



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DA OSTEINTEGRAÇÃO DA LIGA Ti-13Nb-13Zr
OBTIDA POR METALURGIA DO PÓ COM DIFERENTES
GRAUS DE POROSIDADE**

MARCO CÍCERO MARTINS BOTTINO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientador:
Dr. José Carlos Bressiani

São Paulo
2005

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA OSTEOINTEGRAÇÃO DA LIGA Ti-13Nb-13Zr
OBTIDA POR METALURGIA DO PÓ COM DIFERENTES
GRAUS DE POROSIDADE**

MARCO CÍCERO MARTINS BOTTINO



**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais**

**Orientador:
Dr. José Carlos Bressiani**

SÃO PAULO

2005

Ao meu orientador Dr. José Carlos Bressiani,
por confiar e apostar no meu trabalho.
Agradeço a acolhida e, principalmente, a
transmissão de conhecimentos valiosos que
estão proporcionando uma nova direção em meu
caminho profissional.

Aos meus pais, Marco Aurélio e Marina, e
ao meu irmão Marco Aurélio Bottino Jr,
presenças constantes.

À Isadora, pela dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos (processo # 03/10049-5), que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Dr. Vinicius A. R. Henriques, da Divisão de Materiais (AMR) do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE) do Centro Técnico Aeroespacial (CTA), São José dos Campos, pela obtenção e fornecimento das amostras da liga Ti-13Nb-13Zr.

À Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani, por sua disponibilidade, não só para ensinar e esclarecer teorias, assim como me fazer enxergar, com maior nitidez, os desafios que ainda estão por vir.

À Dra. Dolores R. R. Lazar, pela amizade, incentivo e apoio nas discussões, que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto, pela estimável ajuda na realização de todas as etapas dos ensaios “in vivo”, pela amizade e incentivo.

À Dra. Olga Z. Higa, pelos ensinamentos e discussões fundamentais para o entendimento dos ensaios “in vitro”, e à cooperação da aluna Solange Lorenzetti.

Ao Dr. P. G. Coelho, por viabilizar a realização das análises histomorfométricas na Universidade do Alabama (Birmingham, EUA), pela amizade, incentivo e assistência nas discussões dos resultados desta pesquisa.

Ao Dr. Bruno König Jr., do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de conduzir os experimentos “in vivo” sob a sua responsabilidade.

Ao Dr. Nelson B. de Lima, Marilene M. Serna e Rene R. de Oliveira, pela realização das análises de difração de raios X.

Ao Dr. José Roberto Martinelli, por disponibilizar equipamentos e realizar análises importantes para esta pesquisa.

À MSc. Luzinete P. Barbosa e ao Glauson A. Ferreira, pela valiosa contribuição na preparação metalográfica.

À *Conexão Sistemas de Prótese*, pela doação de brocas cirúrgicas, amostras em titânio comercialmente puro (Ticp) e pela gentileza na usinagem de corpos-de-prova.

Aos colegas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, *Prof. Fábio Mitri e Prof. Samuel Koo*, pelo auxílio na realização do estudo “in vivo”.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia do ICB/USP, *Marta Righetti, Maria do Socorro P. Abel, José Amaro Martins, Sebastião Boleta*, por estarem sempre dispostos a solucionar minhas dúvidas durante o decorrer das etapas do estudo “in vivo”.

Aos técnicos do Laboratório de Caracterização Microestrutural, *Celso V. de Moraes e Nildemar A. Messias*, pela extrema dedicação no trabalho de microscopia eletrônica.

Aos amigos dos Laboratórios de Cerâmica, *Carol, Christiane, Cláudio, Daniel Flório, Deiby, Érica, Eduardo, Fernando, Gustavo, Juliana, Luciana, Renata e Sandra*, por estarem sempre dispostos a ajudar e, acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos do CCTM, *Couto, Emília, Liana, Luís Gênova, Mauricio, Rejane, Sandra Cunha, Téo e Valter Ussui*, pelo apoio e amizade.

Aos técnicos dos Laboratórios de Cerâmica e Insumos, *Pedro P. de Freitas e Joana Andrade*, respectivamente, pela amizade e auxílio.

Às secretárias do CCTM *Elisabete dos Santos e Marlene de Fátima P. Marcelino* e da Pós-Graduação, *Ilze Puglia*, pela amizade e auxílio nas questões administrativas.

Aos amigos Pós-Graduandos do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em especial ao meu querido amigo *Prof. José Roberto Bauer*.

Ao *Dr. Marco Antonio Bottino*, pelo carinho e constantes demonstrações de incentivo.

Ao *Prof. L. F. Valandro* (UFSM), pelo apoio e amizade.

ESTUDO DA OSTEINTEGRAÇÃO DA LIGA Ti-13Nb-13Zr OBTIDA POR METALURGIA DO PÓ COM DIFERENTES GRAUS DE POROSIDADE

Marco Cícero Martins Bottino

RESUMO

O desenvolvimento de implantes metálicos porosos vem sendo intensamente pesquisado no campo de biomateriais, já que uma estrutura porosa permite o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros proporcionando melhor estabilidade mecânica. Considerando-se a biocompatibilidade dos materiais à base de titânio, o objetivo deste trabalho foi avaliar a osteointegração de implantes da liga Ti-13Nb-13Zr, processados via metalurgia do pó (M/P), com diferentes graus de porosidade. Amostras cilíndricas foram produzidas a partir da mistura de pós dos hidretos de Ti, Nb e Zr, seguido de prensagem uniaxial/isostática e sinterização a 1000 °C/5h, 1300 °C/3h, 1500 °C/2h. As amostras sinterizadas foram caracterizadas quanto a densidade, fases cristalinas (DRX) e microestrutura (MEV/EDS). Os implantes foram cirurgicamente instalados na tíbia de coelhos por um período de 8 semanas. Durante o período pós-cirúrgico os animais receberam doses de marcadores ósseos fluorocromáticos em diferentes intervalos. Os implantes foram processados e avaliados por MEV, EDS, e análises histomorfométricas em microscópio óptico para observar o contato osso-implante, a bioatividade e a taxa de aposição mineral). As análises por MEV e DRX das amostras sinterizadas indicaram a presença das fases α e β , e a formação da microestrutura tipo Widmannstätten. Amostras sinterizadas a 1000 °C, revelaram regiões contendo nióbio não reagido, apresentando um grau de porosidade de aproximadamente 30%, e poros abertos e interconectados com diâmetro ao redor de 50-100 μm . As amostras sinterizadas 1300 °C e 1500 °C apresentaram um baixo grau de porosidade, ao redor de 10%. Testes de citotoxicidade, realizados de acordo com a ISO-10993-5, demonstraram que os pós e as amostras sinterizadas não apresentaram qualquer efeito tóxico à cultura celular. As análises histológicas não revelaram quaisquer sinais de inflamação ou necrose tecidual ao redor dos implantes. Independentemente da condição de sinterização empregada, uma porcentagem significativa de contato osso-implante pôde ser observada. Análises de bioatividade junto à interface revelaram uma alta atividade de remodelamento ósseo, porém, sem significância estatística entre os grupos. A taxa de aposição mineral (MAR) nos sítios controle foi quantitativamente menor que a MAR junto à interface. O crescimento de tecido ósseo no interior dos poros foi evidenciado por MEV e confirmado por EDS. Somando-se a isso, observou-se que o tecido ósseo remodelado foi capaz de se adaptar à geometria dos poros. Do ponto de vista da biocompatibilidade, os resultados desta pesquisa demonstraram que a metalurgia do pó (M/P), é um processo interessante para a obtenção de materiais porosos, a partir da utilização de elementos não tóxicos, para aplicações como implantes cirúrgicos.

OSSEOINTEGRATION STUDY OF THE Ti-13Nb-13Zr ALLOY OBTAINED BY POWDER METALLURGY WITH DIFERENT POROSITY DEGREES

Marco Cicero Martins Bottino

ABSTRACT

The development of metallic porous implants has been extensively researched in the biomaterials field, since porous structures allow for bone ingrowth to biomaterials, providing better mechanical stability. Based on the established biocompatible properties of titanium based materials, the objective of this work was to evaluate the osseointegration of Ti-13Nb-13Zr implants, processed via powder metallurgy (P/M), with different porosity degrees. Cylindrical samples were produced by mixing metallic powders hydrides of Ti, Nb and Zr, uniaxially/cold isostatically pressing the powders, and sintering at 1000°C/5h, 1300°C/3h, and 1500°C/2h. The sintered samples were evaluated for density, crystalline phases (XRD), and microstructure (SEM/EDS). The implants were surgically placed in rabbit tibias for a 8-week healing period. During postoperative periods, the animals received doses of fluorochrome labels at different periods of time. The implants were retrieved and evaluated by SEM, EDS, and optical microscopy-histomorphometry in order to evaluate bone-implant contact, the bioactivity, and the mineral apposition rate. SEM and XRD analysis of the sintered samples indicated the presence of α and β -phases with the Widmannstätten-like microstructure formation. Samples sintered at 1000 °C. revealed regions with non-reacted niobium particles presenting the highest porosity level at approximately 30%, with open and interconnected pores measuring around 50-100 μm . Samples sintered at 1300 °C and 1500 °C showed low porosity degrees around 10%. Cytotoxicity tests based on ISO 10993-5 shown that both the powders and the sintered samples did not present any toxic effect at a cellular level. Histological findings did not reveal signals of inflammation or tissue necrosis around the different implants. Regardless of sintering condition, significant bone-implant contact could be observed. Bioactivity analysis close to the interface revealed bone modeling activity, not statistically different among the groups. The mean apposition rate (MAR) at control sites was quantitatively lower when compared to the MAR close to the implant surface. Bone ingrowth occurrence for samples sintered at 1000 °C was evidenced by SEM and confirmed by EDS. In addition, it was also observed that newly formed bone was able to adapt into the pores geometry. From a biocompatibility standpoint, the results of this research demonstrate that P/M is an attractive process to obtain porous materials based on non-toxic elements for surgical implant applications.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância.....
C	Calceína.....
Co-Cr	Liga cobalto-cromo.....
Co-Cr-Mo	Liga cobalto-cromo-molibdênio.....
DRX	Difração de raios-X.....
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva.....
FAENQUIL	Faculdade de Engenharia Química de Lorena.....
HA	Hidroxiapatita.....
HC	Canal de Havers.....
I	Implante.....
IC _(50%)	Índice de Citotoxicidade.....
ISO	International Organization for Standardization.....
M/P	Metalurgia do Pó.....
MAR	Mineral Apposition Rate – Taxa de Aposição Mineral.....
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura.....
NbH	Hidreto de nióbio.....
NiTi	Liga níquel-titânio.....
OA	Ossos Antigos.....
Ob	Osteoblastos.....
Oc	Osteócitos.....
Os	Osteona.....
PEAD	Polietileno de Alta Densidade.....

PREP	Processo de Eletrodo Rotativo com Arco de Plasma.....
RTV	Removal Torque Value – Valor de Remoção ao Torque.....
TC	Tetraciclina.....
TCP	Fosfato tricálcico.....
Ti	Titânio.....
Ti-13Nb-13Zr	Liga titânio-nióbio-zircônio.....
Ti-6Al-4V	Liga titânio-alumínio-vanádio.....
Ti-6Al-7Nb	Liga titânio-alumínio-nióbio.....
Ticp	Titânio comercialmente puro.....
TiH ₂	Hidreto de titânio.....
TL	Tecido lamelar.....
TR	Tecido remodelado.....
UV	Ultra-violeta.....
ZrH ₂	Hidreto de zircônio.....

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.:	Representação esquemática da arquitetura do tecido ósseo..... 6
Figura 2.:	Representação esquemática da estrutura da diáfise de ossos longos. Observar os sistemas de Havers desenhado em três dimensões, no alto e à esquerda, mostrando a orientação das fibras colágenas nas lamelas. À direita, esquema de um sistema de Havers isolado (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 1995)..... 7
Figura 3.:	Representação esquemática dos tipos de poros existentes em um material poroso: a) poros abertos; b) poros fechados (Adaptado de Li et al., 2001)..... 17
Figura 4.:	Segmento da tabela periódica dos elementos contendo os metais chamados reativos (Coelho et al., 2005)..... 37
Figura 5.:	Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), do implante Endopore (Innova Corporation, Toronto, ON, Canadá): (a) aspecto geral do implante; (b) camada porosa parcialmente sinterizada sobre a liga Ti-6Al-4V. Observar (b) o início da formação de pescoços (asteriscos)..... 43
Figura 6.:	Forno utilizado para realização da hidretação dos pós elementares e para a sinterização dos compactados (Thermal Technology Inc. – Astro 1000), pertencente à Divisão de Materiais do Centro Técnico Aeroespacial – São José dos Campos – SP)..... 49
Figura 7.:	Matriz de aço com camisa flutuante utilizada na prensagem uniaxial a frio..... 50
Figura 8.:	Micrografias, obtidas por MEV, do material de referência clínica – ITI- Straumann - observar as características de superfície após jateamento com óxido de alumínio e ataque químico..... 53

Figura 9.:	Representação esquemática das áreas de instalação dos implantes.....	55
Figura 10.:	Determinação da bioatividade junto à interface com o implante, região marcada em vermelho no interior do retângulo de análise (0 mm – 0,5 mm a partir da superfície do implante).....	62
Figura 11.:	Determinação da bioatividade em área controle, região marcada em vermelho no interior do retângulo de análise (> 2,0 mm a partir da superfície do implante).....	62
Figura 12.:	Ilustração da tela de trabalho do programa computacional (Bioquant™) utilizado para a realização das análises histomorfométricas.....	63
Figura 13.:	Distribuição granulométrica dos hidretos de Ti, Nb e Zr.....	68
Figura 14.:	Difratogramas de raios-X dos hidretos de TiH ₂ , NbH e ZrH ₂ , utilizados na obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr.....	69
Figura 15.:	Micrografias, obtidas por MEV, dos pós obtidos por hidretação: (a) Ti, (b) Nb e (c) Zr.....	70
Figura 16.:	Difratogramas de raios-X das amostras sinterizadas: (L1) 1000 °C por 5h, (L2) 1300 °C por 3h e (L3) 1500 °C por 2h.....	72
Figura 17.:	Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C (L1) – (a) aspecto geral (b) e (c) presença de regiões (claras) contendo Nb não dissolvido e interconectividade dos poros.....	73
Figura 18.:	Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000° C – EDS em áreas representativas das fases α (b) e β (c).....	74
Figura 19.:	Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000° C - EDS em áreas representativas marcadas pelos números 1 (b) e 2 (c).....	75
Figura 20.:	Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1300 °C - (a) aspecto geral da microestrutura (b) detalhes da porosidade, menor interconectividade dos poros.....	76
Figura 21.:	Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr	

	obtida por sinterização a 1300 °C - (a) áreas analisadas por EDS, (b) área 1 e (c) área 2.....	77
Figura 22.:	Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C - (a) aspecto geral e (b) poros residuais.....	78
Figura 23.:	Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C - (a) estrutura tipo Widmannstätten - Análise por EDS, (b) 1. região escura e (c) 2. região clara.....	78
Figura 24.:	Resultados do percentual de células vivas dos pós de partida - hidretos de Ti, Nb e Zr.....	80
Figura 25.:	Resultados do percentual de células vivas das amostras L1, L2 e L3 da liga Ti-13Nb-13Zr bem como do material de referência clínica e os controle positivo e negativo utilizados neste ensaio....	82
Figura 26.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti- 13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C em região adjacente ao implante (I) - (a) interface osso-implante na região cortical (aumento 40x); (b) aumento de 100x. Observar a presença de osteonas marcadas pela calceína (Os) junto à interface com o implante.....	85
Figura 27.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C em região adjacente ao implante (I) - (a) atividade óssea intensa do endósteo, notar a dupla marcação da calceína (setas brancas), bem como osteonas marcadas pela tetraciclina (setas pretas) aumento 40x; (b) atividade óssea junto à interface - verifica-se a marcação pelos 2 marcadores (aumento 100x).....	86
Figura 28.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500 °C - (a) em região adjacente ao implante (I) ao nível da cortical (aumento 40x); (b) observar intensa atividade óssea ao nível da região medular (*) - dupla marcação do tecido lamelar (TL) pela tetraciclina, TC (2 ^a e	

	3 ^a semanas) e da calceína, C (6 ^a e 7 ^a semanas) - aumento 100x...	87
Figura 29.:	Micrografia, obtida por microscopia de luz sob filtro de luz UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C em região controle (afastada); (a) aumento 40x - notar a presença de osteonas (Os) marcadas tanto pela tetraciclina (laranja) como pela calceína (verde).....	88
Figura 30.:	Representação gráfica dos dados apresentados na Tabela 15. Notar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade entre os diferentes grupos de implantes avaliados ($P > 0,97$).....	89
Figura 31.:	Representação gráfica dos dados apresentados na Tabela 16. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade junto à interface nos diferentes grupos de implantes avaliados ($P > 0,34$).....	90
Figura 32.:	Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 17 e 18. Notar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade nas duas áreas de interesse avaliadas....	92
Figura 33.:	Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 19 e 20. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador tetraciclina, aplicado na 2 ^a e 3 ^a semanas, para as diferentes amostras avaliadas.....	94
Figura 34.:	Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 19 e 20. Não foi constatada diferença com significância estatística em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador tetraciclina, aplicado na 2 ^a e 3 ^a semanas, para as diferentes áreas de interesse avaliadas: junto à interface e controle.....	95
Figura 35.:	Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 21 e 22. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa (em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador calceína, aplicado na 6 ^a e 7 ^a semanas, para as diferentes amostras estudadas.....	96
Figura 36.:	Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 21 e	

	22. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador calceína, aplicado na 6 ^a e 7 ^a semanas, para as diferentes áreas de interesse avaliadas, junto à interface e controle.....	97
Figura 37.:	Micrografia, obtida por microscopia de luz sob campo claro, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C – observar o contato entre o osso e o implante (I), compreendendo a região da cortical cirúrgica (aumento de 40x).	98
Figura 38.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob campo claro, da liga Ti- 13Nb-13Zr; (a) sinterizada a 1300 °C - visão geral do nível de contato osso-implante alcançado (aumento de 12,5x); (b) sinterizada a 1300 °C - região demarcada (*) aumento de 40x; (c) sinterizada a 1500 °C - aumento de 20x e (d) região demarcada (*) aumento de 40x - observar o contato osso-implante.....	99
Figura 39.:	Representação gráfica dos dados de porcentagem de contato osso-implante apresentados nas Tabelas 23 e 24. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,57$) para as amostras avaliadas.....	100
Figura 40.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz em lâminas coradas pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C (a) e (b) observar a remodelação óssea junto à interface e (b) notar a presença de osteócitos (Oc) dispersos na matriz colágena e o colar de osteoblastos (Ob) o qual atua na frente de ossificação originando o tecido osteóide e este por sua vez o tecido ósseo neoformado.....	101
Figura 41.:	Micrografia, obtida por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C – observar a diferença do grau de maturidade do tecido ósseo entre o tecido remodelado (TR) e o osso antigo (OA). Notar a presença acentuada de canais de	102

	Havers (HC) no osso antigo.....	
Figura 42.:	Micrografia, obtida por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C – Verifica-se sitios de contato entre a superfície do implante (I) e o tecido remodelado (TR). A seta aponta uma bolha resultante da colagem do corte histológico sobre lâmina de acrílico com cola à base de cianoacrilato.....	102
Figura 43.:	Micrografias, obtidas por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500 °C – (a) notar a presença de tecido remodelado (TR) junto à interface. Observar ainda canais de havers (HC) no osso antigo (OA) e osteócitos (Oc).....	103
Figura 44.:	Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - notar o contato osso-implante (a) e (b); (c) observar a rede de colágeno precursora da mineralização do tecido ósseo formada sobre a superfície do implante e (d) EDS (*) - presença de cálcio e fósforo.....	105
Figura 45.:	Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C - (a) notar o contato osso-implante; (b) e (c) observar a matriz colágena sobre a superfície do implante e (d) EDS (*) - presença de indícios dos elementos cálcio e fósforo.....	106
Figura 46.:	Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500 °C - (a) observar o contato osso-implante e, (b) EDS (*) - observar os elevados conteúdos de cálcio e fósforo.....	107
Figura 47.:	Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - (a) observar o contato osso-implante (I) e, (b) interface em maior aumento - observar o nível de maturação óssea do osso em contato com o implante, e a presença de osteócitos (Oc).....	108
Figura 48.:	Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - observar o crescimento de tecido ósseo novo no	

	interior dos poros, nota-se que o osso pareceu se adaptar à geometria dos poros, invadindo espaços absolutamente pequenos (setas brancas).....	109
Figura 49.:	Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - (a) e (b) área (*) de crescimento ósseo no interior dos poros e, (c) observar a penetração de osso novo no interior dos poros em outra região da amostra e (d) região ampliada evidenciado áreas de crescimento ósseo em poros ao redor de 20 µm (*).....	110
Figura 50.:	Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr. (a) observar o contato osso-implante (setas pretas) e, interface danificada durante preparo da lâmina (setas brancas); (b) observar em maior aumento a fenda decorrente do processamento histológico (setas brancas).....	111

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.: Propriedades Físicas e Mecânicas do Titânio (Donachie, 1988)....	39
Tabela 2.: Propriedades mecânicas de metais e ligas usadas em implantes (Coelho et al., 2005).....	40
Tabela 3.: Protocolo experimental adotado para instalação dos implantes nos animais.....	55
Tabela 4.: Formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares.....	58
Tabela 5.: Seqüência gradual de álcoois utilizados para a desidratação dos blocos ósseos contendo os implantes.....	59
Tabela 6.: Procedimento de embebição visando a inclusão das amostras contendo os implantes.....	60
Tabela 7.: Distribuição granulométrica dos pós dos hidretos empregados neste trabalho.....	68
Tabela 8.: Valores de densidade das amostras dos diferentes lotes.....	71
Tabela 9.: Teores de Ti, Nb e Zr nas áreas α e β semi-quantitativamente determinados por análise de energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C..	74
Tabela 10.: Teores de Ti, Nb e Zr em área de transição analisadas nas regiões 1 e 2 semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C..	75
Tabela 11.: Teores de Ti, Nb e Zr em regiões α e β , representadas pelos algarismos 1 e 2 analisadas semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1300 °C.....	77

Tabela 12.:	Teores de Ti, Nb e Zr em regiões α e β , representadas pelos algarismos 1 e 2 analisadas semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C.....	79
Tabela 13.:	Resultados do percentual de células vivas obtidos no teste de citotoxicidade para os extratos dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio.....	81
Tabela 14.:	Resultados do percentual de células vivas obtidos no teste de citotoxicidade dos extratos das ligas de Ti-13Nb-13Zr (L1, L2 e L3), do material de referência clínica (ITI) além dos controle positivo e negativo envolvidos neste teste.....	83
Tabela 15.:	Valores médios de bioatividade junto à interface por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Valores médios de bioatividade junto à interface por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Teste estatístico One-way ANOVA ($P > 0,97$).....	89
Tabela 16.:	Valores médios de bioatividade em área controle por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Teste estatístico One-way ANOVA ($P > 0,34$).....	90
Tabela 17.:	Sumário das análises de bioatividade por região de interesse (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).....	91
Tabela 18.:	Análise de Variância ANOVA para bioatividade (Intervalo de Confiança - 95%).....	91
Tabela 19.:	Sumário das análises de taxa de aposição mineral (MAR), $\mu\text{m}/\text{dia}$, por região de interesse - marcador tetraciclina aplicado na 2 ^a e 3 ^a semanas “in vivo” (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).....	93
Tabela 20.:	Análise de Variância ANOVA das análises de taxa de aposição mineral (MAR), relacionada ao marcador tetraciclina aplicado na 2 ^a e 3 ^a semanas “in vivo” por região de interesse e amostra (Intervalo de Confiança - 95%).	94
Tabela 21.:	Sumário das análises de taxa de aposição mineral (MAR), em $\mu\text{m}/\text{dia}$, por região de interesse – marcador calceína aplicado na	

	6 ^a e 7 ^a semanas “in vivo” (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).....	95
Tabela 22.:	Análise de Variância ANOVA das análises de taxa de aposição mineral (MAR), relacionada à calceína ($\mu\text{m}/\text{dia}$), aplicada na 6 ^a e 7 ^a semanas, por região de interesse e amostra (Intervalo de Confiança - 95%).....	96
Tabela 23.:	Médias do Contato Osso-Implante por amostra (Intervalo de Confiança - 95%).....	100
Tabela 24.:	Análise de variância (ANOVA) do Contato Osso-Implante por amostra.....	100
Tabela 25.:	Teores (% em peso) dos elementos cálcio (Ca), fósforo (P) e titânio (Ti), em regiões 1 e 2, analisadas semi-quantitativamente por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	110

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. Histologia do Tecido Ósseo.....	4
3.1.1. Funções do Tecido Ósseo.....	4
3.1.2. Células Ósseas.....	5
3.1.3. Tipos de Tecido.....	5
3.1.4 Arquitetura Óssea.....	6
3.2. Biomateriais e Biocompatibilidade.....	8
3.2.1. Métodos de Análise da Biocompatibilidade.....	9
3.2.2. Biocompatibilidade e Corrosão.....	11
3.3. Resposta do Tecido Ósseo Frente à Instalação de Implantes.....	12
3.4. Utilização de Marcadores Ósseos Fluorocromáticos.....	13
3.5. Considerações sobre a Obtenção de Implantes e Enxertos Ósseos Porosos....	15
3.6. Fenômeno de Invasão Tecidual no Interior de Poros (“Bone Ingrowth”).....	17
3.6.1. Requisitos para a Ocorrência do Fenômeno do “Bone Ingrowth”	18
3.6.2. Influência do Tamanho de Poros no Fenômeno “Bone Ingrowth” e na Resistência à Fixação dos Implantes.....	18
3.6.3. Eventos Biológicos Associados à Instalação de um Implante Poroso.....	28
3.7. Considerações Gerais sobre a Osteointegração.....	29
3.7.1 Efeito da Topografia do Implante na Osteointegração.....	31
3.7.2 Influência da Micromovimentação na Osteointegração dos Implantes.....	36
3.8. Metalurgia do Titânio e suas Ligas.....	37
3.8.1 Classificação das Ligas de Titânio.....	38
3.8.2 Liga Ti-13Nb-13Zr.....	41

3.9. Obtenção de Implantes de Ligas de Titânio por Metalurgia do Pó.....	41
3.9.1 Obtenção de Materiais Metálicos Porosos.....	44
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1. Obtenção da Liga.....	48
4.2. Caracterização Física dos Pós.....	50
4.2.1. Caracterização Física das Amostras Sinterizadas.....	50
4.3. Caracterizações Biológicas.....	52
4.3.1. Ensaio de Citotoxicidade – Pós e Amostras Sinterizadas	52
4.3.2. Ensaio “in vivo” – Osteointegração.....	54
4.3.3. Análises Histológicas.....	61
4.3.3.1. Microscopia de Fluorescência e Avaliação em Campo Claro.....	61
4.3.3.2 Método do Azul de Toluidina.....	65
4.3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Caracterização Física dos Pós de Partida.....	67
5.2. Amostras Sinterizadas.....	71
5.3. Caracterização Biológica.....	80
5.3.1. Ensaio de Citotoxicidade – Pós de Partida.....	80
5.3.2. Ensaio de Citotoxicidade – Amostras Sinterizadas.....	81
5.3.3 Ensaio “in vivo” da Osteointegração.....	84
6. CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais designam uma classe ampla de substâncias naturais ou sintéticas que em contato, de forma permanente ou não, com tecidos e fluidos de seres vivos, não causam efeitos deletérios ao organismo (Williams, 1992). A biocompatibilidade de um material é considerada ótima, quando promove a formação de um tecido sadio na sua superfície capaz de suportar os esforços a que o implante está submetido (Hench, 1993).

Um dos campos mais promissores, associados aos materiais biocompatíveis, refere-se à sua aplicação em implantes cirúrgicos, tendo-se em vista, principalmente, a maior expectativa de vida da população mundial (Niinomi, 2003). Esses implantes, na maioria, constituídos de materiais metálicos, vêm sendo utilizados com a proposta de reparar ou substituir ossos e articulações danificadas, e restabelecer a função do sistema estomatognático.

O emprego do titânio e suas ligas, em aplicações biomédicas, tem se limitado à liga titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e ao titânio comercialmente puro (Ticp), por apresentarem excelentes características de biocompatibilidade, boa relação resistência mecânica/massa específica e resistência à corrosão (Eisenbarth et al., 2004).

Todavia, ensaios de desgaste em meio fisiológico demonstraram a dissolução dos metais alumínio (Al) e vanádio (V) responsáveis por uma alta liberação de mediadores pró-inflamatórios e osteolíticos alertando, portanto, à classe médica, quanto ao uso abundante deste material (Rogers et al., 1997). Posteriormente, confirmou-se a deposição de Al e V em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos (Kuroda et al., 1998; Okazaki et al., 1998a; Okazaki et al., 1998b). O elemento V, contido nesta liga, tem sido associado com possíveis efeitos citotóxicos e reações teciduais adversas. O

alumínio, entretanto, pode estar relacionado com a inibição de crescimento ósseo, e ao desencadeamento de desordens neurológicas (Berthon, 2002). Assim sendo, novas ligas de Ti, sem a adição desses elementos, vêm sendo desenvolvidas para aplicações cirúrgicas (Okazaki et al., 2001; Geetha et al., 2004).

Um dos problemas relacionados aos implantes metálicos é a diferença existente entre o módulo elástico do material e o do tecido ósseo (10-30 GPa) que, normalmente, provoca um inadequado carregamento do osso de suporte, retardando o remodelamento e a cicatrização óssea (Collier et al., 1976; Moyon et al., 1978; Dujovne et al., 1993; Geetha et al., 2004). Neste contexto, desenvolvida pela empresa Smith & Neph (USA), a liga titânio-nióbio-zircônio (Ti-13Nb-13Zr), começou a ser comercializada, no início da década de 90, como material de implantes ortopédicos (Wang, 1996; Semiatin et al., 1997). Suas propriedades podem ser controladas por tratamentos térmicos e deformação à quente ou a frio. Apresenta ainda valores de módulo elástico ao redor de 80 GPa, de resistência mecânica da ordem de 1300 MPa e resistência à corrosão superior às ligas titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) e titânio-alumínio-nióbio (Ti-6Al-7Nb), principais concorrentes na área de implantes ortopédicos (Goodman et al., 1993; Davidson et al., 1994; Yu & Scully, 1997; Schneider, 2001).

Nos últimos anos, a utilização da tecnologia da M/P para o desenvolvimento de implantes porosos, tem possibilitado a obtenção de materiais em que a integração com o tecido ósseo é favorecida (Wen et al., 2001; Wen et al., 2002; Kutty et al., 2004). A questão relacionada ao tamanho médio de poro, que proporciona o crescimento de tecido ósseo, parece não estar ainda bem esclarecida. Alguns autores concordam que sejam necessários poros ao redor de 100 μm , pois este tamanho permitiria o crescimento ósseo e poros maiores do que 150 μm possibilitariam a formação de osteonas (Hulbert et al., 1970; Itäla et al., 2001). O biomaterial deveria apresentar ainda um nível de porosidade entre 30-90% com macroporos entre 50-1000 μm . Todavia, microporos (1-100 μm) com tamanho similar ao de células, e nanoporos (1-10 nm) ao de proteínas, favorecem a adesão celular. Visa-se desta forma, não apenas a fixação do implante pelo crescimento de tecido ósseo no interior dos poros, mas também a melhor distribuição de tensões na interface osso-implante (Schneider et al. 1989; Jones, 2001).

2. OBJETIVOS

Considerando-se a importância das ligas à base de titânio, na área médica, e a constante busca por materiais, que reúnem melhores condições de osteointegração, este trabalho visa avaliar a influência do tamanho, forma e quantidade de poros na citocompatibilidade “in vitro” e na capacidade de osteointegração “in vivo” da liga Ti-13Nb-13Zr, obtida por metalurgia do pó (M/P), com diferentes graus de porosidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A substituição de tecidos ou órgãos, parcialmente ou na sua totalidade, decorrentes de trauma ou determinada patologia, é considerada um dos grande desafios para o campo da ciência dos materiais. No caso do sistema esquelético, os biomateriais devem apresentar resistência mecânica adequada, além de propriedades morfológicas e físico-químicas, que permitam a este material alcançar um elevado grau de biocompatibilidade e biofuncionalidade, ou seja, deve reunir um conjunto de propriedades que permitam ao material desempenhar sua função. Uma revisão destes tópicos será apresentada neste capítulo, dando ênfase à histologia do tecido ósseo, considerações sobre implantes e enxertos porosos, osteointegração e processos metalúrgicos do titânio e suas ligas na confecção de implantes cirúrgicos.

3.1 Histologia do Tecido Ósseo

3.1.1. Funções do Tecido Ósseo

O osso é um tecido de sustentação altamente especializado e apresenta como funções principais: apoio mecânico, locomoção e proteção, atuando ainda como reservatório metabólico dos sais minerais. Constitui ainda um sistema de alavancas que amplia as forças resultantes da contração muscular. Além disso, aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue (Spence, 1991; Junqueira & Carneiro, 1995). O osso é um tecido dinâmico, podendo ser ora formado ora destruído sob o controle de fatores físicos e hormonais. Este dinamismo, permite o processo de remodelação, ou seja, modificação da arquitetura óssea para atender às forças físicas de tensão. Em indivíduos adultos, a taxa de renovação do osso é normalmente baixa, todavia, em bebês e crianças é alta, permitindo assim o crescimento e remodelação ativa devido às novas demandas resultantes do desenvolvimento físico (Kujala, 2003).

3.1.2 Células Ósseas

O tecido ósseo é composto por células de sustentação (osteoblastos e osteócitos), matriz não mineralizada de colágeno e glicosaminoglicanas (osteóide), sais minerais inorgânicos depositados na matriz e células remodeladoras (osteoclastos). Os **osteoblastos** são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz. Os **osteócitos** são encontrados nas lacunas no interior da matriz. Os **osteoclastos**, células multinucleadas gigantes, estão envolvidas no processo de reabsorção e remodelamento. As superfícies interna e externa do osso são recobertas por camadas de tecido conjuntivo chamadas respectivamente de endóstio e perióstio, responsáveis pela nutrição e manutenção de um contínuo fornecimento de células osteoblásticas para a formação ou reparação óssea (Weinlaender, 1991; Junqueira & Carneiro, 1995). É importante enfatizar que superfícies não recobertas por tecido conjuntivo ou por osteoblastos estão sujeitas ao processo de reabsorção pela atividade dos osteoclastos que surgem imediatamente nesta área. Dessa maneira, deve ser dada atenção especial tanto ao perióstio como ao endóstio, durante a realização do procedimento cirúrgico (Weinlaender, 1991).

3.1.3 Tipos de Tecido

Dois tipos de tecido ósseo podem ser identificados, sendo eles: o **osso primário ou imaturo** (“woven bone”), caracterizado pela organização irregular das fibras de colágeno e possuir baixa resistência mecânica, e o **osso secundário ou lamelar**, mais resistente e que apresenta uma organização regular das fibras colágenas dispostas paralelamente umas às outras ou, ainda, organizadas de maneira concêntrica ao redor do canal vascular. Na formação de cada tipo de osso, bem como no processo de reparo após uma fratura, trauma ou cirurgia de implante, o primeiro tecido ósseo a aparecer é o

imaturo, que será posteriormente substituído por osso lamelar (Spence, 1991; Weinlaender, 1991; Junqueira & Carneiro 1995). O osteóide é um tecido de sustentação que contém colágeno do tipo I, imerso em um gel de glicosaminoglicanas com glicoproteínas específicas, como a osteocalcina e a sialoproteína.

3.1.4 Arquitetura Óssea

Quanto à sua arquitetura, a maioria dos ossos possui uma estrutura básica composta por: **zona cortical ou compacta externa** e **zona trabecular ou esponjosa** (Figura 1). A geometria do compartimento cortical e a estrutura trabecular resultam da adaptação funcional a cargas fisiológicas normais, ou seja, a arquitetura óssea é definida de acordo com a resposta óssea à cargas a que um determinado local é submetido (Einhorn, 1992). Tem sido observado que o osso também pode se adaptar às forças externas aplicadas (Raab-Cullen et al., 1994).



Figura 1. - Representação esquemática da arquitetura do tecido ósseo.

