foi o seu próprio controle.

Os animais foram anestesiados de acordo com protocolo definido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (Menezes, 2013) sendo 3,75mL de quetamina - 100mg/mL (cloridrato de Cetamina a 1% Vetaset®), 0,5mL de xylasina – 100mg/mL (cloridrato de Xilasina a 0,2% - Virbaxyl ®) e 5,75mL de água destilada, na proporção de 0,2mL/100g de peso do animal. Após a tricotomia e desinfecção (álcool iodado) da região dorsal, foi realizado incisão central de aproximadamente 10mm de extensão, na região do terço médio do dorso do animal utilizando bisturi com lâmina nº15 e a seguir, divulsão do tecido, tanto para o lado direito como esquerdo, com uma tesoura com ponta romba.

Cada animal recebeu 1 implante no lado direito (fibras ópticas de 5mm de comprimento), o lado esquerdo (contra-lateral) foi o controle, sem implantação de material, somente submetido ao mesmo procedimento cirúrgico. Após a colocação da fibra óptica, foi realizada a sutura com pontos isolados utilizando fio de sutura e porta agulha.

4.2 ANÁLISE DE RESPOSTA DO TECIDO SUBCUTÂNEO AO IMPLANTE DE FIBRAS ÓTICAS

Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias do início do experimento. Para a obtenção das biópsias os animais foram novamente anestesiados de acordo com o protocolo já descrito. Em seguida, foi realizada a tricotomia e desinfecção da região. Foram obtidas duas amostras para cada animal, sendo uma do lado esquerdo (controle) e outra do lado direito (fibra).

A biópsia foi distendida em papel cartão de tamanho compatível, com o tecido conjuntivo em contato com o papel. Este procedimento faz com que as peças cirúrgicas permaneçam “abertas”, facilitando a fixação do tecido. Os animais foram sacrificados em seguida com aprofundamento da anestesia e deslocamento cervical.

As amostras foram fixadas com solução de formol tamponado a 4% em frascos unitários, com identificação do animal e grupo, por 48 horas. Antes da inclusão em parafina, foi realizada a remoção cuidadosa das fibras ópticas; posteriormente foram obtidos os blocos de parafina orientados paralelamente ao longo eixo, para realização de cortes semi-seriados com 5µm de espessura. Estes cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina

(H.E). Uma vez coradas, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro para microscopia de luz comum.

A análise histopatológica foi realizada por um operador sem o conhecimento do grupo e período experimental. As lâminas foram analisadas de forma descritiva considerando:

- A) Espessura da cápsula;
- B) Constituição do tecido conjuntivo;
- C) Severidade do infiltrado inflamatório;
- D) Composição celular do infiltrado inflamatório.

Os espécimes foram fotografados em um fotomicroscópio Olympus® BX41 (Olympus, Tokyo, Japan), obtendo-se imagens com resolução de 5.1 Megapixels (máquina digital Olympus Camedia C-5060, Tokyo, Japan).

4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS APÓS IMPLANTE DE FIBRA ÓTICA

O presente trabalho optou por fazer uma análise de fibras óticas implantadas no tecido subcutâneo de ratos a fim de perceber se haveria o aparecimento de qualquer reação que impossibilitasse a colocação de biosensores baseados em redes de Bragg em fibra ótica. As fibras analisadas foram fibras comuns de padrão utilizado em telecomunicações com e sem o recobrimento de polímero.

Foi detectado que ambas as amostras apresentaram sinais biológicos de resposta à lesão criada. Como o material implantado não é digerível pelo corpo humano a resposta inflamatória crônica está presente em ambos os grupos.

A instalação de um processo de inflamação crônica depende da presença de algumas situações que favorecem este estado, sendo elas: Infecções persistentes, irritações prolongadas, respostas imunes celulares e respostas inflamatórias agudas. No caso estudado o processo de irritação prolongada foi o fator determinante ao processo de inflamação crônica.

A irritação prolongada é gerada neste caso pela presença de um corpo estranho no tecido em estudo, sua baixa toxicidade contribui para que o processo inflamatório seja lento e

não haja destruição tissular na região. As reações de corpo estranho são responsáveis pela formação de granulomas de tipo corpo estranho, presentes no estudo histológico.

Durante o preparo do material foi necessária a retirada da fibra do local, logo após a deposição da parafina fundida, pois o micrótomo não é capaz de fazer cortes em sílica sem que haja danos no material biológico local. O granuloma de corpo estranho facilita o processo de retirada da fibra do local, já que há o encapsulamento do corpo estranho. Vale ressaltar que a fibra encapsada teve sua manipulação feita com mais facilidade do que a sem proteção.

Nenhum animal da pesquisa apresentou problemas de saúde durante os procedimentos cirúrgicos, bem como nos tempos de pós-operatório. Da mesma forma, durante a divulsão, não ocorreu sangramento e/ou perfuração do peritônio. Deste modo, nenhum rato foi descartado durante a pesquisa. Entre os materiais testados a fibra ótica com revestimento teve uma manipulação mais fácil. A fibra sem revestimento foi menos flexível, com corte e visualização mais difícil.

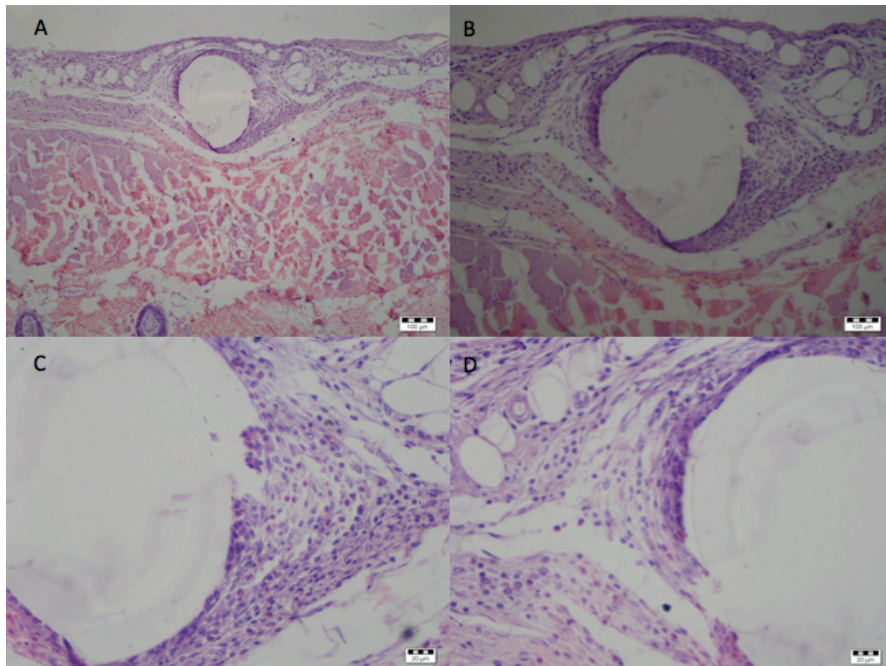


Figura 13 – Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 7 dias do implante (fibra com revestimento de PMMA) A) Aumento de 100X B) Aumento de 200X C) Aumento de 300X e D) Aumento de 400X

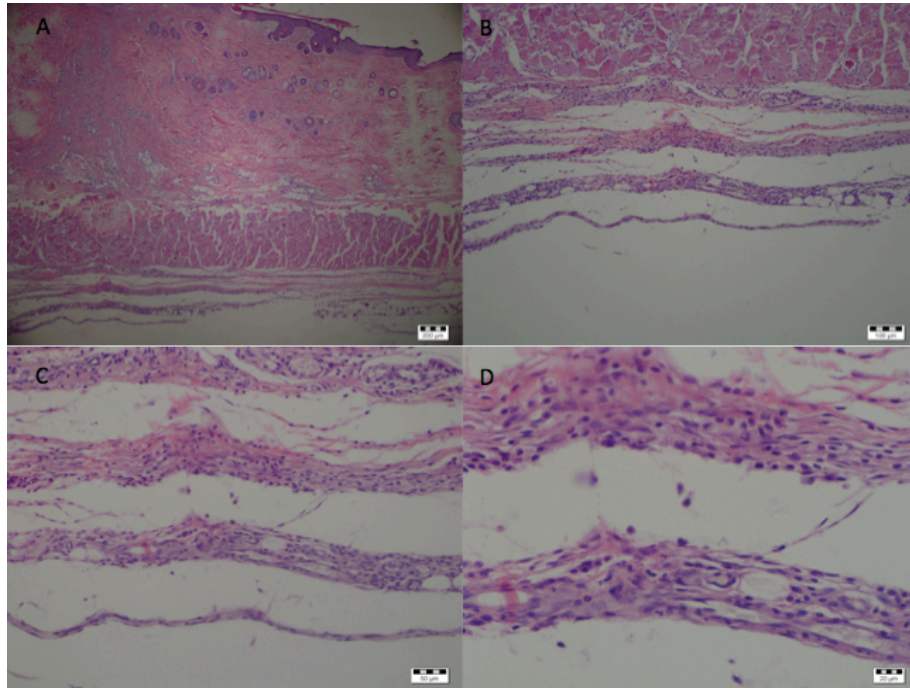


Figura 14 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 7 dias do implante (fibra sem revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X

Nas lâminas apresentadas na figura 13 e 14, pode-se perceber que em sete dias foram observadas células polimorfonucleares e mononucleares ao redor das fibras. O tecido conjuntivo apresentava fibroblastos e alguns fibrócitos. Foi constatado o desenvolvimento de um granuloma do tipo corpo estranho na periferia da fibra ótica de ambos os grupos. Notou-se a presença de macrófagos tipo epitelióides. Notou-se vasos sanguíneos e capilares na área analisada. O tecido do lado controle estava semelhante ao dos grupos teste. A fibra ótica sem revestimento não foi observada em alguns espécimes, sugerindo que a mesma pode ter sido esfoliada, ou a mesma não foi localizada devido ao pequeno diâmetro. No entanto, não foi observada reação inflamatória com presença de exsudação.

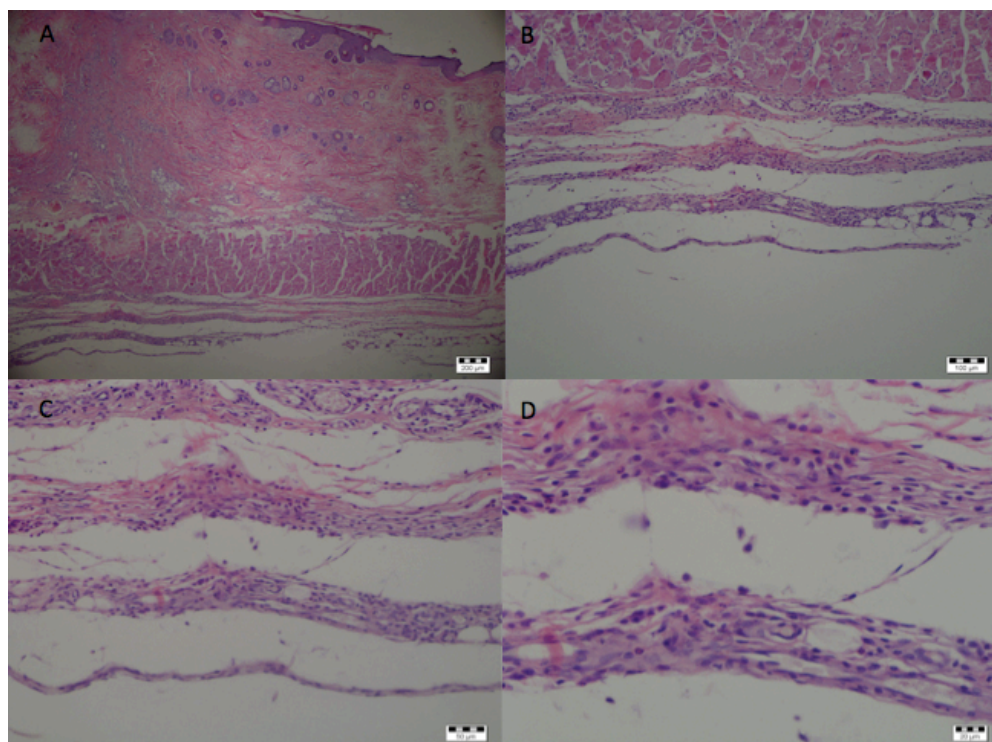


Figura 15 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 30 dias do implante (fibra com revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X

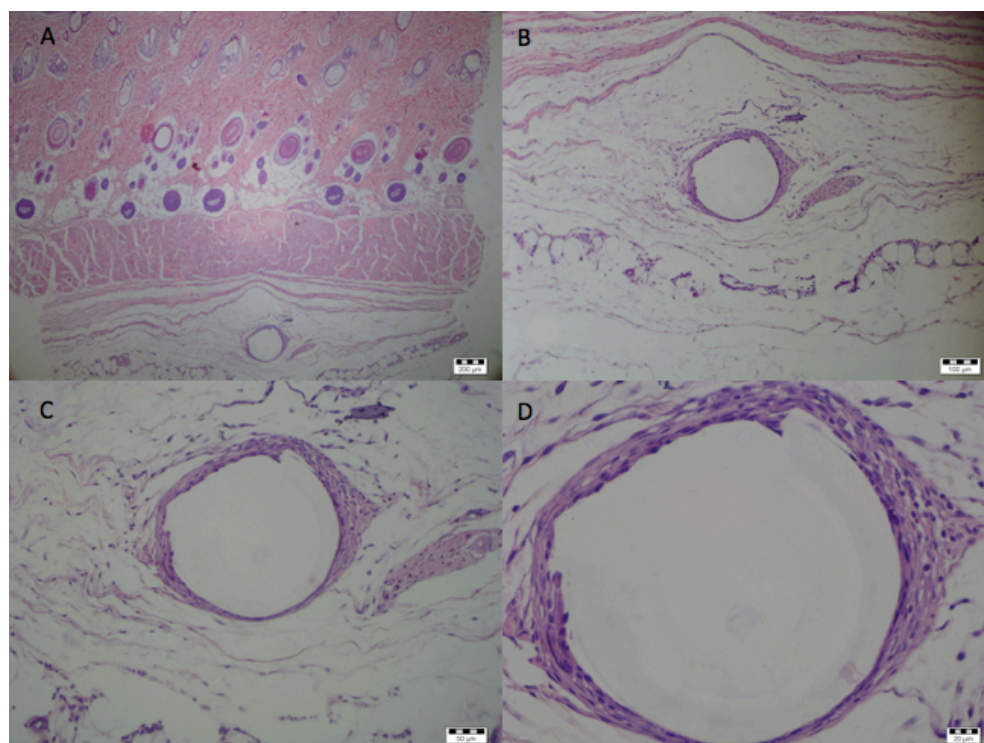


Figura 16 - Figura apresentando os resultados do implante de fibras óticas no tecido subcutâneo de ratos após 30 dias do implante (fibra sem revestimento de PMMA) A) Aumento de 40X B) Aumento de 100X C) Aumento de 200X e D) Aumento de 400X

Com as figuras 15 e 16, pode-se observar que em trinta dias há a presença de células polimorfonucleares, mononucleares, fibroblastos, fibrócitos, vasos sanguíneos e capilares nos dois grupos estudados. A reação de corpo estranho com fibrose ao redor das fibras ficou mais evidente. Pode-se ressaltar que a fibra ótica sem revestimento não foi observada em alguns espécimes, onde pode ter sido perdida no interior do tecido.