Observado ao microscópio, o osso compacto é formado por inúmeros sistemas organizados de canais interconectados. A unidade estrutural do osso compacto adulto é o **sistema harvesiano ou osteona** (Figura 2). O sistema harvesiano apresenta um canal central, denominado canal harvesiano, rodeado por lamelas dispostas de maneira concêntrica proporcionando, assim, resistência máxima às tensões mecânicas que o osso normalmente recebe. Localizadas entre lamelas adjacentes, numa osteona, encontram-se pequenas cavidades denominadas lacunas, as quais interconectam-se por meio de canalículos. Os osteócitos apresentam, na sua superfície, pequenos processos protoplasmáticos que entram nos canalículos e contactam-se com os processos celulares dos osteócitos localizados em lacunas adjacentes. (Spence, 1991; Junqueira & Carneiro, 1995).

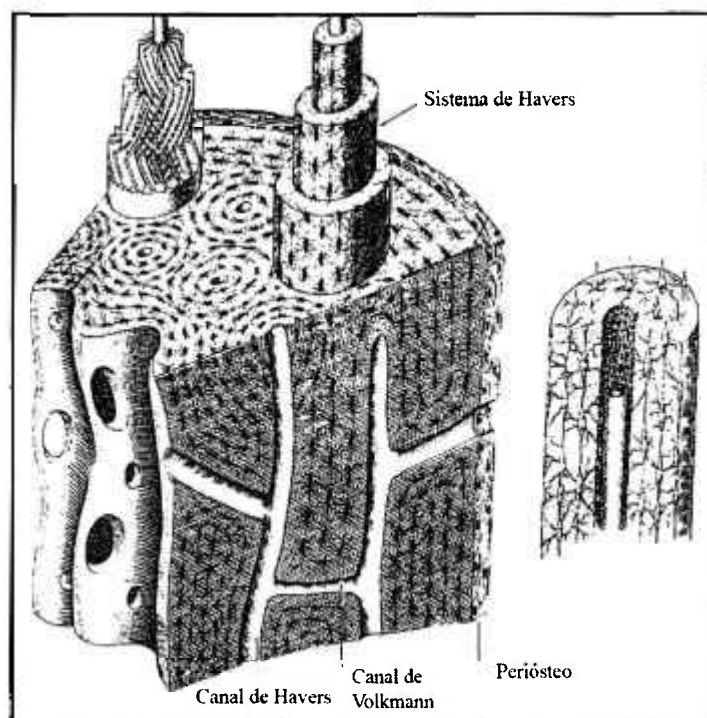


Figura 2. - Representação esquemática da estrutura da diáfise de ossos longos. Observar os sistemas de Havers desenhado em três dimensões, no alto e à esquerda, mostrando a orientação das fibras colágenas nas lamelas. À direita, esquema de um sistema de Havers isolado (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 1995).

3.2 Biomateriais e Biocompatibilidade

A biocompatibilidade de um determinado material, utilizado em aplicações biológicas, refere-se a não incitação de quaisquer reações adversas ao organismo, tais como, inflamação ou tromboembolismo. O termo biocompatibilidade indica que o material não apresenta toxicidade, nem desenvolve reações alergênicas, mutagênicas ou carcinogênicas e, ainda, não influencia na fertilidade do paciente (Groth et al., 1995). As diferentes classes de materiais, atualmente utilizados em engenharia (metais, cerâmicas, polímeros, compósitos e semicondutores), podem ser produzidos ou modificados para que seja possível sua aplicação biológica (Coelho et al., 2005).

As propriedades desejáveis em um biomaterial implantável sujeito a cargas estáticas e dinâmicas, são (Lemons & Bidez, 1991; Puleo & Nanci, 1998; Lemons, 2004):

- Biocompatibilidade:
- Habilidade de suportar e transferir cargas;
- Estabilidade de corpo e ser passível de esterilização;
- Cinética de superfície controlada;
- Indutividade e condutividade na cicatrização da região cirúrgica;
- Homeostase de tecidos periimplantares;
- Longevidade “in situ”.

Até o presente momento, não existem relatos na literatura a respeito do biomaterial ideal. Praticamente, todos os grupos de materiais vêm sendo utilizados em maior ou menor escala na implantodontia, todavia, polímeros, metais e cerâmicas, parecem oferecer uma maior variedade de propriedades mecânicas, físicas e químicas,

podendo estas serem desenvolvidas e aplicadas, para atender aos requisitos desejados para uma reabilitação duradoura (Coelho et al., 2005).

3.2.1 Métodos de Análise da Biocompatibilidade

Em geral, a análise da biocompatibilidade de um material é realizada por meio de dois ensaios (Raimondi, 2000): "in vitro" e "in vivo". conforme regulamentado na norma ISO 10993-1 (ISO, 1993). No método "in vitro". o material a ser testado pode ser avaliado a partir do contato **direto** ou **indireto** com a cultura de células. O método de contato direto inclui o cultivo das células na presença do material. onde a inibição do crescimento nas proximidades do material demonstrará seu efeito citotóxico. Por outro lado, o método indireto, baseia-se: 1) na separação do espécime a ser testado por meio de uma barreira permeável como, por exemplo, uma camada de ágar ou um filtro, permitindo a difusão das substâncias lixiviáveis para o meio de cultura celular ou; 2) na obtenção do extrato do material a partir de um meio líquido (líquido extrator) que irá promover a lixiviação dos componentes tóxicos que serão colocados em contato com o meio de cultura. A obtenção do extrato é realizada com o intento de simular, em condições extremas, a utilização clínica. Na maioria das vezes, recomenda-se que o líquido extrator, deva ser um meio aquoso em virtude da interação com os biofluidos, quando da instalação no organismo. A temperatura e o tempo de extração podem variar, de forma que esta etapa é fundamental para o sucesso do teste. Levando-se em consideração que a maioria dos resultados obtidos pelos testes de biocompatibilidade "in vitro" apresentam um caráter relativo, o uso de materiais de referência clínica é indispensável para a obtenção de conclusões mais significativas (Groth et al., 1995).

Faz-se necessário, todavia, esclarecer que o teste "in vitro" é capaz de discernir entre a biocompatibilidade geral e a específica de um determinado material. entretanto, é difícil extrapolar os resultados obtidos numa cultura de células para as reações que ocorrem no organismo como um todo. A biocompatibilidade geral é realizada, normalmente, utilizando-se uma linhagem celular bem estabelecida, que pode ser

cultivada facilmente, e os resultados utilizados como informação preliminar. Em contraste, a biocompatibilidade “in vitro” específica é determinada utilizando-se linhagens de células primárias, derivadas do tipo de tecido no qual pretende-se usar o material como, por exemplo, o uso de osteoblastos, no sentido de testar a toxicidade de materiais a serem utilizados em contato com o tecido ósseo (Groth et al., 1995).

A influência dos agentes tóxicos derivados dos biomateriais, sobre as funções e viabilidade celular, pode ser caracterizada pela redução na adesão celular, alterações morfológicas, diminuição da proliferação e morte celular, devido à ausência de atividade metabólica, desintegração estrutural (membrana celular) e lise celular (Groth, 1995). A realização do teste “in vitro”, ISO 10993-5 (1993) não exclui a necessidade de se realizar outros estudos, no entanto, é uma alternativa importante na seleção inicial entre materiais diferentes para aplicações médico-odontológicas.

A implantação do material, em animais, caracteriza o método “in vivo”, que avalia a biocompatibilidade do material conforme o comportamento dos tecidos adjacentes ao implante (Groth et al., 1995). Para esse teste recomenda-se que o material estudado não apresente indícios de toxicidade e encontre-se regulamentado pela norma ISO 10993-6 (1993). Vale ressaltar que, na maioria dos casos em que se utilizam modelos animais, o sacrifício dos mesmos é inevitável, pois só assim será possível avaliar os efeitos da sua interação com o organismo (Groth et al., 1995). Levando-se este fato em consideração, o uso dos testes “in vitro” é de fundamental importância para controlar a indicação exagerada dos ensaios “in vivo”.

De maneira geral, os ensaios, “in vitro” e “in vivo”, apresentam desvantagens. Os experimentos “in vitro” nem sempre podem representar, clinicamente, o desempenho de um biomaterial. Paralelamente, o uso de modelos animais, pode levar a uma obtenção de dados de relevância questionável quando da aplicação clínica em humanos (Groth et al., 1995). Entretanto, até o presente momento, estas metodologias são as recomendadas pelas normas apresentadas no guia ISO 10993-1 para a avaliação de biomateriais, antes de sua aplicação em seres vivos.

3.2.2 Biocompatibilidade e Corrosão

É importante salientar que a biocompatibilidade dos metais, além de outros fatores, apresenta-se relacionada à sua interação química entre o metal e o tecido hospedeiro. Todavia, uma boa resistência à corrosão não significa que não ocorrerá a liberação de íons metálicos. A taxa desta liberação, a capacidade de união às proteínas dos íons e, finalmente, as atividades citotóxicas, alergênicas e genotóxicas, determinarão a segurança biológica do material (Wever et al., 1997). Em implantes ortopédicos, a presença de tensões mecânicas localizadas ou desgaste, podem afetar a camada passivadora e, assim, causar um aumento no processo de corrosão e, até mesmo, a liberação de partículas resultantes do desgaste (Kuroda et al., 1998; Okazaki et al., 1998a; Okazaki et al., 1998b).

Por apresentarem excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade, o titânio e suas ligas, vêm sendo utilizados na fabricação de implantes cirúrgicos (Niinomi, 2003). Com relação às características químicas, a interação implante-fluidos corpóreos é fundamental, uma vez que o meio oral é considerado extremamente corrosível (Strietzel et al., 1998). Em implantes dentais à base de titânio, a presença do fenômeno de corrosão localizado, somado ao uso de produtos profiláticos com alta concentração de fluoretos, pode causar problemas de natureza eletroquímica. Por outro lado, a presença da saliva na cavidade oral atua como solução tampão, diluindo a concentração de flúor e minimizando alterações na superfície do material (Strietzel et al., 1998).

3.3. Resposta do Tecido Ósseo Frente à Instalação de Implantes

A resposta do tecido hospedeiro a implantes colocados no osso envolve uma série de eventos celulares e da matriz, resultando na aposição óssea ao biomaterial (Puleo & Nanci, 1999).

À medida que o osso é agredido, durante a preparação do leito cirúrgico, os vasos sangüíneos produzem uma hemorragia localizada com a formação de coágulo. Ocorre, ainda, a morte de células ósseas e a destruição da matriz óssea adjacente ao leito de implantação. A extensão do dano provocado ao tecido ósseo relaciona-se diretamente com a quantidade de calor gerada, ou seja, deve ser utilizada irrigação abundante para se evitar o superaquecimento da broca. Durante o reparo ósseo, o coágulo sangüíneo, as células e a matriz óssea agredidas, serão removidas por fagocitose. O perióstio e o endóstio, ao redor do leito preparado, respondem vigorosamente com a intensa proliferação de fibroblastos e células osteoprogenitoras que formam um tecido celular ao redor do implante. Quando a aposição ou reabsorção óssea ocorre ao nível do perióstio ou do endóstio, este processo é denominado **modelamento**, ou seja, mudança na forma. Todavia, se a atividade dos osteoclastos resulta na formação de cavidades de reabsorção no osso, e os osteoblastos as preenchem com osso novo, tal fenômeno recebe o nome de **remodelamento** (Roberts et al., 1986). Após uma semana, o tecido celular formado ao redor do implante, é transformado em tecido ósseo imaturo pela mudança das células de tecido conjuntivo em osteoblastos que iniciam a produção da matriz óssea ou osteóide. Íons cálcio e fósforo são utilizados na mineralização da matriz óssea. Esta série de eventos leva ao sucesso da cicatrização óssea ao redor dos implantes cirúrgicos, desde que não ocorra, além de outros fatores, uma micromovimentação excessiva da interface osso-implante (Hulbert et al., 1970; Albrektsson et al., 1981; Weinlaender, 1991; Cooper, 1998; Puleo & Nanci, 1999).

Os mecanismos pelos quais os implantes endósseos integram-se ao osso pode ser subdividido em três fenômenos. O primeiro, denominado **osteocondução**, ocorre a partir da migração de células osteogênicas diferenciadas para a superfície do implante por meio de um arcabouço de tecido conjuntivo temporário (malha de fibrina). A perfeita ancoragem deste arcabouço à superfície do implante ocorrerá de acordo com o padrão topográfico da superfície do implante. Entende-se que superfícies rugosas possam promover o fenômeno da osteocondução, tanto por aumentar a área de superfície disponível para a adesão da malha de fibrina, como por promover características de superfície com as quais a fibrina poderá se envolver. A **formação do osso novo**, segundo fenômeno deste processo, resulta na mineralização da matriz interfacial, de maneira similar às linhas cementantes observadas no tecido ósseo natural, sendo depositadas sobre a superfície do implante. O terceiro fenômeno, o **remodelamento ósseo**, também irá ocorrer em locais específicos criando uma interface osso-implante compreendendo a formação do osso novo (Davies, 1998).

3.4. Utilização de Marcadores Ósseos Fluorocromáticos

Existem inúmeros agentes marcadores e outros relacionados à marcação tecidual periódica, utilizados com propostas distintas na pesquisa óssea (Coelho, 2002). De maneira geral, o marcador ósseo é definido como qualquer substância que possa ser identificada e que se deposita no tecido ósseo, devendo marcar algum componente químico ou anatômico do osso. Adicionalmente, deve ser distinguível entre todos os outros componentes.

Denomina-se marcador ósseo periódico qualquer substância induzida, artificialmente ou não, que possa ser identificada e que permita localizar uma dada superfície óssea num espaço anatômico num determinado momento. Sabe-se que nem todos os marcadores ósseos são bons marcadores periódicos e vice-versa (Frost, 1983). Todavia, para se avaliar, por meio de análises histomorfométricas, a dinâmica do tecido ósseo, é indispensável a utilização de um marcador ósseo que também atue como um

marcador periódico nos sítios de remodelamento ósseo (Coelho, 2002). Este é um dos motivos pelo qual, um marcador ósseo ideal, deve apresentar as seguintes características: não toxicidade, baixo custo, simplicidade de aplicação, estabilidade, fácil detecção, capacidade de marcar o osso neoformado e, finalmente, poder ser utilizado como um marcador periódico (Frost et al., 1960). Até o presente momento, apenas a tetraciclina atende à maioria destes critérios, principalmente por apresentar propriedades fluorescentes e capacidade de permitir a mensuração da taxa de neoformação óssea nos sítios de remodelação óssea (Coelho, 2002).

Considera-se, além disso, que a tetraciclina atue como um agente quelante em relação ao cálcio presente no cristal de apatita (Ibsen & Urist, 1964). A fluorescência na cor amarelo-ouro (alaranjado) é observada no osso marcado pela tetraciclina (oxitetraciclina), utilizando-se um microscópio óptico sob excitação por luz ultravioleta/azul, a uma faixa de comprimento de onda entre 240-360 nm. Os comprimentos de onda de excitação e emissão podem variar de 410-420 nm e de 470-500 nm, respectivamente, dependendo do tipo de tetraciclina administrada.

Outros marcadores, tais como a alizarina e a calceína, emitem fluorescência nas cores vermelho-tijolo verde, respectivamente (Lopes & König Jr, 2002; Yoshimoto, 2004). Levando-se em consideração que as tetraciclinas apresentam propriedades farmacocinéticas diferentes, podem ser administradas com diversos propósitos e o seu acúmulo, com o decorrer do tempo nas frentes de calcificação, formam bandas que desempenham um papel importante na determinação dos períodos de formação óssea. Dessa forma, o centro de cada banda pode ser usado como ponto inicial de medida para marcar a localização do osso formado entre dois pontos, em um dado intervalo de tempo, obtendo-se a taxa de aposição mineral (**MAR** – “**Mineral Apposition Rate**”) em micrômetros por dia ($\mu\text{m}/\text{dia}$). A mensuração da MAR é considerada uma ferramenta de extrema relevância pois permite avaliar informações a respeito da cinética de remodelamento ósseo, bem como as atividades ósseas relacionadas (Roberts et al., 1986; Bloebaum et al., 1994; Garetto et al., 1995; Suzuki et al., 1997; Coelho, 2002; Williams et al., 2005).

3.5 Considerações sobre a Obtenção de Implantes e Enxertos Ósseos Porosos

O uso de enxertos autógenos, ou seja, do próprio paciente e de forma mais precisa, àquele retirado da crista ilíaca, é a opção mais indicada para o tratamento de defeitos ósseos (Kienapfel et al. 1999). A justificativa para tal fato é que enxertos autógenos são estruturalmente competentes, osteocondutores, osteoindutores e osteogênicos (Kienapfel et al., 1999). Entretanto, as dificuldades e os riscos envolvidos na execução de tal procedimento cirúrgico, isto é, a retirada de blocos ósseos de outra área operatória e, ainda, o tempo necessário para sua obtenção, têm estimulado o desenvolvimento de materiais de enxerto ósseo alternativos (Keating & McQueen, 2001).

Enxertos ósseos alógenos, isto é, de outro paciente, também têm sido empregados como alternativa aos autógenos. Apresentam capacidade osteocondutora, entretanto, não são osteoindutores nem osteogênicos. Somando-se a isso, o fator custo, a dificuldade de processamento, o risco da transmissão de doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e patologias como a hepatite, têm colaborado para o avanço das pesquisas na área de materiais sintéticos (Kienapfel et al., 1999; Keating & McQueen, 2001).

É sabido que o maior objetivo da engenharia de tecidos é sintetizar ou regenerar tecidos e órgãos. Atualmente, isto é realizado utilizando-se arcabouços (“scaffolds”) sintéticos porosos ou uma matriz que mimetiza a própria matriz extracelular corpórea, na qual as células poderão se aderir, multiplicar, migrar e desempenhar sua função. Estes biomateriais porosos utilizam-se de suas propriedades osteocondutoras, com o objetivo de facilitar a migração de osteoblastos do osso adjacente para o sítio implantar, auxiliando o processo de cicatrização (Wen et al., 2002).

Materiais de origem marinha, como os corais, apresentam poros de diferentes tamanhos, bem como uma estrutura interconectada. Esta conformação estrutural permite a ocorrência do fenômeno de osteocondução. Dessa maneira, tais materiais marinhos (Biocoral[®], Inoteb, Sain-Gonnery, França), têm sido coletados, submetidos a processos de limpeza e esterilização e, posteriormente, processados com o fim de converter aragonita (mineral - carbonato de cálcio, estrutura cristalina ortorrômbica) em hidroxiapatita, sem contudo alterar a sua estrutura tridimensional (Kujala, 2003).

A hidroxiapatita (HA) e outros materiais cerâmicos porosos como o fosfato tricálcico (TCP), são utilizados como enxertos ósseos por apresentarem propriedades interessantes como a de excelente bioadesão, no entanto, desvantagens inerentes como a elevada fragilidade e baixa resistência à tração, tornam difícil sua aplicação em áreas sujeitas a cargas funcionais (Keating & McQueen, 2001). Considerando os riscos da utilização dos enxertos alógenos, devido possível transmissão de doenças, bem como as desvantagens mecânicas apresentadas pelos materiais à base de fosfatos de cálcio, inúmeros estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de materiais porosos metálicos, com propriedades mecânicas adequadas e baixo módulo elástico, que permitam o crescimento de tecido ósseo, e subsequente manutenção da mineralização, por apresentarem uma estrutura interconectada e, ainda, uma melhor distribuição de tensões na interface osso-biomaterial (Pilliar et al., 1987; Schneider et al., 1989; Itälä et al., 2001).

Quanto à forma de processamento dos implantes existem, basicamente, duas classes de materiais porosos, sendo eles: substrato sólido recoberto por uma camada porosa e corpo poroso integral. A primeira, representada, por exemplo, por materiais metálicos, recobertos por uma cobertura de hidroxiapatita porosa, visa melhorar a qualidade de fixação em relação a implantes sólidos. Todavia, a adesão osso-biomaterial é obtida apenas na interface (Li et al., 2001). Já a segunda classe, representada por materiais como a liga níquel-titânio (NiTi) porosa, vem se destacando à medida que consegue aliar importantes características, tais como: biocompatibilidade, boa resistência mecânica em condições funcionais e superelasticidade (Simske & Sachdeva,

1995; Li et al., 2001). Além disso, com relação aos materiais porosos (Figura 3), define-se **poros abertos** os que conectam-se com o exterior do material e, em contraste, os **poros fechados** são isolados do ambiente externo (Li et al., 2001).

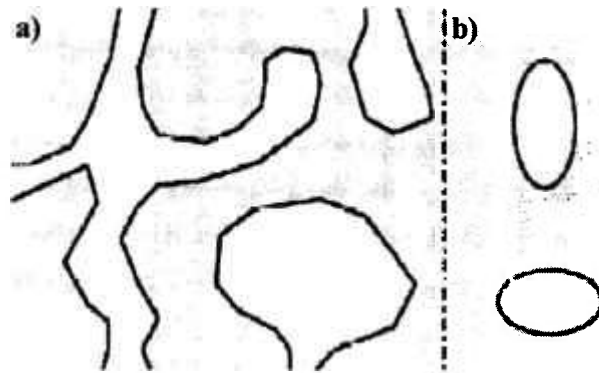


Figura 3. - Representação esquemática dos tipos de poros existentes em um material poroso: a) poros abertos; b) poros fechados (Adaptado de Li et al., 2001).

3.6 Fenômeno de Invasão Tecidual no Interior de Poros (“Bone Ingrowth”)

Assim como Branemark et al. (1969) propuseram o termo “osseointegration”, Greenfield (1909), foi o primeiro autor a mencionar o termo “bone ingrowth”, por acreditar que uma infra-estrutura metálica em formato de gaiola (“cagelike”), projetada para ser utilizada como uma raiz dentária artificial, permitiria o crescimento ou preenchimento por tecido ósseo e, com o decorrer do tempo, perfeitamente estabilizada ao leito cirúrgico. Portanto, desde esta época, inúmeras pesquisas surgiram tornando o campo dos biomateriais porosos extremamente promissor. O surgimento do primeiro dispositivo poroso, com propriedades mecânicas adequadas, para aplicações em áreas sujeitas a cargas funcionais, foi o material Cerosium[®], um compósito introduzido por Smith no ano de 1963 (Kienapfel 1999).

3.6.1 Requisitos para a Ocorrência do Fenômeno do “Bone Ingrowth”

Além do grau de porosidade do implante, o padrão morfológico da infraestrutura também tende a afetar a osteocondutividade, bem como a qualidade do osso formado. Implantes porosos devem apresentar fenestrações interconectadas possibilitando espaço para a manutenção vascular necessária para a mineralização contínua do tecido ósseo. Dessa maneira, tanto a presença de poros abertos como de canais interconectados entre os poros, devem apresentar tamanho suficiente que permita a infiltração de células responsáveis por formar a matriz tecidual no interior dos poros (Hulbert et al., 1970; Itäia et al., 2001; Kujala et al., 2003).

3.6.2 Influência do Tamanho de Poros no Fenômeno “Bone Ingrowth” e na Resistência à Fixação dos Implantes

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de verificar questões relacionadas ao tamanho ideal de poro, grau de porosidade e a influência decorrente deste fenômeno no aumento da resistência de união da interface osso-implante poroso. Todavia, será abordado somente aqueles que utilizaram implantes porosos metálicos.

Nilles et al. (1973), analisaram histológica e biomecanicamente, em diferentes períodos (3, 6 e 12 semanas), a interação ao tecido ósseo, utilizando-se dos seguintes materiais (tamanho de poros): cerâmica porosa à base de aluminato de cálcio (375-450 μm), titânio poroso (275 μm), aço inoxidável poroso (460 μm), carbono pirolítico (3-10 μm) e corpos sólidos das mesmas composições. A análise histológica não detectou crescimento ósseo nos materiais à base de carbono. Com relação aos materiais metálicos porosos verificou-se, após 6 semanas, abundante formação óssea na interface, o

crescimento ininterrupto de tecido ósseo a partir da cortical adjacente e do osso trabecular, bem como a adaptação do osso ao formato dos poros, proporcionando um contato direto com o metal. Observou-se, também, uma diferença existente com relação ao gradiente de maturidade óssea, já que sistemas harvesianos foram encontrados próximo às margens do metal poroso e, ainda, verificou-se que os poros mais internos foram menos preenchidos por tecido ósseo. A formação de osteonas foi detectada a partir da 6ª semana. O marcador ósseo administrado revelou um consistente gradiente de osteogênese, o qual mostrou a cortical interna e a região trabecular como áreas ativas da mineralização óssea. Os testes de resistência mecânica da interface e dureza demonstraram bons resultados para todos os materiais porosos testados. A resistência ao ensaio de cisalhamento da interface dobrou entre os períodos de 3 e 6 semanas, permanecendo constante após 12 semanas. Os controles não-porosos e os implantes de polimetilmetacrilato apresentaram os menores valores de resistência interfacial.

Implantes dentais porosos, metálicos e cerâmicos, foram fabricados e implantados em mandíbulas de porcos miniatura por Karagianes et al. (1976). Os implantes metálicos apresentaram poros de formato esférico entre 275-460 μm e cilíndrico ao redor de 450 μm , e os cerâmicos poros na faixa de 200-400 μm . Observações histológicas revelaram, em amostras não-descalcificadas, crescimento de tecido ósseo em quase todos os implantes metálicos porosos. Aglomerados de osteoblastos foram encontrados ao redor do trabeculado ósseo que penetrou os poros dos implantes. Sistemas harvesianos fizeram-se presentes no osso invadido. Os implantes cerâmicos porosos demonstraram resultados similares aos relatados para os materiais metálicos, ou seja, excelente união interfacial osso-implante, bem como elevados valores de resistência mecânica ao ensaio de cisalhamento. Contudo, foi observada uma menor invasão de tecido ósseo no interior dos poros dos materiais cerâmicos em decorrência da menor interconectividade dos mesmos.

Na década de 1970, Robertson et al. (1976) investigaram o crescimento ósseo no interior de materiais porosos (Stellite-21, Corporate Technology Center, Califórnia, CA, EUA), e a influência da presença de um corpo estranho "glass beads" na cinética de cicatrização, após a confecção de um sítio cirúrgico. Logicamente, avaliaram a

cicatrização de um sítio cirúrgico com as mesmas dimensões, no entanto, sem a colocação do corpo estranho (grupo controle). Determinaram, além disso, a capacidade de união entre o osso e a superfície metálica porosa. Os testes, nos implantes de superfície porosa, revelaram que o tecido ósseo crescerá em um substrato poroso que apresente poros de diâmetro suficiente, o que permitirá sua vascularização e conseqüente nutrição. A resistência adesiva da interface mensurada pelo ensaio de cisalhamento, parece aumentar em função do tamanho do poro e do tempo de cicatrização, posto que, uma maior maturação óssea poderá produzir uma união mais forte. Mensurações referentes ao grau de crescimento de tecido ósseo, expressado pela fração de volume disponível ocupado por novo osso, demonstrou que a presença das “glass beads”, de diâmetro de 200-290 μm , utilizadas para preencher o defeito (2 mm), resultou em poros entre 80-120 μm de diâmetro, proporcionando um crescimento mais acelerado quando comparado ao grupo controle.

Implantes de superfície porosa foram confeccionados e testados, quanto ao crescimento de tecido ósseo no interior dos poros e em ensaio de torção. A técnica de sinterização, em altas temperaturas, foi utilizada com o objetivo de produzir uma fase líquida e soldagem localizados de esferas de Vitallium[®] (100-200 μm) sobre um material de núcleo à base de cobalto. Análise microscópica revelou crescimento de tecido ósseo no interior da cobertura porosa dos implantes e, ainda, sistemas harvesianos foram identificados no tecido ósseo que penetrou nos poros, sendo confirmado, por meio de análise química, conteúdos de cálcio no interior dos poros, similares àqueles encontrados no osso cortical adjacente (Collier & Colligan, 1976).

No trabalho de Cameron et al. (1976) foi observado, em cães, que um implante de superfície porosa (poros 20-100 μm – 35% de porosidade) instalado de maneira eficaz no osso, apresentava-se firmemente aderido ao local após um período de 3 semanas. É indispensável que o implante esteja em íntimo contato com o osso adjacente, todavia, mesmo espaços de 1,5 mm entre o osso e o implante, apresentado em alguns casos, foi preenchido por novo osso após um período de 4 semanas.

Martens et al. (1980) avaliaram a fixação de implantes em decorrência do crescimento ósseo em coberturas porosas. Assim, diferentes materiais foram instalados em cães sob condições funcionais e não-funcionais. Posteriormente, foram realizadas as avaliações histológica e mecânica da interface osso-implante, sendo observado um evidente crescimento ósseo para os implantes em condições funcionais em poros com diâmetro maior que 70 μm .

Buscando obter informações que pudessem ser diretamente aplicadas ao desenho de superfícies porosas, idealizadas para fixação biológica pelo crescimento ósseo, Bobyn et al. (1980a), avaliaram a resistência à tração da interface osso-implante em função de duas configurações de superfície porosa. Placas de fixação padrão de três furos foram preparadas por M/P com partículas esféricas de pó metálico em camada simples ou em múltiplas camadas, visando obter implantes com diferentes camadas porosas. As placas foram implantadas em fêmures de cães por 4, 6, 8, 12, 18 e 24 semanas. Análises de resistência à tração da interface osso-implante indicaram que os materiais que apresentavam configuração de superfície de múltiplas camadas, desenvolveram maior resistência à tração, quando comparado ao grupo de implantes confeccionados com camada única.

Neste mesmo ano, Bobyn et al. (1980b) prepararam quatro diferentes camadas porosas sobre as superfícies de implantes de liga à base de cobalto com pós, apresentando diferentes tamanhos de partículas. Os implantes porosos foram instalados em fêmures de cães por 4, 8 e 12 semanas. Implantes apresentando superfície porosa, com poros variando de 50 a 400 μm , proporcionaram resistência à fixação máxima de 17 MPa, no período de 8 semanas.

Clemow et al. (1981), fabricaram implantes da liga Ti-6Al-4V, com superfícies apresentando poros de diferentes tamanhos, em decorrência do tamanho das partículas de pó utilizadas no processo (297 μm , 420-500 μm e 595-707 μm). Após a sinterização, os poros apresentaram tamanhos aproximados de 75 μm , 225 μm e 325 μm ,

respectivamente. Os implantes foram instalados em fêmures de cães por 24 semanas e, após os ensaios mecânicos, revelaram maior fixação ao osso cortical do que ao osso medular. Observaram que a resistência ao cisalhamento e rigidez diminuíram com o aumento do diâmetro do poro no intervalo de 175-325 μm . Utilizando microscopia óptica, verificaram que a porcentagem de osso que cresceu pela superfície do implante foi inversamente proporcional à raiz quadrada do tamanho do poro e que as propriedades de resistência ao cisalhamento da interface foram proporcionais à quantidade de crescimento ósseo.

Em 1987, Cook et al., desenvolveram implantes da liga Ti-6Al-4V com poros, após o processo de sinterização, apresentando quatro tamanhos médios diferentes: 165; 285; 345 e 550 μm . Estes autores observaram maior resistência ao cisalhamento da interface porosa se comparada ao grupo controle formado por implantes de superfície lisa. Todavia, relataram que à medida que o tamanho do poro aumentava maiores eram os valores de resistência ao cisalhamento.

Ligas porosas 60%Zr-40%Ti foram desenvolvidas (Okuno & Shibata, 1987), para serem utilizadas como implantes dentais, por apresentarem boas propriedades mecânicas, tal como resistência à compressão ao redor de 300 MPa, ou seja, quase duas vezes maior que o titânio poroso obtido com pós de partida de mesmas características (Asaoka et al., 1985). Os implantes foram instalados em fêmures de coelhos com o intuito de avaliar o crescimento de tecido ósseo e fibroso (Shibata & Okuno, 1987). Em linhas gerais, o tecido ósseo pôde crescer em três diferentes tipos de ligas Zr-Ti porosas (variação do tamanho de partícula dos pós: 250-300 μm ; 350-420 μm e 500-590 μm preparadas para este estudo). Os espécimes confeccionados, utilizando partículas de 350-420 μm e 500-590 μm , alcançaram valores de resistência com o osso ao redor de 30 MPa, após 4 semanas de implantação. Adicionalmente, notou-se maior taxa de preenchimento ósseo nos espécimes confeccionados com as partículas de maior diâmetro após 8 semanas. Foi constatado crescimento de osso mesmo em poros com diâmetro inferior a 100 μm . Decorridos 9 meses da implantação, foi observada maturidade óssea (sistema Harvesiano) do tecido, que cresceu no interior dos poros de implantes confeccionados com partículas na faixa de 350-420 μm . Análise histológica

revelou biocompatibilidade com os tecidos moles de maneira semelhante à encontrada para materiais como o titânio denso ou hidroxiapatita.

Zhang et al. (1995) compararam, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste de resistência mecânica ao cisalhamento, dois grupos de implantes em formato de parafuso: o primeiro, apresentava-se recoberto pela técnica de aspersão térmica à plasma com pós de titânio garantindo a presença de poros variando entre 80-300 μm , e o segundo, formado por implantes de superfície lisa. Os implantes foram instalados na mandíbula de cães. Os resultados demonstraram que a osteointegração dos 2 grupos foram completadas após um período de 12 semanas e que o osso cresceu no interior da superfície porosa, contribuindo para maior resistência ao cisalhamento, quando comparado ao grupo de implantes lisos.

Implantes porosos da liga NiTi (tamanho médio de poro = 300 μm e grau de porosidade = 50% em volume) e materiais porosos à base de hidroxiapatita (Interpore 200[®], Interpore, Irvine, CA, EUA), apresentando poros ao redor de 230 μm e um grau de porosidade de aproximadamente 70%, foram instalados em crânios de coelhos, por 2, 6 e 12 semanas. Os materiais apresentaram contato ósseo com o tecido duro craniano adjacente e a porcentagem de crescimento de tecido no interior dos poros aumentou conforme o tempo de cicatrização. Os implantes porosos metálicos demonstraram uma tendência à menor aposição óssea em relação à hidroxiapatita, porém, maior crescimento de tecido ósseo após 6 e 12 semanas da implantação (Simske & Sachdeva, 1995).

Li et al. (1997) avaliaram o crescimento ósseo em poros, obtidos via usinagem a laser em implantes de Ttcp, por meio de análises histológica e resistência mecânica da interface osso-implante. Implantes cilíndricos, apresentando poros côncavos, em três diferentes diâmetros (100, 140 e 160 μm), foram instalados em fêmures de coelhos por 45 dias, 3 e 13 meses. Os diâmetros da concavidade foram escolhidos por permitir a nutrição do osso no interior dos poros. A vantagem associada a poros côncavos é a capacidade que estes apresentam de suportar uma maior torção do que sulcos ou formas

de rosca. Após o ensaio mecânico, as fraturas de superfície da interface osso-implante foram examinadas por microscopia de luz polarizada e eletrônica, sugerindo que a superfície porosa de Ticp favorece o embricamento entre o osso vital e os poros aumentando, desse modo, a retenção do implante ao osso. Os cortes avaliados por microscopia demonstraram que um espaço maior entre o implante e o osso antigo foi preenchido com novo osso, e este também cresceu no interior dos poros. O osso novo, de estrutura harvesiana lamelar, foi observado em contato direto com a superfície do implante. A microscopia revelou formação de osteonas em concavidades de 140 μm de diâmetro, no entanto, nos poros de 100 μm não foi observado tal grau de maturidade óssea. Dessa forma, para estes autores, poros acima de 140 μm de diâmetro parecem ser necessários para a formação óssea em coelhos.

Ayers et al. (1999) objetivavam esclarecer se pode ocorrer em 6 semanas a aposição e crescimento de tecido ósseo no interior dos poros. Desejavam, ainda, determinar o efeito do tamanho do poro em relação à tendência do osso crescer em direção ao interior do implante. Implantes porosos da liga NiTi foram obtidos com três diferentes tamanhos de poros (tipo 1 = $353 \pm 74 \mu\text{m}$; tipo 2 = $218 \pm 28 \mu\text{m}$ e tipo 3 = $178 \pm 31 \mu\text{m}$) e, então, instalados no osso parietal de coelhos por 6 semanas. Análises histológicas evidenciaram a presença de tecido fibro-vascular concomitantemente à penetração do tecido ósseo. Não foram constatadas diferenças significativas entre a quantidade de tecido ósseo, encontrada no interior dos poros, dos diferentes materiais, podendo-se concluir que a faixa entre 150-400 μm , parece ser ideal no que se refere ao crescimento de tecido ósseo em materiais porosos ainda que durante um curto período de tempo.