4.4 CONCLUSÕES DO ESTUDO

Baseada na análise descritiva dos cortes histológicos pode-se concluir que as fibras óticas sem revestimento e com revestimento foram biocompatíveis quando implantadas em subcutâneo de ratos. Sendo assim é possível contemplar o desenvolvimento de um sensor baseado em redes de Bragg em fibras óticas para implantação direta no tecido ósseo.

A continuidade do estudo contempla tentativas de instrumentação direta e indireta (com a presença de um transdutor) do tecido ósseo.

O primeiro estudo para o desenvolvimento do sensor foi a instrumentação da região do ligamento periodontal de mandíbulas de porcos, com o objetivo de tentar caracterizar as propriedades mecânicas do ligamento, além de desenvolver o próprio sensor para aplicações mais generalistas e diretamente sobre o tecido ósseo.

5 INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE SUÍNOS *EX VIVO*

A investigação para construção do biosensor da presente pesquisa se iniciou com trabalhos que tinham como objetivo a instrumentação direta da região do ligamento periodontal (LPD) de mandíbulas de suínos *ex vivo*. O principal objetivo foi mensurar deformações e caracterizar mecanicamente o ligamento periodontal, pois o tema é de grande relevância e vem sendo estudado por muitos pesquisadores, principalmente na área da ortodontia.

Todas as mandíbulas suínas utilizadas foram fornecidas pelo frigorífico Bizzinelli®, que as descartaria como resíduos orgânicos, desta forma o presente estudo não teve a necessidade de passar por avaliação de um comitê de ética e pesquisa com animais.

As FBGs utilizadas no estudo foram previamente descritas no capítulo 3, onde foi detalhado seu processo de fabricação e gravação.

5.1 METODOLOGIA DE INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO DO LPD DE SUÍNOS *EX VIVO*

Primeiramente utilizou-se de um bisturi e uma pinça para realizar a limpeza do material, foram retirados todos os tecidos ao redor da região para facilitar o processo de instrumentação.

Posteriormente, agulhas de acupuntura foram utilizadas para criar um canal de espessura suficiente para a passagem da fibra ótica com a rede de Bragg localizada na ponta da fibra.

A metodologia apresentou limitações principalmente devido a baixa resistência das agulhas, que dificultaram o processo de incisão, até as proximidades da raiz dental. Após alguns testes, percebeu-se que a metodologia deveria ser melhorada e optou-se por utilizar agulhas para aplicações endovenosas comuns de diversos tamanhos, sendo que a escolhida foi a de 25mm de comprimento por 0,8mm de espessura por ter seu desempenho melhor dentre as testadas.

Com agulhas de aplicação endovenosa comum, foi realizado um canal saindo da região das gengivas indo até as proximidades da região da raiz dental. O maior cuidado durante o processo da incisão é para que a agulha fique posicionada entre o dente e o osso alveolar, aproximadamente na interface entre o LPD e o osso.

Para a fixação da rede de Bragg foram testados três modelos comerciais de cianoacrilato. Os modelos foram o modelo *clássico*, o modelo *precision* (nome dado pelo fabricante, que é mais fluido e permite sua aplicação de forma mais precisa) e o modelo *flex gel* (que apresenta borracha em sua composição para oferecer uma maior flexibilidade e resistência, permitindo ajustes durante o processo de cura). Na figura 17 é possível visualizar o processo final onde a FBG estava devidamente fixada na região de interesse.



Figura 17 – Rede de Bragg em fibra ótica fixada na região entre o ligamento periodontal e o osso alveolar

Dentre todas as composições de cianoacrilato testadas, a única que ofereceu uma adesão suficiente para a execução da aplicação de carregamentos, mesmo estando em um meio muito úmido, foi a formulação original. Todas as outras formulações não ofereceram adesão suficiente para que os ensaios pudessem ser realizados e as deformações fossem transmitidas até a região do sensor.

O tempo de secagem da mandíbula instrumentada foi de seis horas para todas as amostras envolvidas nos ensaios. Não se utilizou de um intervalo de tempo maior devido ao processo de degradação natural do material biológico após o período sem refrigeração.

5.2 METODOLOGIA DE APLICAÇÃO DE CARREGAMENTOS EM DENTES DE PORCOS *EX VIVO*

Para a realização dos ensaios foram montados dois sistemas de aplicação de carregamentos. Primeiramente foi utilizado um durômetro fabricado pela Brinell & Vickers®, com carregamentos variando entre 5 e 100N.

Com a utilização do durômetro foi impossibilitado o cálculo da histerese do sensor, bem como a continuidade da aplicação do carregamento devido às características do equipamento que durante a troca da intensidade da aplicação do carregamento ele necessita descarregar totalmente a amostra para então aplicar o novo carregamento em seguida.

Com as características do durômetro bem delimitadas, foi utilizado em uma segunda montagem. Foi desenvolvido um sistema de alavanca que possibilita a aplicação de carregamentos em sequência, bem como adicionar e retirar cargas de acordo com as necessidades do ensaio, apresentado na figura 18.

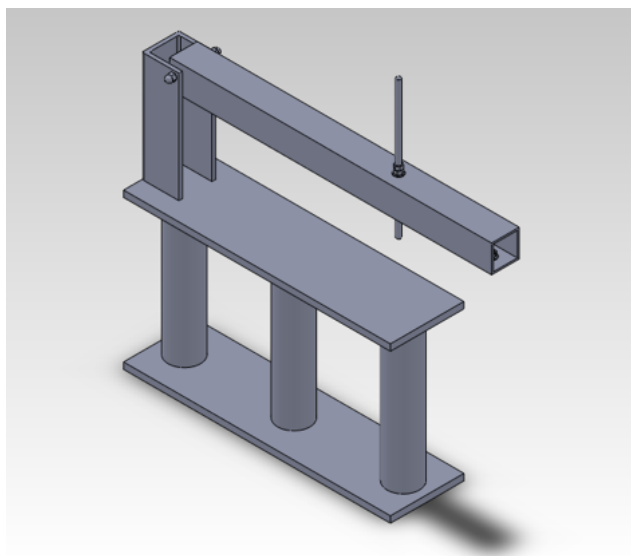


Figura 18 – Desenho esquemático do sistema de aplicação de cargas

Com esta metodologia foi possível aplicar carregamentos de forma muito semelhante aos de uma máquina de ensaios universal, com passos de carga, porém com um controle menos preciso. Este sistema atendeu com tranquilidade a todas as necessidades do estudo planejado, sendo que seu baixo custo favoreceu o processo de fabricação.

Os carregamentos foram inicialmente projetados para variar de 0 até 100N com passos de carga de 10 em 10N até chegar em 40N. Depois desse momento cada passo de carga seria de 20N até completar os 100N. Chegando aos 100N, iniciaria-se a retirada da carga com os passos de carga de forma inversa a forma anteriormente explicada.

Após alguns resultados, a metodologia de aplicação dos carregamentos sofreu alterações, principalmente porque percebeu-se que os níveis de deformações atingidos poderiam superar o coeficiente de adesão plástica do polímero utilizado. Desta forma, adaptou-se os níveis de carga para de 0 a 40N para garantir a aderência do sensor na região de interesse.

A literatura questiona as metodologias de aplicação de carregamentos por julgar que simular questões como a hidratação da região durante o ensaio é de alta complexidade. Com isso, realizou-se uma montagem com a amostra posicionada no interior de um recipiente, e mergulhada em soro fisiológico. Toda essa montagem foi realizada como descrito anteriormente e a aplicação dos carregamentos foi feita conforme o sistema já descrito.

5.3 ANÁLISE DAS DEFORMAÇÕES MEDIDAS NA REGIÃO DO LIGAMENTO PERIODONTAL DE PORCOS *EX VIVO*

O processo de instrumentação do ligamento periodontal em mandíbulas de porcos detalhado na seção 5.1 foi momentaneamente satisfatório para o desenvolvimento do presente trabalho. Na revisão da literatura não foram encontrados relatos de trabalhos com o mesmo nível de proximidade com o local de estudo. A maioria dos trabalhos presentes na literatura se utiliza de amostras seccionadas, o que altera de forma significativa os resultados finais do trabalho haja vista que a distribuição da relação entre tensão e deformação é diretamente afetada com este tipo de alteração morfológica no tecido.

No decorrer do trabalho percebeu-se que os principais problemas apresentados na resposta ao sensoriamento foram decorrentes da metodologia de inserção do sensor no tecido a ser analisado. O processo de inserção tem grandes possibilidades de causar danos teciduais no tecido analisado, desta forma os resultados obtidos podem ser diferentes caso a técnica de análise fosse minimamente invasiva.

Após o processo de inserção, o sensor sofre um processo de colagem com utilização de cianoacrilato. A escolha do cianoacrilato foi feita por se tratar de um projeto piloto para desenvolvimento da técnica pelo teste do material em condições mais próximas ao ambiente biológico pelo teste do desempenho do adesivo e ao próprio custo do adesivo. O ambiente onde é inserido o sensor tem elevado grau de umidade, o que dificultou a adesão local.

Uma análise de revisão da literatura coloca o presente estudo como o mais invasivo atualmente, entretanto as limitações no controle das variáveis presentes, a dificuldade no controle do nível de adesão do sensor ao tecido, os problemas relacionados à lesão tecidual durante a implantação do sensor impossibilitam o desenvolvimento de uma metodologia que gere resultados que possibilitem a caracterização das propriedades mecânicas do LPD.

Como descrito na seção 5.2, os primeiros ensaios foram desenvolvidos em um durômetro desenvolvido para aferição da dureza dos materiais. Esta adaptação gerou uma limitação metodológica no processo, pois não foi possível a aplicação de passos de carga para uma futura avaliação de processos como a histerese e até mesmo a avaliação do comportamento do ligamento periodontal ao longo da aplicação de carregamentos.

A figura 19 mostra o gráfico gerado a partir da relação entre as deformações detectadas pela FBG e a força aplicada pelo durômetro na superfície superior do dente. Os pontos são sequenciais entre carregamentos e relaxamento do tecido, as setas ajudam a demonstrar a progressão de carregamentos que foi realizada. A figura demonstra um ensaio realizado.

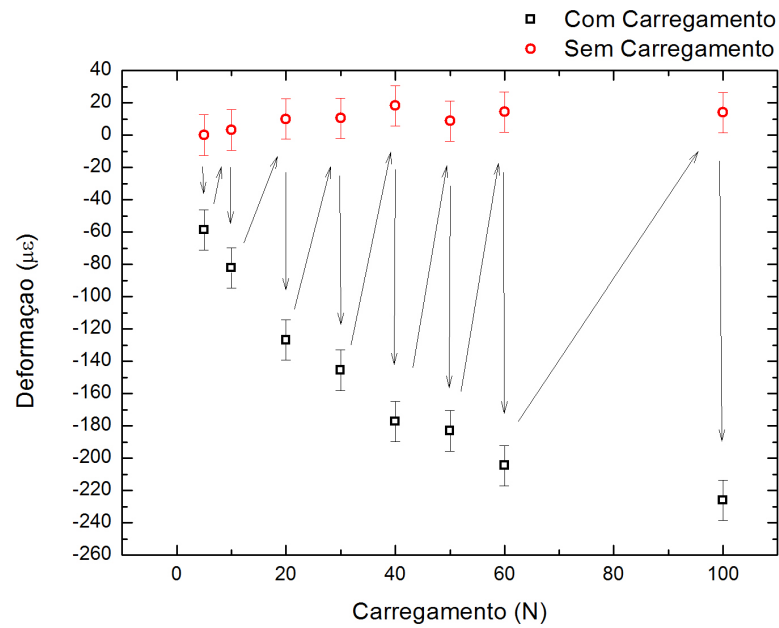


Figura 19 - Gráfico demonstrando as deformações no LPD em função do carregamento aplicado longitudinalmente no dente.

Foi possível plotar gráficos que demonstrem a variação dos níveis de deformação ($\mu\epsilon$) em relação aos carregamentos (N) aplicados longitudinalmente ao longo do eixo central do dente das mandíbulas de porcos.

No gráfico, os círculos representam a fase inicial dos testes e o período de recuperação logo após cada carregamento, retornando ao estado inicial. Os quadrados representam a resposta aos carregamentos com variação entre 5 e 100N, o que significa que as redes de Bragg foram capazes de detectar a aplicação de carregamentos e o descarregamento subsequente na região do ligamento periodontal.

Foi possível observar um intervalo de aproximadamente 0 a $240\mu\epsilon$ em função dos carregamentos de 0 a 100N. Apresentou-se uma curva de deformação do tecido mole biológico que condiz com os padrões de curvas visualizados na literatura, o que pode ser explicado pelo comportamento e as mudanças estruturais das fibras de colágeno do ligamento periodontal. Fato importante a ser destacado é o fato de que o sensor descole sempre que os carregamentos ultrapassaram os níveis de 60 a 70N percebe-se que a força aplicada excede a resistência adesiva entre o cianoacrilato e o ligamento periodontal, fazendo com que o sensor fosse retirado sem esforço por parte dos pesquisadores.

Com a utilização dos valores de deformação resultante da aplicação dos carregamentos de 10 a 50N foi possível traçar uma reta com ajuste linear que nos permite chegar a sensibilidade do sensor as deformações, como se pode visualizar na figura 20.

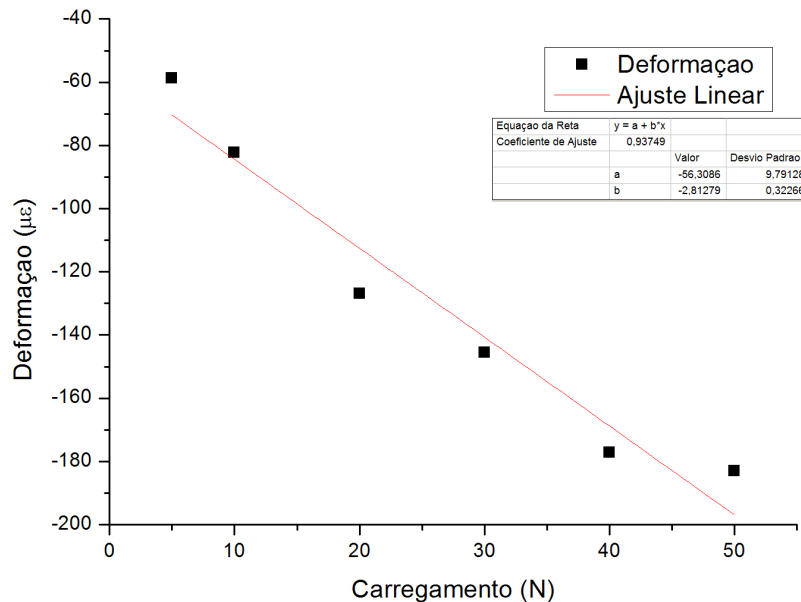


Figura 20 – Gráfico que apresenta a resposta do sensor a partir de carregamentos na região do LPD

Com a utilização da equação da reta e com os valores adquiridos no experimento, foi possível chegar ao valor de $b = -2,81279 \mu\epsilon/N$, que é a resposta do sensor a deformações a partir de carregamentos, ou seja, a cada N carregado o sensor tende a detectar uma deformação de -2,81279.

As respostas satisfatórias obtidas a partir da primeira metodologia motivaram o desenvolvimento do sistema de aplicação de carregamentos apresentado na seção 5.2, o novo sistema possibilitou o controle efetivo da aplicação dos carregamentos e principalmente a aplicação de passos de carga variando entre 5 e 40N. Os valores determinados para a segunda metodologia de aplicação de carregamentos foram definidos a partir dos resultados dos primeiros ensaios, visando não ultrapassar os limites adesivos do cianoacrilato no tecido em estudo.

Com a utilização do novo sistema de aplicação de carregamentos, foram realizados novos ensaios com a intenção de realizar passos de carga progressivos, sem que houvesse a necessidade de retirada da amostra do dispositivo para novo carregamento.

A aplicação de carregamentos de forma constante e progressiva, em passos de carga, não obteve o resultado esperado, visto que o processo de ultrapassagem do limite adesivo do cianoacrilato foi precoce quando comparado com a metodologia anterior.

Os testes foram realizados em 45 ensaios, sem que houvesse reprodutibilidade.

5.4 CONCLUSÕES DO ESTUDO

A partir dos resultados obtidos no estudo foi possível perceber que a instrumentação direta de FBGs no interior do tecido é complexa o suficiente para que o estudo se torne inviável no momento.

Os primeiros testes, com a utilização do durômetro, tiveram resultados positivos e possibilitaram a criação de uma segunda metodologia que é mais adequada, mas que gerou situações as quais o estudo não foi capaz solucionar e fez com que seus resultados não fossem reprodutíveis.

Uma opção do estudo seria retomar a primeira metodologia, entretanto essa opção foi descartada devido as possibilidades de pesquisa criadas durante a pesquisa. Trabalhos futuros podem retomar o tema para uma possível instrumentação da região do ligamento periodontal.

As conclusões do estudo foram positivas para o todo da pesquisa, já que a sequência do estudo foi o teste de colagem do sensor diretamente no tecido ósseo. Para isso seriam testadas resinas odontológicas, cola epóxi e cianoacrilato. No trabalho piloto já seria utilizada uma cabeça *ex vivo* de um bovino, a fim de testar a metodologia que seria utilizada futuramente nos ensaios *in vivo*.

6 INSTRUMENTAÇÃO DA MANDÍBULA DE BOVINOS *EX VIVO*

Com a progressão do trabalho, desde as análises dos processos de esterilização e desinfecção, passando pelos testes em tecido subcutâneo e evoluindo para os testes *ex vivo* foi possível vislumbrar o desenvolvimento do biosensor, para tal seria necessário um estudo piloto, com condições similares aos que poderiam ser encontrados em um possível trabalho *in vivo*.

A partir da doação de uma cabeça de um bovino, com cerca de 4 meses de idade, por um produtor da indústria leiteira local, foi desenvolvido um estudo piloto que teria como principal objetivo, o teste do maior número de possibilidades de situações.

6.1 METODOLOGIA DE INSTRUMENTAÇÕES DE MANDÍBULA DE BOVINOS *EX VIVO*

O procedimento foi realizado no laboratório de Radiofrequência e Compatibilidade Eletromagnética da Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Pato Branco.

Foi utilizada uma cabeça de um bovino que seria descartada como resíduo orgânico na indústria leiteira local, onde os bezerras machos são descartados pois não geram valor agregado ao produto final. Assim, não se fez necessária a submissão do projeto para o comitê de ética e pesquisa com animais.

O acesso à mandíbula foi realizado a partir de um procedimento cirúrgico simulando condições cirúrgicas normais. O ponto de incisão foi o mais próximo possível do local de interesse, que seria exatamente sobre o local onde seria implantado o sensor. A incisão foi realizada com a utilização de bisturi e lâmina de aço esterilizados tamanho 22cm, sendo os demais procedimentos cirúrgicos realizados com o auxílio de uma tesoura reta em inox ponta romba/romba, pinça dente de rato tamanho 16cm, pinças Martin e um raspador ósseo.

O primeiro trabalho do grupo de pesquisa com a utilização de instrumentação para monitoração de processos de mastigação foi realizado por (Wosniak et al., 2012), onde foi

instrumentado um crânio de um caprino e foram realizadas medições das deformações da região mandibular durante a movimentação passiva da articulação temporo mandibular com diferentes alimentos entre os dentes. Para simular a região articular, foi criada uma cápsula articular feita em silicone e as forças eram geradas manualmente. Este estudo fundamentou o presente trabalho, que utilizou-se de um crânio *ex vivo*, com todas as estruturas preservadas. Sendo assim, o local da instrumentação, visualizado na figura 21, foi baseado e descrito no trabalho de Wosniack, *et al.*, 2012, que definiu a posição do sensor (ângulo da mandíbula) para melhor captação das deformações geradas a partir dos processos mastigatórios de diferentes materiais.



Figura 21 – Figura demonstrando o local da incisão bem como o processo de passagem do cabo ótico até o local instrumentado.

Para a fixação do sensor foram testadas colas com base em cianoacrilato, porém as condições do tecido não favoreceram o processo de aderência ao tecido.

Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento, alterando o composto do cianoacrilato para uma cola epóxi, que obteve sucesso no processo de adesão ao tecido, mesmo com as condições de umidade presentes. A principal dificuldade do estudo foi o período de secagem da cola epóxi, haja visto que o material biológico não poderia ficar fora de refrigeração por muitas horas, correndo o risco de perda de características teciduais.

6.2 MEDIÇÃO DE DEFORMAÇÕES NA SUPERFÍCIE ÓSSEA DE BOVINOS DURANTE A MOVIMENTAÇÃO MANDIBULAR

Com a mandíbula bovina instrumentada, foram realizados manualmente a simulação de movimentos mastigatórios para detectar a presença de deformações no tecido ósseo, cujas alterações no campo das deformações foram transmitidas ao sensor a partir da colagem com o composto epóxi depositado na região.

No ensaio foram realizados dez movimentos de abertura e oclusão da mandíbula em sequência. Os resultados das alterações do comprimento de onda do sensor foram plotados no gráfico representado pela figura 22.

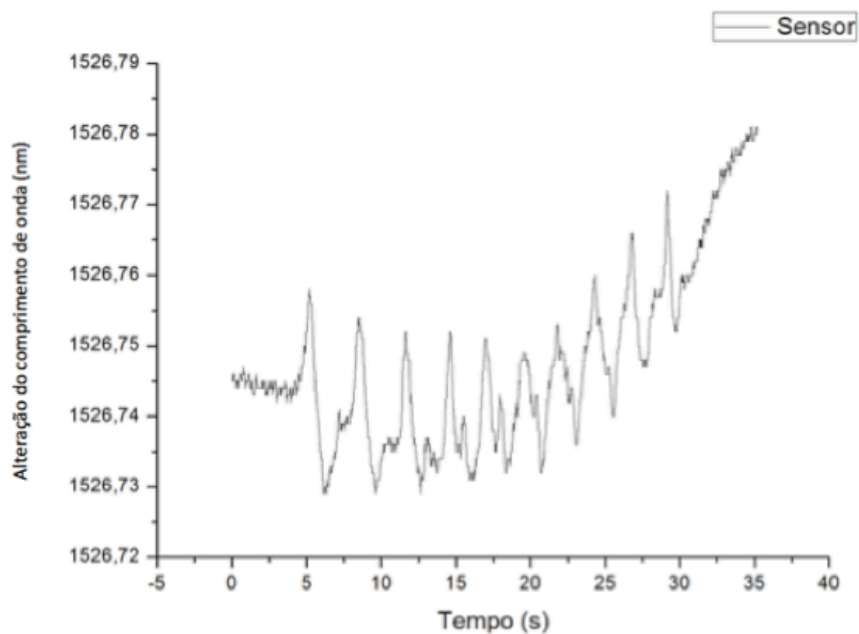


Figura 22 – Gráfico demonstrando a alteração do comprimento de onda do sensor a partir dos movimentos mastigatórios na mandíbula de bovino.

Pode-se perceber que o sensor teve funcionamento satisfatório, ou seja, foram detectadas deformações que indicam os movimentos mastigatórios realizados. Entretanto, problemas como o visível ganho de potência em relação ao tempo pode estar associado a problemas metodológicos como a posição da fibra, que por conter curvaturas pode ter

alterações no padrão de reflexão da rede de Bragg. Outro problema considerado foram as propriedades das colas epóxi, principalmente caso o tempo de cura não seja longo o suficiente, onde apresentaria-se uma condição inadequada para o funcionamento do sensor.

Com a intenção de ter uma análise dos resultados sem a influência da alteração da potência do sinal refletido foi utilizada a ferramenta *baseline* do software Origin 8.0, com isso originou-se a figura 23 apresentada a seguir, já mostrando a deformação indicada pelo sensor em função do tempo na movimentação, com as alterações de comprimento de onda transformadas em μStrain para que se possa perceber melhor o nível de deformação gerado a partir da movimentação.

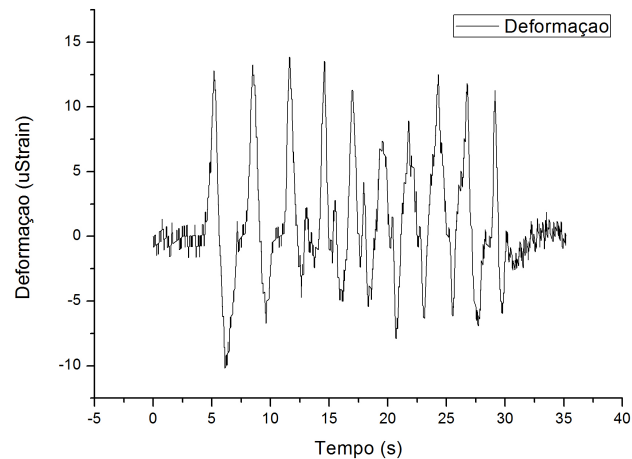


Figura 23 – Gráfico das deformações geradas em movimentos mastigatórios em relação ao tempo

Não houve o carregamento com forças além da necessária para a movimentação da mandíbula até o contato com a maxila, tampouco a presença de qualquer material que fosse capaz de oferecer resistência durante o processo de movimentação, criando uma alavanca que gerasse maiores deformações na região mandibular.

Percebe-se que no processo houveram deformações que variaram de 7 a 15 $\mu\epsilon$ na tração e 5 e 10 $\mu\epsilon$ na compressão, totaliza-se uma variação de 22,99 $\mu\epsilon$.

O trabalho se mostra promissor para sua continuidade, entretanto é necessária uma análise quantitativa mais adequada, com a utilização de algoritmos próprios para tratamento de sinais, o número de movimentos deve ser aumentado, a duração do estímulo de simulação

da força mastigatória deve ser maior, a força aplicada deve ser maior e o número de amostras deve ser maior para garantir a reprodutibilidade.

6.3 CONCLUSÕES DO ESTUDO

Tendo em vista as condições criadas pelo estudo, foi possível entender a complexidade do processo de instrumentação, visualizando-se a impossibilidade de instrumentação direta neste momento. Para a obtenção de dados mais fidedignos, seria necessária a construção de um biosensor que possuísse um transdutor fixo ao tecido ósseo do animal *in vivo*.

Mesmo com todas as limitações, o trabalho foi satisfatório, uma vez que pode esclarecer uma série de dúvidas que a equipe tinha com relação ao processo de adesão do sensor e com relação a transferência de deformações pelo tecido ósseo até a região instrumentada.

O próximo passo é a construção de um biosensor, com um transdutor, que tenha um sistema de fixação mecânico para que os problemas de colagem sejam eliminados, e mesmo assim haja a transferência de deformações até o local do sensor de forma satisfatória.

No próximo capítulo será descrito o processo de construção, instrumentação, medição e análise dos dados.

7 INSTRUMENTAÇÃO E MEDIÇÃO DE DEFORMAÇÕES ÓSSEAS *IN VIVO*

Alguns grupos de pesquisa estão interessados no desenvolvimento de sensores em fibra ótica para o monitoramento das deformações ósseas *in vivo* com base nas possibilidades de aplicação futura dos sensores. As dimensões características dos sensores em fibra ótica fazem com que eles tenham aplicações em pequenas regiões, e principalmente não proporcionem alterações metabólicas além das geradas pelo processo de instrumentação (Lídia Carvalho et al., 2011; Dennison, Wild, Byrnes, et al., 2008; Rao, Webb, Jackson, Zhang, & Bennion, 1998b; D.J. Webb, Jackson, & Bennion, 1997; Willsch, 2000).

Na literatura é consenso entre os autores o fato de que as deformações mecânicas são um dos principais responsáveis pelo processo de diferenciação celular que diferencia a matriz celular entre osteoblastos e osteoclastos (Carter et al., 1998; Frost, 2004; Huiskes et al., 2000). Sendo assim, para que o processo de remodelamento e regeneração óssea seja estudado de forma objetiva é necessário que haja a possibilidade de uma medida quantitativa do processo de deformação óssea, o que possibilitaria o acompanhamento das deformações em uma determinada região do tecido ósseo em momentos de interesse dos profissionais da área da saúde.

Com isso, o presente trabalho apresentou uma série de metodologias de instrumentação do tecido ósseo desenvolvidas e testadas até que se chegasse na metodologia que possibilita a mensuração de deformações mecânicas durante o processo de mastigação.

Para demonstrar as capacidades do sensor, foram fornecidos ao animal, três tipos de alimentos, além de realizar medições de deformação durante o processo de ruminação.

7.1 INSTRUMENTAÇÃO DA REGIÃO MANDIBULAR DE BOVINO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento da pesquisa, foi utilizado um bovino de 4 meses de idade, macho, que seria descartado por estar em uma propriedade de trabalho exclusivo na indústria leiteira.

Com a possibilidade da utilização do animal, foi elaborado e enviado um projeto de pesquisa à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica

Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. O projeto foi aprovado com o parecer CEUA 2013-009.