Levando em consideração que o desenho geométrico da superfície do implante desempenha um papel importante na estabilização primária de implantes, Simmons et al. (1999) compararam a resposta óssea inicial (4, 8 e 16 dias), em coelhos, frente à instalação de implantes com superfícies obtidas por: sinterização de uma camada de partículas de titânio sobre um núcleo denso e por aspensão térmica à plasma de pós de titânio. Decorridos 4 e 8 dias, após a implantação, a formação da rede de fibrina e da malha colágena, apresentaram-se absolutamente mais integradas à superfície porosa

com estrutura interconectada, quando comparada à superfície obtida por aspersão térmica. Esta adesão estável, entre a rede de fibrina e o implante, é auxiliada devido à topografia da superfície que propicia um aumento na área de superfície extremamente importante para adsorção de proteínas e, também, por características físicas com a qual a fibrina torna-se aderida. Observações histológicas indicaram que a mineralização da matriz colágena acelerou o fenômeno de osteointegração dos implantes de superfície porosa, obtida por sinterização, resultados que vieram a ser confirmados por meio de ensaios mecânicos, uma vez que uma maior resistência de união da interface foi observada nos implantes de superfície porosa após 4 e 8 dias. Dezesesseis dias após a implantação, ambos os implantes apresentaram-se osteointegrados e com características de adesão similares. Porém, verificou-se que a estabilidade do implante tende a ser reduzida nos primeiros dias da implantação (0-4 dias) em decorrência da reabsorção mediada por osteoclastos reduzindo-se o contato osso-implante.

Ainda com relação a obtenção de uma interface osso-implante estável, Svehla et al. (2000) avaliaram, histológica e mecanicamente, a influência de 5 diferentes estruturas de superfície: jateamento com óxido de alumínio; jateamento associado à hidroxiapatita; uma cobertura porosa; uma cobertura porosa associada à hidroxiapatita; e, implantes de superfície lisa, na resposta cicatricial em períodos de 4, 8 e 12 semanas, utilizando ovelhas. Testes de avaliação mecânica da interface revelaram que as superfícies de cobertura porosa e cobertura porosa associada à hidroxiapatita apresentaram os melhores resultados de resistência à fixação. Paralelamente, a cobertura de hidroxiapatita associada aos implantes que sofreram jateamento, demonstraram aumento significativo da resistência à fixação após 8 e 12 semanas. A associação de uma camada de hidroxiapatita à superfície porosa não apresentou diferença significativa. As imagens obtidas por MEV revelaram uma maior taxa de aposição e crescimento ósseo, após 4 semanas, nos implantes jateados e cobertos por hidroxiapatita.

Itála et al. (2001) propuseram-se a avaliar se poros da ordem de 100 μm representam o valor limite para o crescimento ósseo em condições não funcionais em coelhos. Placas triangulares de titânio, apresentando 250 ou 500 μm em espessura, foram perfuradas a laser, para se obter poros de tamanhos padronizados (50, 75, 100 e

125 μm) e em múltiplas séries. A análise detalhada do crescimento ósseo, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) equipado com detector de elétrons retroespalhados, após 12 semanas da implantação, revelou que a quantidade de crescimento do novo osso não dependeu do tamanho do poro e da espessura do implante sob condições estáticas.

Uma outra técnica, utilizada na confecção de materiais porosos, foi testada no estudo de Melican et al. (2001). A fabricação de moldes cerâmicos complexos permite o emprego de metodologias de fundição convencionais para a obtenção de superfícies metálicas texturizadas com dimensões extremamente controladas. Portanto, a proposta deste estudo foi analisar, em cães (tíbia), por períodos de 6, 12 e 26 semanas, as características de adesão e aposição óssea, em superfícies assim manufaturadas, tendo-se como controle implante de macrotextura da liga Co-Cr-Mo. As superfícies controle foram obtidas pela sinterização de partículas de CoCr em três camadas, rendendo um grau de porosidade superficial ao redor de $37,1 \pm 3,4 \mu\text{m}$ e tamanho de poros entre $271 \pm 29 \mu\text{m}$. As superfícies experimentais, denominadas X, Y e Z, foram confeccionadas em duas camadas com graus de porosidade de 43%, 38% e 67%, e tamanho de poros de (X) 350-1000 μm , (Y) 200 μm e (Z) 350-1000 μm , respectivamente. Todas as superfícies experimentais apresentaram poros de formato cúbico organizados no formato de escada com retenções e saliências. Decorridas 26 semanas, as superfícies X e Y revelaram os maiores percentuais de crescimento de tecido ósseo, enquanto a superfície Z demonstrou tal fato após 12 e 26 semanas. O maior grau de porosidade das superfícies Z podem ter permitido o crescimento de maior volume tecidual em comparação às outras superfícies analisadas, acarretando maior resistência de união da interface frente ao ensaio de cisalhamento.

O efeito do grau de porosidade (%), bem como o tamanho médio de poros (μm) no processo de osteointegração, foi alvo do estudo de Kujala et al. (2003). Os implantes instalados na região distal da metáfise femural de ratos apresentavam as seguintes características: grupo 1 – 66,1% e $259 \pm 30 \mu\text{m}$; grupo 2 – 59,2% e $272 \pm 17 \mu\text{m}$ e, grupo 3 – 46,6 e $505 \pm 136 \mu\text{m}$. A relação contato osso-implante, após um período de avaliação de 30 semanas, foi maior no grupo 1 (51%), no entanto, não foi considerada

estatisticamente significante quando comparada ao grupo 3 (39%). O grupo 2 apresentou o menor valor contato osso-implante (29%) sendo significativamente menor do que o relatado para o grupo 1. Frequência maior na evidenciação de tecido fibrótico no interior dos poros, foi observada no grupo 1 quando comparado ao grupo 3.

Visando acelerar o chamado “bone ingrowth” e, conseqüentemente, otimizar a resistência à fixação osso-implante, Frosch et al. (2003) associaram osteoblastos autógenos (coelhos) a poros com dimensões variadas. Foram instalados implantes apresentando poros com diferentes diâmetros (400, 500 e 600 μm), associados ou não a osteoblastos autógenos, em fêmures de coelhos, por períodos de 5, 11 e 42 dias. Em ambos os grupos não foi evidenciado qualquer sinal de formação óssea em nenhum dos poros, após o período de 5 dias. Decorridos 11 dias da implantação, foi observado maior quantidade de tecido ósseo e maior contato osso-implante, estatisticamente significante ao grupo associado às células (grupo teste). O tecido ósseo formou-se no grupo teste entre os 15-30 dias, já no grupo controle, tal fato pôde ser observado entre o 25-40 dias. Seis semanas após a implantação, ocorreu o preenchimento de $68,8 \pm 15,1\%$ dos poros no grupo teste, significativamente maior do que no grupo controle ($49,8 \pm 21,9\%$). Após este período de tempo (6 semanas), os poros com diâmetro de 600 μm , demonstraram a melhor osteointegração.

Götz et al. (2004) relataram resultados interessantes relacionados ao efeito da textura de superfície associada a implantes da liga Ti-6Al-4V apresentando poros de diferentes tamanhos (100, 200 e 300 μm). O enfoque deste trabalho foi comparar implantes porosos de superfície polida em relação a poros do mesmo diâmetro, porém, de superfícies rugosas obtidas por jateamento com partículas de óxido de alumínio. Os diferentes implantes foram instalados em fêmures de coelhos por 3, 6 e 12 semanas. Os autores demonstraram que o tratamento de superfície adicional (jateamento), em implantes apresentando poros de 200 μm , resultou em extrema melhora na capacidade de osteointegração, após 12 semanas. Todavia, uma formação óssea do tipo lamelar foi observada em todos os diferentes diâmetros de poros. Em poros medindo 100 μm o remodelamento ósseo ocorreu tardiamente, quando comparado aos poros maiores. Implantes com poros ao redor de 300 μm demonstraram um atraso, no que diz respeito à

osteointegração comparativamente aos implantes com 200 μm . A associação entre a presença de poros e uma superfície rugosa tendem a produzir melhor contato osso-implante e, conseqüentemente, favorecer a interação biomecânica do dispositivo implantado.

3.6.3 Eventos Biológicos Associados à Instalação de um Implante Poroso

Materiais porosos têm sido utilizados no desenho de implantes cirúrgicos por vários motivos: 1) fabricar dispositivos para substituir ou reparar tecidos moles ou duros; 2) como recobrimentos em próteses, com a função de acomodar o crescimento de tecido no interior dos poros intencionalmente produzidos, promovendo assim uma fixação biológica e; 3) como arcabouço (“scaffold”), a fim de facilitar a regeneração tecidual. O aspecto relevante, da sua utilização em implantes, recai na capacidade destes materiais serem incorporados pelos tecidos nos quais estão implantados (Spector et al., 1988).

O processo de reparo ou regeneração associado à resposta cicatricial decorrente da instalação cirúrgica de um implante poroso, apresenta algumas fases. Imediatamente após a implantação, uma resposta inflamatória caracterizada por um aumento da vascularização, bem como da atividade celular é induzida, e um coágulo sangüíneo é formado no interior dos poros. Poucos dias depois, o coágulo sangüíneo torna-se organizado contendo células vermelhas do sangue, fibrina e plaquetas. A seguir, o coágulo inicial é substituído pelo tecido fibrocolagenoso perdido e capilares. Após a formação do coágulo, os poros serão preenchidos por células mesenquimais osteoprogenitoras. Decorridas, aproximadamente, quatro semanas da implantação, osso trabecular novo pode ser observado no interior dos poros do implante completando-se, assim, o **primeiro estágio** do crescimento de tecido ósseo no interior dos poros ou “bone ingrowth”. O **segundo estágio** deste processo envolve o modelamento e o remodelamento induzido por estresse de espículas ósseas em trabeculado maduro (Spector et al., 1979; Spector et al., 1988). A presença de tecido ósseo dentro e ao redor

dos implantes porosos é influenciada pela distribuição de estresses alterada devido à presença do dispositivo implantado (Weinans et al., 1993). Enquanto o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros depende do grau de porosidade da estrutura porosa do material, o processo de remodelamento é influenciado pelas propriedades mecânicas do material, principalmente pelo módulo elástico (Spector et al., 1978).

Os fatores que iniciam o crescimento de tecido ósseo (“bone ingrowth”), a partir dos tecidos adjacentes, e os que determinam a perfeição da incorporação ou que afetam o tipo de tecido novo formado no interior do arcabouço, ainda são pouco compreendidos (Cornell & Lane, 1998; Itäla et al., 2001). Todavia, os requisitos inquestionáveis para o sucesso do chamado “bone ingrowth” são: o grau de porosidade da superfície ou do material; a estabilidade do implante e o grau de micromovimentação entre o implante e o osso; a disponibilidade de osso adjacente (cortical ou trabecular); e a existência de espaços entre o implante e a superfície do osso (Cornell & Lane, 1998; Kienapfel et al., 1999; Frosch et al. 2003).

3.7 Considerações Gerais sobre a Osteointegração

A osteointegração é a base biológica fundamental dos implantes cirúrgicos, de forma que a natureza da interface entre osso e o titânio comercialmente puro (TiCp), vem sendo estudada há algumas décadas (Branemark et al., 1969; Branemark et al., 1983). O termo, osteointegração ou osseointegração, refere-se ao contato direto osso-biomaterial sem a interposição de um tecido fibroso quando observado sob os limites de resolução da microscopia óptica, tendo sido inicialmente utilizado na implantodontia (Branemark et al., 1969).

A espessura, constituintes e funções dessa camada interfacial, ainda não está bem estabelecida. No entanto, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), dependendo do período decorrido da implantação, observa-se uma zona pouco

mineralizada e extremamente fina (Steflik et al., 1992). Felizmente, a zona de separação formada, insuficientemente mineralizada, entre o osso e o implante, por ser tão fina, permite um ótimo embricamento mecânico, proporcionando uma fixação rígida para implantes submetidos à carga funcional de desenho convencional (Pilliar et al., 1991). Esta camada interfacial eletro-densa apresenta uma espessura de aproximadamente 20-50 nm, rica em proteínas não colágenas, tais como, a osteopontina e a sialoproteína óssea. (Steflik et al., 1998; Puleo & Nanci, 1999).

No que se refere à cinética da interface osso-biomaterial, estudos sobre a integração óssea, reportaram que tal interação ocorre em uma zona estreita de menos de 10 nm, de forma que as reações interfaciais desempenham um importante papel na aposição óssea inicial (Kasemo & Lausmaa, 1985; Kasemo & Lausmaa, 1986). Existem, também, evidências de adsorção de biomoléculas na superfície do implante sendo esse fenômeno dependente do tempo (Thomsen & Ericsson, 1985). À medida que essas interações biomaterial-biomoléculas ocorrem, existe um aumento na espessura da camada de óxido em até 200 nm em diferentes regiões ao longo do implante. Nessas condições, há a liberação de íons e óxidos nos tecidos vivos adjacentes à interface, causando uma remodelação dinâmica desta zona interfacial (Larsson et al., 1995). Essa liberação de substâncias vindas do biomaterial foi caracterizada, sendo constatado que são dependentes de fatores como: química de superfície, macroestrutura, topografia, e tempo pós-implantação (Baier et al, 1984).

Dependendo de sua composição, os biomateriais podem exibir diferentes valores de energia de superfície, podendo alterar o potencial de adsorção de biomoléculas e a biocompatibilidade do dispositivo implantado (Baier et al. 1982; Baier, 1984). Outras pesquisas demonstraram que baixos valores de energia de superfície são desfavoráveis a interações biomoleculares e, portanto, prejudicam a bioadesão (Keller et al. 1990). Esses resultados foram comprovados em estudos “in-vivo” e “in-vitro” e ressaltam a importância da topografia de superfície, bem como da energia química na resposta biológica do hospedeiro (Kasemo & Lausmaa, 1986).

Em contraste, o termo **fibro-integração**, é definido como o contato indireto em decorrência da interposição de um ligamento periimplantar, entre um tecido ósseo bem diferenciado e a superfície de um implante funcionalmente carregado (Oleinick, 1993).

3.7.1 Efeito da Topografia do Implante na Osteointegração

Levando-se em consideração que os implantes dentais são vulneráveis à força de torção, mecanismos anti-rotacionais vêm sendo desenvolvidos na maioria dos sistemas de implantes. Neste contexto, estes implantes, podem apresentar uma superfície lisa ou rugosa e, ainda, serem recobertos ou não por hidroxiapatita. A maior parte dos implantes dentais, que apresentam desenhos anti-rotacionais, têm um ou mais sulcos de retenção ao longo da raiz ou no fim do implante, já que a proposta destes desenhos é prevenir que o implante dental rotacione, após crescimento ósseo, nestas reentrâncias intencionalmente propostas (Buser et al., 1991). Um implante que apresente cantos arredondados, bom acabamento superficial e uma estrutura porosa, poderá ser melhor penetrado por tecido ósseo regenerado, contribuindo para uma melhor osteointegração do material implantado (Puleo & Nanci, 1999).

Existem diversos fatores relacionados ao processo de reparação óssea ao redor de implantes, sendo eles: a biocompatibilidade do material, o desenho, a topografia da superfície do implante, as condições sistêmicas do paciente, a qualidade e a quantidade de osso disponível, a técnica cirúrgica e as condições de carregamento funcional (Albrektsson et al., 1981; Weinlaender, 1991; Puleo & Nanci, 1999).

Embora implantes de superfície usinada tenham sido utilizados por muitos anos, e considerados os que propiciavam os melhores resultados, inúmeros estudos demonstram que a modificação do padrão topográfico tende a aumentar não só o contato direto entre o osso e o implante, mas também a resistência de união da interface,

devido aos altos valores de resistência de remoção ao torque quando comparados aos implantes de superfície usinada.

As alterações, na topografia da superfície do implante, são realizadas por diferentes tratamentos de superfície, tais como: usinagem, aspersão térmica à plasma, jateamento com óxido de alumínio, associado ou não ao ataque com soluções ácidas, com o fim de alcançar uma fixação mais efetiva e, se possível, proporcionar uma maior ancoragem óssea no menor período de tempo independentemente da qualidade óssea (Weinlaender, 1991; Wennerberg et al., 1993). O efeito de tais características de superfície sobre a osteocondutividade e, também, a taxa de adaptação óssea ao implante, ainda continuam sob investigação (Wennerberg et al., 1996).

O perfil topográfico mostra importante relação no que diz respeito ao posicionamento e alinhamento celular observados em estudos “in-vitro” e, assim, torna esta superfície texturizada preferível às superfícies lisas e polidas (Brunette, 1988). Vale ressaltar que a limpeza da superfície do implante, ou seja, a remoção dos fluidos utilizados durante a usinagem, associado a um processo de esterilização eficaz, é de estimável importância para que sejam alcançadas altas taxas de sucesso clínico (Baier et al. 1984).

Estudos “in vitro”, acerca da biocompatibilidade do titânio usando-se células osteoblásticas, têm demonstrado que superfícies rugosas favorecem o aumento da adesão celular, a síntese de colágeno, de matriz extracelular, de fatores de crescimento e, conseqüentemente, formação óssea (Bowers et al., 1992; Rosa & Beloti, 2003). Estudos “in vivo” confirmam o observado “in vitro”, deixando claro o papel da rugosidade de superfície na otimização, bem como na velocidade de osteointegração. Superfícies rugosas, tais como obtidas por aspersão térmica ou após submetidas a processos de jateamento com óxido de alumínio e ataque químico com soluções ácidas, mostraram valores de resistência ao teste de remoção ao torque (RTV) significativamente superiores a implantes de superfície usinada (Buser et al., 1999; Li et al., 1999). É importante frisar que não se sabe ao certo se a presença de partículas de

óxido de alumínio, empregadas no tratamento de superfície, influencia negativamente a osteointegração, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de contato osso-implante (Piatelli et al., 2003).

Análises da capacidade de osteointegração de implantes confeccionados puramente em nióbio mostram que após um período de três meses, a resistência de remoção ao torque é maior quando comparada ao titânio comercialmente puro. Todavia, as análises histomorfométricas mostraram resultados de contato osso-implante muito similares, sendo 41,1% para os implantes de nióbio e 37,2% para os implantes de titânio. A diferença apresentada pelos valores de remoção ao torque pode estar relacionada à superfície dos materiais, pois o implante de nióbio, quando observado por microscopia eletrônica de varredura, apresentava uma topografia de superfície mais irregular (Johansson & Albrektsson, 1991).

Suzuki et al. (1997) investigaram a atividade de remodelamento ósseo em coelhos, ao redor de implantes de titânio, com diferentes rugosidades de superfície. Utilizaram implantes usinados e implantes de superfície rugosa obtidos pela técnica de aspersão térmica à plasma. Estes implantes foram instalados em fêmures de coelhos e avaliados em períodos de 6, 16 e 42 semanas. Análises histomorfométricas foram realizadas ao nível da cortical na interface osso-implante em imagens obtidas por microscopia confocal a laser. Após um período de 42 semanas, os implantes de superfície rugosa, apresentaram maior porcentagem de contato direto osso-implante e volume ósseo em relação aos implantes de superfície lisa. Análises de mineralização da superfície e da taxa de aposição mineral (MAR) não revelaram diferenças estatisticamente significantes. Estes resultados indicam que o aumento no volume ósseo, apresentado ao redor dos implantes de superfície rugosa, deve-se à menor atividade de remodelamento durante o estágio inicial, quando comparado aos implantes de superfície lisa.

A fase inicial de cicatrização dos implantes é de fundamental importância para o sucesso do tratamento a longo prazo. Neste sentido, Dhert et al. (1998) observaram

histológica e histomorfometricamente o processo de cicatrização óssea em implantes da liga Ti-6Al-4V, de titânio comercialmente puro e em implantes, recobertos pela técnica de aspersão à plasma de hidroxiapatita, e outros, recobertos por fluorapatita, instalados no osso cortical de coelhos, após 3, 7, 14 e 28 dias de implantação. Em todos os implantes, a cicatrização foi caracterizada pela formação de hematoma, reabsorção óssea e a formação de osso novo, revelando ainda um maior contato osso-implante após três dias da implantação, se comparado aos períodos de 7 e 14 dias. Análises histológicas, após o período de 28 dias, revelaram para todos os implantes, um aparente decréscimo da atividade celular ao longo da interface e a recém-formação de osso lamelar entre o implante e o osso cortical original, não sendo observada a encapsulação de tecido fibroso nos implantes não recobertos.

Jinno et al. (1998) compararam a osteointegração entre implantes da liga Ti-6Al-4V e da liga Co-Cr, que receberam jateamento da superfície com partículas de óxido de alumínio. As avaliações radiográfica, histológica e histomorfométrica foram realizadas após períodos de 3, 6 e 12 semanas de implantação em coelhos. Ambos os implantes demonstraram-se biocompatíveis quando analisados radiográfica e histologicamente. Análise, por microscopia de luz, de amostras coradas pelo método de azul de toluidina, revelou um efeito osteocondutor da superfície jateada. Paralelamente, os marcadores fluorocromáticos demonstraram formação óssea ativa na interface osso-implante, em ambos materiais, mesmo após 12 semanas. A liga Co-Cr apresentou menor adesão osso-implante, frente à realização do ensaio de resistência ao cisalhamento, do que a liga Ti-6Al-4V, embora a área de contato ósseo com a superfície do implante fosse semelhante, não sendo identificado na interface osso-implante a presença de tecido fibroso sob microscopia eletrônica de varredura (elétrons retroespalhados). Tecido não mineralizado (cartilagem e osteóide) foi observado com maior frequência sobre a superfície da liga Co-Cr.

A influência de quatro diferentes topografias de superfície, sendo elas: usinada, jateada com óxido de alumínio, modificada por aspersão térmica à plasma e atacada com ácido (Osseotite®), foi testada após a implantação na tíbia de coelhos por 5 semanas. A histomorfometria revelou um aumento significativo na porcentagem de

contato osso-implante (33%) para os implantes atacados com solução ácida em relação às outras superfícies testadas, resultado este confirmado pelos valores obtidos no ensaio de remoção ao torque (Cordioli et al., 2000).

A dinâmica do remodelamento ósseo ao redor de implantes de Tícp de superfícies lisas e rugosas foi avaliada, após serem instalados em ovelhas, por períodos de 3, 6, 12 e 18 meses (Grizon et al., 2002). Foram avaliadas a quantidade de osso ao redor dos implantes (volume ósseo, fração em volume de osso imaturo, espessura óssea e interface de contato), a atividade osteoblástica (taxa de aposição mineral e de formação óssea), bem como a atividade de reabsorção. A taxa de aposição mineral foi mensurada próximo ao implante e em áreas afastadas ao leito cirúrgico expressada em $\mu\text{m}/\text{dia}$. Não foram observadas diferenças significativas entre os 2 tipos de implantes entre os períodos de 3 e 6 meses. Decorridos 12 e 18 meses da implantação, o volume ósseo e a interface de contato continuaram aumentando, havendo sempre uma tendência dos implantes de superfície rugosa estarem associados aos maiores valores. De maneira contrária, as taxas de aposição mineral, formação e reabsorção óssea, foram mais evidentes, nos implantes de superfície rugosa. Tal fato pode ser explicado pelo aumento na resistência de união interfacial que acarreta uma menor estimulação dos osteócitos. A taxa de aposição mineral, após 3 meses de implantação adjacente ao implante, foi muito maior que a taxa de aposição controle.

Giavaresi et al. (2003) instalaram, por períodos de 8 e 12 semanas, no osso cortical de ovelhas, implantes com diferentes tratamentos de superfície: usinado, anodizado, aspersão térmica à plasma de hidroxiapatita e ataque químico, com o objetivo de investigar a relação entre os parâmetros histomorfométricos e mecânicos em relação à topografia de superfície. Após 8 semanas da implantação, os implantes anodizados, apresentaram resistência de união ao osso significativamente maior do que os implantes usinados. No entanto, uma diminuição ao redor de 39% foi observada para os implantes de superfície tratada por ácido, quando comparado com os outros tratamentos. Decorridas 12 semanas, os valores de resistência mecânica dos implantes de superfície atacada por ácidos, foram ainda significativamente menores do que aqueles observados para os implantes usinados, e os maiores valores, foram associados

aos implantes tratados por aspersão térmica à plasma de hidroxiapatita. Após 8 e 12 semanas da implantação, a porcentagem de contato osso-implante dos implantes atacados por ácido, foi significativamente menor do que os observados para os outros implantes, inclusive para os implantes de superfície usinada.

3.7.2 Influência da Micromovimentação na Osteointegração dos Implantes

Levando-se em consideração que existe uma união óssea confiável em implantes porosos sob condições estáticas (Welsh et al., 1971), alguns trabalhos foram conduzidos no sentido de estabelecer o limite máximo de movimentação permitido sem influenciar negativamente na adesão osso-implante. O efeito da micromovimentação, na interface osso-implante, pode representar dois efeitos principais sobre os componentes celular e extracelular do osso. Primeiro, a micromovimentação pode levar ao rompimento do contato entre a célula óssea e a superfície do implante, e por essa razão, apresenta a capacidade de prejudicar a reação celular devido ao descolamento das células; segundo, a micromovimentação pode levar à deformação dos osteoblastos fixados à superfície de maneira relacionada à aplicação de tensões (Szmukler-Moncler et al., 1998).

Neste sentido, vem sendo demonstrado que há um limite máximo de movimentação permitido, ao redor de 30 μm , já que tal movimentação é conhecida por estimular a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina de células osteoblásticas. Todavia, movimentação em excesso, 150 μm ou mais, ou seja, a movimentação realizada em caminhadas mais intensas e o ato de subir escadas, poderá resultar na fixação por crescimento de tecido conjuntivo fibroso, não mineralizado, devido ao rompimento dos elementos do estroma, formados nos estágios iniciais de cicatrização, prevenindo a regeneração do tecido ósseo no interior dos poros (Cameron et al., 1973; Pilliar et al., 1986; Pillar, 1991; Nishioka et al., 1993; Puleo & Nanci, 1999; Zou et al., 2004).

3.8 Metalurgia do Titânio e suas Ligas

Os metais são os elementos mais abundantes na tabela periódica e, apesar da grande variedade de propriedades, nem todos podem ser utilizados como biomateriais, devido à suscetibilidade que este grupo possui à degradação em ambientes aquosos (Shackelford, 2000). Dentre os metais mais utilizados para aplicações biomédicas, os chamados reativos, têm se mostrado os mais biocompatíveis (Lemons & Bidez, 1991; Matsuno et al., 2001). Eles ocupam as colunas IV B, V B e VI B da tabela periódica (Figura 4), e são assim denominados por produzirem óxidos estáveis em suas superfícies, tornando-os mais resistentes à degradação em ambientes desfavoráveis, como os fluidos orgânicos (Lemons & Bidez, 1991).

IV B	V B	VI B
22 Ti	23 V	24 Cr
40 Zr	41 Nb	42 Mo
72 Hf	73 Ta	74 W

Figura 4. - Segmento da tabela periódica dos elementos contendo os metais chamados reativos (Coelho et al., 2005).

O titânio ocupa o nono lugar na ordem de abundância dos elementos, sendo o quarto metal mais encontrado na crosta terrestre atrás apenas do alumínio, ferro e magnésio. Seus principais minérios são o rutilo (TiO_2) e a ilmenita (FeTiO_3), dos quais se extrai o titânio metálico por operações baseadas no processo Kroll. O

desenvolvimento da metalurgia do titânio é considerado recente, pois, apesar de ter sido descoberto em 1789, o titânio só começou a ser utilizado como metal a partir de 1948, quando começou a ser produzido em escala industrial (Rover et al., 1971).

3.8.1 Classificação das Ligas de Titânio

O titânio puro exibe estrutura cristalina do tipo hexagonal compacta (hc) até 882,5° C, sendo esta fase denominada α . Acima desta temperatura, o titânio sofre nova transformação alotrópica e passa a apresentar estrutura cúbica de corpo centrado (ccc), conhecida como fase β . Elementos **alfagênicos**, tais como Al, O, N e C, estabilizam a fase α , aumentando a temperatura de transformação alotrópica. Paralelamente, a adição de solutos **betagênicos**, tais como os metais de transição, V, Nb, Ta (grupo V) e Mo (grupo VI), em ligas de titânio, estabilizam a fase β , agindo de modo inverso (Bania, 1994).

A classificação das ligas de titânio é dada de acordo com suas fases predominantes: ligas alfa (α), ligas alfa+beta ($\alpha+\beta$) e ligas beta (β). A principal função da adição de elementos de liga ao titânio relaciona-se à estabilização preferencial das fases α e β . Tais elementos alteram a temperatura e a estabilidade das formas alotrópicas do titânio. Já, o processamento termomecânico, visa otimizar as propriedades mecânicas do titânio (Donachie, 1988).

Ligas Ti- α , ou com alto teor desta fase, apresentam elevada resistência à corrosão, no entanto, sua aplicação como biomaterial é limitada, por apresentar baixa resistência mecânica em temperatura ambiente. As ligas β , todavia, são ligas para trabalho a frio, com alta conformabilidade, endurecem por tratamento térmico e são requeridas quando se necessita de resistências elevadas em temperaturas relativamente baixas. Em geral, as ligas Ti- β demonstram elevada resistência mecânica, melhores

propriedades ao entalhe e maior conformabilidade. A versatilidade de ligas à base de titânio é notada em ligas $\alpha+\beta$, posto que, agregam propriedades das fases α e β . Tal combinação garante boa resistência mecânica em qualquer faixa de temperatura acima da ambiente, boas condições de conformabilidade e usinabilidade, ótima relação resistência mecânica/densidade específica, razoável soldabilidade e, ainda, boa resistência à corrosão (Donachie, 1988; Henriques, 2001; Niinomi, 2003). As principais propriedades físicas e mecânicas do titânio estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. - Propriedades Físicas e Mecânicas do Titânio (Donachie, 1988).

Propriedades do Titânio	
Número Atômico	22
Massa Atômica	47,90 (u.m.a.)
Massa Específica	4,51 g/cm ³
Ponto de Fusão	1668 °C \pm 10 °C
Raio Atômico	0,146 nm
Limite de Escoamento	485 MPa
Limite de Resistência	550 MPa
Alongamento	15 %
Módulo Elástico	100 GPa

O titânio apresenta alta afinidade pelo hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio, que são formadores de soluções sólidas intersticiais. A presença desses elementos tende a aumentar a dureza, a resistência mecânica e diminuir a ductilidade do titânio. Sendo o oxigênio o elemento intersticial mais importante em termos de alteração das características mecânicas do titânio, o controle de seu teor é de extrema importância para o bom desempenho da liga (Vallet-Regi, 1997).

O emprego do titânio e de suas ligas apresentou um grande crescimento durante a década de 70. O interesse na liga Ti-6Al-4V ($\alpha+\beta$), para aplicação em próteses ortopédicas, aumentou consideravelmente, no entanto, um dos problemas relacionados a este material refere-se aos prováveis acúmulos de alumínio e vanádio, provocados pela

degradação da liga em decorrência de desgaste da prótese e pelo ataque dos fluidos orgânicos (Kuroda et al., 1998; Okazaki et al., 1998a; Okazaki et al., 1998b).

As ligas ($\alpha+\beta$) Ti-6Al-7Nb e Ti-5Al-2,5Fe foram desenvolvidas para aplicações na área de biomateriais, devido às crescentes preocupações relativas à citotoxicidade em potencial do vanádio (Okazaki et al., 1998a; Okazaki et al., 1998b; Okazaki et al., 2001; Henriques et al., 2003). Normalmente, ligas β de titânio contém elementos de liga como molibdênio (Mo), nióbio (Nb), zircônio (Zr), tântalo (Ta) ou ferro (Fe), e podem apresentar módulos de elasticidade menores que o da liga Ti-6Al-4V (Long & Rack, 1998). Em geral, as ligas de titânio possuem módulo de elasticidade relativamente menor do que outros metais ou ligas (Tabela 2), destacando-se as ligas Ti- β cujos módulos estão entre 55 e 80 GPa (Taddei et al., 2004). Entretanto, esses valores ainda estão distantes do módulo de elasticidade do osso, ao redor de 10-30 GPa (Geetha et al., 2004). Este fato torna o “design” do corpo dos implantes endósseos de grande importância para uma melhor distribuição de cargas no tecido ósseo circunjacente (Bozkaya & Muftu, 2003).

Tabela 2. - Propriedades mecânicas de metais e ligas usadas em implantes (Coelho et al., 2005).

Material	Módulo Elástico (GPa)	Limite de Escoamento (MPa)
Ti $\alpha\beta$	100	170-485
Ti-6Al-4V	120	795-827
Aço 316L	200	700-800 (trabalhado à frio)
Co-Cr-Mo	240	490

Durante a década de 90 foram desenvolvidas as ligas β , Ti-15Mo, Ti-12Mo-6Zr-2Fe e Ti-15Mo-5Zr-3Al (Long & Rack, 1998). A elevada porcentagem de molibdênio (Mo) pode ser prejudicial, sendo associada a inúmeras reações adversas em estudos com animais ou em cultura de células, onde não foi observada a mineralização celular quando comparada com espécimes de nióbio comercialmente puro (Pypen et al. 1998).

3.8.2 Liga Ti-13Nb-13Zr

Na liga Ti-13Nb-13Zr, o teor de 13% em peso de nióbio, corresponde à relação atômica de 8%, sendo esta a composição ideal para se conseguir módulo de elasticidade compatível com o da estrutura óssea (Schneider, 2001). Outros estabilizadores β -isomorfos poderiam ser utilizados, entretanto, o nióbio (Nb) é preferível, pois, além de atuar na redução do módulo elástico, é extremamente biocompatível (Kuroda et al., 1998; Long & Rack, 1998; Pypen et al., 1998). Por outro lado, o zircônio é considerado um elemento neutro, capaz de estabilizar as fases α e β , porém, quando em solução, atua como estabilizador β (Lopez et al., 2001). Ainda, relacionado ao zircônio, resultados de testes “in vivo”, demonstram que este metal apresenta comportamento similar ao titânio quando em contato com o osso, embora o titânio tenha demonstrado maiores valores de remoção ao torque, bem como maior contato osso-implante após 12 semanas em coelhos (Thomsen et al., 1997). Rica em fase β , destaca-se também pela excelente resistência à corrosão e baixo módulo elástico (Khan et al., 1999; Schneider, 2001). A camada passivadora formada sobre esta liga, apresenta uma maior porcentagem atômica do elemento zircônio em relação ao nióbio, o que pode auxiliar nas possíveis correlações ao potencial de osteointegração desta liga (Lopez et al., 2001).

3.9 Obtenção de Implantes de Ligas de Titânio por Metalurgia do Pó (M/P)

A utilização da tecnologia da metalurgia do pó (M/P), na área biomédica, é recente, e os aspectos positivos relacionados à fabricação de materiais para implantes cirúrgicos, entre outros são (Henriques et al., 2001; Wojnar et al., 2001):

- Obtenção de peças próximas ao formato final (“near-net-shape”), reduzindo-se assim custos com etapas de usinagem;

- Possibilidade da escolha precisa da composição química do material;
- Porosidade e geometria de poros apropriada, permitindo o crescimento de tecido ósseo no seu interior e aumentando-se assim a estabilidade e fixação do implante.