O procedimento cirúrgico foi realizado em uma propriedade que trabalha com a indústria leiteira na região de Pato Branco/PR. Levou-se ao local todo o material necessário para a aquisição do sinal ótico após a instrumentação, bem como a verificação do andamento do processo cirúrgico (no que diz respeito a integridade do sensor).

A figura 24 apresenta um desenho esquemático que representa a disposição do experimento bem como o local da fixação do sensor. Nas próximas seções serão descritos detalhadamente todos os passos do experimento desde a gravação das redes de Bragg, da construção e instrumentação do sensor, bem como a implantação do mesmo seguida pela aquisição dos sinais.

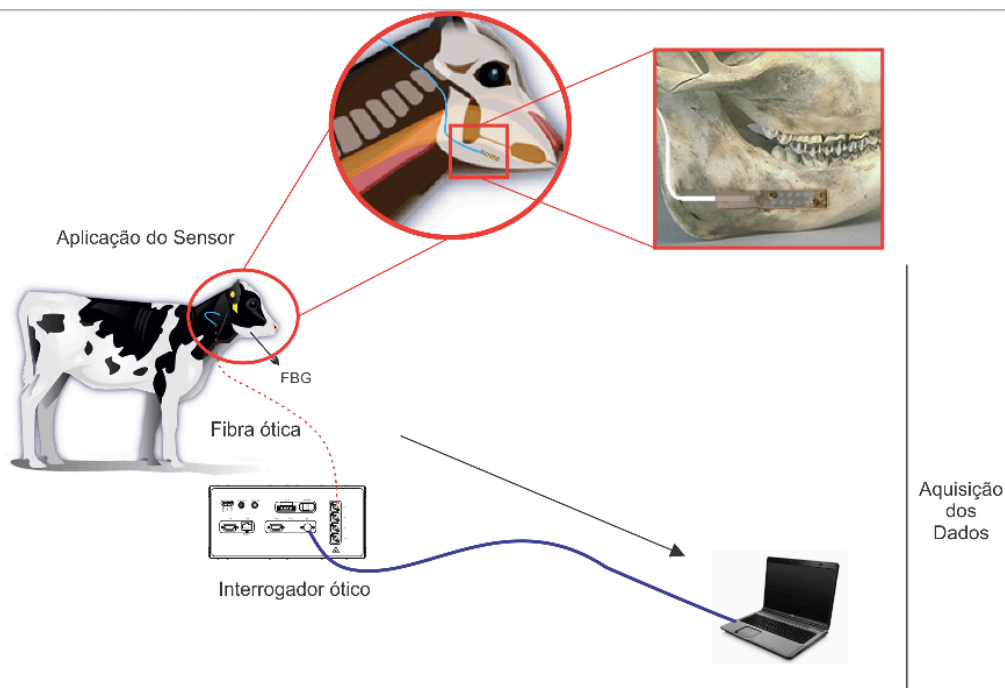


Figura 24 – Figura esquemática representando a instrumentação do bovino e a disposição do sistema de aquisição de dados.

7.1.1 CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

Todas as redes de Bragg em fibras óticas utilizadas foram derivadas do processo descrito no Capítulo 3, sem qualquer alteração metodológica.

Com o sensor a mão, utilizou-se uma malha de titânio que pode ser recortada para atingir a dimensão desejada. A malha de titânio, figura 25A, foi cedida pela NEOORTHO® para fins de pesquisa, sem qualquer tipo de conflito de interesses.

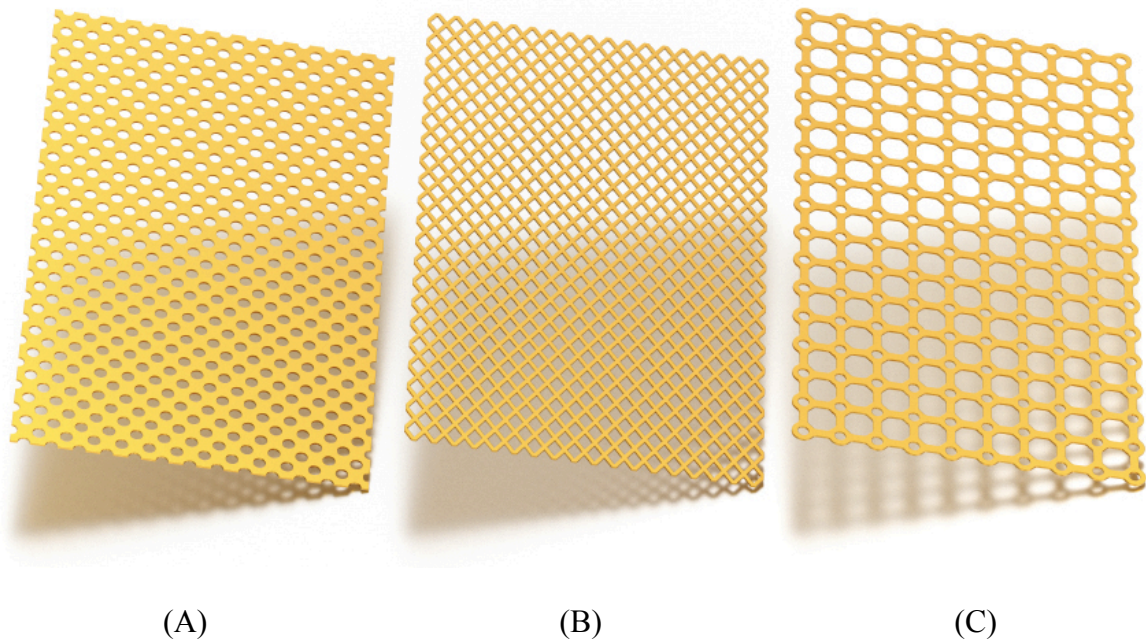


Figura 25 – Placa de titânio cirúrgico fornecida pela empresa NEOORTHO® (foto ilustrativa retirada do catálogo da empresa)

Como apresentado na figura 25, as malhas de titânio tem diferentes tipos de formas e tamanhos de orifícios, o que possibilita o ajuste adequado para o tipo de tecido a ser analisado.

Tendo em vista a área da mandíbula do bovino, optou-se por utilizar a malha A da figura 25, por ter uma área maior de contato, já que a área para implante seria muito reduzida. Após o recorte a placa apresentou medidas de 5mm×15mm.

Após o corte da malha de titânio no tamanho e forma adequados, com a utilização de uma tesoura específica para corte deste tipo de malhas, a FBG foi fixada na malha com o objetivo de ser um transdutor para as deformações ao qual o tecido estaria sujeito. A fixação da FBG na malha de titânio foi realizada com a utilização de cianoacrilato.

Primeiramente o sensor foi posicionado na porção medial da malha, após o posicionamento foi feita uma cobertura com uma fina camada de cianoacrilato, que foi

distribuído de forma homogênea a partir da utilização de uma fita médica microporosa e sustentada em posição com a utilização do dedo do pesquisador.

Uma vez que o sensor foi posicionado no transdutor, foi necessário envolver a fibra ótica, da região do transdutor até o cabo ótico, em algum material que fosse capaz de proteger a fibra de forças de tração e forças de cisalhamento as quais a fibra estaria suscetível uma vez implantada.

Como haveria um trecho de fibra com comprimento próximo a 45cm, e que estaria dentro do organismo do animal, buscou-se um material que fosse biocompatível, além de ter características mecânicas favoráveis as situações as quais seria submetido.

Após uma série de análises em diferentes materiais optou-se por utilizar uma cânula de silicone, biocompatível, utilizada na fabricação de cateteres totalmente implantáveis, como se ve na figura 26 (normalmente utilizados em situações onde o paciente necessita receber medicação endovenosa por longos períodos, ficando implantada e ligada diretamente ao sistema circulatório do paciente), e fornecido pela empresa Instituto de Bioengenharia Erasto Gertner – IBEG®.



Figura 26 – Cânula de cateter de silicone implantável fornecido pela empresa IBEG®

Para a conexão do sensor até o interrogador foi utilizado um *pigtail* com conectores FC/PC produzidos pela empresa Fibracem®. Para garantir que não houvessem perdas de

sinal, a gravação do sensor foi realizada diretamente sobre a fibra ótica do *pigtail*, sem a necessidade da realização de emendas.

7.1.2 PROCESSO CIRÚRGICO

O animal utilizado na pesquisa era um bovino, macho, de 4 meses de vida e pesando 160Kg. Para a realização do processo cirúrgico para a instrumentação da mandíbula do animal foi necessário que, inicialmente, o animal passasse por um jejum sólido e hídrico de 24 horas.

Para a cirurgia foi utilizado o anestésico cloridrato de xilazina 2% na dosagem de 0,3mg/Kg (ou 1,ml/100Kg), sendo aplicado nos primeiros instantes do procedimento até que houvesse efeito do farmaco.

A incisão foi realizada com a utilização de bisturi e lâmina de aço esterilizado tamanho 22cm, sendo os demais procedimentos cirúrgicos realizados com o auxílio de uma tesoura reta em inox ponta romba/romba, pinça dente de rato tamanho 16cm, pinças Martin e um raspador ósseo.

Após a fixação do sensor (que será apresentada na seção 7.1.3) foi realizada a sutura com pontos simples, internos e externos, utilizando-se um porta agulha tipo Mayo Hegar 16cm, uma agulha curva em aço inox com ponta triangular e tamanho de 6cm entre as extremidades e fio de nylon tamanho 2-0.

Encerrado o procedimento cirúrgico foi aplicado no animal o antibiótico Oxitetraciclina (dihidratada) 20% na dosagem de 1ml/10Kg de peso do animal por via intra muscular, repetendo-se a mesma dosagem em duas aplicações com intervalo de 3 dias entre cada uma delas, totalizando três aplicações. O objetivo da aplicação foi a prevenção de processos inflamatórios intensos e que pudessem gerar qualquer tipo de rejeição do material pelo organismo do bovino.

7.1.3 FIXAÇÃO DO BIOSENSOR

Antes de sua fixação o biosensor foi devidamente esterilizado com a utilização de uma autoclave. O biosensor foi colocado em um grau cirúrgico e submetido a um ciclo de esterilização de 30 minutos com temperatura entre 132 e 135°C, o que garante mínimos riscos de contaminação, e o funcionamento adequado do sensor (conforme seção 3.4).

A fixação do biosensor foi realizada com a utilização de um conjunto de parafusos, idênticos ao parafuso (A) da figura 27, desenvolvidos pela NEOORTHO® para a fixação da malha de titânio no tecido ósseo.

Durante o processo cirúrgico, os tecidos foram rebatidos lateralmente para que o osso mandibular fosse exposto e fosse possível que os parafusos auto brocantes fossem devidamente posicionados e implantados.

Para a brocagem, foi utilizada uma chave própria para os parafusos NEOORTHO® também disponibilizada pela empresa para que todo o trabalho fosse realizado com a metodologia apropriada para o material que seria implantado no animal.



Figura 27 – Parafusos de fixação fornecidos pela empresa NEOORTHO® (foto ilustrativa retirada do catálogo da empresa)

Após a finalização do processo de fixação do biosensor, foi realizada a sutura e aplicação de antibióticos, como descrito na seção anterior.

7.2 ANÁLISE DE DEFORMAÇÕES DURANTE O PROCESSO MASTIGATÓRIO

Para aquisição do sinal ótico e coleta dos dados, foi utilizado um interrogador DI410 (HBM) e o software CatmanEasy, a taxa de amostragem utilizada nos ensaios foi de 1.000 amostras por segundo.

Durante a aquisição dos dados o animal ficou posicionado dentro de um cercado com aproximadamente 3,5m×3m com um comedouro, o qual foi utilizado para o fornecimento de todos os tipos de alimentos para o animal. O novilho tinha liberdade de movimento dentro do cercado, que foi limitado a 2m×2m, para evitar qualquer movimentação brusca que pudesse interferir na aferição e na coleta do sinal.

Todo o processo de coleta de dados foi monitorado em vídeo que, posteriormente, foi utilizado durante a etapa de pré-processamento para rotular os dados de acordo com o material que estava sendo ingerido.

Para garantir que o processo de alimentação teria o mínimo de interferência do processo cirúrgico, foi dado um intervalo de 7 dias da cirurgia até a coleta de dados durante a alimentação do animal.

O primeiro alimento ingerido foi a ração, com tempo de ingestão de 13 minutos. O segundo material ingerido foi o feno, com tempo de ingestão aproximado de 10 minutos. O terceiro alimento fornecido foi o azevém, com tempo de ingestão de cerca de 5 minutos. Durante a coleta, houveram momentos em que o animal não estava ingerindo qualquer material, sem a presença de movimentação mandibular. Essas amostras não foram utilizadas na presente pesquisa.

Após aproximadamente 45 minutos do final do processo de ingestão de alimentos, iniciou-se o processo de ruminação, que foi acompanhado por aproximadamente 15 minutos.

Durante a coleta de dados, em alguns momentos, o animal realizou movimentos bruscos com a cabeça, o que gerou ruídos no sinal adquirido. As amostras ruidosas foram descartadas e não analisadas no presente trabalho pois não representavam um movimento real de mastigação.

Após análise do sinal e correlação com os vídeos produzidos as amostras foram rotuladas de acordo com o tipo de material que estava sendo ingerido em cada momento.

Foram realizadas duas segmentações do sinal adquirido para melhor analisar as amostras, a primeira segmentação foi de 6 segundos (relativo a 6.000 amostras) de dados de cada classe, esses dados foram coletados em instantes de tempo aleatórios dentro do conjunto total de dados coletados. A segunda segmentação, de 1s de duração, foi empregada a cada movimento mandibular.

Posteriormente a segmentação dos conjuntos de dados foi aplicada a *Fast Fourier Transform* (FFT), que permite a análise dos sinais no domínio da frequência. Os coeficientes da FFT dos sinais são calculados a partir da *Discrete Fourier Transform* (DFT) e de sua inversa, *Inverse Discrete Fourier Transform* (IDFT). O uso da série de Fourier é de alta complexidade em algoritmos computacionais, sendo normalmente de complexidade N^2 . Diante deste problema, pesquisadores desenvolveram algoritmos que permitem efetuar a transformada de Fourier de forma mais rápida. Cooley e Tukey, 1965 propuseram um algoritmo que reduziu a ordem de complexidade do cálculo da transformada de Fourier complexa para $N \log_2 N$, sendo este algoritmo utilizado para o processamento dos dados (Cooley & Tukey, 1965).

Foram realizadas duas análises a partir das FFT, a primeira delas utilizou-se do conjunto de dados correspondente a 6s (relativo a 6.000 amostras), para a segunda análise foi realizado um pré-processamento para aplicação da FFT, o qual iniciou-se com a identificação do sinal correspondente a um ciclo completo movimentos mandibulares mastigatórios. Os dados correspondentes aos movimentos mastigatórios foram então analisados e percebeu-se que tais movimentos possuem uma variação de tempo de execução que varia entre 0,3 e 1 segundo, representando 300 a 1.024 amostras, dependendo do tipo de alimento que está sendo mastigado. Sendo assim, nos movimentos mastigatórios com menos de 1.024 amostras foi adicionada a média do sinal nos pontos faltantes, completando 1.024 amostras representando o movimento de mastigação. Desta forma a FFT representa de maneira mais adequada o padrão de mastigação para cada tipo de alimento no domínio da frequência.