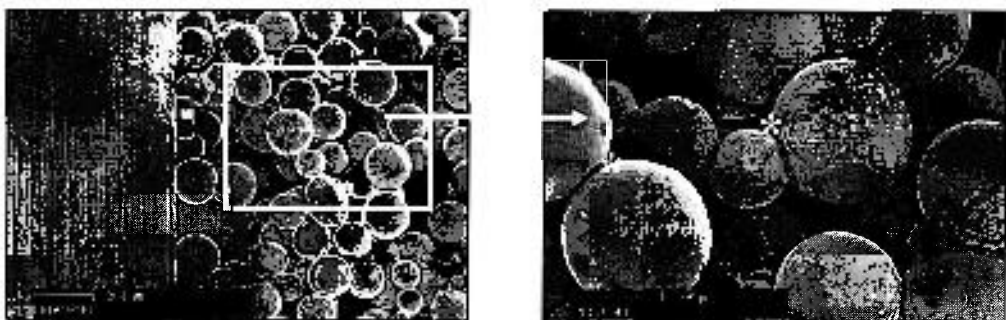
O processo de sinterização se realiza à temperatura inferior ao ponto de fusão do metal mais importante, sendo definido no momento em que um conjunto de partículas, compactadas ou não, se ligam, por mecanismos difusionais, geralmente por difusão, no estado sólido. A força motriz, que viabiliza o processo, é obtida pela redução na energia livre do sistema, observada pelo decréscimo na curvatura superficial e redução da energia superficial das partículas pela formação do contorno de grão, crescimento de pescoços entre as partículas e densificação (Pilliar, 1987; German, 1990). O processo de sinterização, no estado sólido, é definido em três estágios. No **estágio inicial**, ocorre a formação e crescimento de pescoços entre as partículas. A estrutura do poro é aberta e totalmente interconectada. No **estágio intermediário**, ocorre a densificação do compactado e decréscimo do diâmetro dos poros interligados, que apresentam uma estrutura cilíndrica. No **estágio final**, por sua vez, ocorre o isolamento e eliminação gradual dos poros residuais (German, 1990).

As duas técnicas mais utilizadas para a obtenção de ligas de titânio por metalurgia do pó são (German, 1990; Froes, 1998):

- **“Prealloyed”** (PA), que utiliza pós pré-ligados, obtidos preferencialmente por atomização, e posterior compactação por prensagem isostática à quente. As peças obtidas denotam excelentes propriedades mecânicas, no entanto, apresentam custo elevado; e,
- **“Blended elemental”** (BE), empregando a mistura dos pós elementares visa reduzir os altos custos do primeiro processo. Em geral, a obtenção de peças por esta técnica, associa-se à prensagem isostática a frio e posterior sinterização ou prensagem uniaxial à quente. As vantagens desta técnica envolvem a possibilidade de redução de custo, em virtude dos pós obtidos pelo processo de hidrogenação-desidrogenação (HDH), ou mesmo da utilização de finos de esponja de titânio.

O processo HDH é um método de obtenção de pós metálicos a partir da fragilização dos metais pela ação do hidrogênio (Mitikov & Bozic, 1996). É aplicável preferencialmente ao titânio, nióbio e zircônio, em razão desses metais serem capazes de absorver grandes quantidades de hidrogênio em elevadas temperaturas (Bobrová, 1994). Este processo normalmente envolve as etapas de: obtenção de cavacos por usinagem de lingotes ou sucata, hidrogenação do cavaco, moagem do cavaco em moinho planetário e desidrogenação do pó, dando origem a um pó metálico com morfologia angular e isento de poros (Mitikov & Bozic, 1996).

Baseando-se na tecnologia da M/P, uma empresa canadense, desenvolveu para o mercado odontológico, um implante à base da liga Ti-6Al-4V (Figura 5), recoberto por partículas de titânio parcialmente sinterizadas (Pilliar, 1983). O sistema Endopore[®] é o único implante dentário que apresenta uma superfície porosa, obtida via sinterização de pós de titânio em sua superfície, a qual garante alta previsibilidade clínica (Deporter et al. 2002).



(a)

(b)

Figura 5. - Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), do implante Endopore (Innova Corporation, Toronto, ON, Canadá): (a) aspecto geral do implante; (b) camada porosa parcialmente sinterizada sobre a liga Ti-6Al-4V. Observar (b) o início da formação de pescoços (asteriscos).

A maioria das superfícies rugosas são produzidas por técnicas de cobertura, no entanto, é evidente que se alterações ocorrerem nessa camada porosa, problemas com relação à fixação dos implantes poderão aparecer. Neste sentido, a tecnologia da M/P,

utilizada com o fim de produzir um implante dotado de poros de tamanho adequado, busca favorecer o crescimento de tecido ósseo no seu interior, otimizando a capacidade de fixação do implante ao tecido ósseo e, ainda, uma melhor distribuição de tensões na interface (Pilliar, 1983).

3.9.1 Obtenção de Materiais Metálicos Porosos

Um fator extremamente relevante a ser considerado diz respeito ao fenômeno de escudo de tensão ou “stress-shielding”, o qual acarreta a reabsorção do osso remodelado devido a uma distribuição de tensão anormal na interface osso-biomaterial. Considerando que a rigidez de um material é determinada pelo seu módulo elástico, além de outras propriedades como o momento de inércia da área, no caso dos implantes metálicos convencionais, sua magnitude ultrapassa consideravelmente o módulo elástico apresentado pelas estruturas ósseas. Uma maneira de se contornar este problema pode ser a partir da introdução de poros na estrutura do material e, dessa forma, tentar minimizar os prejuízos ocasionados e, eventualmente, prolongar o tempo de vida do dispositivo implantado além de promover uma fixação osso-implante pela interdigitação entre o osso e a matriz porosa do implante (Itin et al., 1994; Thieme et al., 2001; Wen et al., 2001; Wen et al., 2002; Oh et al., 2002; Oh et al., 2003; Kutty et al., 2004; An et al., 2005).

Inicialmente, a produção de coberturas porosas foi alcançada a partir da sinterização de pós metálicos sobre a superfície de um sólido denso. Entretanto, falhas catastróficas como, por exemplo, microfraturas e delaminação desta camada, foram detectadas nestes primeiros recobrimentos. Outras técnicas, envolvendo a sinterização de partículas esféricas ou fibras de titânio, também foram empregadas a fim de se obter um rede interconectada de poros (Kutty et al., 2004).

A técnica, conhecida por compactação por descarga elétrica, foi utilizada com a intenção de fabricar implantes dentários porosos à base de titânio (Lifland & Okazaki, 1994). Baseia-se na obtenção de uma superfície porosa, a partir da aplicação de descargas elétricas a uma alta voltagem e com altos pulsos de densidade de corrente, a uma coluna preenchida com pós de titânio, obtidos por atomização, fracamente compactados.

O método comumente empregado na produção de uma superfície porosa é o de aspersão térmica à plasma de pós de titânio. A superfície obtida apresenta características morfológicas interessantes como, por exemplo, macroporosidades. Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens, posto que, acredita-se que a geometria da interface, entre a camada porosa e o substrato, concentre tensões, reduzindo-se assim a resistência à fadiga da mesma. Além disso, as altas temperaturas, utilizadas no processo com o objetivo de aderir esta camada ao substrato e as rápidas taxas de solidificação, afetam a microestrutura, podendo levar o implante a falhas catastróficas (Coelho et al., 2005). Ainda que o gás utilizado no plasma seja inerte ao titânio, existe a possibilidade de difusão de hidrogênio em sua estrutura cristalográfica, contribuindo para a redução das propriedades mecânicas (Herman, 1988).

O manufaturamento de ligas do sistema NiTi porosa, utiliza-se de técnicas de metalurgia do pó (M/P) ou síntese por combustão. Neste contexto, Li et al. (2001), obtiveram pelo processamento de pós sintetizados por combustão, materiais porosos da liga NiTi com tamanho médio de poros entre 300-600 μm , taxa de porosidade entre 60-64%, e uma porcentagem de poros abertos superior a 90%.

Thieme et al. (2001) mostraram ser possível, por técnicas de metalurgia do pó (M/P), a obtenção de materiais com níveis de porosidade gradual no sentido perpendicular à superfície do material. Basicamente, o estudo utilizou-se de partículas de titânio esféricas, obtidas pelo processo de eletrodo rotativo com arco de plasma (PREP), apresentando uma larga distribuição granulométrica (180-1000 μm). A

utilização de pó de silício (Si) de granulação fina (<32 μm), como aditivo de sinterização, mostrou ser efetivo no tocante à indução da sinterização, via fase líquida, resultando numa microestrutura satisfatória.

O trabalho de Wen et al. (2002), objetivou o processamento de espumas altamente porosas à base de titânio, utilizando técnicas de M/P. Para isso, utilizaram os seguintes materiais de partida: pós de titânio (pureza > 99,9%), aos quais foram associadas partículas esféricas de um ligante à base de hidrogenocarbonato de amônio (pureza > 99% e distribuição granulométrica variando entre 200-600 μm). As espumas obtidas apresentaram porosidade acima de 80% e poros variando de 200-500 μm . Ensaio de compressão resultaram em valores de resistência ao redor de 40 MPa, o que parece ser suficiente para resistir, tanto a manipulação durante sua inserção “in vivo”, bem como em áreas sujeitas à cargas funcionais e módulo elástico ao redor de 3 GPa.

Em 2003, Oh e colaboradores, obtiveram materiais de titânio, com grau de porosidade variando entre 5-37%, a partir do controle das condições de sinterização e da granulometria dos pós. Pós obtidos por atomização a gás foram peneirados em duas diferentes faixas granulométricas, sendo elas: 150-250 μm com diâmetro médio de 189 μm e 45-150 μm com diâmetro médio de 65 μm . Os pós obtidos pelo processo PREP apresentou após peneiramento granulometria entre 300-500 μm e com diâmetro médio de 374 μm . Em linhas gerais, o grau de porosidade diminuiu, utilizando-se pós de tamanhos menores e, também, com o aumento na pressão de sinterização na mesma temperatura. O módulo elástico, bem como a resistência à flexão, apresentaram-se ao redor de 25 GPa e 115 MPa, respectivamente, ou seja, próximo ao das estruturas ósseas.

Kutty et al. (2004) sinterizaram materiais metálicos utilizando-se de um forno microondas semi-industrial, capaz de operar a uma potência de 3 kW com uma frequência de 2,45 GHz. Serviram-se do gradiente de temperatura gerado durante a exposição as microondas criando um material de estrutura porosa gradual. Vale ressaltar que a maioria dos materiais não se ligam bem quando a radiação de microondas é utilizada em baixas temperaturas. Neste sentido, é necessário que os elementos

metálicos a serem ligados sejam submetidos a um pré-aquecimento por condução, convecção ou por radiação de outra fonte. Em resumo, a técnica mostrou-se eficiente já que possibilitou obter uma superfície porosa, com 100-200 μm de espessura e poros com dimensões variando de 30-100 μm .

Recentemente, uma outra técnica, conhecida por “environmental-electro-discharge-sintered”, foi empregada por An et al. (2005), visando a produção de implantes dentários porosos. Para isso, utilizaram pós de titânio atomizados (50-100 μm), os quais foram submetidos a descargas elétricas variando entre 0,75-2,0 kJ. Materiais de superfície porosa e um corpo sólido apresentaram resistência à compressão muito maiores do que os valores obtidos pelo processo de sinterização convencional.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção da Liga

As etapas de obtenção dos pós dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio, bem como a obtenção da liga foram realizadas na Divisão de Materiais (AMR) do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE) do Centro Técnico Aeroespacial (CTA) de acordo com técnicas de metalurgia do pó (M/P) previamente estabelecidas para a obtenção da liga Ti-13%Nb-13%Zr (% em peso) (Henriques et al., 2003).

Foram utilizados hidretos dos elementos titânio, nióbio e zircônio resultantes de processo de hidretação. Este processo é bastante eficaz quando aplicado aos elementos metálicos Ti, Nb e Zr, já que esses metais são capazes de absorver grandes quantidades de hidrogênio em função da temperatura (Bobrová, 1994).

Para a obtenção dos hidretos de titânio e zircônio, foram utilizados finos de esponja (produzidas no CTA). Hidretos de nióbio foram obtidos a partir de cavacos de lingotes comercialmente puros (FAENQUIL). A hidretação do titânio foi realizada 500 °C, em um forno (Figura 6) de alto vácuo (10^{-7} Torr), durante aproximadamente 3 horas, com pressão de 1 atm (manométrica). Após o resfriamento ao forno, o material, friável, foi moído em um moinho rotativo com tambor e bolas de titânio sob vácuo (10^{-2} Torr). Os pós dos hidretos de nióbio e zircônio foram obtidos por esta mesma rota, porém com temperatura de 800 °C (Taddei et al. 2004).



Figura 6. - Forno utilizado para realização da hidratação dos pós elementares e para a sinterização dos compactados (Thermal Technology Inc. – Astro 1000), pertencente à Divisão de Materiais do Centro Técnico Aeroespacial – São José dos Campos – SP).

Após pesagem dos pós, em balança analítica na estequiometria da liga, foi realizada mistura, por 15 minutos, em agitador mecânico. Os pós foram compactados em prensa manual, sob pressão de 80 MPa, em matriz cilíndrica de 14 mm de diâmetro (Figura 7). Posteriormente, apenas as amostras dos lotes 2 (L2) e 3 (L3) foram encapsuladas sob vácuo, em moldes flexíveis de látex, e compactadas isostaticamente a frio a uma pressão de 200 MPa e 300 MPa por 30 segundos, respectivamente. Por fim, as amostras foram sinterizadas a vácuo em forno com elemento resistivo de grafite, em três diferentes condições de temperatura e patamar, respectivamente, estabelecendo-se assim, os grupos experimentais, sendo eles: **Lote 1 (L1)** - 1000°C/5h, **Lote 2 (L2)** - 1300°C/3h e **Lote 3 (L3)** - 1500°C/2h, com taxa de aquecimento de 20°C/min.

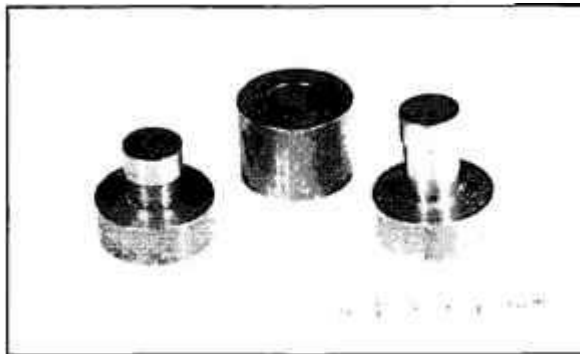


Figura 7. - Matriz de aço com camisa flutuante utilizada na prensagem uniaxial a frio.

4.2 Caracterização Física dos Pós

É de extrema relevância conhecer as características do pó a ser utilizado, já que apresenta grande influência na microestrutura final do material. A determinação da distribuição do tamanho de partículas foi realizada pela técnica de difração à laser (Cilas granulometer - modelo 1064). A caracterização das fases cristalinas foi realizada por difração de raios-X (DMAX 2000, Rigaku) com radiação $\text{Cu-K}\alpha$, e os dados foram coletados na faixa de 2θ entre 10° e 110° , com passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 8 segundos por passo. A morfologia dos pós foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30).

4.2.1 Caracterização Física das Amostras Sinterizadas

A seguir, são citadas as técnicas utilizadas para a caracterização das amostras sinterizadas.

- **Determinação da densidade**

A densidade geométrica (ρ), das amostras sinterizadas, foi determinada pela relação entre a massa e volume dos corpos-de-prova, sendo o volume determinado pelas dimensões das amostras.

- **Difração de raios-X (DRX)**

Análises por difração de raios-X (DMAX 2000. Rigaku) foram realizadas visando identificar as fases cristalinas presentes nas três condições experimentais estudadas, adotando-se as seguintes condições: radiação Cu-K α , 2θ na faixa de 10-110 °, passo de 0,02 ° e tempo de contagem de 8 segundos por passo.

- **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A prática metalográfica, empregada no preparo das amostras, envolveu as etapas de embutimento, desbaste com lixas de carbetto de silício (SiC) na seqüência: 220, 400, 600, 1200 e 2400 mesh e polimento em feltro, utilizando-se pasta adiamantada de granulometrias 6 μm , 3 μm e 1 μm . A microestrutura foi revelada utilizando-se solução de Kroll, na proporção 3 mL HF: 6 mL HNO₃: 100 mL H₂O (Boyer, 1994). O recobrimento com carbono foi realizado com o fim de evitar a presença de cargas eletrostáticas. As fotomicrografias foram capturadas utilizando-se o detector de elétrons retroespalhados e as análises químicas semi-quantitativas foram realizadas por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), em equipamento (EDAX[®]) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (Philips XL 30).

4.3 Caracterizações Biológicas

4.3.1 Ensaio de Citotoxicidade – Pós e Amostras Sinterizadas

Testes de citotoxicidade foram realizados após a obtenção dos pós dos hidretos dos elementos de partida, bem como nas amostras sinterizadas nas diferentes condições (L1, L2 e L3). O ensaio fundamenta-se no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund & Puerner (1984), para a triagem de agentes citotóxicos em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio (MTS) e um agente acoplador de elétrons PMS. O MTS é biorreduzido pelas células a um produto formazan que é solúvel no meio de cultura e, então, efetuada uma análise espectrofotométrica do corante incorporado, de acordo com Barltrop et al. (1991). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular, incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

No teste de citotoxicidade utilizou-se como controle positivo uma solução de fenol a 0,2%. Como controle negativo foram utilizadas amostras de polietileno de alta densidade (PEAD) e amostras de titânio comercialmente puro grau 2 (Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo - Brasil), respectivamente, para o ensaio de toxicidade para os pós de partida e para as amostras sinterizadas.

O material de referência clínica, utilizado no ensaio das amostras sinterizadas foi o implante da empresa europeia ITI-Straumann® (Berne-Suíça). Tal implante (Figura 8) é de titânio comercialmente puro (grau 2) com superfície tratada (SLA) por jateamento de óxido de alumínio associado a ataque químico (Bornstein et al., 2003).

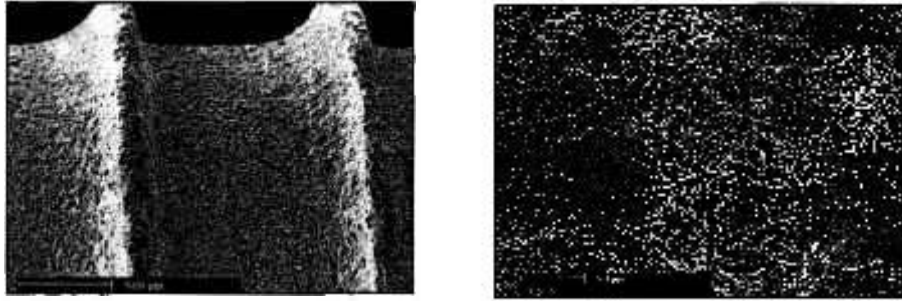


Figura 8. - Micrografias, obtidas por MEV, do material de referência clínica – ITI-Straumann - observar as características de superfície após jateamento com óxido de alumínio e ataque químico.

A preparação dos extratos, para os pós e para as amostras sinterizadas, foi realizada de acordo com a norma ISO-10993-5 (1993), deixando-se as amostras em contato com meio de cultura por 48 h em estufa a 37° C e com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Uma cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) em monocamada foi separada por tripsinização. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada, lavada com solução tampão salina (PBS) estéril e o precipitado ressuspensão em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino.

Uma microplaca de cultura celular de 96 poços foi preparada a partir da adição de diluições crescentes (6,25; 12,5; 25; 50; 100%) do extrato dos materiais testados (50µL/poço, 4 poços/diluição). Em seguida, depositou-se por pipetagem 50µL da suspensão celular (~3000 células) nos poços. O volume total em cada poço foi de 100µL. Colunas controle de 4 poços foram preparadas: a) com o meio, mas sem a colocação das células (branco); e, b) meio e células, considerando-se 100% a porcentagem de células vivas. Feito isso, a microplaca foi colocada em estufa (37° C sob atmosfera úmida de 5% de CO₂) para incubação. Decorridas 72 h, 20µL de uma mistura (20:1) de MTS-0,2% e PMS-0,09% em PBS foi adicionada aos poços teste, deixando-se incubar por 2 horas. A incorporação do corante foi avaliada por um leitor de microplacas a 490 nm em relação ao branco.

4.3.2 Ensaio “in vivo” - Osteointegração

- **Implantes**

Neste estudo foram utilizados 12 implantes cilíndricos da liga Ti-13Nb-13Zr, sendo 4 implantes de cada condição experimental (L1 - 1000° C; L2 - 1300° C e L3 - 1500° C), e usinado nas seguintes dimensões: diâmetro externo = 3,2 mm e comprimento = 6,0 mm. Os implantes foram identificados, acondicionados individualmente em frascos de vidro e, então, esterilizados a uma dose de 25 kGy por meio de radiação gamma (⁶⁰Co, Gammacell modelo 220 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

- **Animais, Anestesia e Medicação**

Quatro coelhos adultos fêmeas, da raça Nova Zelândia com peso médio de 3,5 kg, foram designados como modelo animal, neste estudo. Os animais durante toda pesquisa permaneceram alojados no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), em sala climatizada com temperatura constante (21° C), isentos de estresse, sob iluminação em intervalos de 12 horas (claro/escuro) controlada por temporizador, em gaiolas individuais, tratados com dieta à base de ração seca (NUVILAB – coelhos 6045) e água fornecida à vontade.

O procedimento cirúrgico seguiu o padrão adotado pelo Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP). Dessa forma, os implantes foram instalados nas tíbias direita e esquerda, e nas posições proximal (mais próxima à articulação do joelho) e distal (mais distante da articulação do joelho) de cada animal

(Figura 9). O protocolo cirúrgico experimental foi realizado de acordo com a Tabela 3. O coelho de número 3 foi utilizado para análise da osteointegração por meio de microscopia eletrônica de varredura, de acordo com a técnica que será, posteriormente, detalhada.

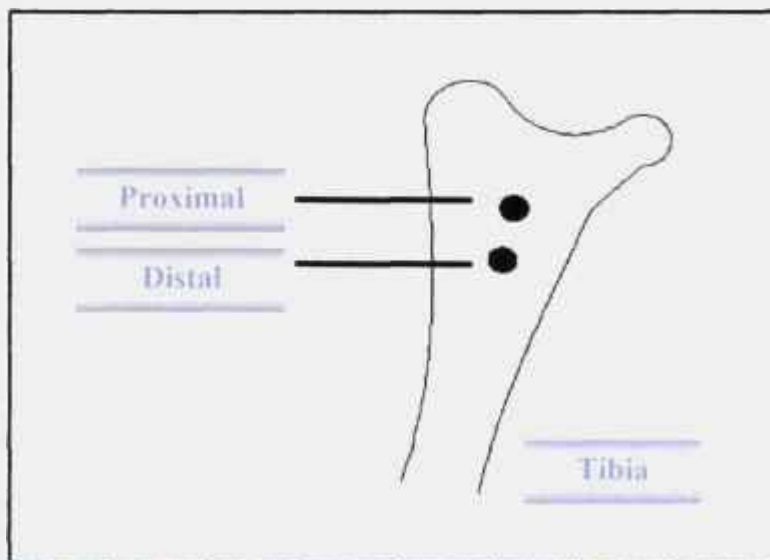


Figura 9. - Representação esquemática das áreas de instalação dos implantes.

Tabela 3. - Protocolo experimental adotado para instalação dos implantes nos animais

Região de instalação	Tíbia direita (material-lote)	Tíbia esquerda (material-lote)
Proximal	L1	L3
Distal	L2	-

Como medicação pré-operatória foi utilizado 22.500 UI/kg da droga Benzetacil (benzil penicilina, procaína, benzilpenicilina potássica 1.200.000 UI.), por animal, no dia anterior ao da cirurgia.

O procedimento cirúrgico foi realizado após a administração, por via intramuscular, das seguintes drogas: Rompun - Cloridrato de (2–2,6-xilidino) - 5,6 - dihidro - 4H - 1,3 – tiazina (Bayer do Brasil S/A, São Paulo), sedativo analgésico e relaxante muscular em concentração de 5 mg/kg; Ketalar - Cloridrato de Ketamina (Ketamina – Agener), anestésico geral em concentração de 35 mg/kg e Acepran 1% - neuroepiléptico e tranquilizante (Univet) em concentração de 0,75 mg/kg. Este conjunto de drogas proporcionou narcose profunda nos animais durante 90 a 120 minutos. Como anestésico local foi administrado, nas áreas cirúrgicas, cloridrato de prilocaína-felipressina a 3% (Citanest-Astra, México), com apresentação em anestubes de 1,8 mL. Vale salientar que a felipressina, por ser um vasoconstritor, age promovendo uma hemostasia eficaz facilitando, portanto, os procedimentos cirúrgicos. Não foram utilizadas drogas de qualquer natureza como forma de medicação pós-operatória.

▪ **Procedimento Cirúrgico**

Todo procedimento cirúrgico foi realizado sob consentimento da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) de acordo com o protocolo (Protocolo nº 001 fls. 13 do livro 2 – 23.03.2005), adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Previamente à realização da cirurgia, a região do joelho dos animais foi tricotomizada e, então, realizada a anti-sepsia com gluconato de clorhexidina a 0,12% (Colgate Palmolive) e iodopovidona (Johnson Wax). Em seguida, os tecidos moles foram deslocados ântero-lateralmente, permanecendo estabilizados sobre o osso da tíbia a fim de impedir a sua movimentação durante a incisão. Assim, o bisturi foi introduzido perpendicularmente à pele e aprofundado pelo celular subcutâneo, fáscia, camadas musculares e periósteo, até alcançar o plano ósseo. Posteriormente, o bisturi (Bard-Parker nº 3) munido de lâmina número 15 (Paramount Surgimed Ltd), foi angulado em 45°, e realizada uma incisão retilínea num único movimento, estendida de superior para inferior em cerca de 5,0 cm paralelamente ao longo eixo da porção medial da tíbia. Esta

possibilitou a elaboração do retalho total, e o descolamento do periósteo (FREER), com o objetivo de proporcionar o acesso e visão necessários à área operatória. A hemostasia da região foi obtida pela compressão dos tecidos com gaze.

O leito de inserção dos implantes, respeitando-se uma distância de aproximadamente 7 mm entre as perfurações, foi preparado com a utilização de brocas, acopladas a um contra-ângulo com redução de 16:1, movido por um motor elétrico com velocidade de 1.500 rpm e 30 N/cm de torque, apresentando diâmetros sucessivos, sendo a inicial do tipo “lança” (1,8 mm) e as subseqüentes com desenho helicoidal e com diâmetros de: 2,0; 3,1 e 3,15 mm (Conexão Sistemas de Prótese – São Paulo – SP). A utilização de instrumentos rotatórios na preparação do leito cirúrgico foi realizada sob constante irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Áster produtos médicos), direcionada para o local no qual as brocas penetravam, possibilitando-se, dessa forma, a refrigeração simultânea da broca e do leito cirúrgico. O processo de perfuração foi realizado de maneira intermitente, de cima para baixo, com a intenção de que a solução salina pudesse alcançar o extremo da ponta ativa da broca, irrigar e retirar o osso cortado. Assim, os implantes da liga Ti-13Nb-13Zr, nas três diferentes condições (L1, L2 e L3), foram instalados.

Após a instalação dos implantes, as áreas cirúrgicas foram irrigadas abundantemente a fim de eliminar quaisquer resíduos ósseos que pudessem ficar acumulados sob o retalho. A sutura foi realizada com fios de sutura mononylon, com procedimentos de pontos simples e consecutivos por camadas, utilizando fio (4-0) 75cm com agulha 3/8 CR 3,0 cm (Brasmédica). Finalizado o procedimento de sutura, realizou-se a anti-sepsia da área com gluconato de clorhexidina a 0,12% (Colgate Palmolive) e iodopovidona (Johnson Wax).

▪ **Aplicação dos Marcadores Celulares**

No decorrer das oito semanas aguardadas para a cicatrização dos implantes nos animais, foram administrados, subcutaneamente, marcadores ósseos de união à apatita, com a finalidade de determinar o processo de formação óssea. Para uma interpretação morfológica quantitativa, foi utilizada uma seqüência de três marcadores com cores diferentes, em intervalo de tempo apropriado (Tabela 4).

Os marcadores utilizados nesta pesquisa foram, respectivamente, a tetraciclina (Fosfato complexo de tetraciclina - Bristol - Meyer Squibb - Brasil), a alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA) e a calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), utilizando o procedimento experimental de seqüência de marcadores detalhado na Tabela 4 (Lopes & König, 2002; Yoshimoto, 2004). Os marcadores celulares de polifluorocromo em forma de pó, foram pesados em balança de precisão (Metler – Toledo AG245) e diluídos em soro fisiológico e solução tampão de Na_2HPO_4 .

Tabela 4. - Formulação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares

Tempo	Marcador	Dose por kg de animal
14 dias	Tetraciclina	60 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
21 dias	Tetraciclina	60 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
28 dias	Alizarina	30 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
35 dias	Alizarina	30 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
42 dias	Calceína	10 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
49 dias	Calceína	10 mg + 1 mL de soro + 2 mg Na_2HPO_4
56 dias	Sacrifício	

▪ **Preparação das Amostras**

O tempo de 8 semanas “in vivo” foi adotado, como comparativo ao tempo de reparação óssea em humanos que é de 24 semanas; uma vez que o metabolismo ósseo no coelho é, em média, três vezes superior ao da espécie humana (Roberts et al., 1986). Os animais foram então sacrificados por meio de uma dose excessiva de ketamina (7 mL/animal). Os tecidos moles foram dissecados e blocos das tíbias, contendo os implantes, foram removidos, com o auxílio de serra manual, e mantidos imersos em solução neutra de formalina a 10% durante 48 horas. Após a lavagem das amostras em água corrente por 24 horas a fim de eliminar o fixador, procedeu-se a desidratação em diferentes soluções de etanol por períodos de 24 horas conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. - Sequência gradual de álcoois utilizados para a desidratação dos blocos ósseos contendo os implantes

Seqüência	Concentração de álcool (vol.%)
1	70
2	80
3	90
4	96
5	100

Posteriormente, as amostras desidratadas foram colocadas em agitador (Exakt 510 Dehydration and Infiltration System[®] - Ika Schurttler 510 HS 501 Digital) contendo diferentes concentrações da resina Technovit 7200 VCL[‡] (Kulzer & Co, Wehrhein, Alemanha), dissolvida em álcool absoluto (etanol), permanecendo por um período de 72 horas em cada solução (Tabela 6) para que o material resinoso pudesse infiltrar na amostra de maneira homogênea (Donath, 1992).

Tabela 6. - Procedimento de embebição visando a inclusão das amostras contendo os implantes

Solução	Tempo (h)
30% Technovit + 70% Etanol	72
50% Technovit + 50% Etanol	72
70% Technovit + 30% Etanol	72
100% Technovit	72
100% Technovit	72

Os blocos contendo osso-implante foram individualmente colocados em moldes de acrílico apropriados e, em seguida, verteu-se sobre os mesmos a resina Technovit 7200 VCL[®] (Kulzer & Co, Wehrhein, Alemanha) e, então, efetuou-se a polimerização da resina (Exakt 520 Light Polymerization Unit) permanecendo 3 horas sob luz branca, com o objetivo de desencadear a reação prevenindo trincas na resina e, 96 horas sob luz azul.

Finalizado o procedimento de inclusão das amostras que foram retiradas dos moldes, iniciou-se a etapa de obtenção das lâminas (Donath & Breuner, 1982). Inicialmente, os blocos foram seccionados no sentido do longo eixo utilizando-se uma máquina de corte (Isomet 2000, Buehler, Alemanha) munida de um disco diamantado a uma carga de 1000 g, obtendo-se então por bloco, aproximadamente, 2-3 cortes apresentando ao redor de 700 µm de espessura. Os cortes obtidos foram então colados em lâminas de acrílico utilizando cola à base de cianoacrilato (Superbonder, Loctite, Brasil). A etapa seguinte envolveu desbaste e polimento (30 µm) em politriz metalográfica (Struers, DP 10), empregando-se lixas d'água de carbeto de silício de granulometria decrescente (800, 1000, 1200, 2400, 4000 mesh).

4.3.3 Análises Histológicas

As análises histológicas foram realizadas pelos seguintes métodos: a) Microscopia de Fluorescência; b) Campo Claro sem Coloração; c) Campo Claro com Corante Azul de Toluidina e d) Microscopia Eletrônica de Varredura e Análise por Energia Dispersiva de raios-X (MEV/EDS).

4.3.3.1 Microscopia de Fluorescência e Avaliação em Campo Claro

Análises histomorfométricas foram realizadas visando avaliar a quantidade de tecido ósseo neoformado (bioatividade), o contato osso-implante e a taxa de aposição mineral (MAR). As regiões de interesse estabelecidas foram: 1) 0 mm a 0.5 mm a partir da superfície do implante e; 2) > 2.0 mm a partir da superfície do implante (Figuras 10 e 11). Vale salientar, que as medidas de bioatividade para cada marcador celular foram realizadas nas duas regiões de interesse. A taxa MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$) foi calculada a partir da realização de uma média de 20-30 medições por espécime para cada marcador, dividindo-se a distância obtida entre os marcadores pelo número de dias aguardado entre uma aplicação e outra. A utilização de marcadores ósseos fluorocromáticos é uma ferramenta extremamente eficiente no que diz respeito ao conhecimento dos períodos de maior atividade óssea (Garetto et al. 1995; Suzuki et al., 1997; Jinno et al., 1998; Coelho, 2002; Grizon et al., 2002; Giavaresi et al., 2003; Williams et al., 2005).



Figura 10. - Determinação da bioatividade junto à interface com o implante, região marcada em vermelho no interior do retângulo de análise (0 mm – 0,5 mm a partir da superfície do implante).

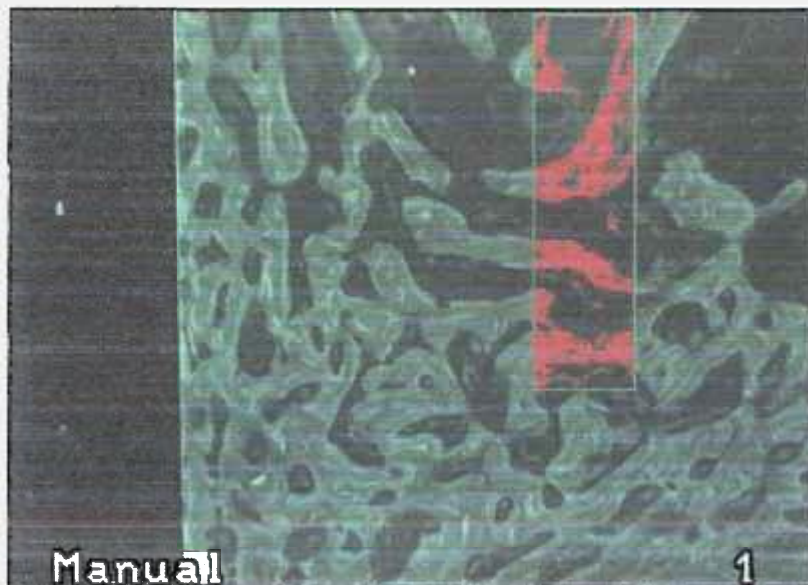


Figura 11. - Determinação da bioatividade em área controle, região marcada em vermelho no interior do retângulo de análise ($> 2,0$ mm a partir da superfície do implante).

O aumento, utilizado para tais análises, foi de 40x e, posteriormente, uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico capturou as imagens. A histomorfometria foi realizada por meio de um programa computacional Bioquant™ (Figura 12).

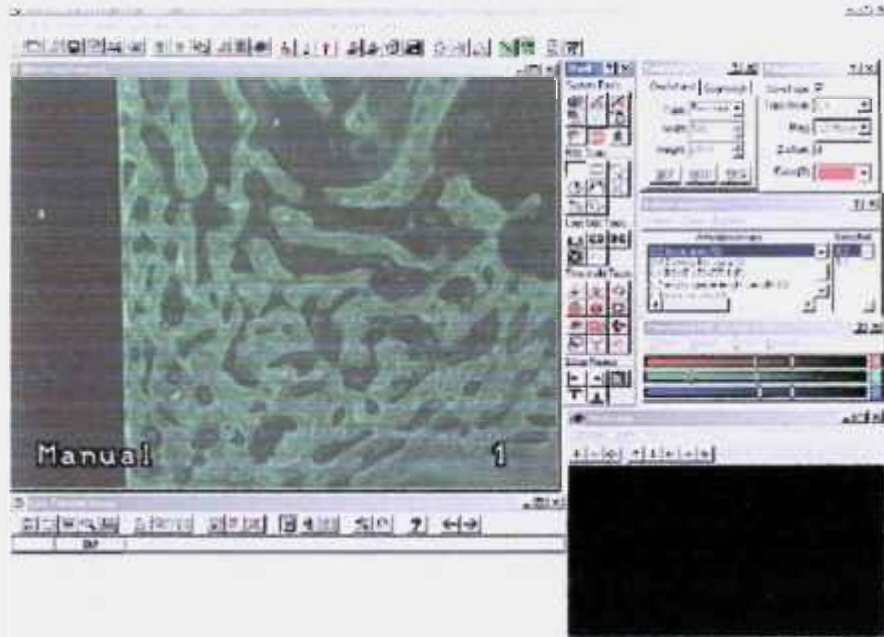


Figura 12. - Ilustração da tela de trabalho do programa computacional (Bioquant™) utilizado para a realização das análises histomorfométricas.

O sistema Bioquant foi utilizado para computar o número de pixels marcado para cada retângulo, o qual foi padronizado nas medidas de 0,5 mm de largura e 2,0 mm de altura. A medida da porcentagem de contato osso-implante foi realizada com auxílio do programa computacional, de maneira que as superfícies do implante, que não se apresentavam em contato com o tecido ósseo foram subtraídas das superfícies de contato osso-implante. Assim, o comprimento total do implante foi mensurado integralmente, iniciando-se pelo lado esquerdo do implante no sentido anti-horário. O programa computacional definiu linhas demarcatórias de diferentes cores para apontar áreas de contato osso-implante ou áreas isentas de contato. Posteriormente, o programa realizou a subtração destas medidas lineares do comprimento total da área de superfície do implante instalado no osso do animal, de forma que um percentual, do contato osso-

implante, foi registrado para cada amostra. Esta etapa foi realizada no Departamento de Pesquisa Ortopédica da Universidade do Alabama (Birmingham - EUA).

As análises estatísticas utilizadas para comparar os dados histomorfométricos obtidos pelos implantes da liga Ti-13Nb-13Zr, processados via metalurgia do pó nas diferentes condições de sinterização 1000 °C, 1300 °C e 1500 °C, foram realizadas, utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) e o teste Tukey HSD ao nível de significância de 95% ($P \leq 0,05$). O nível de significância, designado pela letra grega alfa (α), refere-se ao “risco assumido” pelo pesquisador para fazer determinada inferência estatística. Em estatística são definidas duas hipóteses iniciais: a hipótese nula, afirma que não existe diferença entre os dois grupos, e a hipótese alternativa, que mostra a diferença entre eles. Basicamente, o objetivo de se testar uma hipótese é permitir, a partir de uma amostra limitada, generalizações para a população da qual foi originada a amostra. O nível de significância corresponde à probabilidade de se rejeitar de maneira incorreta a hipótese nula quando ela é, na realidade verdadeira. Considerando-se que é extremamente indesejável se rejeitar uma hipótese nula verdadeira, esse “risco assumido” deve ser absolutamente baixo, de tal forma que os valores comumente adotados são de 0,05 (5%), 0,01 (1%) e 0,001 (0,1%). Adicionalmente, deve-se salientar que o nível de significância está intimamente associado ao valor de P (valor de probabilidade), calculado após o tratamento estatístico. O valor de P é considerado a probabilidade do resultado obtido ser devido ao acaso. Se o valor de P for menor que o valor de α a hipótese nula é rejeitada. Em outras palavras, a hipótese nula, ou de igualdade entre amostras, será rejeitada se os valores de P correspondem a $P \leq 0,05$ (para $\alpha=5\%$, $P \leq 0,01$ (para $\alpha=1\%$) ou $P \leq 0,001$ (para $\alpha=0,01$). Neste caso, considera-se que há diferença ao nível estatístico adotado entre as amostras. Por outro lado, ou seja, se o valor de P for maior que o valor de α , a hipótese nula não é rejeitada e a diferença entre as amostras é, então, considerada não significativa (Leles. 2001).

4.3.3.2 Método do Azul de Toluidina

O procedimento de coloração iniciou-se com a limpeza das lâminas com uma mistura de álcool e acetona na proporção de 1:1, seguida da agitação por 5 minutos em água oxigenada a uma proporção de 70 mL de água oxigenada para 130 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se: a) hidratação das lâminas em uma série de álcoois (etanol) a partir da graduação absoluta 100% em volume, passando pelas graduações 96, 90, 80 e 70%, sucessivamente, permanecendo imersas durante 2 minutos em cada solução; b) lavagem por dois minutos em água corrente; c) lavagem por dois minutos em água oxigenada 10 % (vol); d) lavagem por cinco minutos em água corrente; e) secagem em papel absorvente; f) imersão em solução aquosa contendo 0,5 g de azul de toluidina diluída em 100 mL de água destilada por 30 minutos; g) lavagem em água destilada por 2 minutos a fim de retirar o excesso de corante e secagem.

Esta metodologia foi empregada com a proposta de revelar as células dos tecidos na interface com o implante. Ademais, permite a clara identificação de osso imaturo: o azul de toluidina é altamente fixado pelas glicosaminoglicanas presentes em alta quantidade neste tipo de osso e em baixa quantidade no osso lamelar (Grizon et al. 2002). Para isso, foi utilizado um microscópio de luz (Nikon – Eclipse E-1000) acoplado a uma câmera digital (Midia Cybernetics) ambos pertencentes ao Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4.3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

A morfologia, o nível de integração óssea, bem como a composição química do osso formado, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30) e análise por energia dispersiva (EDS/EDAX[®]), respectivamente. Conforme mencionado anteriormente, as amostras osso-implante, instalados em um dos animais (coelho 3), foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas. Uma das tábuas corticais de cada bloco ósseo foi removida a fim de expor a medula óssea adiposa, que foi cuidadosamente retirada com o auxílio de curetas, permitindo a visualização do implante e do tecido ósseo remanescente. Após este procedimento, as amostras foram novamente imersas em solução de Karnovsky por 24 horas. Em seguida, foram lavadas em solução tampão fosfato (0,1 M), por três vezes, e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2% por 2 horas e mais uma vez lavadas com a solução tampão. As amostras foram desidratadas em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 96 até 100%) e então secas pelo método do ponto crítico (Baltec, CPD 030 – Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP), visando evitar cargas eletrostáticas no material durante a observação. Cada conjunto osso-implante foi montado individualmente em bases de alumínio e então recobertos por ouro durante 1 minuto (Balzers Union, SCD 040).

Após a realização das análises de microscopia de luz, fluorescência e método do Azul de Toluidina, as lâminas foram recobertas, com carbono, e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30) e análise por energia dispersiva (EDS/EDAX[®]), pretendendo avaliar a presença de tecido ósseo no interior dos poros (“bone ingrowth”), utilizando o detector para elétrons retroespalhados, bem como determinar semi-quantitativamente os elementos químicos presentes no tecido ao redor dos implantes (Sumner et al. 1990).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação e discussão dos resultados desta dissertação iniciam-se com a apresentação das caracterizações físicas e químicas dos pós de partida e das amostras sinterizadas. Em seguida, são apresentados os resultados da caracterização biológica, abrangendo os ensaios de citotoxicidade e os ensaios “in vivo”, separadamente descritos, de acordo com a técnica de análise.

5.1 Caracterização Física dos Pós de Partida

As distribuições de tamanho de partículas dos pós dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio, obtidas pelo método de espalhamento a laser (Cilas), são apresentadas na Figura 13 e Tabela 7. Vale ressaltar, que a combinação da utilização de pós obtidos por hidratação, custo relativamente baixo, técnicas de compactação de alta produtividade e boas propriedades mecânicas, fazem da tecnologia da metalurgia do pó (M/P) uma ferramenta importante na obtenção de ligas de titânio, destinadas a aplicações biomédicas.

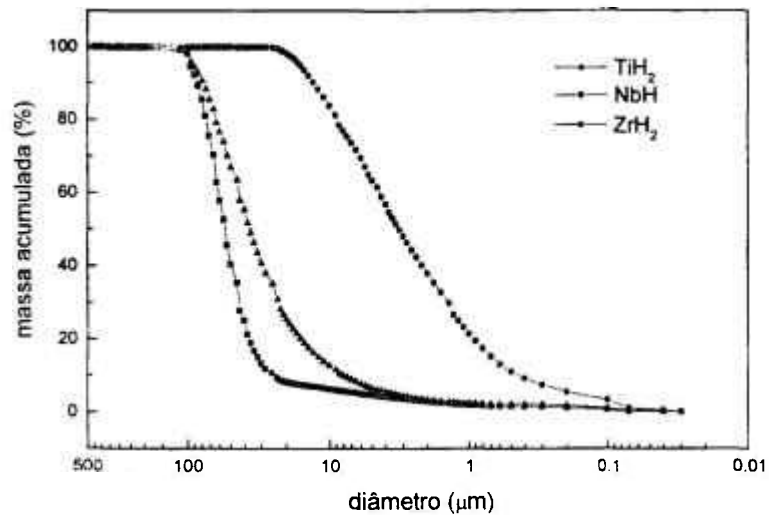


Figura 13. - Distribuição granulométrica dos hidretos de Ti, Nb e Zr.

Tabela 7. - Distribuição granulométrica dos pós dos hidretos empregados neste trabalho

Parâmetros avaliados	TiH ₂	NbH	ZrH ₂
Tamanho de partículas D 10% (μm)	8,41	25,95	0,54
Tamanho de partículas D 50% (μm)	38,64	58,47	3,41
Tamanho de partículas D 90% (μm)	83,42	91,11	13,84
Diâmetro médio (μm)	43,11	58,27	5,42

A partir dos resultados obtidos na análise de distribuição granulométrica nota-se, que o pó do hidreto de zircônio resultante da moagem apresentou tamanho de partículas cerca de 10 vezes menor que o pó do hidreto de nióbio. Não foi objeto de estudo, identificar as variáveis responsáveis por esta diferença, mas certamente este fato influencia a microestrutura final, principalmente com relação a homogeneidade da liga.

As análises, por difratometria de raios-X, dos pós dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio, revelaram somente a presença dos picos referente a estes hidretos, não sendo identificados quaisquer outros compostos (Figura 14). Foram utilizadas as fichas JCPDS 25-0982, 39-1327 e 17-0314, respectivamente, para identificação dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio.

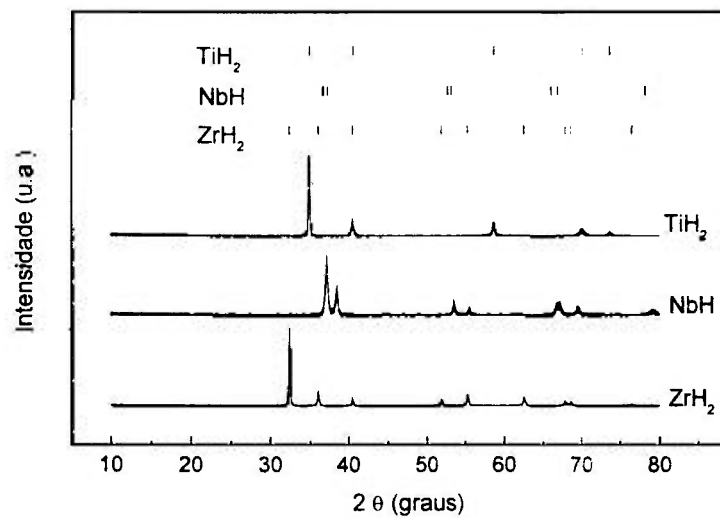
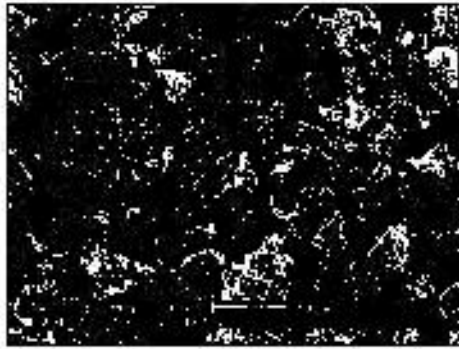
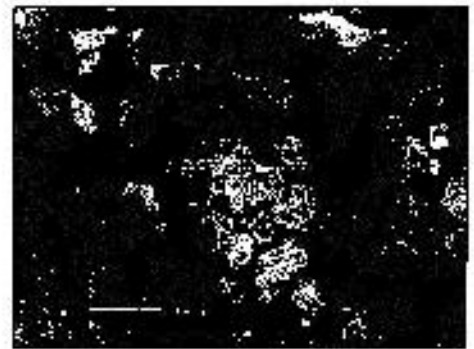


Figura 14. - Difratogramas de raios-X dos hidretos de TiH₂, NbH e ZrH₂, utilizados na obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr.

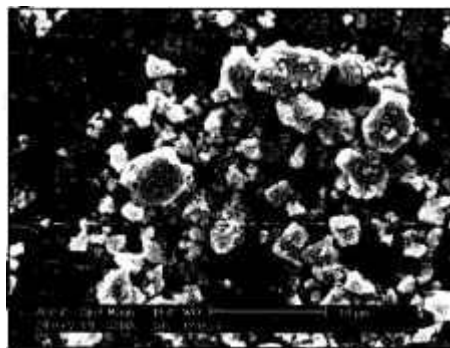
De maneira geral, os pós dos hidretos utilizados apresentam partículas com morfologia angular, sem poros e com baixa rugosidade (Figura 15).



(a)



(b)



(c)

Figura 15. - Micrografias, obtidas por MEV, dos pós obtidos por hidretação: (a) Ti, (b) Nb e (c) Zr.

5.2 Amostras Sinterizadas

Após sinterização, amostras dos diferentes lotes, foram avaliadas com relação à densidade pelo método geométrico (Tabela 8), considerando-se o valor de $5,01\text{g/cm}^3$ como a densidade teórica da liga Ti-13Nb-13Zr, uma vez que este material, obtido por fusão a arco, apresenta elevada densificação (Schneider. 2001).

Tabela 8. - Valores de densidade das amostras dos diferentes lotes

Lote	ρ (g/cm^3)	% ρ teórica
L1	$3,4\pm 0,1$	$68,0\pm 2,6$
L2	$4,4\pm 0,1$	$88,0\pm 0,4$
L3	$4,6\pm 0,1$	$92,0\pm 0,4$

O resultado das análise de difração de raios-X, dos materiais sinterizados, nas diferentes condições é mostrado na Figura 16. Não foram encontrados dados de difração catalogados no banco JCPDS para a liga em estudo. As reflexões obtidas foram comparadas às fases identificadas encontradas na literatura em pesquisas prévias (Yu & Scully, 1997; Schneider. 2001). Levando-se em consideração que a fase α do titânio puro apresenta estrutura cristalina idêntica a da fase α ou α' da liga Ti-13Nb-13Zr, foram utilizados os dados do JCPDS da fase α e β do titânio. A amostra do lote 1, na qual foi empregada a menor temperatura de sinterização (1000°C), além das fases α e β , apresenta também picos referente a nióbio residual. Não foram identificados picos relativos a hidretos, óxidos ou intermetálicos. Um dos motivos da não homogeneidade microestrutural deve estar relacionado ao tamanho das partículas do hidreto de nióbio que apresentou-se bem maior do que dos outros hidretos, levando desta forma, mais tempo para se difundir.

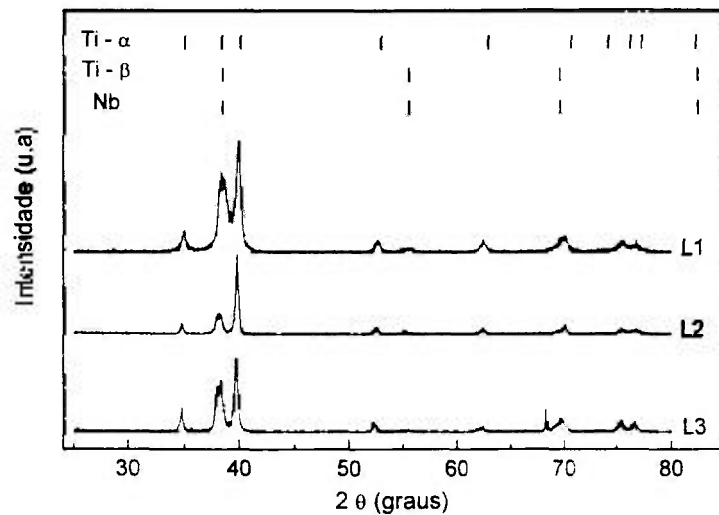


Figura 16. - Difratomogramas de raios-X das amostras sinterizadas: (L1) 1000 °C por 5h, (L2) 1300 °C por 3h e (L3) 1500 °C por 2h.

▪ Lote 1 – 1000 °C

Com base nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas na Figura 17, é possível observar na liga Ti-13Nb-13Zr, sinterizada a 1000 °C, a presença de inúmeras regiões porosas, encontrando-se, na sua grande maioria, poros interconectados e com diâmetro da ordem de 50-100 μm , condição esta de extrema importância, para se obter o crescimento do tecido ósseo no interior dos poros, garantindo a manutenção e nutrição das células ósseas. Uma estrutura de poros abertos e interconectados, proporciona a invasão de tecidos perivascularres e, ainda, a migração de células ósseas progenitoras, incorporando a estrutura porosa com a formação de novo osso, notabilizando o fenômeno da osteocondução (Puleo & Nanci, 1999).

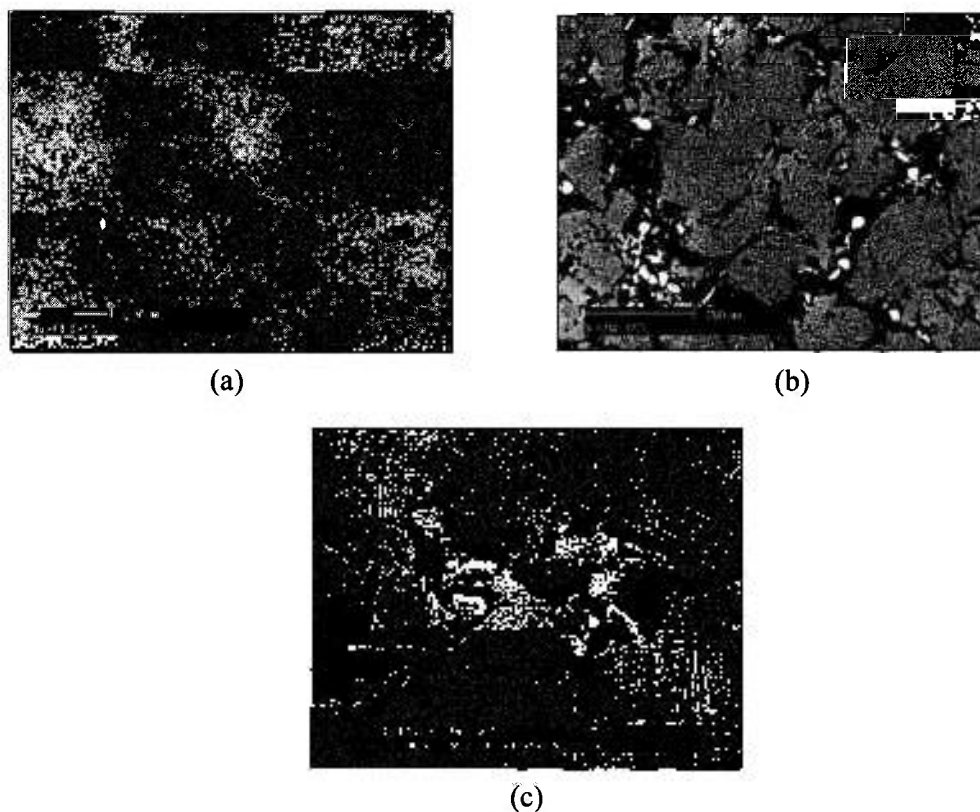


Figura 17. - Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C (L1) – (a) aspecto geral (b) e (c) presença de regiões (claras) contendo Nb não dissolvido e interconectividade dos poros.

A Figura 18 apresenta micrografia obtida por MEV onde foi realizada análise por energia dispersiva (EDS) de regiões α e β . A microanálise semiquantitativa (EDS), uma medida por região, revelou a presença dos elementos Ti, Nb, Zr, nas fases α e β (Tabela 9), indicando considerável dispersão em relação aos valores obtidos por Henriques et al. (2003), o que está de acordo com a observação de picos alargados obtidos na difração de raios-X. Em todas as microestruturas apresentadas neste trabalho, a fase β é a mais clara. A fase α , presente entre as regiões de fase β , apresenta coloração escura.

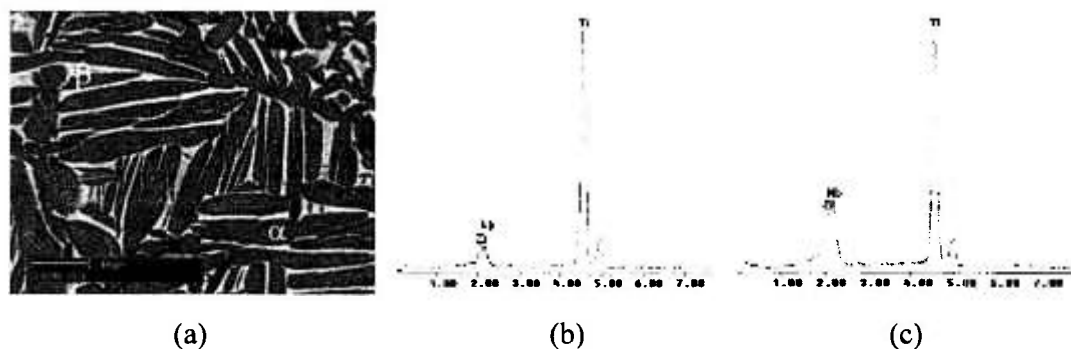


Figura 18. - Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000° C – EDS em áreas representativas das fases α (b) e β (c).

Tabela 9. - Teores de Ti, Nb e Zr nas áreas α e β semi-quantitativamente determinados por análise de energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C.

Regiões avaliadas	% Ti (peso)	% Nb (peso)	% Zr (peso)
Fase- α	67	16	17
Fase- β	85	5	10

A micrografia apresentada na Figura 19 revela regiões contendo nióbio parcialmente reagido. A análise por energia dispersiva desta região, representada com os números 1 e 2 apontam os respectivos teores dos elementos Ti, Nb e Zr nestes sítios. É importante ressaltar que a condição de sinterização, empregada nas amostras do lote 1, não possibilitou a total formação da liga Ti-13Nb-13Zr, uma vez que existem ainda áreas de nióbio não reagido.

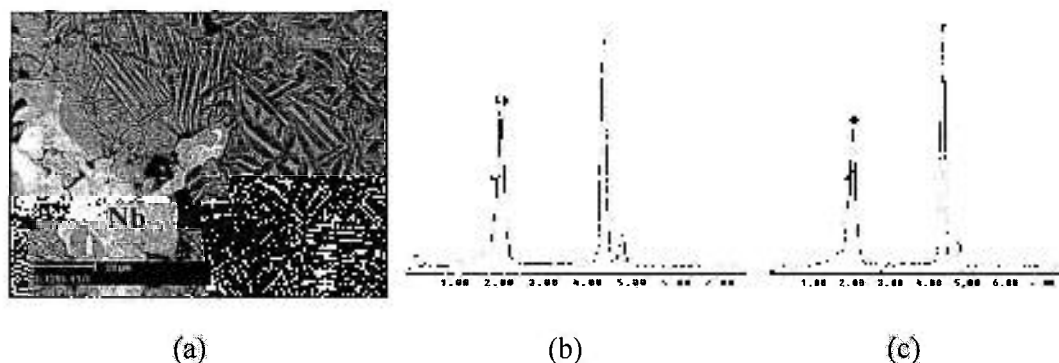


Figura 19. - Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000° C - EDS em áreas representativas marcadas pelos números 1 (b) e 2 (c).

Na micrografia apresentada na Figura 19, nota-se áreas de transição entre a estrutura tipo Widmannstätten e regiões com elevado conteúdo de nióbio, fato este comprovado pela análise química semi-quantitativa (EDS) que revelou altas porcentagens em peso do elemento nióbio quando comparado ao elemento zircônio (Tabela 10).

Tabela 10. - Teores de Ti, Nb e Zr em área de transição analisadas nas regiões 1 e 2 semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1000 °C.

Regiões avaliadas	% Ti (peso)	% Nb (peso)	% Zr (peso)
Região 1	52	37	11
Região 2	53	32	15

- **Lote 2 – 1300 °C**

A temperatura de sinterização, empregada nesta série de amostras (1300 °C), foi eficaz para a reação das partículas de nióbio. Todavia, houve coerente redução no nível de porosidade da amostra conforme observado nas micrografias obtidas por MEV (Figura 20). Os poros apresentam menor diâmetro, na sua grande maioria fechados, ficando evidente a evolução microestrutural da liga.

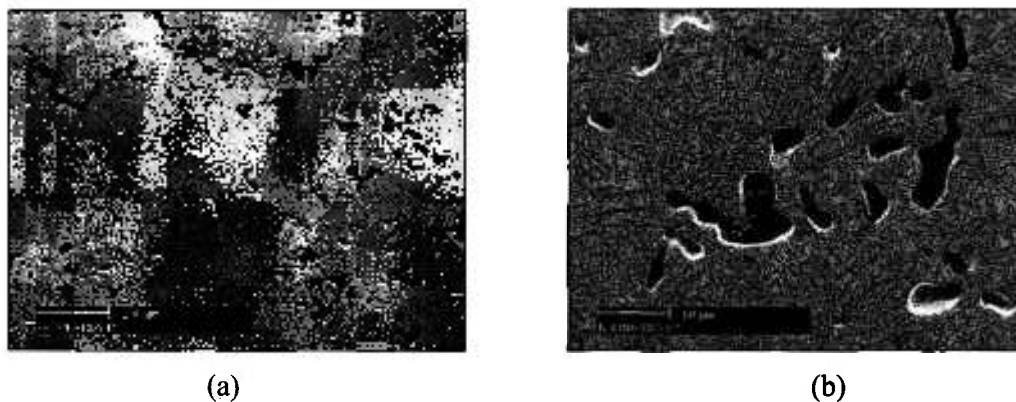


Figura 20. - Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1300 °C - (a) aspecto geral da microestrutura (b) detalhes da porosidade, menor interconectividade dos poros.

Na Figura 21 é mostrada micrografia representativa de regiões nas quais foram feitas análises por energia dispersiva. Vale salientar que não mais se observa áreas contendo nióbio não dissolvido e, paralelamente a isto, a análise por EDS de área correspondente a fase β revelou uma menor porcentagem em peso do elemento em questão, quando comparado a análise realizada na amostra do lote 1 (Tabela 11), demonstrando neste sentido maior homogeneidade microestrutural.

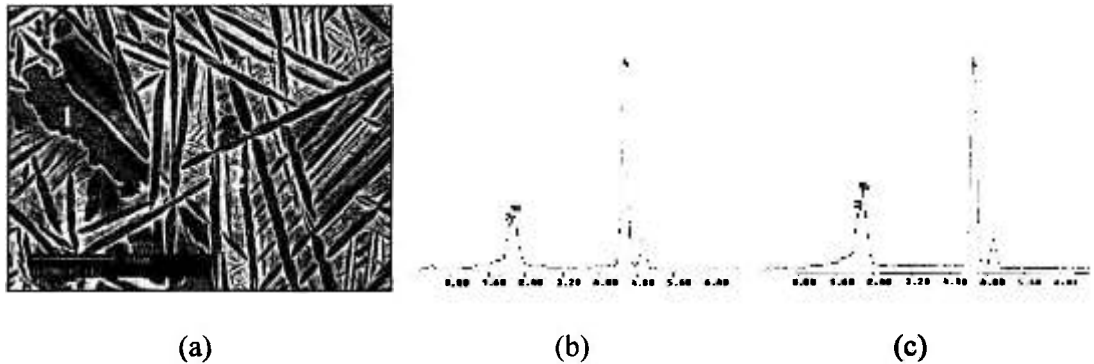


Figura 21. - Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1300 °C - (a) áreas analisadas por EDS, (b) área 1 e (c) área 2.

Tabela 11. - Teores de Ti, Nb e Zr em regiões α e β , representadas pelos algarismos 1 e 2 analisadas semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1300 °C.

Regiões avaliadas	% Ti (peso)	% Nb (peso)	% Zr (peso)
Área 1 - Fase- α	71	15	14
Área 2 - Fase- β	66	20	14

▪ Lote 3 – 1500 °C

As micrografias apresentadas na Figura 22 mostram o aspecto geral da amostra após sinterização a 1500 °C, evidenciando-se a presença de poros residuais, característica do estágio final de sinterização. A formação da clássica estrutura tipo Widmannstätten, bifásica ($\alpha+\beta$), caracterizada por grupos de placas de α paralelas em diferentes direções pode ser visualizada na Figura 23.

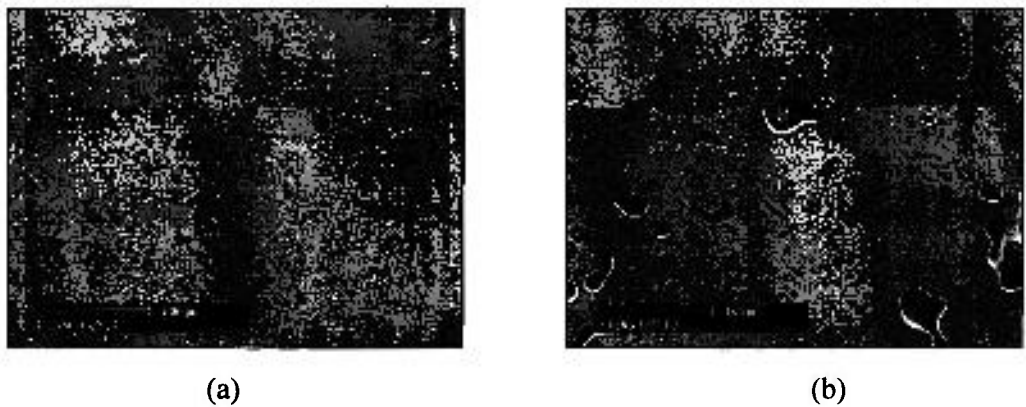


Figura 22. - Micrografias, obtidas por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C - (a) aspecto geral e (b) poros residuais.

Na Figura 23 são apresentadas as regiões onde foram realizadas análises por EDS. Esta análise revelou a distribuição dos elementos Ti, Nb, Zr nas fases α e β (Tabela 12), sendo possível verificar homogeneidade microestrutural similar à verificada para as amostras do lote 2.

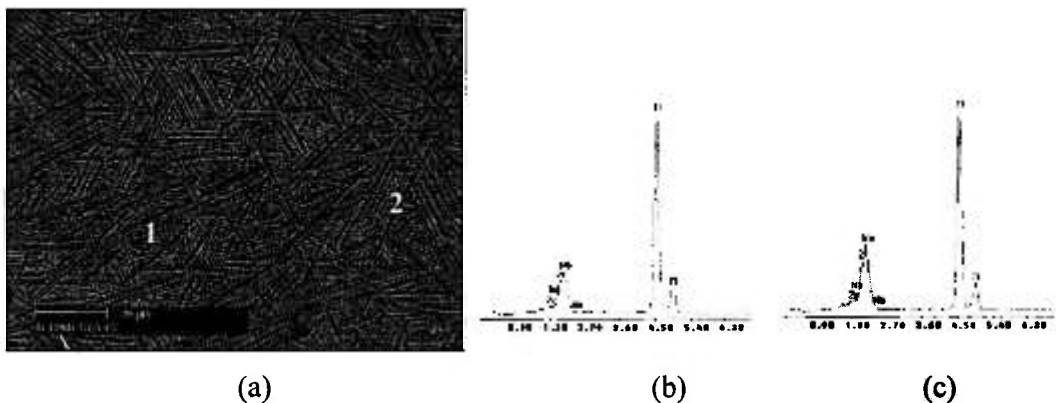


Figura 23. - Micrografia, obtida por MEV, da amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C - (a) estrutura tipo Widmannstätten - Análise por EDS, (b) 1, região escura e (c) 2, região clara.

Tabela 12. - Teores de Ti, Nb e Zr em regiões α e β , representadas pelos algarismos 1 e 2 analisadas semi-quantitativamente por energia dispersiva (EDS) em amostra da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por sinterização a 1500 °C.

Regiões avaliadas	% Ti (peso)	% Nb (peso)	% Zr (peso)
Área 1 - Fase- α	76	13	11
Área 2 - Fase- β	66	19	15

O processamento empregado possibilitou, de maneira geral, a obtenção de amostras com diferentes graus de porosidade, apenas pela utilização de diferentes parâmetros de processo, tais como condições de prensagem e temperaturas de sinterização, permitindo a confecção de corpos-de-prova para os ensaios programados com características suficientes para a consecução dos objetivos propostos.

O lote de amostras sinterizado a 1000 °C permitiu a obtenção de uma microestrutura porosa, apresentando um grau de porosidade ao redor de 30% e poros entre 50-100 μm mostrando-se tão eficaz como a metodologia empregada por Kutty et al. (2004) onde verificou-se ser possível a obtenção de uma superfície porosa, com 100-200 μm de espessura e poros com dimensões variando de 30-100 μm . De acordo com Kutty et al. (2004), o controle do tamanho dos poros e a profundidade da camada porosa parece estar relacionado, respectivamente, ao tamanho dos pós utilizados e ao tempo de sinterização. A redução do grau de porosidade detectado para os lotes de amostras sinterizadas a 1300 °C e 1500 °C é justificada pela utilização de técnicas de compactação adicionais (prensagem isostática a frio) e aumento da temperatura de sinterização.

5.3 Caracterização Biológica

5.3.1 Ensaio de Citotoxicidade – Pós de Partida

O gráfico apresentado na Figura 24 mostra os resultados obtidos no teste de citotoxicidade para as diferentes concentrações de extrato dos pós elementares, bem como dos controle positivo e negativo utilizados neste estudo. Estes valores referem-se à viabilidade celular nas diferentes concentrações (Tabela 13). O Índice de Citotoxicidade ($IC_{50(\%)}$) foi determinado pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial, que inibe 50% da incorporação do MTS. A curva foi obtida correlacionando, em um gráfico, o percentual médio de células vivas contra a concentração dos extratos.

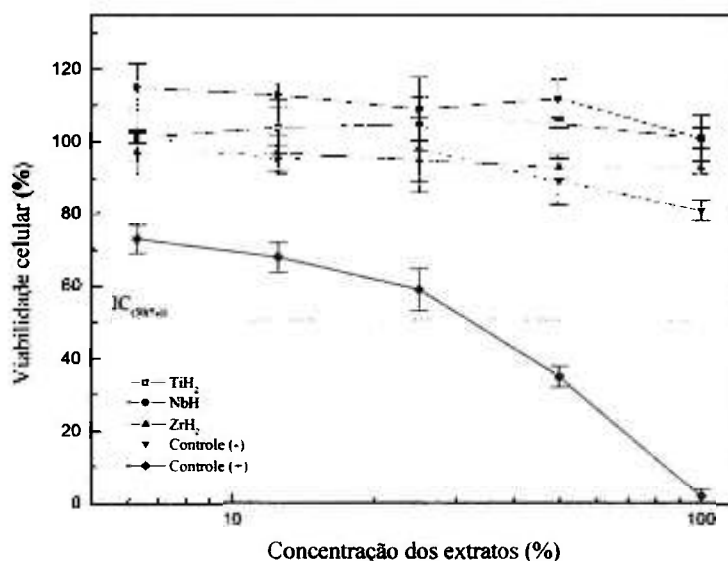


Figura 24. - Resultados do percentual de células vivas dos pós de partida - hidretos de Ti, Nb e Zr.

Tabela 13. - Resultados do percentual de células vivas obtidos no teste de citotoxicidade para os extratos dos hidretos de titânio, nióbio e zircônio

Concentração dos Extratos (%)	Viabilidade Celular (%)				
	Ti	Nb	Zr	C. positivo (Fenol 0,2%)	C. negativo (PEAD)
100	101±2,9	101±6,0	93±1,7	2±2,0	81±2,7
50	105±1,2	112±5,0	93±3,5	35±2,8	89±6,3
25	105±7,2	109±9,0	95±9,0	59±5,8	98±8,8
12,5	104±7,5	113±3,0	97±5,0	68±4,0	95±4,1
6,25	101±1,5	115±6,0	97±6,0	73±4,0	102±7,1

O controle negativo não deve apresentar qualquer efeito citotóxico, conforme observado neste ensaio, para o extrato obtido de polietileno de alta densidade (PEAD) uma vez que a curva não intercepta o índice de citotoxicidade ($IC_{(50\%)}$). Já, o controle positivo, demonstrou sua toxicidade conforme observado para solução fenólica $IC_{(50\%)}=32$. Ainda, com relação aos valores da Tabela 13, colocados no gráfico da Figura 24, visualiza-se a não toxicidade dos pós avaliados, cujos resultados estão bem acima do valor de $IC_{(50\%)}$. Em suma, nenhum dos hidretos obtidos por técnicas de metalurgia do pó mostraram-se citotóxicos.