Sendo assim, a figura 28 apresenta o gráfico da alteração de comprimento de onda em relação ao tempo durante o processo de mastigação e ingestão de todos os alimentos fornecidos ao animal, inclusive o processo de ruminação.

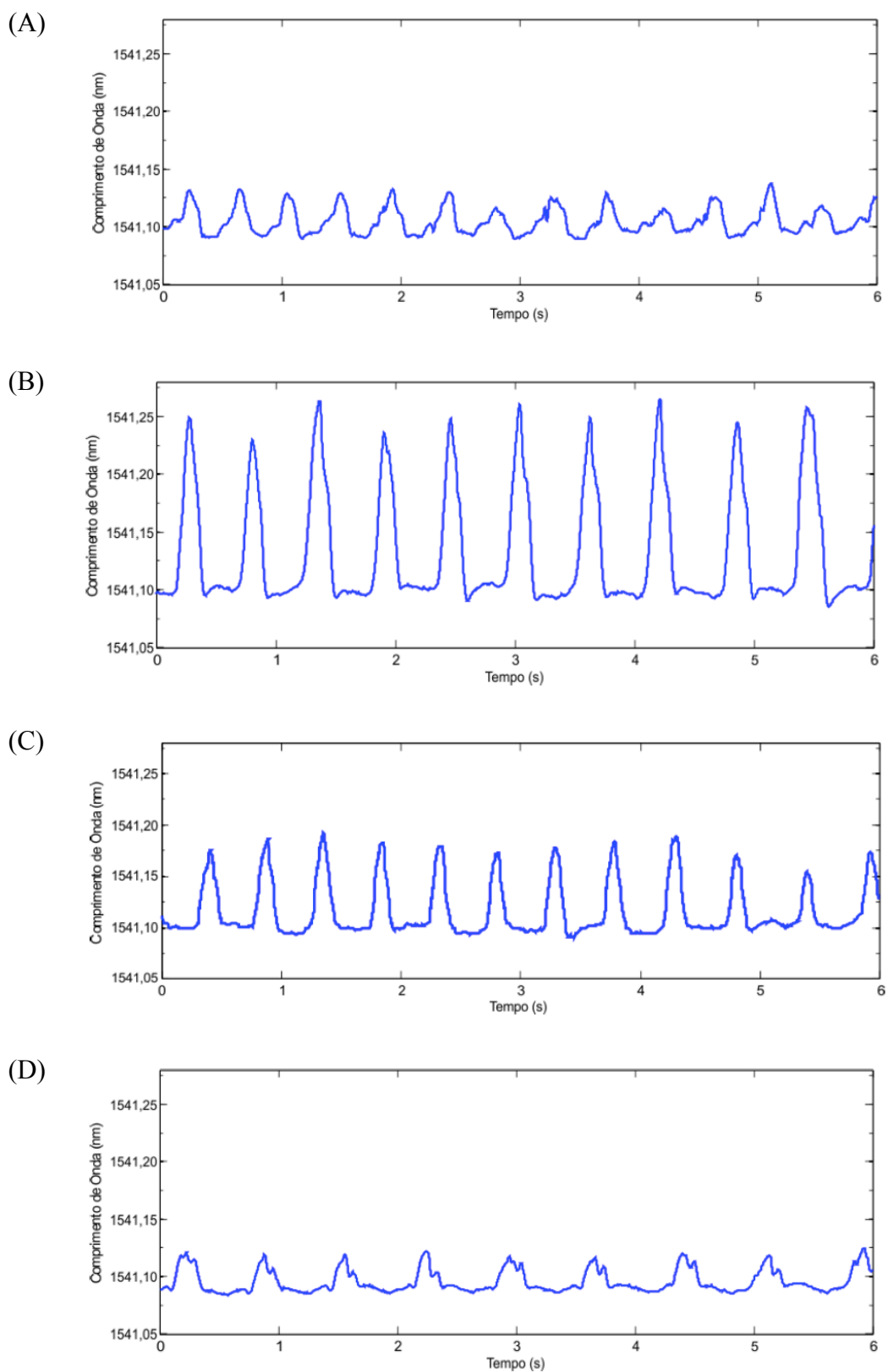


Figura 28 – Gráficos da alteração do comprimento de onda em relação ao tempo para os diferentes alimentos e padrões mastigatórios. (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação

Após a apresentação dos resultados e com a compilação dos gráficos na figura 28, é possível visualizar com clareza que as deformações (que provocam a alteração no comprimento de onda refletido) variam de acordo com a dureza do material mastigado pelo animal. Outro fator muito importante para a geração das deformações é a amplitude de movimento que o animal necessita realizar para completar o movimento mastigatório.

Ao verificar os materiais mastigados, percebe-se que não há nenhum material que necessite grandes e intensas contrações musculares, uma vez que não há material que necessite passar pelo processo de dilaceração.

A frequência de ciclos mastigatórios está relacionada com a quantidade de fibras que o material tem. Materiais mais fibrosos tem a tendência de necessitar uma frequência mastigatória maior para pode ser deglutido.

Especialmente na análise da mastigação da ração, percebe-se a presença de “reflexos dolorosos inibitórios” que são responsáveis pela perda abrupta de força mastigatória a partir do momento em que uma mordida em um material duro, gera um reflexo de estiramento no ligamento periodontal e faz com que o animal automaticamente perca a força para mastigar e evite uma lesão nos dentes e/ou tecidos adjacentes.

Na figura 28A pode-se perceber que a alteração de comprimento de onda girou em torno dos 0,04nm, o que significa uma deformação no tecido ósseo de 35 μ Strains, considerando que a alteração térmica pode ser considerada irrelevante (mesmo que haja sensibilidade cruzada, a temperatura corpórea do animal permaneceu constante durante o experimento).

Após o animal alimentar-se de ração, lhe foi servido feno, que é uma mistura de gramíneas e leguminosas secas. O feno é utilizado como forragem (alimento) para o gado, após passar por um processo de desidratação que retira a água mas mantém o seu valor nutritivo e permite a armazenagem por grandes períodos sem que haja danos ao animal. A qualidade do feno está diretamente relacionada com a proporção entre a quantidade de folhas e de talos(Foster, Kindscher, Houseman, & Murphy, 2009; Jefferson, 2005).

Ao analisar a figura 28B, pode se perceber que existe uma significativa alteração no comprimento de onda refletido pela FBG. Durante o processo de mastigação do feno há um deslocamento de 0,26nm no comprimento de onda do sensor. Tal deslocamento é referente a uma deformação de aproximadamente 220 μ Strains transmitida do tecido ósseo até a FBG.

Assim como no caso da ração é possível ignorar o fato de o sensor ter sensibilidade cruzada entre deformação e temperatura pelo fato da temperatura no interior do animal ter-se mantido constante durante o experimento.

Logo após o novilho alimentar-se com ração e feno, lhe foi dado uma porção de azevém. O azevém é uma espécie de gramínea que apresenta alta palatabilidade para os animais, além de elevados teores de proteínas e com excelente digestibilidade e composição mineral. Somado a isso é uma planta com rebrote e grande resistência ao pastejo, desta forma é amplamente utilizada na pecuária e indústria leiteira (A. da Costa, Albuquerque, Mafra, & Silva, 2009; A. M. da Costa, Restle, & Müller, 2008).

Na análise da figura 28C pode-se perceber que o deslocamento do comprimento de onda refletido foi na ordem de 0,16nm, o que significa que a deformação transmitida pelo tecido ósseo até o sensor foi de algo em torno de 135 μ Strains. Durante o processo de alimentação do novilho, foram três tipos de alimentos e o azevém foi o único que estava *in natura*, com isso o material apresentava uma grande concentração de água. O material apresentava uma densidade média em relação aos outros alimentos fornecidos, com dureza baixa e a concentração de fibras natural do alimento. Com isso o animal realizou movimentos de pequena amplitude de movimento.

Após o processo de mastigação dos três tipos de alimentos, o animal repousou por cerca de 45 minutos até que o mesmo iniciou o processo de ruminação. A ruminação é a remastigação do alimento que é regurgitado, esse processo é característico dos animais ruminantes. Todo o processo consiste no retorno do bolo alimentar do rúmen para a boca, onde é remastigado com uma concentração maior de saliva (Baker, 2008; Bell, 1960; Muscher, Hattendorf, Pfeffer, Breves, & Huber, 2008).

Durante 15 minutos foi analisado o padrão de mastigação do animal durante o processo de ruminação, o qual foi apresentado na figura 28D. Ao visualizar o gráfico se percebe que a amplitude do gráfico é pequena, devido aos baixos níveis de deformação registrados. Como o alimento foi previamente mastigado, no processo de ruminação o alimento retorna a boca do animal, com uma quantidade grande de saliva, formando uma pasta que é remastigada e com isso apresenta níveis mais baixos de deformação. A alteração do comprimento de onda refletido fica próxima aos 0,04nm o que corresponde a uma deformação óssea de aproximadamente 35 μ Strains.

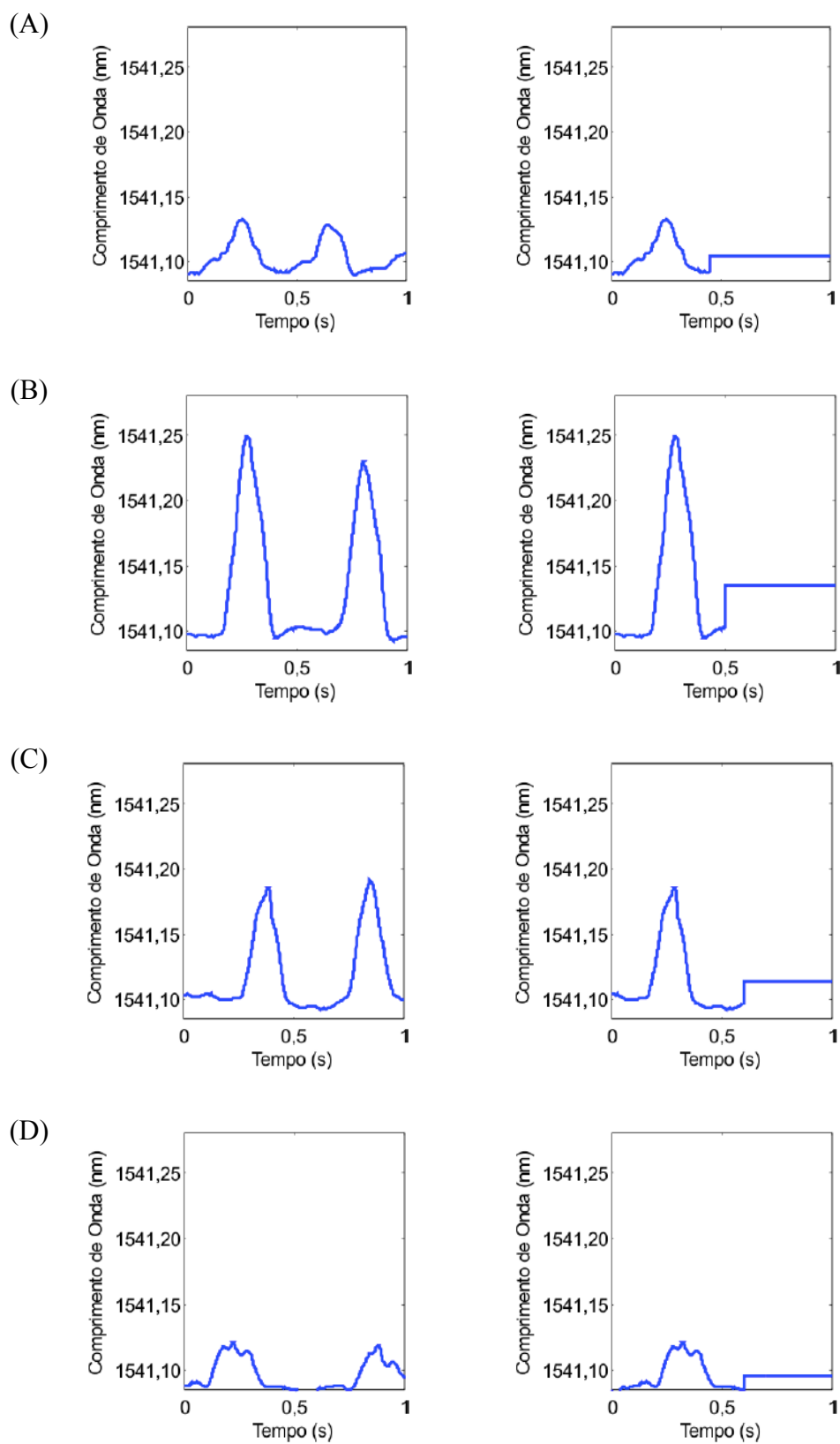


Figura 29 - Gráficos de alteração do comprimento de onda refletido em função da mastigação de ração em 1s e a alteração em um ciclo de mastigação seguido do ajuste com o valor médio da alteração do sinal. (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação

Na figura 29 são apresentados dois gráficos para cada alimento, o primeiro deles demonstra a relação entre comprimento de onda refletido e o tempo, para uma amostragem de 1 segundo, durante o processo de mastigação. No segundo gráfico é apresentado a amostra tratada para o processamento da FFT, mantendo 1 ciclo mastigatório, e os demais pontos até que se completem os 1.000 preenchidos com o valor médio entre os pontos do ciclo.

Ao analisar o padrão de mastigação apresentado nas figuras 29A referentes a ração, percebe-se que o movimentos mastigatórios foram mais breves (0,4 segundos) e com intensidade baixa ($35\mu\text{Strains}$). Um grande número de fatores pode ser responsável pelas características apresentadas no sinal adquirido, dentre eles pode-se destacar o fato de que a ração se trata de um material processado. Durante o processamento se produz um material de densidade e dureza elevadas, principalmente quando se comparada com os alimentos *in natura* que normalmente também podem ser oferecidos ao novilho. Outras características importantes das rações é que elas possuem grande quantidade de fibras, além de se apresentar em estado desidratado. Tendo como base tais características, se faz necessário que o animal realize movimentos de pequena amplitude de movimento, e que desta forma aumente o ritmo de mastigação, elevando a frequência de ciclos mastigatórios.

Percebe-se também que as curvas da figura 29A não apresentam fluidez e um padrão visual, pode-se sugerir que o que se apresenta são os chamados “reflexos dolorosos inibitórios” que acontecem sempre que o novilho mastiga qualquer material de dureza mais elevada que o restante do material. A ração apresenta tais características principalmente pela presença constante de grãos de milho.