5.3.2 Ensaio de Citotoxicidade – Amostras Sinterizadas

No Gráfico 25 são apresentados os resultados do percentual de células vivas, para as diferentes concentrações de extrato das amostras sinterizadas, do grupo de referência clínica, bem como dos controle negativo e positivo.

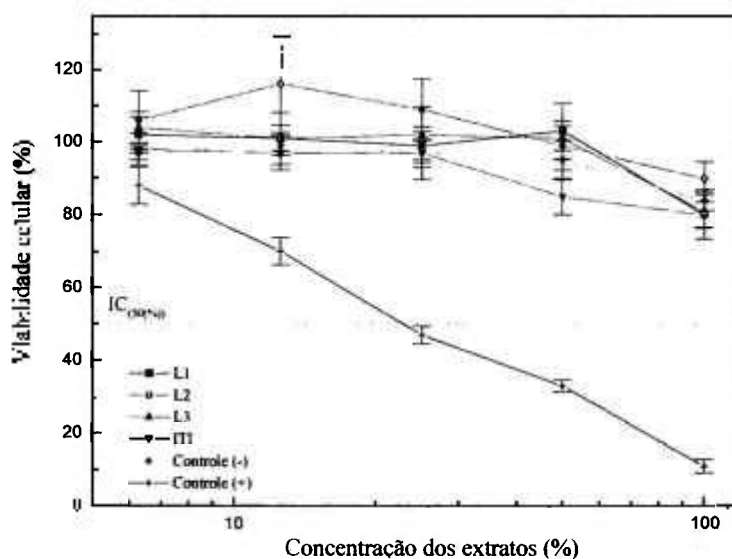


Figura 25. - Resultados do percentual de células vivas das amostras L1, L2 e L3 da liga Ti-13Nb-13Zr bem como do material de referência clínica e os controle positivo e negativo utilizados neste ensaio.

Os valores da Tabela 14, utilizados para construir o gráfico da Figura 25, detalham a não toxicidade dos materiais da liga Ti-Nb-Zr, nas diferentes concentrações testadas, bem como para o grupo de referência clínica, além do controle negativo, representado por amostras titânio comercialmente puro grau 2. O controle positivo (solução fenólica a 0,2%) mostrou-se citotóxico $IC_{(50\%)}=22$. Em geral, todas as condições de sinterização testadas neste trabalho (L1, L2 e L3), produziram materiais atóxicos, ainda que, na temperatura de 1000 °C, tenha ficado evidente dissolução parcial do conteúdo de nióbio.

Tabela 14. - Resultados do percentual de células vivas obtidos no teste de citotoxicidade dos extratos das ligas de Ti-13Nb-13Zr (L1, L2 e L3), do material de referência clínica (ITI) além dos controle positivo e negativo envolvidos neste teste.

Concentração Extratos (%)	Viabilidade Celular (%)					
	L1	L2	L3	ITI®	C. positivo (Fenol 0,2%)	C. negativo (Ticp)
100%	80±3,4	90±4,5	81±4,7	80±6,6	11±1,8	84±2,8
50%	103±7,6	99±6,8	101±3,3	85±5,0	33±1,6	95±5,5
25%	99±3,8	109±8,6	102±7,6	97±7,3	47±2,3	97±4,0
12,5%	101±3,5	116±13,4	101±7,1	97±4,7	70±3,7	99±2,6
6,25%	102±4,9	106±8,1	104±4,3	98±4,3	88±5,2	97±1,9

Os materiais para implantes obtidos da liga Ti-13Nb-13Zr, bem como o de referência clínica e o controle negativo, apresentaram percentuais de viabilidade celular bem próximos na concentração do extrato a 100%. Uma possível dúvida acerca da biocompatibilidade do elemento nióbio, uma vez que não houve uma reação completa de seu conteúdo, em amostras sinterizadas a 1000° C, julga-se de pouca relevância, em virtude dos resultados desta pesquisa (Figura 25) e daqueles apresentados por Pypen et al. (1998) já que não foi observada citotoxicidade do elemento, mas sim a formação de matriz óssea mineralizada sobre a superfície de amostras confeccionadas puramente em nióbio. O material de referência clínica que apresenta um tratamento de superfície, a fim de alterar seu padrão topográfico, demonstrou o mesmo nível de resultados no ensaio de citotoxicidade que as amostras da liga Ti-13Nb-13Zr.

5.3.3 Ensaio “in vivo” da Osteointegração

- **Aspectos Gerais**

Todos os animais recuperaram-se bem do procedimento cirúrgico. Não houve diferença significativa no que diz respeito a ganho/perda de peso pelos animais. Adicionalmente, nenhum animal demonstrou reações adversas ou inflamatórias. Os resultados da interação alcançada entre o tecido ósseo e as amostras dos implantes (Ti-13Nb-13Zr), após oito semanas de cicatrização, em coelhos, são apresentados a seguir e detalhados individualmente para cada técnica.

- **Microscopia de Luz - Fluorescência**

Análises histomorfométricas foram realizadas ao nível da cortical na interface osso-implante em imagens obtidas por microscopia de luz utilizando-se um filtro ultravioleta (UV). A análise por microscopia revelou claramente os marcadores fluorescentes, a superfície óssea e a superfície do implante.

O osso observado na interface (Figura 26) apresentou-se permeado por marcadores fluorescentes e demonstrou uma estrutura similar às osteonas encontradas em osso compacto. Adicionalmente, dupla marcação com os fluorocromos tetraciclina e calceína foram observadas no osso calcificado ao longo da superfície óssea ao redor do implante. Ainda com base nas micrografias apresentadas na Figura 26 nota-se que a formação de osteonas não ocorre de maneira organizada, ou seja, não existe uma seqüência cronológica para a formação dos anéis, sendo portanto formadas em períodos diferentes marcados pela tetraciclina, injetada nas primeiras semanas (2^a e 3^a) e pela calceína, injetada no período mais próximo do sacrifício dos animais (6^a e 7^a semanas).

Estes resultados concordam com àqueles apresentados por Carbonari (2004) que verificou ainda que a formação dos anéis pode ocorrer de maneira aleatória e em períodos mais longos.

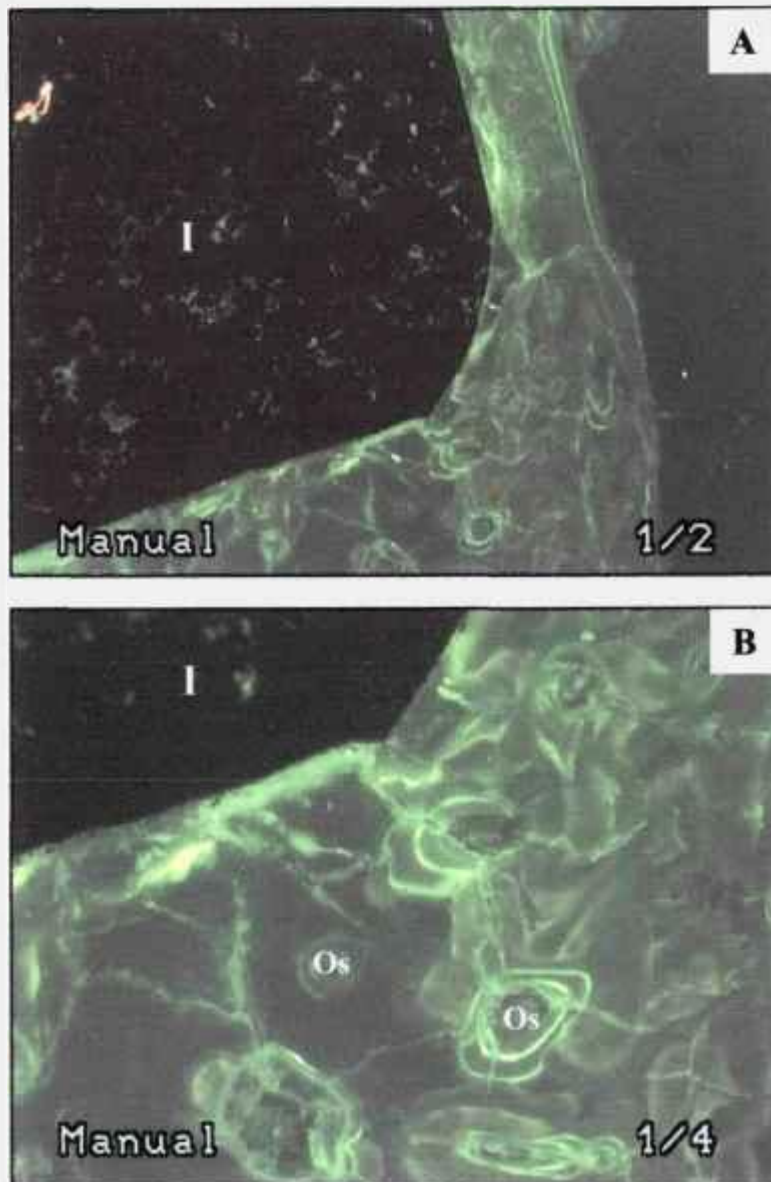


Figura 26. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C em região adjacente ao implante (I) - (a) interface osso-implante na região cortical (aumento 40x); (b) aumento de 100x. Observar a presença de osteonas marcadas pela calceína (Os) junto à interface com o implante.

Na Figura 27, observa-se que o marcador ósseo administrado nas últimas 2 semanas (calceína) revelou um consistente padrão de osteogênese, mostrando a cortical interna e a região trabecular como áreas ativas de mineralização concordando com as pesquisas de Nilles et al. (1973) e Suzuki et al. (1997).

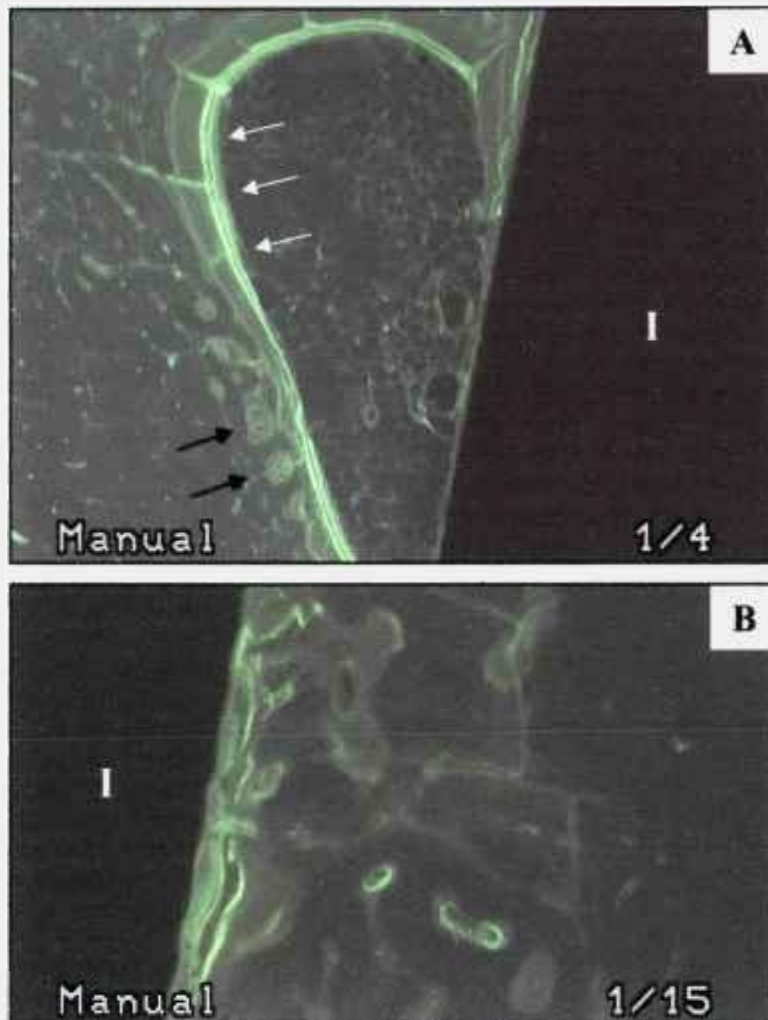


Figura 27. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C em região adjacente ao implante (I) - (a) atividade óssea intensa do endóstio, notar a dupla marcação da calceína (setas brancas), bem como osteonas marcadas pela tetraciclina (setas pretas) aumento 40x; (b) atividade óssea junto à interface - verifica-se a marcação pelos 2 marcadores (aumento 100x).

Os marcadores fluorescentes foram observados com maior frequência no interior da área de análise (Figura 28), ou seja, na região junto à interface (0 a 0.5 mm a partir da superfície do implante) comparada à área controle (Figura 29), região afastada (> 2 mm a partir da superfície do implante).

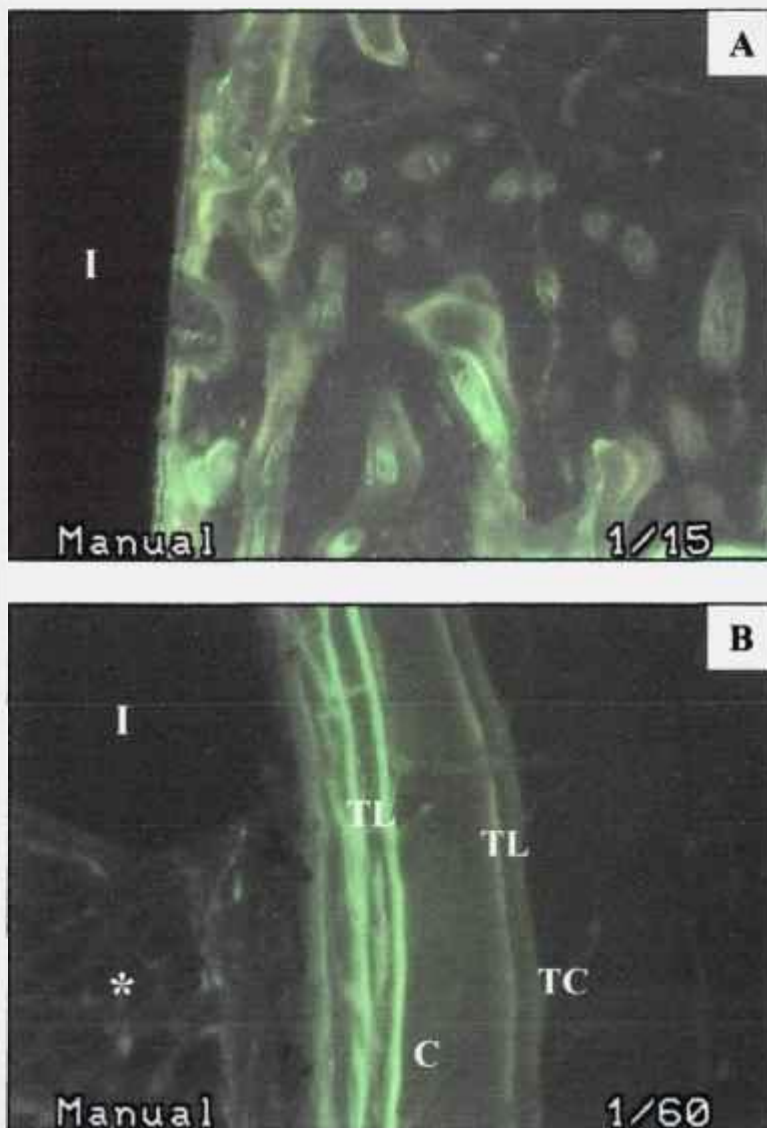


Figura 28. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob filtro UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500 °C - (a) em região adjacente ao implante (I) ao nível da cortical (aumento 40x); (b) observar intensa atividade óssea ao nível da região medular (*) - dupla marcação do tecido lamelar (TL) pela tetraciclina, TC (2^a e 3^a semanas) e da calceína, C (6^a e 7^a semanas) - aumento 100x.

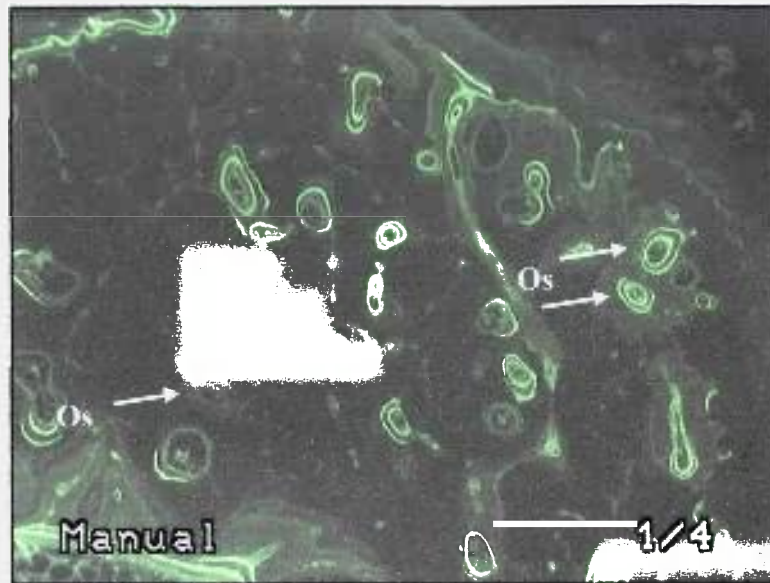


Figura 29. - Micrografia, obtida por microscopia de luz sob filtro de luz UV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C em região controle (afastada); (a) aumento 40x - notar a presença de osteonias (Os) marcadas tanto pela tetraciclina (laranja) como pela calceína (verde).

Com base nos resultados reportados a seguir, a respeito da bioatividade junto à interface, nota-se uma alta atividade de remodelamento ósseo, porém, não foi constatada significância estatística, entre os grupos avaliados (Tabela 15 e Figura 30), concordando com relatos apresentados em outros trabalhos (Bloebaum et al., 1994; Suzuki et al., 1997, Coelho, 2002). Entende-se, dessa forma, que o grau de porosidade das amostras parece não influenciar no nível de bioatividade ao nível da interface. Nota-se que devido ao baixo número de espécimes avaliados, o intervalo confiança de 95% demonstrou valores negativos para os menores limites para dois grupos.

Tabela 15. - Valores médios de bioatividade junto à interface por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Valores médios de bioatividade junto à interface por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Teste estatístico One-way ANOVA ($P > 0,97$).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Sint 1000 °C (n=4)	5,125	1,826	1,162	9,087
Sint 1300 °C (n=3)	4,523	2,109	- 0,052	9,099
Sint 1500 °C (n=2)	5,0	2,583	- 0,604	10,604
Total (n=9)	4,896			

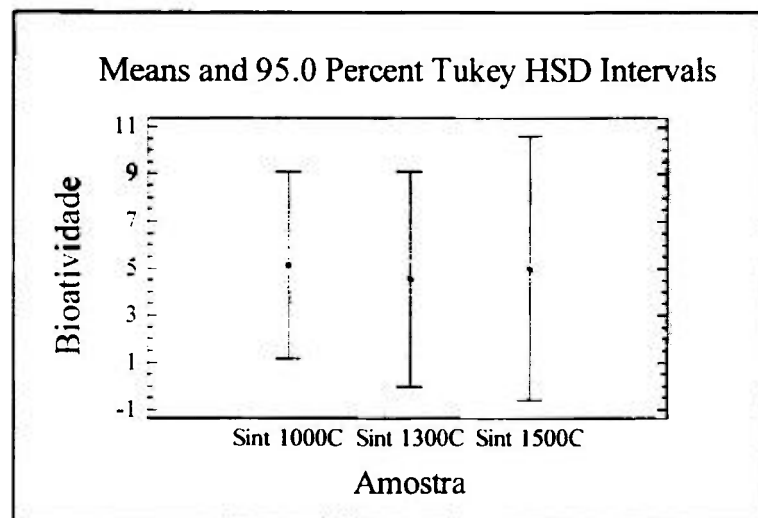


Figura 30. - Representação gráfica dos dados apresentados na Tabela 15. Notar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade entre os diferentes grupos de implantes avaliados ($P > 0,97$).

Os níveis de bioatividade apresentado em áreas controle ($> 2,0$ mm a partir da superfície do implante) não revelaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,34$) entre os grupos avaliados (Tabela 16 e Figura 31), concordando com relatos apresentados em outros trabalhos (Bloebaum et al., 1994; Suzuki et al., 1997, Coelho, 2002). Adicionalmente, estes resultados confirmam ainda que, em regiões afastadas da interface osso-implante, os níveis de atividade óssea apresentam valores comparáveis a níveis fisiológicos, uma vez que sabe-se que o tecido ósseo apresenta uma natureza dinâmica (Roberts et al. 1986; Garetto et al., 1995; Coelho, 2002).

Tabela 16. - Valores médios de bioatividade em área controle por grupo (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD). Teste estatístico One-way ANOVA ($P > 0,34$).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Sint 1000 °C (n=4)	3,525	1,116	1,594	5,455
Sint 1300 °C (n=3)	2,626	1,288	0,396	4,856
Sint 1500 °C (n=2)	5,85	1,578	3,119	8,580
Total (n=9)	3,742			

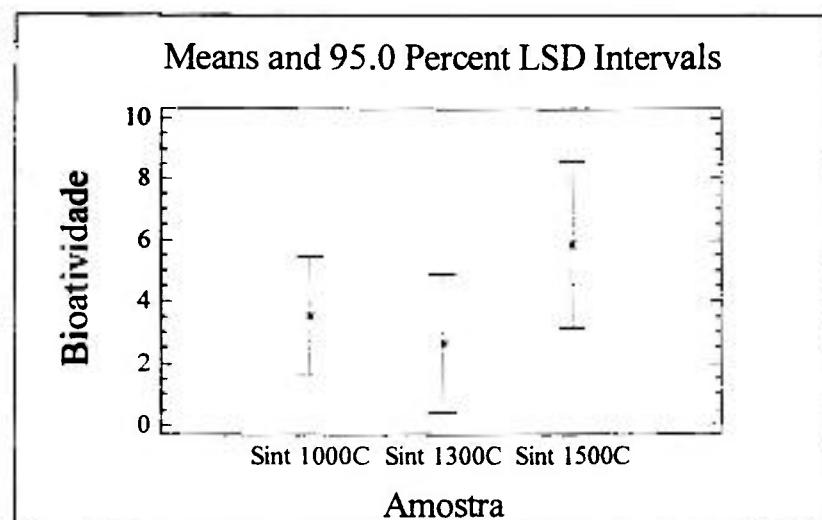


Figura 31. - Representação gráfica dos dados apresentados na Tabela 16. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade junto à interface nos diferentes grupos de implantes avaliados ($P > 0,34$).

A seguir, são apresentados os resultados da análise de variância tendo como a variável dependente *bioatividade* e variáveis independentes a *região de interesse* (interface ou controle) e *amostras* (sinterização a 1000 °C, 1300 °C, e 1500 °C). Estes resultados demonstraram que não existiu um efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente. O sumário estatístico está representado pelas Tabelas 17 e 18. A Figura 32 é a representação gráfica das Tabelas 17 e 18.

Tabela 17. - Sumário das análises de bioatividade por região de interesse (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Grande Média (n=18)	4,291			
Sint 1000 °C (n=8)	3,875	0,909	1,923	5,826
Sint 1300 °C (n=6)	3,575	1,050	1,321	5,828
Sint 1500 °C (n=4)	5,425	1,286	2,665	8,184
Região de Interesse				
Controle (n=9)	3,914	0,875	2,036	5,792
Interface (n=9)	4,668	0,875	2,791	6,546

Tabela 18. - Análise de Variância ANOVA para bioatividade (Intervalo de Confiança - 95%).

Fonte	Soma dos Quadrados	DF	Média do Quadrado	F-Ratio	P-Value
A: Amostra	9,074	2	4,537	0,69	0,520
B: Região Interesse	2,561	1	2,561	0,39	0,544
Residual	92,711	14	6,622		
Total (Corrigido)	104,347	17			

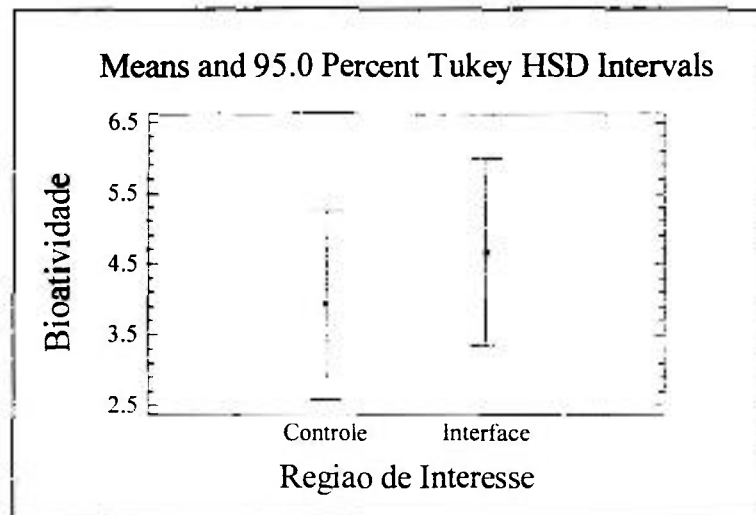


Figura 32. - Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 17 e 18. Notar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à bioatividade nas duas áreas de interesse avaliadas.

A análise, após o período de 8 semanas “in vivo”, revelou a formação de osso na interface com o implante. Os marcadores, tetraciclina injetado na 2^a e 3^a semanas e calceína injetado no último período antes do sacrifício, ou seja na 6^a e 7^a semanas, foram observados ao longo da interface osso-implante. Infelizmente, não foi possível verificar a presença do marcador alizarina, o qual foi injetado entre a 4^a e 5^a semanas. A não verificação do segundo marcador (alizarina) pode estar associada à baixa taxa de remodelamento ocorrida no período após a 4^a e 5^a semanas da implantação, baixa dosagem do marcador ou não incorporação do agente durante este período. Esses resultados parecem concordar com aqueles apresentados por Dhert et al. (1998), uma vez que também observaram, por meio de análises histológicas, uma importante diminuição da atividade celular ao longo da interface após 4 semanas em coelhos, e ainda aos relatos de Suzuki et al. (1997), onde constataram que o marcador tetraciclina, aplicado 4 semanas antes do sacrifício (6 semanas “in vivo”), havia desaparecido, justificando a ocorrência de tal fato pela atividade de remodelamento ósseo.

Análise da MAR levou em consideração as distâncias entre os mesmos marcadores procedendo-se então a mensuração da distância entre eles, a partir do centro do primeiro marcador ao centro do segundo marcador, perpendicularmente, às superfícies marcadas. Foram realizadas entre 20-30 medições por amostra para cada marcador. A taxa de aposição mineral foi mensurada junto à interface do implante e na área controle, ou seja, afastado do implante, sendo expressada em $\mu\text{m}/\text{dia}$. Basicamente, a MAR foi calculada dividindo-se a distância obtida entre os marcadores pelo número de dias de intervalo entre a nova aplicação.

Dando seguimento, são apresentados os resultados de taxa de aposição mineral (MAR) normalizados e tabulados para os diferentes marcadores identificados, tetraciclina (Tabelas 19 e 20 e Figuras 33 e 34) e calceína (Tabelas 21 e 22 e Figuras 35 e 36). O objetivo das análises histomorfométricas da MAR foi o de verificar se houve diferença estatisticamente significativa nas medidas junto à interface e àquelas realizadas na área de controle, para os diferentes materiais implantados.

Tabela 19. - Sumário das análises de taxa de aposição mineral (MAR), $\mu\text{m}/\text{dia}$, por região de interesse - marcador tetraciclina aplicado na 2ª e 3ª semanas “in vivo” (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Grande Média (n=18)	3,525			
Sint 1000 °C (n=8)	3,025	0,284	2.414	3,635
Sint 1300 °C (n=6)	3,573	0,328	2.868	4,277
Sint 1500 °C (n=4)	3,977	0,402	3.114	4.840
Região de Interesse				
Controle (n=9)	3,414	0,273	2.827	4,0
Interface (n=9)	3,635	0,273	3.048	4,223

Tabela 20. - Análise de Variância ANOVA das análises de taxa de aposição mineral (MAR), relacionada ao marcador tetraciclina aplicado na 2ª e 3ª semanas “in vivo” por região de interesse e amostra (Intervalo de Confiança - 95%).

Fonte	Soma dos Quadrados	DF	Média do Quadrado	F-Ratio	P-Value
A: Amostra	2,632	2	1,316	2,03	0,167
B: Região de Interesse	0,220	1	0,220	0,34	0,569
Residual	9,067	14	0,647643		
Total (Corrigido)	11,9195	17			

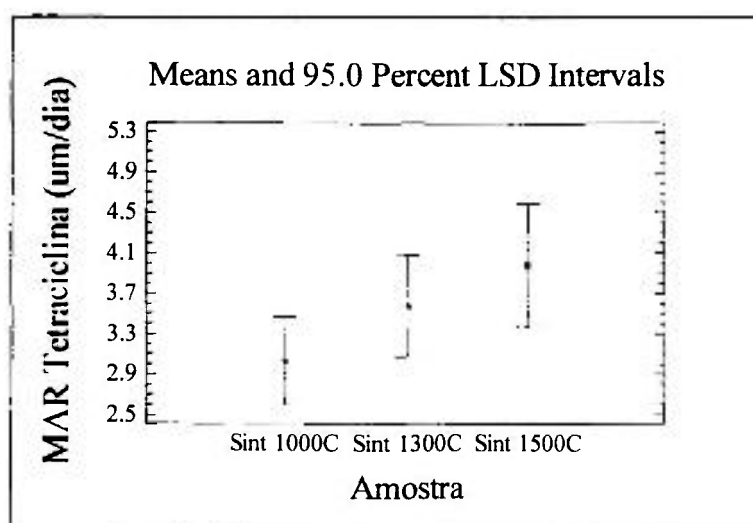


Figura 33. - Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 19 e 20. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador tetraciclina, aplicado na 2ª e 3ª semanas, para as diferentes amostras avaliadas.

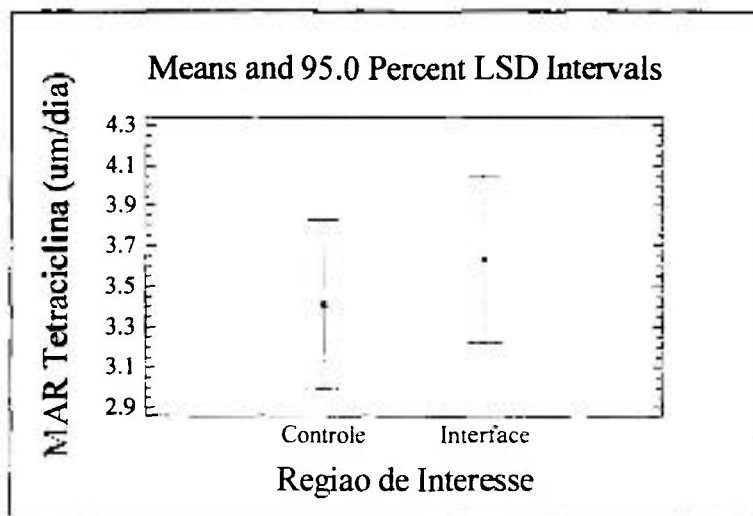


Figura 34. - Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 19 e 20. Não foi constatada diferença com significância estatística em relação à taxa de deposição mineral relacionada ao marcador tetraciclina, aplicado na 2^a e 3^a semanas, para as diferentes **áreas de interesse** avaliadas: junto à interface e controle.

Tabela 21. - Sumário das análises de taxa de deposição mineral (MAR), em $\mu\text{m}/\text{dia}$, por região de interesse – marcador calceína aplicado na 6^a e 7^a semanas “in vivo” (Intervalo de Confiança - 95% - Teste de Tukey HSD).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Grande Média (n=18)	3,684			
Sint 1000 °C (n=8)	3,543	0,323	2,849	4,237
Sint 1300 °C (n=6)	3,703	0,373	2,902	4,504
Sint 1500 °C (n=4)	3,807	0,457	2,826	4,788
Região de Interesse				
Controle (n=9)	3,894	0,311	3,227	4,562
Interface (n=9)	3,474	0,311	2,807	4,142

Tabela 22. - Análise de Variância ANOVA das análises de taxa de aposição mineral (MAR), relacionada à calceína ($\mu\text{m}/\text{dia}$), aplicada na 6^a e 7^a semanas, por região de interesse e amostra (Intervalo de Confiança - 95%).

Fonte	Soma dos Quadrados	DF	Média do Quadrado	F-Ratio	P-Value
A: Amostra	0,206	2	0,103	0,12	0,885
B: Região de Interesse	0,793	1	0,793	0,95	0,346
Residual	11,720	14	0,837		
Total (Corrigido)	12,720	17			

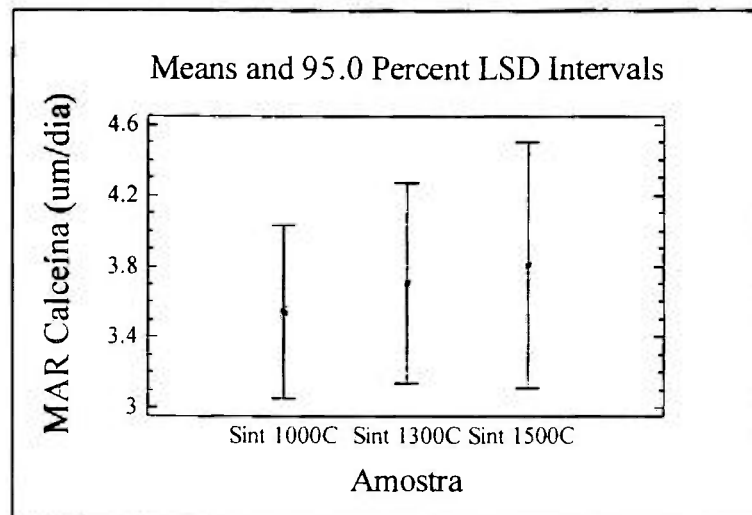


Figura 35. - Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 21 e 22. Observar que não houve diferença estatisticamente significante (em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador calceína, aplicado na 6^a e 7^a semanas, para as diferentes amostras estudadas.

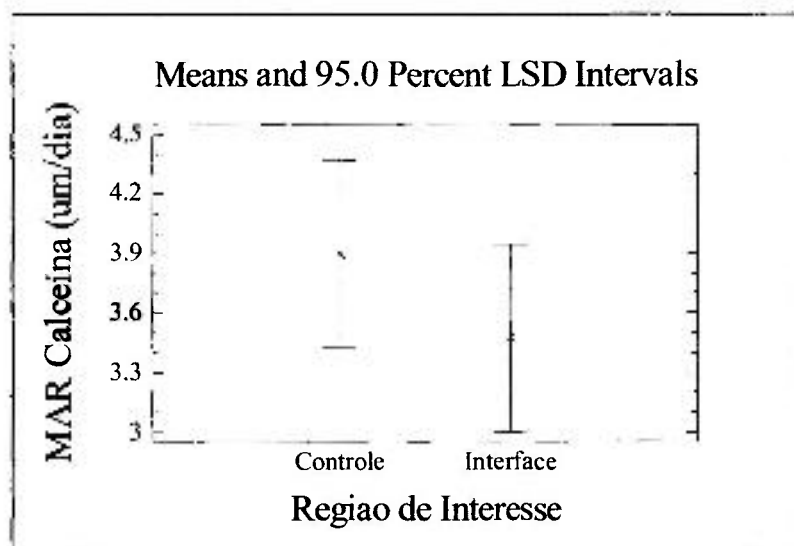


Figura 36. - Representação gráfica dos dados apresentados nas Tabelas 21 e 22. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à taxa de aposição mineral relacionada ao marcador calceína, aplicado na 6^a e 7^a semanas, para as diferentes **áreas de interesse** avaliadas, junto à interface e controle.

De maneira geral, a taxa de aposição mineral à distância, ou seja nas áreas controle ($> 2,0$ mm a partir da superfície do implante), foi quantitativamente menor que a MAR junto à interface, porém, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,34$ e $P > 0,56$ para calceína e tetraciclina, respectivamente). Adicionalmente, tanto o marcador tetraciclina, aplicado na 2^a e 3^a semanas, como a calceína, aplicada na 6^a e 7^a semanas, demonstraram valores semelhantes para a taxa de aposição mineral (MAR). Neste sentido entende-se que a atividade de remodelamento ósseo no período logo após a instalação dos implantes, bem como no período antes do sacrifício dos animais, apresentou-se semelhante. De acordo com Grizon et al. (2002), o contínuo decréscimo na MAR controle, ou seja, junto à interface (0 a 0,5 mm a partir da superfície do implante), ao longo dos tempos de avaliação, também reflete que o osso afastado do leito de implantação está sujeito a um fenômeno de aceleração regional. Este fenômeno é consequência do trauma e, provavelmente, pode também refletir a mudança de concentração de estresse na rede trabecular causada pelo próprio implante. Uma possível explicação para esta diferença é que o nível de estresse transmitido aos osteócitos é maior ao redor do implante (Grizon et al. 2002).

▪ Análises do Contato Osso-Implante – Campo Claro

Cumprе salientar que, os valores médios encontrados referente ao contato osso-implante para os materiais utilizados, concordam com a literatura pesquisada, ou seja, com os trabalhos que utilizaram implantes na maioria das vezes, de titânio comercialmente puro, que foram submetidos a diferentes modalidades de tratamento de superfície (Johansson & Albrektsson, 1991; Cordioli et al., 2000; Giavaresi et al., 2003), revelando mais uma vez o potencial osteocondutor da liga Ti-13Nb-13Zr.

As micrografias, apresentadas nas Figuras 37 e 38, demonstram o íntimo contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície da liga Ti-13Nb-13Zr, obtidas nas diferentes condições.



Figura 37. - Micrografia, obtida por microscopia de luz sob campo claro, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C – observar o contato entre o osso e o implante (I), compreendendo a região da cortical cirúrgica (aumento de 40x).

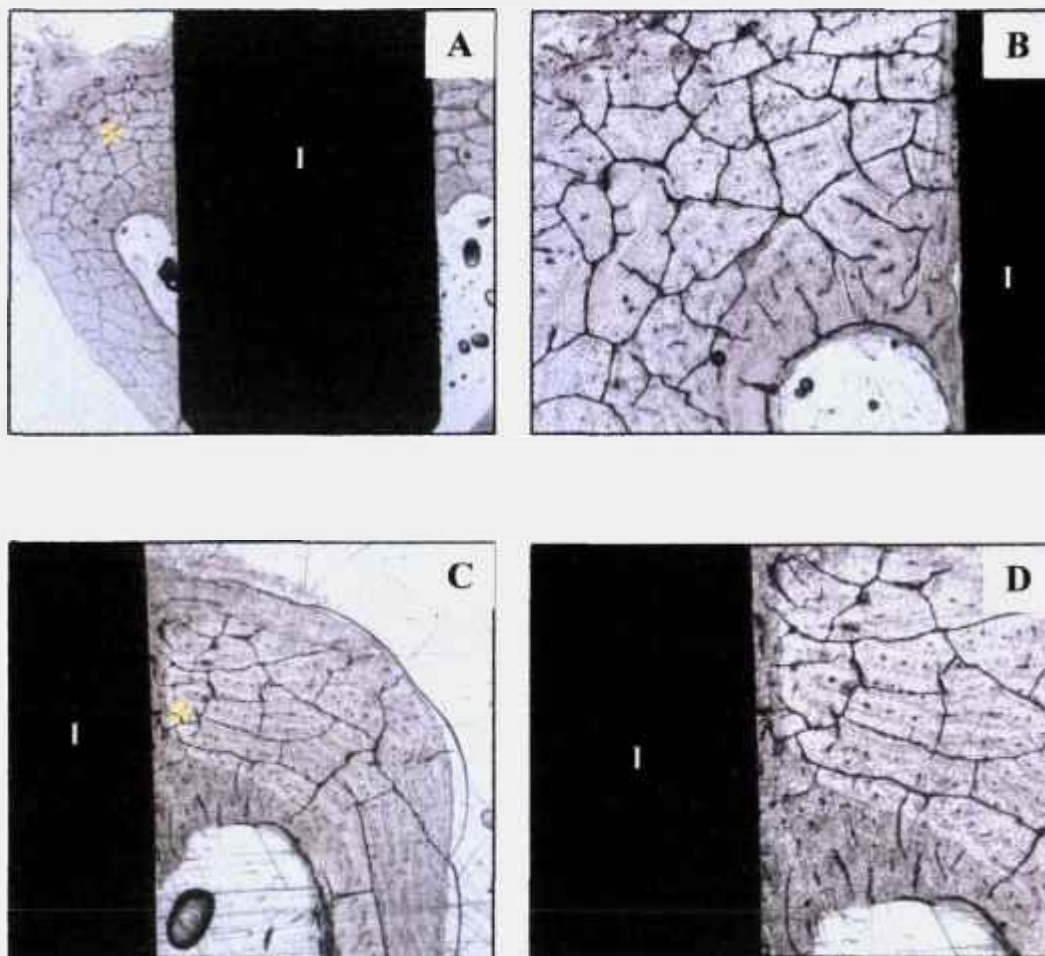


Figura 38. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz sob campo claro, da liga Ti-13Nb-13Zr; (a) sinterizada a 1300 °C - visão geral do nível de contato osso-implante alcançado (aumento de 12,5x); (b) sinterizada a 1300 °C - região demarcada (*) aumento de 40x; (c) sinterizada a 1500 °C - aumento de 20x e (d) região demarcada (*) aumento de 40x - observar o contato osso-implante.

Os dados referentes a análise histomorfométrica das porcentagens de contato direto osso-implante em relação às diferentes amostras avaliadas, mostradas nas Figuras 37 e 38, e a análise estatística, são apresentados nas Tabela 23 e 24 e Figura 39. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes para a porcentagem de contato osso-implante para os grupos avaliados ($P > 0,57$).

Tabela 23. - Médias do Contato Osso-Implante por amostra (Intervalo de Confiança - 95%)

Grupos	Média (%)	Desvio Padrão	Menor Limite	Maior Limite
Sint 1000 °C	50,05	7,115	37,738	62,361
Sint 1300 °C	62,2	8,216	47,983	76,416
Sint 1500 °C	55,35	10,06	37,938	72,761

Tabela 24. - Análise de variância (ANOVA) do Contato Osso-Implante por amostra

	Soma dos Quadrados	DF	Média do Quadrado	F-Ratio	P-Value
Entre Grupos	253,081	2	126,54	0,62	0,57
Dentro dos Grupos	1215,13	6	202,522		
Total (corrigido)	1468,22	8			

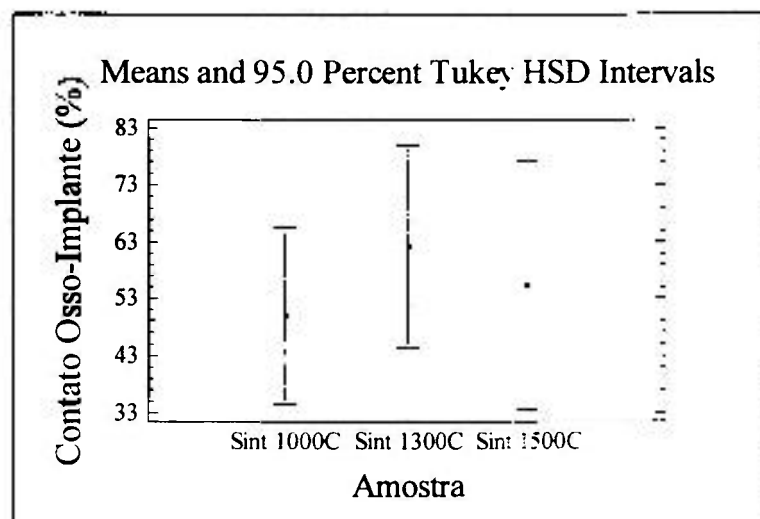


Figura 39. - Representação gráfica dos dados de porcentagem de contato osso-implante apresentados nas Tabelas 23 e 24. Observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,57$) para as amostras avaliadas.

- **Método de Azul de Toluidina**

Com base nas lâminas coradas pelo método de azul de toluidina é possível identificar o grau de maturação do tecido ósseo, bem como o tipo de célula. A seguir, são apresentadas micrografias onde é possível verificar, de maneira geral, o nível de contato osso-implante alcançado, logicamente são visualizadas áreas onde não foi evidenciada a ocorrência da osteointegração, o que é extremamente aceitável. Tal fato pode ser justificado por três razões principais: 1) técnica de desbaste e polimento das lâminas a qual pode danificar a interface osso-implante (Suzuki et al., 1997); 2) a presença de uma camada de tecido não mineralizado rico em glicosaminoglicanas e proteoglicanas a qual não é corada pelo método do azul de toluidina (Steflik et al., 1992) e; 3) a não osteointegração propriamente dita em determinadas regiões.

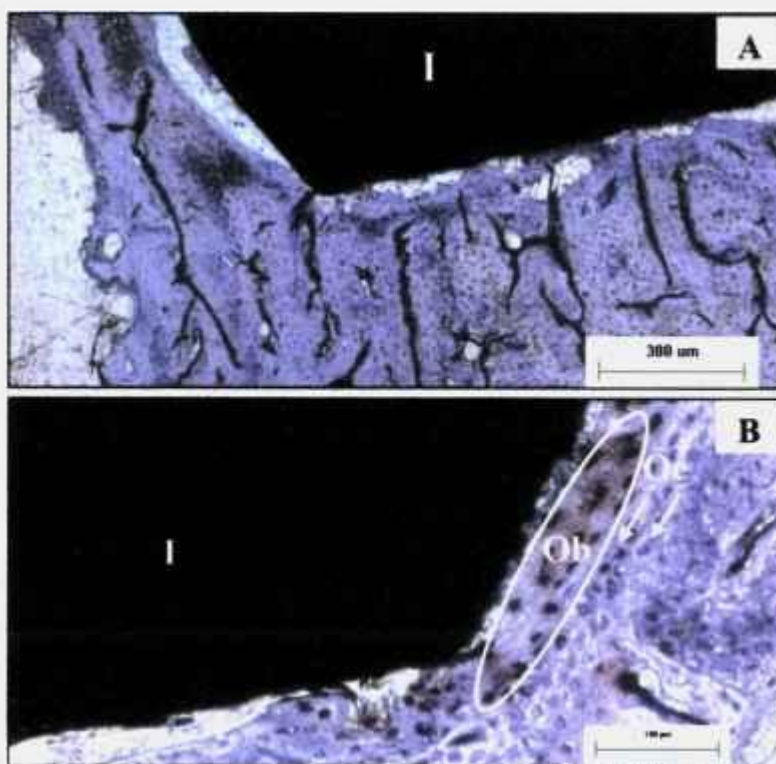


Figura 40. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz em lâminas coradas pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C (a) e (b) observar a remodelação óssea junto à interface e (b) notar a presença de osteócitos (Oc) dispersos na matriz colágena e o colar de osteoblastos (Ob) o qual atua na frente de ossificação originando o tecido osteóide e este por sua vez o tecido ósseo neoformado.

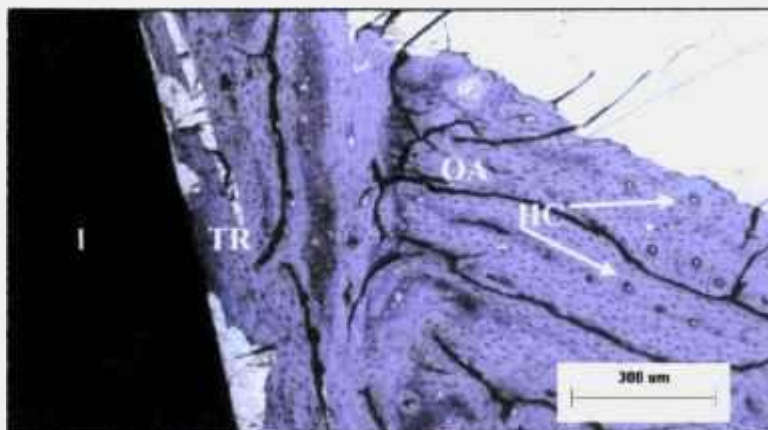


Figura 41. - Micrografia, obtida por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C – observar a diferença do grau de maturidade do tecido ósseo entre o tecido remodelado (TR) e o osso antigo (OA). Notar a presença acentuada de canais de Havers (HC) no osso antigo.



Figura 42. - Micrografia, obtida por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C – Verifica-se sítios de contato entre a superfície do implante (I) e o tecido remodelado (TR). A seta aponta uma bolha resultante da colagem do corte histológico sobre lâmina de acrílico com cola à base de cianoacrilato.

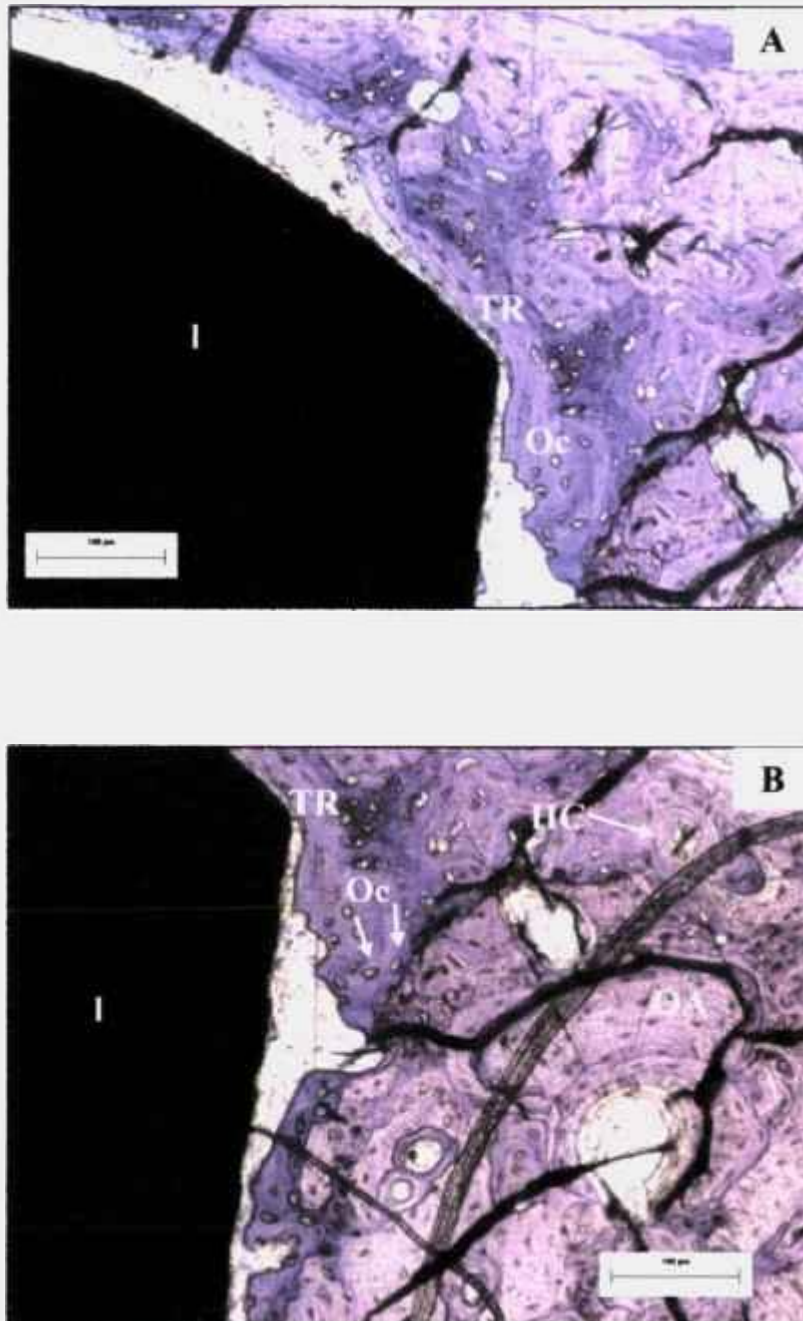


Figura 43. - Micrografias, obtidas por microscopia de luz em lâmina corada pelo método de Azul de Toluidina, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500 °C – (a) notar a presença de tecido remodelado (TR) junto à interface. Observar ainda canais de havers (HC) no osso antigo (OA) e osteócitos (Oc).

▪ **Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva**

As análises por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva da morfologia e composição química do osso formado ao redor do implante bem como o nível de integração obtido na interface osso/implante conforme metodologia descrita anteriormente são mostradas a seguir:

▪ **Lote 1 – 1000°C**

Na Figura 44 são apresentadas micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde se observa, depositado sobre a superfície do implante, uma grande quantidade de tecido, identificando a osteocondução como processo ativo. A região indicada na Figura 44 (a) foi ampliada para melhor avaliação da interface osso-implante (b). Verificou-se desta forma, que o tecido ósseo apõe-se diretamente sobre a superfície do implante. Análise por energia dispersiva (EDS), da região marcada (c) com o símbolo (*), indicou a presença de cálcio e fósforo, principais componentes da fase mineral do tecido ósseo.

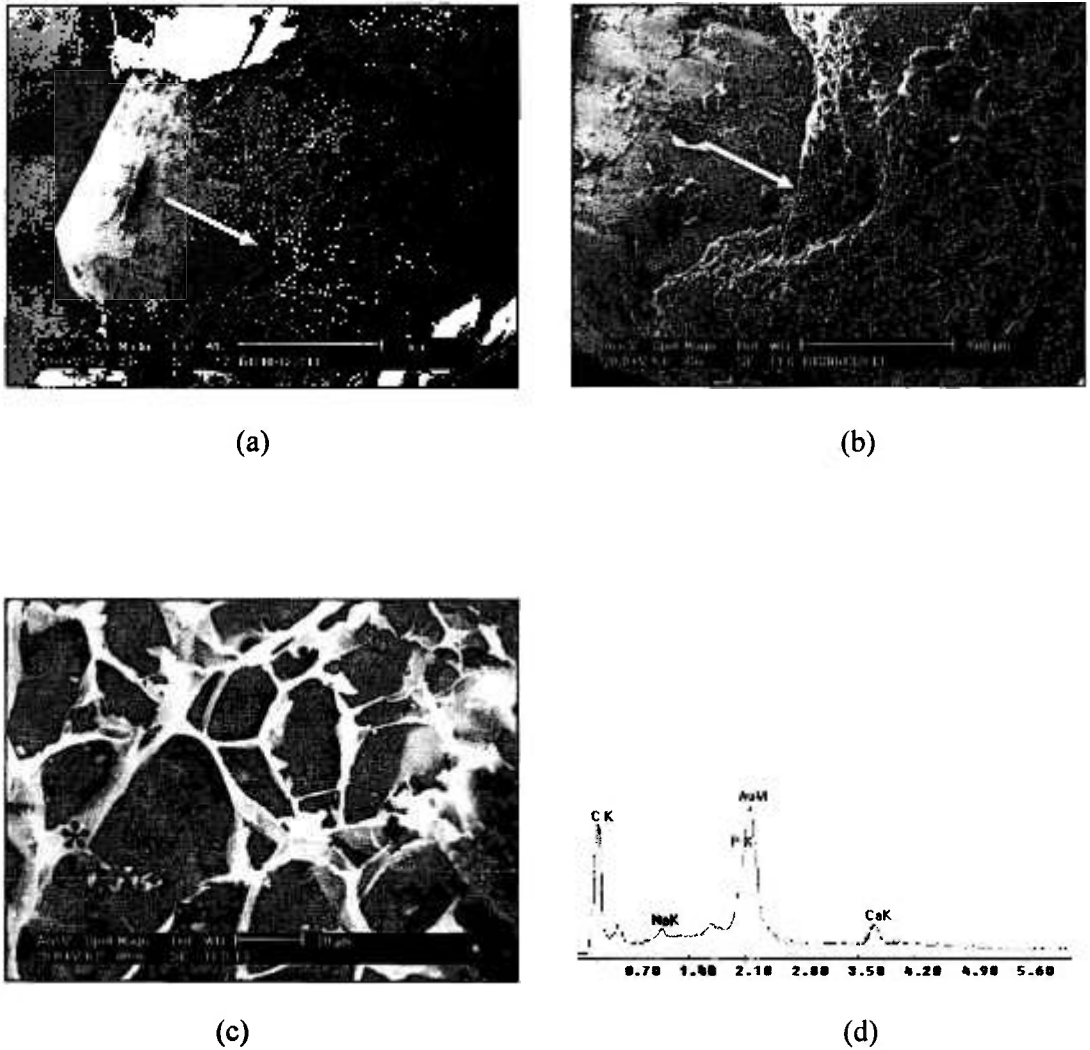


Figura 44. - Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - notar o contato osso-implante (a) e (b); (c) observar a rede de colágeno precursora da mineralização do tecido ósseo formada sobre a superfície do implante e (d) EDS (*) - presença de cálcio e fósforo.

▪ Lote 2 – 1300°C

A Figura 45 apresenta micrografias, obtidas por MEV, que revelam o estabelecimento de contato entre o tecido ósseo e a superfície do implante. O processo de mineralização pode ser observado, de acordo com a presença de malha colágena, onde foi realizada análise química semi-quantitativa por energia dispersiva (EDS), revelando a presença de cálcio e fósforo ainda que em pequenas quantidades.

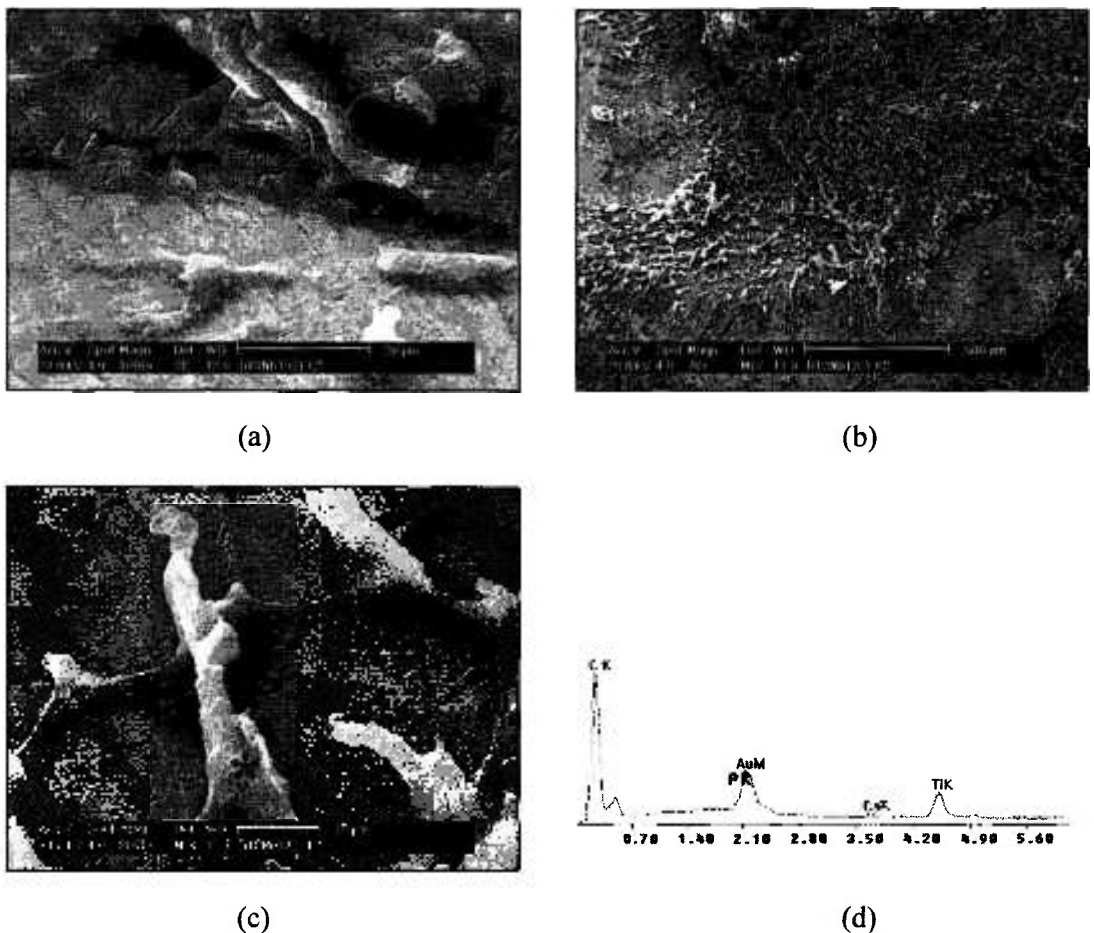


Figura 45. - Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C - (a) notar o contato osso-implante; (b) e (c) observar a matriz colágena sobre a superfície do implante e (d) EDS (*) - presença de indícios dos elementos cálcio e fósforo.

▪ Lote 3 – 1500°C

Na Figura 46 é mostrada micrografia obtida por MEV, revelando a biocompatibilidade da liga, já que houve deposição de tecido ósseo sobre a superfície do implante. Este fato é confirmado pela grande quantidade de tecido ósseo aposto à superfície do implante. Na região demarcada pelo símbolo (*) foi realizada análise por energia dispersiva obtendo-se picos significantes para os elementos cálcio e fósforo. De certo modo, observou-se por análises de MEV que nas amostras sinterizadas a 1500°C o grau de maturação óssea foi superior ao verificado nas amostras dos lotes 1 e 2. Entretanto, as análises histomorfométricas com relação ao nível de bioatividade para as diferentes amostras não comprovam tal fato.

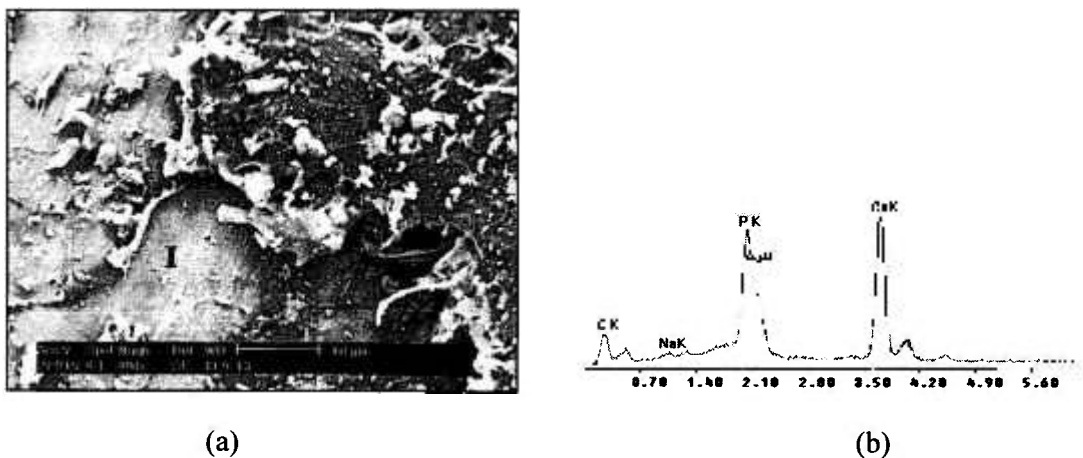


Figura 46. - Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1500°C - (a) observar o contato osso-implante e, (b) EDS (*) - observar os elevados conteúdos de cálcio e fósforo.

A seguir, são apresentadas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, bem como, as análises químicas semi-quantitativas realizadas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) em lâminas histológicas com aproximadamente 30 µm de espessura previamente avaliadas pelas outras técnicas utilizadas no trabalho.

Com base nas micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas na Figura 47, observa-se o importante contato osso-implante alcançado nas amostras da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizadas a 1000 °C. A Figura 47 (a) foi ampliada para melhor avaliação da interface (b), verificou-se desta forma, um nível avançado de maturação óssea em relação ao tecido formado diretamente sobre a superfície do implante.

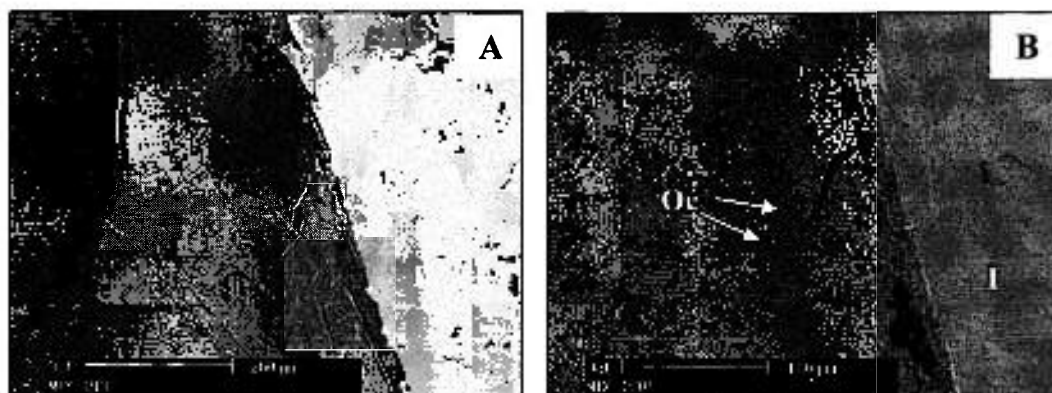


Figura 47. - Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - (a) observar o contato osso-implante (I) e, (b) interface em maior aumento - observar o nível de maturação óssea do osso em contato com o implante, e a presença de osteócitos (Oc).

A micrografia apresentada na Figura 48 revela a ocorrência do fenômeno do “bone ingrowth”, ou seja, o tamanho dos poros apresentado pelas amostras da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizadas a 1000 °C (lote 1) foi suficiente para permitir o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros. Tal observação pôde ser constatada já que as análises de caracterização microestrutural revelaram a existência de poros abertos apresentando diâmetro médio entre 50-100 μm para este lote de amostras. É interessante ressaltar que o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros durante o processo de reparo/regeneração confere uma estabilidade mecânica adicional. De acordo com o trabalho de Simmons et al. (1999) uma estrutura porosa permite uma adesão significativamente importante da rede de fibrina, possibilitando que células osteogênicas alcancem a superfície do implante podendo então iniciar a formação óssea pelo processo de osteogênese de contato.



Figura 48. - Micrografia, obtida por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - observar o crescimento de tecido ósseo novo no interior dos poros, nota-se que o osso pareceu se adaptar à geometria dos poros, invadindo espaços absolutamente pequenos (setas brancas).

Observou-se ainda, que a interconectividade dos poros parece de certa forma favorecer o crescimento bem como a mineralização do tecido (Figuras 48 e 49). Neste sentido, foram realizadas análises por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do osso adjacente ao implante e das áreas invadidas, ficando comprovado que os teores dos elementos cálcio e fósforo apresentam-se similares em ambos os sítios avaliados (Tabela 25). Os resultados desta pesquisa corroboram com aqueles apresentados por Nilles et al. (1973) uma vez que o tecido ósseo tendeu a preencher os poros e se adaptar ao seu formato o que propiciou um contato direto com o metal. Neste contexto, a distância entre os poros, a profundidade e a geometria, parecem desempenhar um papel de considerável importância na questão do crescimento tecidual em implantes porosos. Do mesmo modo que os relatos de Itäla et al. (2001), neste estudo pôde ser observada a formação de estruturas ósseas em poros inferiores a 50 µm.

Tabela 25. - Teores (% em peso) dos elementos cálcio (Ca), fósforo (P) e titânio (Ti), em regiões 1 e 2, analisadas semi-quantitativamente por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Áreas avaliadas	% Ca (peso)	% P (peso)	% Ti (peso)
1	68,24	26,47	5,30
2	69,34	28,75	1,91

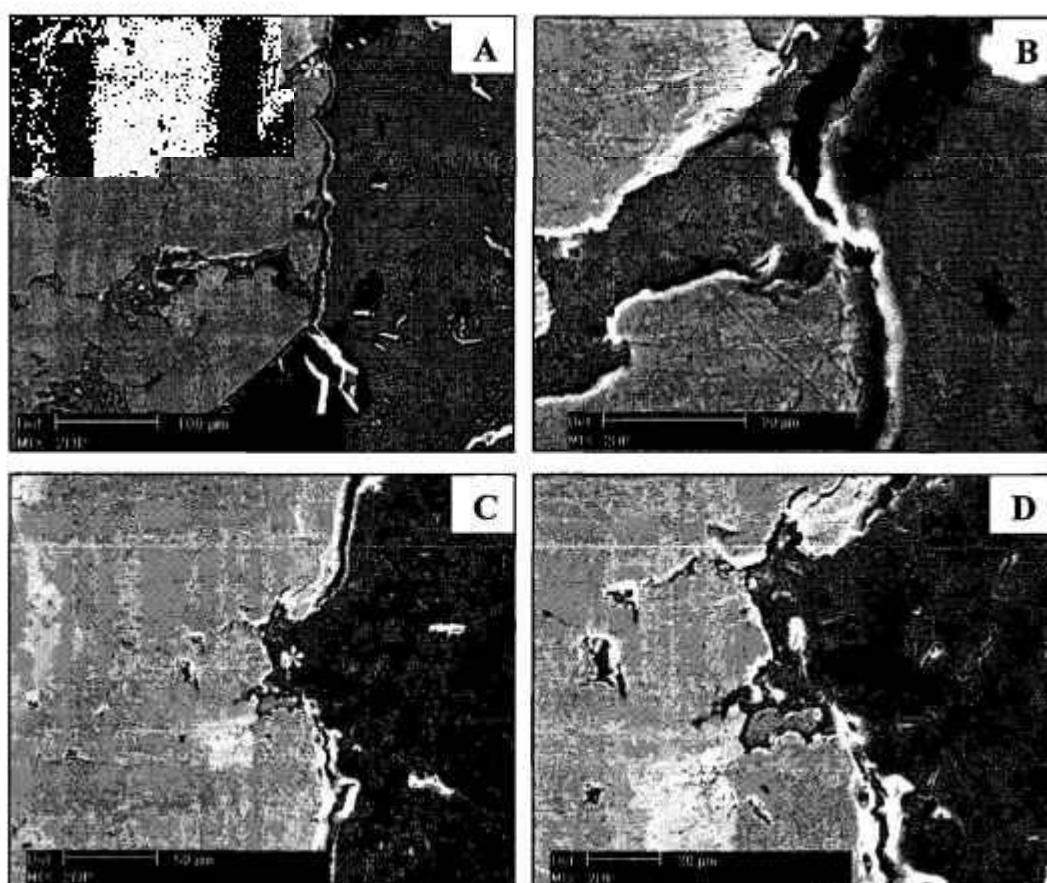


Figura 49. - Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1000 °C - (a) e (b) área (*) de crescimento ósseo no interior dos poros e, (c) observar a penetração de osso novo no interior dos poros em outra região da amostra e (d) região ampliada evidenciado áreas de crescimento ósseo em poros ao redor de 20 µm (*).

De maneira contrária ao apresentado por outros trabalhos (Nilles et al., 1973; Collier & Colligan, 1976; Karagianes et al., 1976; Shibata & Okuno, 1987), talvez pelo pouco tempo de implantação, não foi possível observar neste trabalho a presença de sistemas Harvesianos no tecido ósseo que cresceu no interior dos poros, todavia, por meio de análise química (EDS), conteúdos de cálcio e fósforo foram identificados no tecido ósseo que invadiu o interior dos poros, similares àqueles encontrados no osso cortical adjacente.

Na Figura 50, são apresentadas micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), da liga Ti-13Nb-13Zr sinterizada a 1300 °C e 1500 °C. Observa-se, o contato osso-implante em relação aos dois materiais, semelhante àquele relatado para as amostras do lote 1. A fenda visualizada em alguns pontos ao redor do implante é, de acordo com Suzuki et al. (1997), resultado da técnica de desbaste das lâminas histológicas. Devido ao baixo grau de porosidade e a presença de poros na sua grande maioria fechados não foi possível verificar crescimento de tecido ósseo no interior dos poros.