Na figura 29B podem ser visualizadas curvas correspondentes ao movimento mastigatório realizado na mandíbula do bovino, reflexo direto da contração muscular e da deformação tecidual gerada pelo mesmo.

Ao discutir algumas das propriedades do feno, como o fato do material ser rico em fibras, e com uma concentração elevada das mesmas, pelo fato de o material ser desidratado após ser extraído. Somado a isso, o material apresenta uma baixa densidade e dureza relativamente baixa. Como o material é apresentado em folhas e talos compridos, é necessário que o novilho realize movimentos de grande amplitude com isso há uma deformação maior resultante do processo.

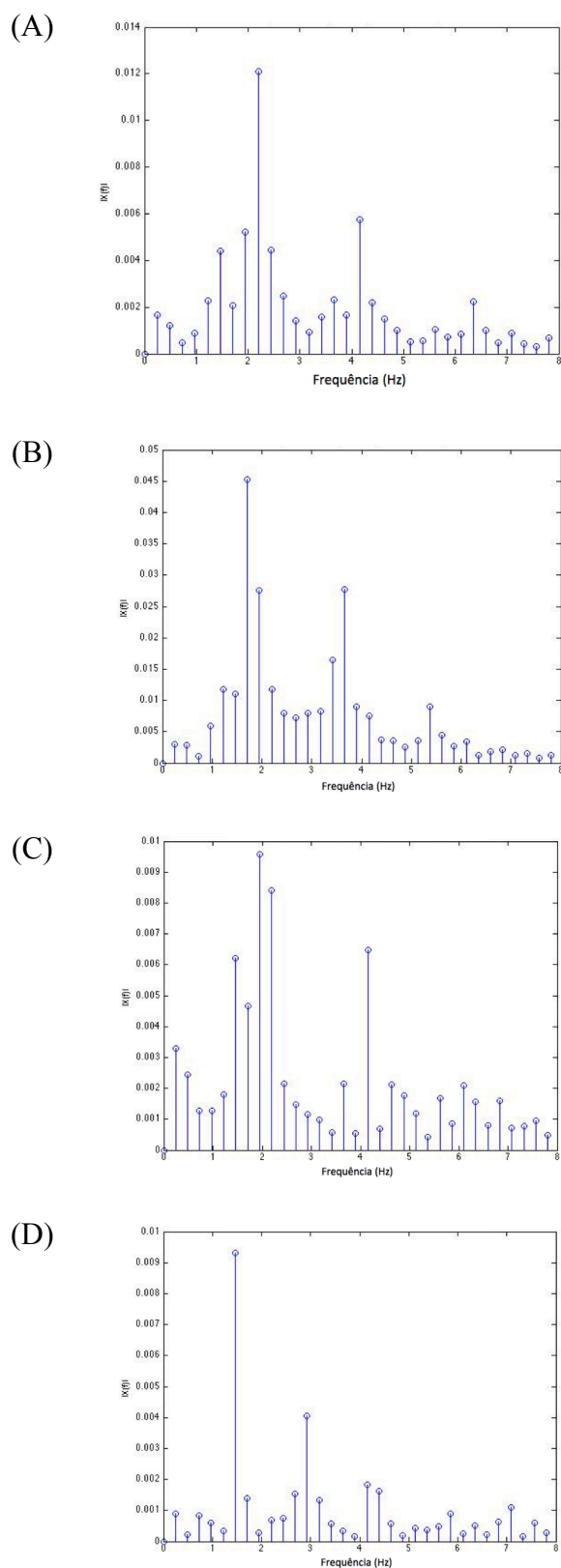


Figura 30 - - Figura que compara os gráficos das FFT do processo de mastigação de alimentos fornecidos ao animal e ruminação com o intervalo de 6s de amostras, sendo: (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação

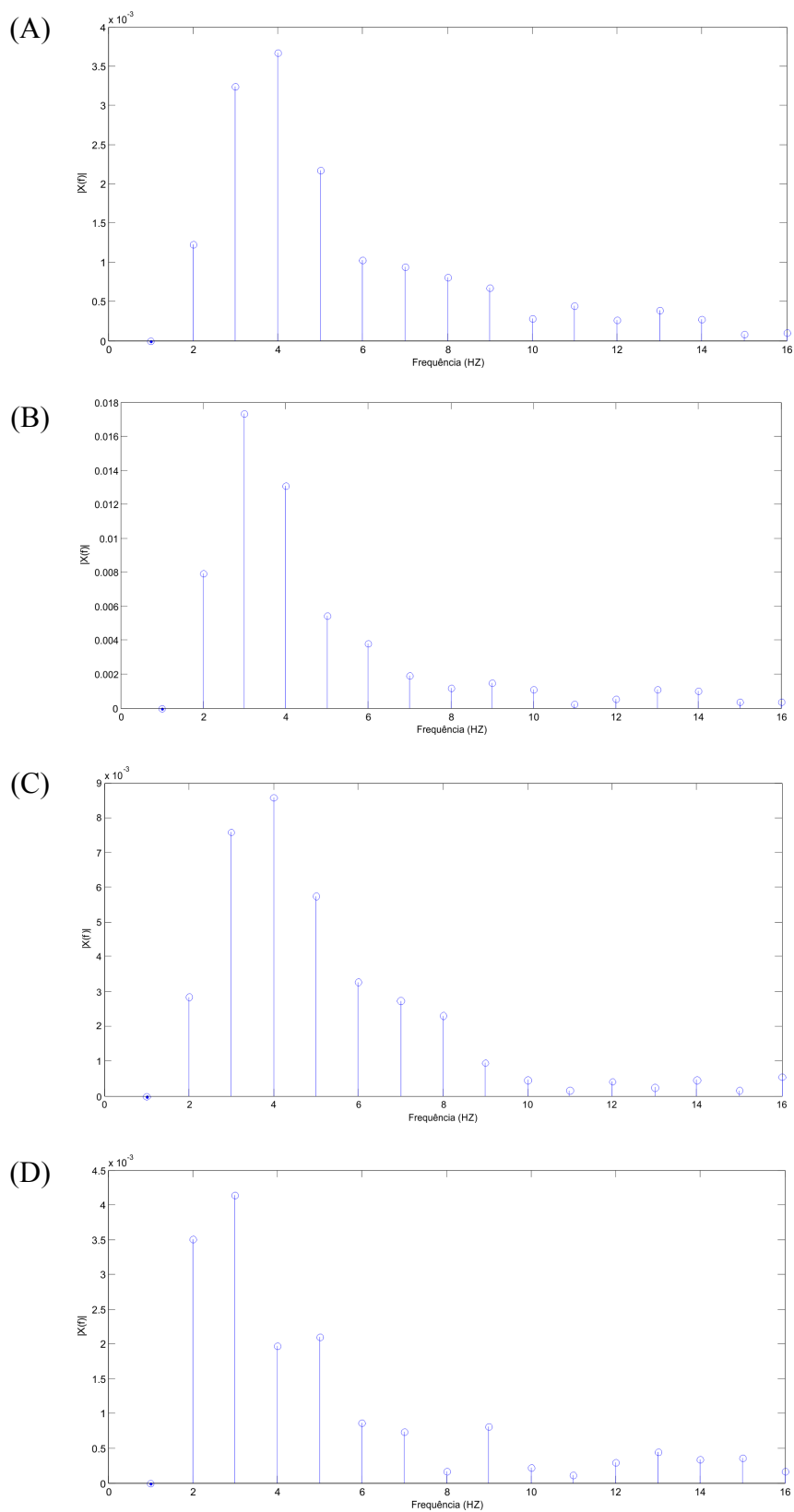


Figura 31 -- Figura que compara os gráficos das FFT do processo de mastigação de alimentos fornecidos ao animal e ruminação com o intervalo de 1s de amostras, sendo: (A) Ração (B) Feno (C) Azevém (D) Ruminação

Caso a figura 29A seja analisada juntamente com a figura 30A, levando em consideração a frequência do processo da mastigação da ração e a amplitude do sinal, percebe-se que o processo mastigatório deste alimento é com uma frequência mais alta ($\approx 2,25\text{Hz}$), entretanto com uma amplitude de sinal mais baixa, devido aos movimentos mais curtos para a trituração.

Ao correlacionar as figuras 29B e 30B, pode-se perceber uma grande diferença em relação ao mesmo gráfico referente a mastigação da ração, principalmente graças a grande diferença de amplitude das alterações de comprimento de onda durante as mastigações da ração e do feno. Outro ponto interessante de ser analisado é o fato de que a frequência dos movimentos mastigatórios é menor ($\approx 1,75\text{Hz}$), ou seja a velocidade de mastigação é menor, entretanto a amplitude do movimento é maior, fato que corrobora com o tipo de alimento que está sendo mastigado.

Na figura 29C e 30C apresenta-se o sinal ótico refletido, segmentado com a finalidade de análise da mastigação durante um segundo e durante somente um movimento mastigatório. Com isso percebe-se que a frequência de movimentos mastigatórios para o azevém ($\approx 1,8\text{Hz}$). As propriedades do material interferem diretamente no padrão mastigatório e, conseqüentemente, no sinal adquirido no experimento, como se percebe na figura a seguir, que apresenta o gráfico da FFT referente ao processo de mastigação do azevém, que é o único alimento *in natura*, com a presença de talos e com concentração hídrica em teor natural.

No caso das figuras 29D e 30D entende-se que o bolo alimentar já foi previamente mastigado e então apresenta baixa densidade, dureza baixa e baixa concentração de fibras, fazendo com que o animal possa executar a mastigação com pequena amplitude de movimentos e com uma frequência de mastigação baixa ($\approx 1,5\text{Hz}$) e de baixa amplitude graças às características do alimento.

No caso da figura 31, apresenta-se um conjunto de gráficos correspondentes as FFTs dos conjuntos de dados de somente um movimento mastigatório. Percebe-se nos gráficos as FFT apresentam resultados similares aos visualizados na figura 30, entretanto entende-se que um conjunto maior de dados é mais adequado para analisar a frequência de movimentos em relação ao tempo. Vale ressaltar que os resultados da FFT utilizando somente o conjunto de dados para um movimento mastigatório foi fundamental para o desenvolvimento de algoritmos de identificação de padrões de mastigação com a utilização de redes neurais

artificiais (RNA) e de algoritmos de árvores de decisão. O desenvolvimento dos algoritmos para identificação de padrões de mastigação foi desenvolvido paralelamente ao presente trabalho, como parte de uma dissertação de mestrado do PPGE – Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica do Campus Pato Branco (UTFPR)

Na figura 32 é apresentado um histograma que mostra a frequência de incidência de determinado comprimento de onda durante o processo total de alimentação do animal, incluindo os três alimentos e o processo de ruminção.

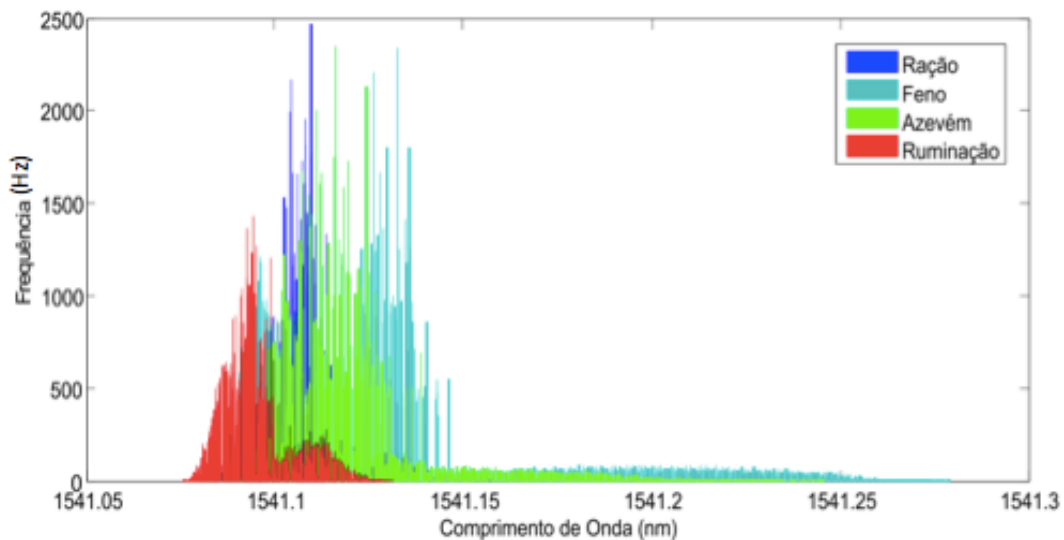


Figura 32 – Histograma completo da frequência de incidência (número de amostras) de alteração do comprimento de onda durante toda a aquisição do sinal

Pode-se perceber que com o histograma a visualização dos diferentes comportamentos em relação aos diferentes tipos de alimentos é clara. Tal fenômeno é possível graças as diferenças entre cada tipo de alimento, que fazem com que sejam gerados diferentes níveis de deformação no tecido ósseo em cada momento.

Destaca-se no processo a sensibilidade do sensor e a capacidade do transdutor em fazer com que as deformações sejam transmitidas. A compatibilidade com o tecido vivo e a dimensão do biosensor fazem com que ele seja versátil e de aplicação simples.

7.3 CONCLUSÕES DO ESTUDO

No presente estudo foi possível verificar a eficiência do biosensor para aquisição de dados durante o processo de mastigação, o mesmo foi capaz de ter resolução suficiente para captar o comprimento de onda refletido mesmo com pequenas diferenças de comportamento do animal durante o processo mastigatório.

Os dados adquiridos foram essenciais para o desenvolvimento (em progresso) de um algoritmo de identificação de alimentos mastigados totalmente automatizado, que irá ajudar a solucionar problemas e demandas da indústria pecuarista e leiteira.

As possibilidades a partir do presente estudo são ilimitadas e vão desde a validação, testes e aperfeiçoamento do atual sensor, bem como a aplicação do mesmo em diferentes situações, ajudando a compreender de melhor forma o comportamento do tecido ósseo em situações muito especiais (como fraturas e processos degenerativos).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

O principal objetivo do presente trabalho era o desenvolvimento de um biosensor implantável, que pudesse medir deformações no tecido ósseo, para tal seriam necessários uma série de estudos sequenciais, viabilizando passo a passo da construção do biosensor e todos os testes necessários para garantir a segurança do animal em que os testes seriam realizados.

Durante a execução da presente pesquisa foi analisado o comportamento das redes de Bragg antes e após processos de esterilização e desinfecção, com o estudo objetivou-se compreender o comportamento da FBG nesta situação. Com o trabalho percebe-se que nenhum dos métodos interferiu no comportamento da FBG de modo que alterasse o comportamento do sensor. Alguns métodos, principalmente os que realizam ataques químicos à fibra, produzem um aumento da sensibilidade mecânica a FBG, que ficou mais suscetível a quebras. Com relação aos processos de esterilização, o que se mostrou com a melhor relação entre custos e benefícios foi a Autoclave. Os resultados sobre os processos de esterilização foram publicados em 2011 na *International Conference on Applications of Optics and Photonics*, em Braga, Portugal, e foi o trabalho inicial para o desenvolvimento do biosensor (Karam et al., 2011).

Após o estudo dos impactos dos processos de esterilização e desinfecção, foi desenvolvido um estudo em parceria com o Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa do Professor Fábio André Santos, para testar a resposta fisiológica do organismo animal para a presença de fibras óticas inseridas no tecido subcutâneo de ratos. O principal objetivo da pesquisa seria testar como seria a resposta tecidual a presença da fibra ótica implantada no interior do mesmo. O principal resultado do estudo foi perceber que não há qualquer incompatibilidade biológica entre o tecido animal e a fibra. Houve a formação de um granuloma de corpo estranho, o que demonstrou que a fibra não é absorvível, porém não houve o aparecimento de quadros infecciosos no local.

Os testes para o processo de instrumentação do tecido ósseo *in vivo* se iniciaram com os primeiros estudos das deformações geradas no tecido ósseo mandibular e na região do ligamento periodontal. As pesquisas consistiram na tentativa de instrumentação do ligamento periodontal de suínos, a fim de mensurar as deformações transmitidas até a região do sensor durante carregamentos mecânicos, conseguiu-se um bom número de amostras, porém percebeu-se a complexidade da instrumentação em tecidos *ex vivo*, por ainda terem

características do tecido vivo, como a humidade, a presença de sangue, dentre outras. Outra pesquisa tratou de instrumentar uma caveira de um caprino a fim de encontrar os melhores pontos de instrumentação para mensuração de deformações no tecido ósseo durante o processo de mastigação. Tais pesquisas ocorreram em paralelo durante o ano de 2012 nos Campus Curitiba e Pato Branco da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e foram apresentados na OFS-2012, *22nd International Conference on Optical Fiber Sensor* em Beijing, China (Karam et al., 2012; Wosniak et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos anteriormente foi possível chegar a um modelo de instrumentação que foi testado em um projeto piloto que tinha como objetivo aperfeiçoar a técnica cirúrgica e o processo de fixação do sensor na região mandibular do bovino. Para tal foi utilizado uma cabeça de um bovino *ex vivo*, descartado por um produtor local. O processo ocorreu dentro do planejado e ajudou muito no desenvolvimento de uma metodologia cirúrgica, entretanto o estudo demonstrou que seria necessária a construção de um sensor, e não seria possível somente a colagem do sensor no tecido ósseo do novilho, mesmo com a utilização de resinas odontológicas testadas em pesquisas paralelas (Karam et al., 2011; Franco et al., 2012; Pulido et al., 2014). Os resultados coletados foram muito interessantes principalmente para auxiliar no desenvolvimento de uma metodologia de interpretação dos padrões mastigatórios, utilizando-se das deformações geradas no tecido ósseo durante o processo de mastigação (os movimentos mastigatórios foram gerados manualmente e foram utilizados direntes materiais com densidades diferentes), os resultados foram publicados na OFS-2014, *23rd International Conference on Optical Fiber Sensor* em Santander, Espanha (Karam et al., 2014).

Com todo o trabalho desenvolvido até o momento, foi possível o desenvolvimento e construção de um Biosensor que foi implantado *in vivo*. O biosensor foi fixado na região mandibular de um novilho de quatro meses de idade. Uma semana após a implantação, o animal recebeu diferentes tipos de alimentos e foi monitorado durante a ingesta dos alimentos. Com as deformações mensuradas foi possível interpretar os diferentes padrões mastigatórios e as diferentes magnitudes de força e frequência mastigatórias que o animal desenvolveu durante o processo de mastigação concluindo os objetivos do presente estudo.

8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todo o trabalho foi desenvolvido com a utilização de redes de Bragg em fibra ótica gravadas pelo grupo de pesquisa em Dispositivos Fotônicos e aplicações da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Agradecimento as agências de fomento brasileiras que auxiliam no desenvolvimento da pesquisa nacional (CAPES, FINEP, Fundação Araucária e SETI), e em especial para o CNPq pela bolsa de Doutorado fornecida para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradecimento as empresas IBEG® e NEOORTHO® pelo fornecimento de materiais para o desenvolvimento e construção do biosensor.

Agradecimento especial ao grupo de pesquisa em Dispositivos Fotônicos e aplicações, e a própria Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

8.2 TRABALHOS FUTUROS

Futuramente é interessante que o desenvolvimento do biosensor seja continuado para implementar melhorias e para que o mesmo seja submetido a todos os testes que lhe são cabíveis.

Seria interessante um novo modelo de biosensor onde o mesmo ficasse no animal por um período maior, e então pode-se avaliar melhor outras características do padrão mastigatório do animal, bem como entender como seria o comportamento do sensor levando em consideração o crescimento do animal.

É importante que novos trabalhos testem novas realidades do sensor, principalmente melhorias no que diz respeito aos processos de construção do sensor, para diminuir riscos de insucesso e para facilitar o processo de implante.

É fundamental que próximos trabalhos estabeleçam as possíveis relações entre deformações mecânicas transferidas até o sensor, e características específicas dos alimentos fornecidos, como a concentração de fibras e concentração hídrica de cada alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Fakih, E., Abu Osman, N. A., & Mahamd Adikan, F. R. (2012). The use of fiber Bragg grating sensors in biomechanics and rehabilitation applications: the state-of-the-art and ongoing research topics. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *12*(10), 12890–926. doi:10.3390/s121012890
- Alberto, N., Carvalho, L., Lima, H., Antunes, P., Nogueira, R., & Pinto, J. L. (2011). Characterization of different water/powder ratios of dental gypsum using fiber Bragg grating sensors. *Dental Materials Journal*, *30*(5), 700–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946491>
- Albrich, J. M., McCarthy, C. A., & Hurst, J. K. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(1), 210–214. Retrieved from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.1.210>
- Aro, H. T., & Chao, E. Y. (1993). Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (293), 8–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8339513>
- Baker, D. H. (2008). Animal models in nutrition research. *The Journal of Nutrition*, *138*(2), 391–396.
- Bell, F. R. (1960). The electroencephalogram of goats during somnolence and rumination. *Animal Behaviour*.
- Brown, B. L., & Fuerst, R. (1963). ETHYLENE OXIDE STERILIZATION OF TISSUE CULTURE MEDIA. *Science*, *142*, 1654–1655.
- Buijtsels, P. C. A. M., & Petit, P. L. C. (2005). Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods*, *62*(1), 83–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823396>
- Carraway, J., & Ghosh, C. (2006). The challenge to global acceptance of Part 3 of ISO 10993. *Medical Device Technology*, *17*(5), 16–18.
- Carter, D. R., Beaupré, G. S., Giori, N. J., & Helms, J. A. (1998). Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *355*(355 Suppl), S41–S55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917625>
- Carvalho, L., Alberto, N. J., Gomes, P. S., Nogueira, R. N., Pinto, J. L., & Fernandes, M. H. (2011). In the trail of a new bio-sensor for measuring strain in bone: osteoblastic biocompatibility. *Biosensors & Bioelectronics*, *26*(10), 4046–52. doi:10.1016/j.bios.2011.03.028
- Carvalho, L., Silva, J. C. C., Nogueira, R. N., Pinto, J. L., Kalinowski, H. J., & Simões, J. A. (2006). Application of Bragg Grating Sensors in Dental Biomechanics. *The Journal of Strain Analysis for Engineering Design*, *41*(6), 411–416. doi:10.1243/03093247JSA191
- Cattaneo, P. M., Dalstra, M., & Melsen, B. (2009). Strains in periodontal ligament and alveolar bone associated with orthodontic tooth movement analyzed by finite element. *Orthodontics Craniofacial Research*, *12*(2), 120–128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19419455>

- CHAMBERS, A. R. M., HODGSON, J., & MILNE, J. A. (1981). The development and use of equipment for the automatic recording of ingestive behaviour in sheep and cattle. *Grass and Forage Science*, 36(2), 97–105. doi:10.1111/j.1365-2494.1981.tb01545.x
- Chassot, A. L. C., Poisl, M. I. P., & Samuel, S. M. W. (2006). In vivo and in vitro evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. *Brazilian Dental Journal*, 17(2), 117–121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924337>
- Clapham, W. M., Fedders, J. M., Beeman, K., & Neel, J. P. S. (2011). Acoustic monitoring system to quantify ingestive behavior of free-grazing cattle. *Computers and Electronics in Agriculture*, 76(1), 96–104. doi:10.1016/j.compag.2011.01.009
- Cooley, J. W., & Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of Computation*, 19(90), 297–297. doi:10.1090/S0025-5718-1965-0178586-1
- Cordova, A. F. J., Wallace, J. D., & Pieper, R. D. (1978). Forage Intake by Grazing Livestock : *Journal of Range Management*, 31(6), 430–438.
- Costa, A. da, Albuquerque, J. A., Mafra, Á. L., & Silva, F. R. da. (2009). Propriedades físicas do solo em sistemas de manejo na integração agricultura-pecuária. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Retrieved from <http://www.scientificcircle.com/pt/45484/propriedades-fisicas-solo-sistemas-manejo-integracao/>
- Costa, A. M. da, Restle, J., & Müller, L. (2008, August 1). Influência da pastagem cultivada no desempenho reprodutivo de vacas com cria ao pé. *Revista Do Centro de Ciências Rurais*. Retrieved from <http://coral.ufsm.br/revistaccr/index.php/RCCCR/article/view/423>
- Dadd, A. H., Stewart, C. M., & Town, M. M. (1983). A standardized monitor for the control of ethylene oxide sterilization cycles. *The Journal of Hygiene*, 91(1), 93–100. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2129287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Denis, B., Bibinov, N., Awakowicz, P., & Wunderlich, J. Investigation on the sterilization mechanisms of a double inductively coupled plasma, 40 Plasma Science 2010 Abstracts IEEE International Conference on 4154–4154 (2010). doi:10.1109/PLASMA.2010.5533908
- Dennison, C. R., Wild, P. M., Byrnes, P. W. G., Saari, A., Itshayek, E., Wilson, D. C., ... Wilson, D. R. (2008). Ex vivo measurement of lumbar intervertebral disc pressure using fibre-Bragg gratings. *Journal of Biomechanics*, 41(1), 221–5. doi:10.1016/j.jbiomech.2007.07.015
- Dennison, C. R., Wild, P. M., Dvorak, M. F., Wilson, D. R., & Cripton, P. A. (2008). Validation of a novel minimally invasive intervertebral disc pressure sensor utilizing in-fiber Bragg gratings in a porcine model: an ex vivo study. *Spine*, 33(17), E589–E594.
- Dennison, C. R., Wild, P. M., Wilson, D. R., & Cripton, P. A. (2008). A minimally invasive in-fiber Bragg grating sensor for intervertebral disc pressure measurements. *Measurement Science and Technology*.
- Dinsmore, J. R. (1969). Ethylene oxide gas sterilization. *Medical Device Technology*, 6(5), 2016–2017.

- Epari, D. R., Taylor, W. R., Heller, M. O., & Duda, G. N. (2006). Mechanical conditions in the initial phase of bone healing. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)*, *21*(6), 646–55. doi:10.1016/j.clinbiomech.2006.01.003
- Everall, P. H., Morris, C. A., & Yarnell, R. (1978). Sterilisation in the laboratory autoclave using direct air displacement by steam. *Journal of Clinical Pathology*, *31*(2), 144–147.
- Fehling, P. C., Alekel, L., Clasey, J., Rector, A., & Stillman, R. J. (1995). A comparison of bone mineral densities among female athletes in impact loading and active loading sports. *Bone*, *17*(3), 205–10. Retrieved from [http://www.thebonejournal.com/article/8756-3282\(95\)00171-9/abstract](http://www.thebonejournal.com/article/8756-3282(95)00171-9/abstract)
- Fleisher, G. R., Kearney, T. E., Henretig, F., & Tenenbein, M. Gastric decontamination in the poisoned patient., *7 Pediatric Emergency Care* 378–381 (1991). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347499>
- Foster, B. L., Kindscher, K., Houseman, G. R., & Murphy, C. A. (2009). Effects of hay management and native species sowing on grassland community structure, biomass, and restoration. *Ecological Applications*, *19*(7), 1884–1896.
- Fresvig, T., Ludvigsen, P., Steen, H., & Reikerås, O. (2008). Fibre optic Bragg grating sensors: an alternative method to strain gauges for measuring deformation in bone. *Medical Engineering & Physics*, *30*(1), 104–8. doi:10.1016/j.medengphy.2007.01.006
- Frost, H. (2004). A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *The Angle Orthodontist*, *74*(1), 3–15. Retrieved from [http://www.angle.org/doi/full/10.1043/0003-3219\(2004\)074<0003:AUOBPA>2.0.CO;2](http://www.angle.org/doi/full/10.1043/0003-3219(2004)074<0003:AUOBPA>2.0.CO;2)
- Galli, J. R., Cangiano, C. A., Demment, M. W., & Laca, E. A. (2006). Acoustic monitoring of chewing and intake of fresh and dry forages in steers. *Animal Feed Science and Technology*, *128*(1-2), 14–30.
- Galli, J. R., Cangiano, C. A., Milone, D. H., & Laca, E. A. (2011). Acoustic monitoring of short-term ingestive behavior and intake in grazing sheep. *Livestock Science*, *140*(1-3), 32–41.
- García, J. (2002). Bone remodelling simulation: a tool for implant design. *Computational Materials Science*, *25*(1-2), 100–114. doi:10.1016/S0927-0256(02)00254-9
- Goodship, A., & Kenwright, J. (1985). The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br*, *67-B*(4), 650–655. Retrieved from <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/67-B/4/650.short>
- Grand, I., Bellon-Fontaine, M.-N., Herry, J.-M., Hilaire, D., Moriconi, F.-X., & Naïtali, M. (2010). The resistance of *Bacillus atrophaeus* spores to the bactericidal activity of peracetic acid is influenced by both the nature of the solid substrates and the mode of contamination. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(5), 1706–1714. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04799.x
- Griffiths, W. M., Alchanatis, V., Nitzan, R., Ostrovsky, V., Ben-Moshe, E., Yonatan, R., ... Ungar, E. D. (2006). A video and acoustic methodology to map bite placement at the patch scale. *Applied Animal Behaviour Science*, *98*(3-4), 196–215.
- Halfmann, H., Denis, B., Bibinov, N., Wunderlich, J., & Awakowicz, P. (2007). Identification of the most efficient VUV/UV radiation for plasma based inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *40*(19), 5907–5911. doi:10.1088/0022-3727/40/19/019

- Hallowell, P., Murphy, J. T., & Mangiaracine, A. B. (1975). Sterilization of ampuls with ethylene oxide. *Anesthesiology*, *19*(5), 665–670. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2060/19750017988>
- Hao, J. Z., Tan, K. M., Tjin, S. C., Liaw, C. Y., Chaudhuri, P. R., Guo, X., & Lu, C. (2003). Design of a foot-pressure monitoring transducer for diabetic patients based on FBG sensors. In *The 16th Annual Meeting of the IEEE Lasers and Electro-Optics Society, 2003. LEOS 2003*. (Vol. 1, pp. 23–24). IEEE. doi:10.1109/LEOS.2003.1251581
- Hill, K., & Fujii, Y. (1978). Photosensitivity in optical fiber waveguides: Application to reflection filter fabrication. *Applied Physics Letters*, *32*(10), 647–649. Retrieved from http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=4847049
- Huiskes, R., Ruimerman, R., Van Lenthe, G. H., & Janssen, J. D. (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, *405*(6787), 704–706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864330>
- Jefferson, R. G. (2005). The conservation management of upland hay meadows in Britain: A review. *Grass and Forage Science*.
- Karam, L., Silva, J. da, Pintos, L., Grabarski, L., Carvalho, L., & Kalinowski, H. (2009). CHARACTERIZATION OF A SINTETIC FEMUR WITH THE EMPLOYMENT OF THE FINITE ELEMENT METHOD AND VALIDATION BY OPTICAL. In *Proceedings of COBEM 2009 20th International Congress of Mechanical Engineering*. Retrieved from <http://www.abcm.org.br/pt/wp-content/anais/cobem/2009/pdf/COB09-2080.pdf>
- Karam, L. Z., Franco, A. P. G. O., Tomazinho, P., Signorini, L., Carvalho, L., Fernandes, M. H., ... Kalinowski, H. J. (2011). Evaluation of the efficacy and influence of the decontamination and sterilization of FBGs exposed to *S. aureus* and *E. coli*. In *European Applied Optics and Photonics, AOP Braga 2011* (pp. 800134–800134–6). doi:10.1117/12.892192
- Karam, L. Z., Milczewski, M. S., & Kalinowski, H. J. (2012). Strain monitoring of the periodontal ligament in pig's mandibles. In Y. Liao, W. Jin, D. D. Sampson, R. Yamauchi, Y. Chung, K. Nakamura, & Y. Rao (Eds.), *OFS2012 22nd International Conference on Optical Fiber Sensor* (p. 84215W–84215W–4). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.975270
- Karam, L. Z., Pegorini, V., Pitta, C. S. R., Assmann, T. S., Cardoso, R., Kalinowski, H. J., & Silva, J. C. C. (2014). Ex vivo determination of chewing patterns using FBG and artificial neural networks. In J. M. López-Higuera, J. D. C. Jones, M. López-Amo, & J. L. Santos (Eds.), *OFS2014 23rd International Conference on Optical Fiber Sensors* (p. 91573Z). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.2057974
- Kurze, T., Apuzzo, M. L., Weiss, M. H., & Heiden, J. S. (1977). Experiences with sterilization of the operating microscope. *Journal Of Neurosurgery*, *47*(6), 861–863.
- Laca, E. A., Ungar, E. D., & Demment, M. W. (1994). Mechanisms of handling time and intake rate of a large mammalian grazer. *Applied Animal Behaviour Science*, *39*(1), 3–19. doi:10.1016/0168-1591(94)90011-6
- LACA, E. A., UNGAR, E. D., SELIGMAN, N. G., RAMEY, M. R., & DEMMENT, M. W. (1992). An integrated methodology for studying short-term grazing behaviour of cattle. *Grass and Forage Science*, *47*(1), 81–90. doi:10.1111/j.1365-2494.1992.tb02250.x

- Mahnel, H. (1977). Studies on inactivation of viruses in drinking and surface water. A contribution to the decontamination of water by field methods (author's transl). *Zentralblatt Fur Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe B Hygiene Praventive Medizin*, 165(5-6), 527–538.
- Majcher, M. R., Bernard, K. A., & Sattar, S. A. (2008). Identification by quantitative carrier test of surrogate spore-forming bacteria to assess sporicidal chemicals for use against *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 676–681. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2227719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Manius, G. J. (1984). Determination of ethylene oxide, ethylene chlorohydrin, and ethylene glycol residues in ophthalmic solutions at proposed concentration limits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(9), 1305–1307.
- Menezes, S. M. P. N. J. M. F. E. W. De. (2013). Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. Ed. USP, 234 p.
- Mihailov, S. J. (2012). Fiber Bragg grating sensors for harsh environments. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(2), 1898–918. doi:10.3390/s120201898
- Milczewski, M. S., da Silva, J. C. C., Martelli, C., Grabarski, L., Abe, I., & Kalinowski, H. J. (2012). Force monitoring in a maxilla model and dentition using optical fiber Bragg gratings. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 11957–65. doi:10.3390/s120911957
- Milczewski, M. S., Silva, J. C. C. Da, Abe, I., Carvalho, L., Nogueira, R. N., Paterno, A. S., ... Pinto, J. L. (2006). Determination of setting expansion of dental materials using fibre optical sensing. *Measurement Science and Technology*, 17(5), 1152–1156. doi:10.1088/0957-0233/17/5/S36
- Mishra, V., Singh, N., Tiwari, U., & Kapur, P. (2011). Fiber grating sensors in medicine: Current and emerging applications. *Sensors and Actuators A: Physical*, 167(2), 279–290. doi:10.1016/j.sna.2011.02.045
- Muscher, A., Hattendorf, J., Pfeffer, E., Breves, G., & Huber, K. (2008). Hormonal regulation of phosphate homeostasis in goats during transition to rumination. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(5), 585–596.
- Othonos, A., & Kalli, K. (1999). *Fiber Bragg Gratings: Fundamentals and Applications in Telecommunications and Sensing*. Artech House optoelectronics library. Artech House. Retrieved from <http://www.worldcat.org/isbn/0890063443>
- Ottevaere, H., Tabak, M., Bartholomees, F., de Wilde, W. P., Veretennicoff, I. P., & Thienpont, H. (2001). Monitoring the stress build-up in dental cements: a novel optical characterization technique. In P. Brouwer (Ed.), *EOS/SPIE European Biomedical Optics Week* (pp. 309–317). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.413691
- Ottevaere, H., Tabak, M., Fernandez Fernandez, A., Berghmans, F., & Thienpont, H. (2005). Optical fiber sensors and their application in monitoring stress build-up in dental resin cements. In L. R. Jaroszewicz, B. Culshaw, & A. G. Mignani (Eds.), *Congress on Optics and Optoelectronics* (p. 59520P–59520P–13). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.619786

- Palenik, C. J., Burke, F. J., Coulter, W. A., & Cheung, S. W. (1999). Improving and monitoring autoclave performance in dental practice. *British Dental Journal*, *187*(11), 581–584.
- Paula, A., Oliveira, G. De, Karam, L. Z., & Scandelari, M. (2012). Monitoring Deformation of Resin Cements During Polymerization. *Latin America Optics and Photonics Conference*, *100*, 3–5.
- Postma, D. F., Sankatsing, S. U. C., Thijsen, S. F. T., & Endeman, H. (2012). Effects of Chlorhexidine Oral Decontamination on Respiratory Colonization during Mechanical Ventilation in Intensive Care Unit Patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, *33*(5), 527–30. doi:10.1086/665325
- Pulido, C. A., Franco, A. P. G. O., Karam, L. Z., Kalinowski, H. J., & Gomes, O. M. M. (2014). Study of deformation of resin cements used in fixing of root posts through fiber Bragg grating sensors. In J. M. López-Higuera, J. D. C. Jones, M. López-Amo, & J. L. Santos (Eds.), *OFS2014 23rd International Conference on Optical Fiber Sensors* (p. 91574R). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.2059194
- Ramos, A., Abe, I., Schiller, M. W., Lopes, P., Nogueira, R., Pinto, J. L., & Simões, J. A. (2006). On the use of fiber bragg sensors to assess temperature and thermal induce strain profiles in cemented hip mantles. *Journal of Biomechanics*, *39*, S514. doi:10.1016/S0021-9290(06)85108-0
- Rao, Y. J., Webb, D. J., Jackson, D. A., Zhang, L., & Bennion, I. (1998a). Optical in-fiber bragg grating sensor systems for medical applications. *Journal of Biomedical Optics*, *3*(1), 38–44. doi:10.1117/1.429860
- Rao, Y. J., Webb, D. J., Jackson, D. A., Zhang, L., & Bennion, I. (1998b). Optical in-fiber bragg grating sensor systems for medical applications. *Journal of Biomedical Optics*, *3*(1), 38–44. doi:10.1117/1.429860
- Ren, L., Song, G., Conditt, M., Noble, P. C., & Li, H. (2007). Fiber Bragg grating displacement sensor for movement measurement of tendons and ligaments. *Applied Optics*, *46*(28), 6867–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906712>
- Rolland, S. L., Carrick, T. E., Walls, A. W., & McCabe, J. F. (2007). Dentin decontamination using chloramine T prior to experiments involving bacteria. *Dental Materials Official Publication of the Academy of Dental Materials*, *23*(12), 1468–1472. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349688>
- Roriz, P., Abe, I., Schiller, M., Gabriel, J., & Simões, J. (2011a). Ex Vivo Intervertebral Disc Bulging Measurement Using a Fibre Bragg Grating Sensor. *Experimental Mechanics*, *51*(9), 1573–1577. doi:10.1007/s11340-011-9470-7
- Roriz, P., Abe, I., Schiller, M., Gabriel, J., & Simões, J. (2011b). Ex Vivo Intervertebral Disc Bulging Measurement Using a Fibre Bragg Grating Sensor. *Experimental Mechanics*, *51*(9), 1573–1577. doi:10.1007/s11340-011-9470-7
- Schmitz, H., & Draeger, J. (1986). Inactivation of HTLV-III/LAV by UV irradiation and chemical disinfection. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, *189*(2), 154–157.

- Seyfert, U. T., Biehl, V., & Schenk, J. (2002). In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. In *Biomolecular Engineering* (Vol. 19, pp. 91–96).
- Silva, C. J. A. da, Dittrich, J. R., Monteiro, A. L. G., Moraes, A. de, Barros, C. S. de, & Oliveira, E. B. de. (2009, September 30). PREFERÊNCIA DE CAPRINOS EM PASTEJO: EFEITO DA ALTURA DE DOSSÉIS DAS FORRAGEIRAS ARUANA E HEMÁRTRIA. *Ciência Animal Brasileira*. doi:10.5216/cab.v10i3.1025
- Soni, J. F., Santili, C., Lancellotti, C. L. P., Hecke, M. B., Almeida, F. R. de, & Karam, L. Z. (2008). Análise comparativa em modelo computadorizado bidimensional com simulação do emprego de hastas flexíveis de aço e titânio, na fratura do fêmur da criança, utilizando o método dos elementos finitos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 43(5), 183–192. doi:10.1590/S0102-36162008000400005
- Sweet, H. C. (1971). Surface Decontamination in an Autoclave Chamber with Formaldehyde Gas. *Applied Microbiology*, 22(2), 250–251.
- Talaia, P., Ramos, A., Abe, I., Schiller, M., Lopes, P., Nogueira, R., ... Simões, J. (2007). Plated and Intact Femur Strains in Fracture Fixation Using Fiber Bragg Gratings and Strain Gauges. *Experimental Mechanics*, 47(3), 355–363. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s11340-007-9034-z> DO - 10.1007/s11340-007-9034-z
- Tiwari, U., Mishra, V., Bhalla, A., Singh, N., Jain, S. C., Garg, H., ... Kapur, P. (2011). Fiber Bragg grating sensor for measurement of impact absorption capability of mouthguards. *Dental Traumatology : Official Publication of International Association for Dental Traumatology*, 27(4), 263–8. doi:10.1111/j.1600-9657.2011.00998.x
- Tjin, S. C., Tan, Y. K., Yow, M., Lam, Y. Z., & Hao, J. (2001). Recording compliance of dental splint use in obstructive sleep apnoea patients by force and temperature modelling. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 39(2), 182–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11361244>
- Ungar, E. D., & Rutter, S. M. (2006). Classifying cattle jaw movements: Comparing IGER Behaviour Recorder and acoustic techniques. *Applied Animal Behaviour Science*, 98(1-2), 11–27. doi:10.1016/j.applanim.2005.08.011
- Webb, D. J., Hathaway, M. W., Jackson, D. A., Jones, S., Zhang, L., & Bennion, I. (2000). First in-vivo trials of a fiber Bragg grating based temperature profiling system. *Journal of Biomedical Optics*, 5(1), 45–50. doi:10.1117/1.429967
- Webb, D. J., Jackson, D. A., & Bennion, I. (1997). In-fiber Bragg-grating temperature sensor system for medical applications. *Journal of Lightwave Technology*, 15(5), 779–785. doi:10.1109/50.580812
- Wehrle, G., Nohama, P., Kalinowski, H. J., Torres, P. I., & Valente, L. C. G. (2001). A fibre optic Bragg grating strain sensor for monitoring ventilatory movements. *Measurement Science and Technology*, 12(7), 805–809. doi:10.1088/0957-0233/12/7/309
- Willsch, R. (2000). Application of optical fiber sensors: Technical and market trends. In A. J. Rogers (Ed.), *Symposium on Applied Photonics* (Vol. 4074, pp. 24–31). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.397874
- Wood, J. P., Choi, Y. W., Rogers, J. V., Kelly, T. J., Riggs, K. B., & Willenberg, Z. J. (2011). Efficacy of liquid spray decontaminants for inactivation of Bacillus anthracis spores on

- building and outdoor materials. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1262–1273. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04980.x
- Wosniak, C., Silva, W. J., Cardoso, R., Assmann, T. S., Hill, J. A. G., Silveira, A. L. F., ... Silva, J. C. C. (2012). Determination of chewing patterns in goats using fiber Bragg gratings. In Y. Liao, W. Jin, D. D. Sampson, R. Yamauchi, Y. Chung, K. Nakamura, & Y. Rao (Eds.), *Conference proceedings : OFS 22 Beijing - China* (Vol. 8421, p. 84214F–84214F–4). doi:10.1117/12.974332
- Yagi, N., Mori, M., Hamamoto, A., Nakano, M., Akutagawa, M., Tachibana, S., ... Kinouchi, Y. (2007). Sterilization using 365 nm UV-LED. *Conference Proceedings of the International Conference of IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2007*, 5842–5845. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003342>
- Yeboah-Manu, D., Bodmer, T., Mensah-Quainoo, E., Owusu, S., Ofori-Adjei, D., & Pluschke, G. (2004). Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5875–5876. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15583329
- Zen Karam, L., Franco, A. P., Tomazinho, P., & Kalinowski, H. J. (2012). Validation of a Sterilization Methods in FBG Sensors for in vivo Experiments. In *Latin America Optics and Photonics Conference* (p. LT2A.7). doi:10.1364/LAOP.2012.LT2A.7
- Zheng, H. L., Huang, C., Zhao, J., & Xu, Z. (1997). The development and efficacy tests for the autoclave indicator tape. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 21(1), 16–19.