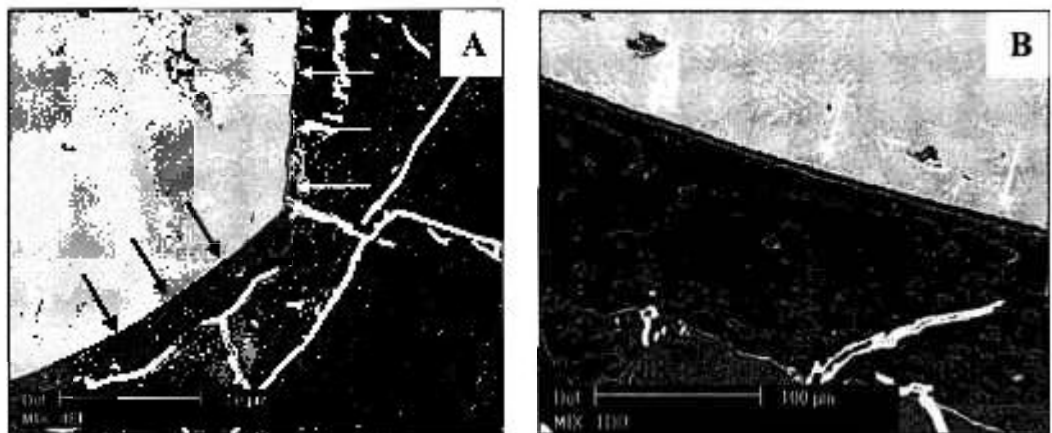


Figura 50. - Micrografias, obtidas por MEV, da liga Ti-13Nb-13Zr. (a) observar o contato osso-implante (setas pretas) e, interface danificada durante preparo da lâmina (setas brancas); (b) observar em maior aumento a fenda decorrente do processamento histológico (setas brancas).

A avaliação global dos resultados de biocompatibilidade “in vivo”, aliado à possibilidade de utilização de materiais de partida absolutamente biocompatíveis, mostram que o processamento via metalurgia do pó (M/P) é bastante atrativo para a obtenção de materiais porosos, da liga Ti-13Nb-13Zr, extremamente promissores para aplicações como implantes.

6. CONCLUSÕES

As diferentes condições de sinterização estudadas mostraram a possibilidade do desenvolvimento da liga Ti-13Nb-13Zr pela tecnologia da metalurgia do pó (M/P) a partir de hidretos. O processamento utilizado permitiu a obtenção de amostras com boas características para avaliar o efeito do grau de porosidade na biocompatibilidade “in vitro” e principalmente verificar a influência no fenômeno de crescimento ósseo no interior dos poros a partir dos ensaios “in vivo”. Todavia, um maior tempo de patamar nas amostras sinterizadas a 1000 °C poderia ter garantido uma microestrutura mais homogênea uma vez que não houve total reação do conteúdo de nióbio;

O teste “in vitro” revelou a não citotoxicidade dos pós de partida demonstrando a segurança da rota utilizada na obtenção dos hidretos, bem como das amostras sinterizadas da liga Ti-13Nb-13Zr nas diferentes condições estudadas. De maneira geral, as análises “in vivo” das amostras implantadas revelaram-se biocompatíveis, já que não foram observadas durante o período “in vivo”, nem nas análises histológicas, quaisquer sinais de inflamação ou necrose tecidual ao redor dos implantes;

As amostras da liga Ti-13Nb-13Zr, nas diferentes condições, demonstraram uma porcentagem significativa de contato direto entre o tecido ósseo e a superfície do implante. Nas amostras sinterizadas a 1000 °C foi possível observar a penetração de tecido ósseo no interior dos poros, e verificou-se ainda que o tecido ósseo remodelado foi capaz de se adaptar à geometria dos poros. Notou-se ainda que poros ao redor de 30 μm não impediram a ocorrência deste fenômeno. Por outro lado, nas amostras sinterizadas a 1300 °C e a 1500 °C, em função das amostras apresentarem apenas poros fechados, não se verificou qualquer sinal de penetração de tecido ósseo nos poros;

Nas análises de bioatividade junto à interface não foi constatada significância estatística, entre os grupos avaliados. Assim, o grau de porosidade das amostras parece não influenciar no nível de bioatividade junto à interface.

A taxa de aposição mineral à distância do sítio implantar foi quantitativamente menor que a MAR junto à interface, porém, não demonstrou significância estatística. Adicionalmente, tanto o marcador tetraciclina, aplicado na 2^a e 3^a semanas, como a calceína, aplicada na 6^a e 7^a semanas demonstraram valores semelhantes para a taxa de aposição mineral (MAR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T., BRANEMARK, P.I., HANSSON, H.A., LINDSTROM, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* vol. 52, n. 2, pp. 155-170, 1981.

AN, Y.B., OH, N.H., CHUN, Y.W., KIM, Y.H., KIM, D.K., PARK, J.S., KWON J.-J., CHOI, K.O., EOM, T.G., BYUN, T.H., KIM, J.Y., REUCROFT, P.J., KIM, K.J., LEE, W.H. Mechanical properties of environmental-electro-discharge-sintered porous Ti implants. *Mater Lett*, vol. 59, n. 17, p. 2178-2182, 2005.

ASAOKA, K., KUWAYAMA, N., OKUNO, O., MIURA, I. Mechanical properties and biomechanical compatibility of porous titanium for dental implants. *J Biomed Mater Res*, vol. 19, n. 6, p. 699-713, 1985.

AYERS, R.A., SIMSKE, S.J., BATEMAN, T.A., PETKUS, A., SACHDEVA, R.L.C., GYUNTER, V.E. Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks. *J Biomed Mater Res*, vol. 45, n. 1, p. 42-47, 1999.

BAIER, R.E., MEYER, A.E., AKERS, C.K., NATIELLA, J.R., MEENAGHAN, M., CARTER, J.M. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomaterials*, vol. 3, n. 4, pp. 241-245, 1982.

BAIER, R.E., MEYER, A.E., NATIELLA, J.R., CARTER, J.M. Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res*, vol. 18, n. 4, pp. 327-355, 1984.

BANIA, P.J. Beta titanium alloys and their role in the titanium industry. *Journal of Metals*, vol. 46, n. 7, pp. 16-19, 1994.

BARLTROP, J.A., OWEN, T.C., CORY, A.H., CORY, J.G. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg & Med Chem Lett*, vol. 1, n. 11, pp. 611-614, 1991.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 228, n. 2-3, pp. 319-341, 2002.

BLOEBAUM, R.D., BACHUS, K.N., MOMBERGER, N.G., HOFMANN, A.A. Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants. *J Biomed Mater Res*, vol. 28, n. 5, pp. 537-544, 1994.

- BOBROVÁ, E. Production and properties of titanium powders using HDH-method. *Powder Metall*, vol. 32, pp.57-65, 1994.
- BOBYN, J.D., PILLIAR, R.M., CAMERON, H.U., WEATHERLY, G.C. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop*, vol. 150, pp. 263-270, 1980.
- BOBYN, J.D., PILLIAR, R.M., CAMERON, H.U., WEATHERLY, G.C., KENT, G.M. The effect of porous surface configuration on the tensile strength of fixation of implants by bone ingrowth. *Clin Orthop*, vol. 149, pp. 291-298, 1980.
- BOREFREUND, E., PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tissue Culture Meth*, vol. 9, pp. 7-9, 1984.
- BORNSTEIN, M.M., LUSSI, A., SCHMID, B., BELSER, U.C., BUSER, D. Early loading of nonsubmerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: 3-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 18, n. 5, pp. 659-666, 2003.
- BOWERS, K.T., KELLER, J.C., RANDOLPH, B.A., WICK, D.G., MICHAELS, C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 7, n.3, pp.302-10, 1992.
- BOYER, R.R. Aerospace applications of beta titanium alloys. *Jom-J Min Met Mat S*, vol. 46, pp. 20-23, 1994.
- BOZKAYA, D., MUFTU, S. Mechanics of the tapered interference fit in dental implants. *J Biomech*, vol. 36, n. 11, pp. 1649-1658, 2003.
- BRANEMARK, P.I., ADELL, R., BREINE, U., HANSSON, B.O., LINDSTROM, J., OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, vol. 3, n. 2, pp. 81-100, 1969.
- BRANEMARK, P.I., ADELL, R., ALBREKTSSON, T., LEKHOLM, U., LUNDKVIST, S., ROCKLER, B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*, vol. 4, n. 1, pp.25-28, 1983.
- BRUNETTE, D.M. The effect of surface topography on cell migration and adhesion. In: Surface characterization of biomaterials. Ratner BD. editor. New York: Elsevier Science Publishers B.V. 1988; 203-218.
- BUSER, D., SCHENK, R.K., STEINEMANN, S., FIORELLINI, J.P., FOX, C.H., STICH, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, vol. 25, n. 7, pp. 889-902, 1991.

- BUSER, D., NYDEGGER, T., OXLAND, T., COCHRAN, D.L., SCHENK, R.K., HIRT, H.P., SNETIVY, D., NOLTE, L.P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, vol. 45, n. 2, pp. 75-83, 1999.
- CAMERON, H.U., PILLIAR, R.M., MACNAB, I. The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *J Biomed Mater Res*, vol. 7, n. 4, pp. 301-11, 1973.
- CAMERON, H.U., PILLIAR, R.M., MACNAB, I. The rate of bone ingrowth into porous metal. *J Biomed Mater Res*, vol. 10, n. 2, pp. 295-302, 1976.
- CARBONARI, M. J. Desenvolvimento de vidros niobofosfato bioativos. Tese de doutoramento. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 121 páginas, 2004.
- CLEWOW, A.J., WEINSTEIN, A.M., KLAWITTER, J.J., KOENEMAN, J., ANDERSON, J. Interface mechanics of porous titanium implants. *J Biomed Mater Res*, vol. 15, n. 1, pp. 73-82, 1981.
- COELHO, P.G. Histomorphometric and Biomechanical Studies of a Surface Modified Ti-6Al-4V Implant. A thesis. 2002; University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama.
- COELHO, P.G., BOTTINO, M.C., SUZUKI, M. Biomateriales en implantodoncia – Aspectos Físicos, Químicos e Biológicos. In.: *Implantodoncia Contemporanea*. Todescan, F.F.; Bechelli, A.; Romanelli, H. Artes Médicas. 2005. pp. 497-519.
- COLLIER, J.P., COLLIGAN, G.A., BROWN, S.A. Bone ingrowth into dynamically loaded porous-coated intramedullary nails. *J Biomed Mater Res*, n. 7, pp. 485-492, 1976.
- COOK, S.D., THONGPREDA, N., ANDERSON, R.C., THOMAS, K.A., HADDAD, R.J. Jr, GRIFFIN, C.D. Optimum pore size for bone cement fixation. *Clin Orthop*, vol. 223, pp. 296-302, 1987.
- COOPER, L.F. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *J Prosthet Dent*, vol. 80, n. 4, pp. 439-49, 1998.
- CORDIOLI, G., MAJZOUB, Z., PIATELLI, A., SCARANO, A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: An experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 15, n. 5, pp. 668-674, 2000.
- CORNELL, C.N. & LANE, J.M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop*, vol. 355, suppl, pp. 267-273. 1998.
- DAVIDSON, J.A., MISHRA, A.K., KOVACS, P., POGGIE, R.A. New surface hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloy for total hip arthroplasty. *Bio-Medical Materials and Engineering*, vol. 4, pp. 231-243, 1994.

- DAVIES, J.E. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*, v. 11, n. 5, pp. 391-401, 1998.
- DEPORTER, D.A., WATSON, P.A., PHAROAH, M., TODESCAN, R., TOMLINSON, G. Ten-year results of a prospective study using porous-surfaced dental implants and a mandibular overdenture. *Clin Implant Dent Relat Res*, vol. 4, n. 4, pp. 183-9, 2002.
- DHERT, W.J.A., THOMSEN, P., BLOMGREN, A.K., ESPOSITO, M., ERICSON, L.E., VERBOUT, A.J. Integration of press-fit implants in cortical bone: A study on interface kinetics. *J Biomed Mater Res*, vol. 41, n. 4, pp. 574-583, 1998.
- DONACHIE, M.J. Titanium - a technical guide. OH. USA: ASM International, 1988.
- DONATH, K., BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*, vol. 11, n. 4, pp. 318-326, 1982.
- DONATH, K., LAASS, M., GÜNZL, H.J. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, vol. 420, n. 2, pp. 131-137, 1992.
- DUJOVNE, A.R., BOBYN, J.D., KRYGIER, J.J., MILLER, J.E., BROOKS, C.E. Mechanical compatibility of noncemented hip prostheses with the human femur. *J Arthroplasty*, vol. 8, n. 1, pp. 7-22, 1993.
- EINHORN, T.A. Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int*, vol. 51, n. 5, pp. 333-339, 1992.
- EISENBARTH E, VELTEN D, MULLER M, THULL R, BREME J. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*, vol. 25, n. 26, pp. 5705-5713, 2004.
- FROES, F.H. The production of low-cost titanium powders. *Journal of Metals*, vol. 50, n. 9, pp. 41-43, 1998.
- FROSCH, K-H., SONDERGELD, I., DRESING, K., RUDY, T., LOHMANN, C.H., RABBA, J., SCHILD, D., BREME, J., STUERMER, K.M. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res*, vol. 21, n. 2, pp. 213-223, 2003.
- FROST, H.M. In vivo impermeability of feathered bone to tetracyclines. *Henry Ford Hosp Med Bull*, vol. 8, pp. 225-227, 1960.
- FROST, H.M. "Bone histomorphometry: Analysis of trabecular bone dynamics", In.: Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. R.R. Recker (ed.), CRC Press, Boca Raton, 1983, 37-133.

- GARETTO, L.P., CHEN, J., PARR, J.A., ROBERTS, W.E. Remodeling dynamics of bone supporting rigidly fixed titanium implants: a histomorphometric comparison in four species including humans. *Implant Dent*, vol. 4, n. 4, pp. 235-243, 1995.
- GEETHA, M., MUDALI, U.K., GOGIA, A.K., ASOKAMANI, R., RAJ, B. Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy. *Corros Sci*, vol. 46, n. 4, pp. 877-892, 2004.
- GERMAN, R.M. Powder metallurgy science, Metal Powder Industry Federation, 1990.
- GIAVARESI, G., FINI, M., CIGADA, A., CHIESA, R., RONDELLI, G., RIMONDINI, L., TORRICELLI, P., ALDINI, N.N., GIARDINO, R. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials*, vol. 24, n. 9, pp. 1583-1594, 2003.
- GOODMAN, S.B., DAVIDSON, J.A., FORNASIER, L.V., MISHRA, A.K. Histological response to cylinders of low modulus titanium alloy (Ti-13Nb-13Zr) and a wear-resistant zirconium alloy (Zr-2,5Nb) implanted in the rabbit tibia. *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 4, pp. 331-339, 1993.
- GÖTZ, H.E., MÜLLER, M., EMMEL, A., HOLZWARTH, U., ERBEN, R.G., STANGL, R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*, vol. 25, n. 18, pp. 4057-4064, 2004.
- GRIZON, F., AGUADO, E., HURÉ, G., BASLÉ, M.F., CHAPPARD, D. Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *J Dent*, vol. 30, n. 5-6, pp. 195-203, 2002.
- GREENFIELD, E.J. inventor: Mounting of artificial teeth. US Patent Office, 478360, 1909.
- GROTH, T., FALCK, P., MIETHKE, R-R. Cytotoxicity of Biomaterials – Basic mechanisms and in vitro test methods: a review. *ATLA*, vol. 23, n. 6, pp. 790-799, 1995.
- HENCH, L.L. & WILSON, J. An Introduction to Bioceramic. Singapore: World Scientific, 1993. Cap 1, p.1-23 (Advanced Series in Ceramics 1).
- HENRIQUES, V.A.R. Obtenção da liga Ti-6%Al-7%Nb por metalurgia do pó. Tese de Doutorado (FAENQUIL), 122p, 2001.
- HENRIQUES, V.A.R., BELLINATI, C.E., SILVA, C.R.M. Production of Ti-6%Al-7%Nb alloy by powder metallurgy (P/M). *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 118, n. 1-3, pp. 212-215, 2001.
- HENRIQUES, V.A.R., CAIRO, C.A.A., SILVA, C.R.M., BRESSIANI, J.C. Microstructural evolution of Ti-13Nb-13Zr alloy during sintering. Proceedings of the Fourth International Latin-American Conference on Powder Technology. 2003; 49.

- HERMAN, H. Plasma spray deposition processes. *MRS bulletin*, vol. 12, pp. 60-67, 1988.
- HULBERT, S.F., YOUNG, F.A., MATHEWS, R.S., KLAWITTER, J.J., TALBERT, C.D., STELLING, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*, vol. 4, n. 3, pp. 433-56, 1970.
- IBSEN, K.H. & URIST, M.R. The biochemistry and the physiology of the tetracyclines: with special reference to mineralized tissues. *Clin Orthop*, vol. 32, pp. 143-169, 1964.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-1. 1993. Biological evaluation of medical devices. Part 1: Guidance on selection of tests.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5. 1993. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-6. 1993. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation.
- ITÄLA, A.I., YLANEN, H.O., EKHOLM, C., KARLSSON, K.H., ARO, H.T. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res*, vol. 58, n. 6, pp. 679-683, 2001.
- ITIN, V.I., GYUNTER, V.E., SHABALOVSKAYA, S.A., SACHDEVA, R.L.C. Mechanical properties and shape memory of porous nitinol. *Mater Charact*, vol. 32, n. 3, pp. 179-187, 1994.
- JINNO, T., GOLDBERG, V.M., DAVY, D., STEVENSON, S. Osseointegration of surface-blasted implants made of titanium alloy and cobalt-chromium alloy in a rabbit intramedullary model. *J Biomed Mater Res*, vol. 42, n. 1, pp. 20-29, 1998.
- JOHANSSON, C.B. & ALBREKTSSON, T. A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium and titanium implants in rabbit bone. *Clin Oral Impl Res*, vol. 2, n. 1, pp. 24-29, 1991.
- JONES, F.H. Gradient surface porosity in titanium dental implants: relation between processing parameters and microstructure. *Surface Science Reports*, vol. 42, pp. 75-145, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Guanabara Koogan. 8.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- KARAGIANES, M.T., WESTERMAN, R.E., RASMUSSEN, J.J. LODMELL, A.M. Development and evaluation of porous dental implants in miniature swine. *J Dent Res*, vol. 55, n. 1, pp. 85-93, 1976.

- KASEMO B, LAUSMAA J. *Metal selection and surface characteristics*. In: BRÅNEMARK, P-I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. (Eds). *Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence. 1985:99-116.
- KASEMO B, LAUSMAA J. Surface science aspects on inorganic biomaterials. *CRC Crit Rev Biocomp* 2, pp. 335-380, 1986.
- KEATING, J.F., MCQUEEN, M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br*, vol. 83, n. 1, pp. 3-8. 2001.
- KELLER, J.C., DRAUGHN, R.A., WIGHTMAN, J.P., DOUGHERTY, W.J., MELETIOU, S.D. Characterization of sterilized CP titanium implants surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 5, n. 4, pp. 360-367, 1990.
- KHAN, M.A., WILLIAMS, R.L., WILLIAMS, D.F. The corrosion behavior of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. *Biomaterials*, vol. 20, n. 7, pp. 631-637, 1999.
- KIENAPFEL H, SPREY C, WILKE A, GRISS P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty*, vol. 14, n. 3, pp. 355-68, 1999.
- KUJALA S, RYHANEN J, DANILOV A, TUUKKANEN J. Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials*, vol. 24, n. 25, pp. 4691-4697, 2003.
- KUJALA, S. Biocompatibility and biomechanical aspects of nitinol shape memory metal implants. Academic dissertation. University of Oulu. Oulu. 88 páginas. 2003.
- KURODA, D., NIINOMI, M., MORINAGA, M., KATO, Y., YASHIRO, T. Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials. *Mater Sci Eng A*, vol. 243, n. 1-2, pp. 244-249. 1998.
- KUTTY, M.G., BHADURI, S., BHADURI, S.B. Gradient surface porosity in titanium dental implants: relation between processing parameters and microstructure. *J Mater Sci-Mater M*, vol. 15, n. 2, pp.145-150. 2004.
- LARSSON, C., THOMSEN, P., LAUSMAA, J., RODAHL, M., KASEMO, B., ERICSON, L.E. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials*, vol. 15, n. 13, pp. 1062-1074, 1994.
- LELES, C.R. Princípios de bioestatística. In: *Metodologia Científica – Ensino e pesquisa em odontologia*. Estrela, C. Artes Médicas. 1991. pp. 276-305.
- LEMONS, J.E., BIDEZ, M.W. Endosteal Implant Biomaterials and Biomechanics. In: *Endosteal Dental Implants*. McKinney Jr, R.V. Saint Louis (Missouri): Mosby. 1991:27-36.

- LEMONS, J.E. Biomaterials, Biomechanics, Tissue Healing, and Immediate-Function Dental Implants. *J Oral Implantol*, vol. 30, n. 5, pp. 318-324, 2004.
- LI, J., LIAO, H., FARTASH, B., HERMANSSON, L., JOHNSON, T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials*, vol. 18, n. 9, pp. 691-696, 1997.
- LI, YONG-HUA., RONG, LI-JIAN, LI, YI-YI. Pore characteristics of porous NiTi alloy fabricated by combustion synthesis. *J Alloys Compd.* vol. 325, n. 1-2, pp. 259-262, 2001.
- LI, D.H., LIU, B.L., ZOU, J.C., XU, K.W. Improvement of osseointegration of titanium dental implants by a modified sandblasting surface treatment: an in vivo interfacial biomechanics study. *Implant Dent*, vol. 8, n. 3, pp. 289-294, 1999.
- LIFLAND, M.I., OKAZAKI, K. Properties of titanium dental implants produced by electro-discharge compaction. *Clin Mater*, vol. 17, n. 4, pp. 203-209, 1994.
- LONG, M., RACK, H.J. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. *Biomaterials*, vol. 19, n. 18, pp. 1621-1639, 1998.
- LOPES, C.C., KÖNIG, JR. B. Histological findings of bone remodeling around smooth dental titanium implants inserted in rabbit's tibias. *Ann Anat*, vol. 184, n. 4, pp. 359-362, 2002.
- LÓPEZ, M.F., GUTIÉRREZ, A., JIMÉNEZ, J.A. Surface characterization of new non-toxic titanium alloys for use as biomaterials. *Surf Sci*, vol. 482-485, n. 1, pp. 300-305, 2001.
- MARTENS, M., DUCHEYNE, P., DE MEESTER, P., MULIER, J.C. Skeletal fixation of implants by bone ingrowth into surface pores. *Arch Orthop Trauma Surg*, vol. 97, n. 2, pp. 111-116, 1980.
- MATSUNO, H., YOKOYAMA, A., WATARI, F., UO, M., KAWASAKI, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, vol. 22, n. 11, pp. 1253-1262, 2001.
- MELICAN, M.C., ZIMMERMAN, M.C., DHILLON, M.S., PONNAMBALAM, A.R., CURODEAU, A., PARSONS, J.R. Three-dimensional printing and porous metallic surfaces: a new orthopedic application. *J Biomed Mater Res*, vol. 55, n. 2, pp. 194-202, 2001.
- MITIKOV, M., BOZIC, D. Hydride-dehydride conversion of Ti-6Al-4V to powder form. *Mater Charact.* vol. 37, pp. 53-60, 1996.
- MIURA, F., MOGI, M., OHURA, Y., HAMANAKA, H. The super-elastic property of the Japanese NiTi alloy wire for use in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, vol. 90, n. 1, pp. 1-10, 1986.

- MOYEN, B.J., LAHEY, P.J. JR., WEINBERG, E.H., HARRIS, W.H. Effects on intact femora of dogs of the application and removal of metal plates. A metabolic and structural study comparing stiffer and more flexible plates. *J Bone Joint Surg Am*, vol. 60, n. 7, pp. 940-947, 1978.
- NIINOMI, M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 4, n. 5, pp. 445-454, 2003.
- NILLES, J.L., COLETTI, J.M. JR., WILSON, C. Biomechanical evaluation of bone-porous material interfaces. *J Biomed Mater Res*, vol. 7, n. 2, pp. 231-251, 1973.
- NISHIOKA, S., FUKUDA, K., TANAKA, S. Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E2. *Bone Miner*, vol. 21, n. 2, pp. 141-150, 1993.
- OH, IK-H, NOMURA, N., HANADA, S. Microstructures and Mechanical Properties of Porous Titanium Compacts Prepared by Powder Sintering. *Mater Trans*, vol. 43, n. 3, pp.443-446, 2002.
- OH IK-H, NOMURA N, HANADA S. Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scr Mater*, vol. 49. n. 12, pp. 1197-1202, 2003.
- OKAZAKI Y, RAO S, ITO Y, TATEISHI T. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials*, vol. 19, n. 13, pp. 1197-1215, 1998(a).
- OKAZAKI Y, RAO S, TATEISHI T, ITO T. Cytocompatibility of various metals and development of new titanium alloys for medical implants. *Mat Sci Eng A*. vol. 243, n. 1-2, pp. 250-256, 1998(b).
- OKAZAKI, Y., NISHIMURA, E., NAKADA, H., KOBAYASHI, K. Surface analysis of Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy after implantation in rat tibia. *Biomaterials*, vol. 22, n. 6, pp. 599-607, 2001.
- OKUNO, O., SHIBATA, N., MIURA, I. Pore structures and mechanical properties of the porous Zr-Ti implants. *Dent Mater J*, vol. 6, n. 2, pp. 175-184, 1987.
- OLEINICK, A.J. Osseointegration versus fibro-osseointegration: review of endosseous dental implant systems. *Gen Dent*, vol. 41, n. 5, pp. 406-408, 1993.
- PIATTELLI, A., DEGIDI, M., PAOLANTONIO, M., MANGANO, C., SCARANO, A. Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. *Biomaterials*, vol. 24, n. 22, pp. 4081-4089, 2003.
- PILLIAR, R.M. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by bone tissue ingrowth. *Clin Orthop*, vol. 176, pp. 42-51, 1983.

- PILLIAR, R.M., LEE, J.M., MANIATOPOULOS, C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clin Orthop*, vol. 208, pp. 108-113, 1986.
- PILLIAR, R.M. Porous-surfaced metallic implants for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res*, vol. 21, (A1 Suppl), pp. 1-33, 1987.
- PILLIAR, R.M., DEPORTER, D.A., WATSON, P.A., VALIQUETTE, N. Dental implant design--effect on bone remodeling. *J Biomed Mater Res*, vol. 25, n. 4, pp. 467-483, 1991.
- PULEO DA, NANCI A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, vol. 20, n. 23-24, pp. 2311-2321, 1999.
- PYPEN, C.M.J.M., DESSEIN, K., HELSEN, J.A., GOMES, M., LEENDERS, H., BRUIJN, J.D. Comparison of the cytotoxicity of molybdenum as powder and as alloying element in a niobium-molybdenum alloy. *J Mater Sci-Mater M*, vol. 9, n. 12, pp. 761-765, 1998.
- RAAB-CULLEN, D.M., AKHTER, M.P., KIMMEL, D.B., RECKER, R.R. Bone response to alternate-day mechanical loading of the rat tibia. *J Bone Miner Res*, vol. 9, n. 2, pp. 203-211, 1994.
- RAIMONDI, T. The in-vivo wear performance of prosthetic femoral heads with titanium nitride coating. *Biomaterials*, vol. 21, n. 9, pp. 907-913, 2000.
- ROBERTS, E.W., POON, L.C., SMITH, R.K. Interface histology of rigid endosseous implants. *J Oral Implantol*, vol. 12, n. 3, pp. 406-416, 1986.
- ROBERTSON, D.M., PIERRE, L., CHAHAL, R. Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials. *J Biomed Mater Res*, vol. 10, n. 3, pp. 335-344, 1976.
- ROGERS, S.D., HOWIE, D.W., GRAVES, S.E., PEARCY, M.J., HAYNES, D.R. In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J Bone Joint Surg Br*, vol. 79, n. 2, pp. 311-315, 1997.
- ROSA, A.L., BELOTI, M.M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Braz Dent J*, vol. 14, n. 1, pp. 16-21, 2003.
- ROVER, C.F.S., GUIMARÃES, P.R., FERRANTE, M. A redução do $TiCl_4$ pelo Mg na obtenção de esponja de titânio na usina piloto do CTA. *Metallurgia*, vol. 27, n. 158, pp. 11-18, 1971.
- SCHNEIDER, E., KINAST, C., EULENBERGER, J., WYDER, D., ESKILSSON, G., PERREN, S.M. A comparative study of the initial stability of cementless hip prostheses. *Clin Orthop*, vol. 248, pp. 200-209, 1989.

- SCHNEIDER SG. Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial. Tese de doutoramento. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 141 páginas, 2001.
- SEMIATIN, S.L., SEETHARAMAN, V., WEISS, I. The thermomechanical processing of alpha/beta titanium alloys. *Journal of Metals*, vol. 49, pp. 33-39, 1997.
- SHACKELFORD JF. Introduction to Materials Science for Engineers. New Jersey (Upper Saddle River). Prentice-Hall, Inc. 2000.
- SHIBATA, N. & OKUNO, O. Bone and fibrous tissue ingrowth into the porous Zr-Ti implants. *Dent Mater J*, vol. 6, n. 2, pp. 185-200, 1987.
- SIMMONS, C.A., VALIQUETTE, N., PILLIAR, R.M. Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasma spray-coated implants: An animal model study of early postimplantation healing response and mechanical stability. *J Biomed Mater Res*, vol. 47, n. 2, pp.127-138, 1999.
- SIMSKE, S.J., SACHDEVA, R. Cranial bone apposition and ingrowth in a porous nickel-titanium implant. *J Biomed Mater Res*, vol. 29, n. 4, pp. 527-533, 1995.
- SPECTOR, M., MICHNO, M.J., SMAROOK, W.H., KWIAKOWSKI, G.T. A high-modulus polymer for porous orthopedic implants: biomechanical compatibility of porous implants. *J Biomed Mater Res*, vol. 12, n. 5, pp. 665-677, 1978.
- SPECTOR, M., HARMON, S.L., KREUTNER, A. Characteristics of tissue growth into Proplast and porous polyethylene implants in bone. *J Biomed Mater Res*, vol. 13, n. 5, pp. 677-692, 1979.
- SPECTOR, M., MILLER, M., BEALS, N. Porous Materials. In: Webster, J.G. (ed) Encyclopedia of medical devices and instrumentation. vol. 1. A Wiley-interscience publication John Wiley & Sons, New York, pp. 2335-2341. 1988.
- SPENCE, A.P. *Anatomia humana básica*. Manole. 2.ed. São Paulo, Brasil, 1991.
- STEFLIK, D.E., HANES, P.J., SISK, A.L., PARR, G.R., SONG, M.J., LAKE, F.T., MCKINNEY, R.V. Transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations of the bone and osteocyte activity adjacent to unloaded dental implants placed in dogs. *J Periodontol*, vol. 63, n. 5, pp. 443-452, 1992.
- STEFLIK, D.E., CORPE, R.S., LAKE, F.T., YOUNG, T.R., SISK, A.L., PARR, G.R., HANES, P.J., BERKERY, D.J. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *J Biomed Mater Res*, vol. 39, n. 4, pp. 611-620, 1998.
- STRIETZEL R, HOSCH A, KALBFLEISCH H, BUCH D. In vitro corrosion of titanium. *Biomaterials*, vol. 19, n. 16, pp. 1495-1499, 1998.

SUMNER, D.R., BRYAN, J.M., URBAN, R.M., KUSZAK, J.R. Measuring the volume fraction of bone ingrowth: a comparison of three techniques. *J Orthop Res*, vol. 8, n. 3, pp. 448-452, 1990.

SUZUKI, K., AOKI, K., OHYA, K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*, vol. 21, n. 6, pp. 507-514, 1997.

SVEHLA, M., MORBERG, P., ZICAT, B., BRUCE, W., SONNABEND, D., WALSH, W.R. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res*, vol. 51, n. 1, pp. 507-514, 2000.

SZMUKLER-MONCLER, S., SALAMA, H., REINGEWIRTZ, Y., DUBRUILLE, J.H. Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature. *J Biomed Mater Res*, vol. 43, n. 2, pp. 192-203, 1998.

TADDEI, E.B., HENRIQUES, V.A.R., SILVA, C.R.M., CAIRO, C.A.A. Production of a new Titanium Alloy for Orthopedic Implants. *Mat Sci Eng C*, vol. 24, n. 5, pp. 683-687, 2004.

THIEME, M., WIETERS, K.P., BERGNER, F., SCHARNWEBER, D., WORCH, H., NDOP, J., KIM, T.J., GRILL, W. Titanium powder sintering for preparation of a porous functionally graded material destined for orthopaedic implants. *J Mater-Sci Mater Med*, vol. 12, n. 3, pp. 225-231, 2001.

THOMSEN, P., ERICSSON, L.E. Light and transmission electron microscopy used to study the tissue morphology close to implants. *Biomaterials*, vol. 6, n. 6, pp. 421-424, 1985.

THOMSEN, P., LARSSON, C., ERICSON, L.E., SENNERBY, L., LAUSMAA, J., KASEMO, B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci Mater Med*, vol. 8, n. 11, p. 653-665, 1997.

VALLET-REGI, M. Introduction to the world of biomaterials. *Anales de Quimica*, vol. 93, pp. S6-S14, 1997.

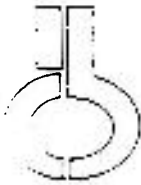
WANG, K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Material Science and Engineering A*, vol. 213, pp. 134-137, 1996.

WEINLAENDER, M. Bone growth around dental implants. *Dent Clin North Am*, vol. 35, n. 3, pp. 585-601, 1991.

WEINANS, H., HUISKES, R., van RIETBERGEN, B., SUMNER, D.R., TURNER, T.M., GALANTE, J.O. Adaptive bone remodeling around bonded noncemented total hip arthroplasty: a comparison between animal experiments and computer simulation. *J Orthop Res*, vol. 11, n. 4, pp. 500-513, 1993.

WELSH, R.P., PILLIAR, R.M., MACNAB, I. *J Bone Joint Surg Am*, vol. 53, n. 5, pp. 963-977, 1971.

- WEN, C.E., MABUCHI, M., YAMADA, Y., SHIMOJIMA, K., CHINO, Y., ASAHINA, T., MABUCHI, M. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scr Mater*, vol. 45, n. 10, pp. 1147-1153, 2001.
- WEN, C.E., YAMADA, Y., SHIMOJIMA, K., CHINO, Y., ASAHINA, T., MABUCHI, M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci-Mater M*, vol. 13, n. 4, pp. 397-401, 2002.
- WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T., ANDERSSON, B. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 8, n. 6, pp. 622-633, 1993.
- WENNERBERG A., ALBREKTSSON T., LAUSMAA J. Torque and histomorphometric evaluation of c.p. titanium screws blasted with 25- and 75-micronsized particles of Al₂O₃. *J Biomed Mater Res*, vol. 30, n. 2, pp. 251-260, 1996.
- WEVER, D.J., VELDHUIZEN, A.G., SANDERS, M.M., SCHAKENRAAD, J.M., van HORN, J.R. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, vol. 18, n. 16, pp. 1115-1120, 1997.
- WILLIAMS, B.E., KING, G.J., LIU, Z.J., RAFFERTY, K.L. Sequential histomorphometric analysis of regenerate osteogenesis following mandibular distraction in the rat. *Arch Oral Biol*, vol. 50, n. 5, pp. 497-506, 2005.
- WILLIAM, D. F. Biofuncionalidade e biocompatibilidade. Medical and Dental Materials. New York: VCH, 1992.
- WOJNAR, L., DABROWSKI, J.R., OKSIUTA, Z. Porosity structure and mechanical properties of vitallium-type alloy for implants. *Mater Charact*, vol. 46, n. 2-3, pp. 221-225, 2001.
- YOSHIMOTO, M. Resposta biológica de diferentes tratamentos de superfícies de implantes de titânio frente ao feixe vaso nervoso e ao tecido ósseo de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Tese de doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 150 páginas, 2004.
- YU, S.Y. & SCULLY, J.R. Corrosion and passivity of Ti-13Nb-13Zr in comparison to other biomedical implant alloys. *Corrosion*, vol. 53, n. 12, pp. 965-976, 1997.
- ZHANG, H., LIU, B., ZHANG, X. Titanium porous-surface screw implant. *J Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, vol. 30, n. 3, pp. 172-174, 1995.
- ZOU, X., LI, H., BÜNGER, M., EGUND, N., LIND, M., BÜNGER, C. Bone ingrowth characteristics of porous tantalum and carbon fiber interbody devices: an experimental study in pigs. *Spine J*, vol. 4, n. 1, pp. 99-105, 2004.




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br


CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 001 nas fls. 13 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Konig Junior, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Estudo da osteointegração da liga Ti-13Nb-13Zr obtida por metalurgia do pó**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Marcelo Yoshimoto, Marco Cícero M.Bottino**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.03.2005**.

São Paulo, 23 de março de 2005.



Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA



Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA