



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

## **ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NITRETO DE SILÍCIO**

**CECILIA CHAVES GUEDES E SILVA**

**Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor 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 BIOCOMPATIBILIDADE DE NITRETO DE SILÍCIO**

**CECILIA CHAVES GUEDES E SILVA**



**Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear – Materiais**

**Orientador:**

**Dr. José Carlos Bressiani**

**SÃO PAULO**

**2005**

À minha mãe, pelo amor e pela  
dedicação demonstrados ao  
longo de toda a minha vida

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Carlos Bressiani pela orientação e incentivo.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, por ter viabilizado a realização deste trabalho.

Ao Dr. Bruno König Jr., do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo acesso aos laboratórios, pela revisão do texto e pelas valiosas discussões.

Ao Dr. Marcelo Carbonari, do SIM – Sistemas de Implantes, pela ilimitada colaboração nas etapas do experimento “*in vivo*”, pelas discussões e pela amizade.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto e ao Dr. Sérgio Allegrini Jr., do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela realização da cirurgia.

Ao Dr. Nelson Adami Jr., do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela revisão do texto.

Aos colegas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, MSc. Fábio Nitri e MSc. Samuel Koo, pelo apoio nos laboratórios.

Aos técnicos de laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Sebastião Aparecido Boleta e Marta Maria da Silva Righett, pelo apoio na preparação das amostras para microscopia.

À Dra. Olga Higo, do Centro de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela realização dos testes de citotoxicidade e pelas discussões.

Ao MSc. Alfredo Abe, do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo, pelo apoio, compreensão, incentivo e amizade.

À Física Lea Sarita Montagna, do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo, pelo auxílio irrestrito nas análises de microscopia eletrônica de varredura e pela amizade.

Ao Dr. Thomaz Augusto Guisard Restivo, do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo, pelas análises de dilatométrica.

Ao Supervisor da Oficina Mecânica do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo II, Irênio Glória e ao Eng. Orlando Sanches pelo auxílio na preparação dos corpos de prova para as análises biológicas.

Aos amigos do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo, Dr. João Moreira, MSc. Gilson Mendonça, Dra. Nanami Kosaka, Eng. Vicente Ortega e Marcus Augusto Arnold, pela amizade e incentivo.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações e Serviços do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela esterilização dos corpos de prova.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela presteza e paciência.

Ao Dr. Frank Müller, da Universidade de Erlangen-Nuernberg (Alemanha), pela realização dos testes de solubilidade.

Ao Laboratório de Difração de Raios X do Departamento de Mineralogia e Geotectônica do Instituto de Geociências

Ao Flávio, pela compreensão e companheirismo nos momentos mais difíceis.

A minha irmã Daniela, pela amizade e incentivo.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NITRETO DE SILÍCIO

Cecilia Chaves Guedes e Silva

### RESUMO

Cerâmicas à base de nitreto de silício são fortes candidatas para aplicações biomédicas, principalmente como implantes ortopédicos e dentais, devido à sua estabilidade química e dimensional aliada à relativamente alta tenacidade à fratura, baixa taxa de desgaste e baixo coeficiente de atrito. Considerando essa combinação de propriedades, componentes de nitreto de silício obtidos por sinterização sem aplicação de pressão, foram investigados com relação à sua biocompatibilidade. Testes *“in vitro”* foram realizados a fim de se analisar a citotoxicidade do material e sua solubilidade em ambiente semelhante ao do organismo vivo (SBF – Simulated Body Fluid). A resposta do tecido ósseo na presença de implantes de nitreto de silício contendo os óxidos de ítrio, itérbio e alumínio como aditivos, bem como os processos de neoformação e remodelamento nas proximidades do implante foram avaliados por meio de experimentos em animais. A interface osso/implante foi analisada por diferentes técnicas analíticas e o processo de osteogênese pôde ser acompanhado por microscopia de fluorescência e estudos morfométricos. Os materiais estudados mostraram-se ser não citotóxicos e apresentaram baixa solubilidade quando imersos em SBF, sendo essa última análise influenciada pela composição da amostra. Os experimentos *“in vivo”* associados às análises histológicas demonstraram ausência de reações adversas nas proximidades do implante e crescimento ósseo na região da cortical da tíbia do coelho. Crescimento ósseo por condução foi observado em algumas lâminas analisadas, ocorrendo sempre que distância entre o implante e o endóstio era pequena. Dois tipos de interface entre o osso e o implante foram identificados. O primeiro deles foi caracterizado por tecido ósseo lamelar contendo osteócitos e osteonas e o segundo, por uma matriz não calcificada contendo osteoblastos. Um espaço entre o osso e o implante também foi notado em algumas regiões, sendo atribuído à preparação histológica das lâminas. Dentre as oito semanas nas quais os implantes foram mantidos nos animais, constatou-se por morfometria, que o processo de osteogênese foi mais intenso entre a quinta e a sexta semana. Os resultados demonstraram que nitreto de silício obtido de acordo com o procedimento seguido nesse trabalho é um material biocompatível.

## BIOCOMPATIBILITY STUDY OF SILICON NITRIDE

Cecilia Chaves Guedes e Silva

### ABSTRACT

The chemical and dimensional stability associated with the suitable fracture toughness, the low wear rates and the low friction coefficient make silicon nitride based-ceramics potential candidates for biomedical applications, mainly as orthopaedic and dental implants. Therefore, considering these combination of properties, silicon nitride components were investigated in relation to their biocompatibility. "*In vitro*" tests were carried out in order to evaluate the materials' cytotoxicity and their solubility in a medium similar to that in the live organism (SBF – Simulated Body Fluid). The tissue response for silicon nitride containing yttrium, ytterbium and aluminum oxides as aids, as well as the bone formation and remodeling processes were evaluated by means of animal experiments. The bone/implant interface was researched by different methods and the osteogenesis process might be observed by fluorescence microscopy and morphometric studies. The results showed that the studied materials are non cytotoxic and have low solubility when are immersed into SBF. The materials' solubility was influenced by their composition. The "*in vivo*" experiments associated with the histological analyses demonstrated the absence of adverse reactions close to the implant. In addition, the histological analyses showed that bone growth occurred preferentially in the cortical areas. The bone formation by conduction was also noted in some analyzed laminas when the distance between the implant and the endosteum was small. Two kinds of interface between the bone and the implant were identified. The first of them was characterized by lamellar bone tissue containing osteocytes and osteons while the second kind was formed by a non-calcified matrix containing osteoblasts. The gap found in some areas of the interface bone/implant of interface was attributed to the histological sections. The osteogenesis process was more favorable between the fifth and the sixth weeks while the implants were kept into the animals. The results demonstrated that silicon nitride obtained according the procedure used in this research is a biocompatible material.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Biocerâmicas.....	5
2.1.1. Cerâmicas Bioinertes: Alumina e Zircônia.....	6
2.1.2 Nitreto de Silício.....	10
2.1.2.1 Biocompatibilidade.....	10
2.1.2.2. Estrutura, Propriedades e Processamento.....	12
2.1.2.3. Tribologia do Nitreto de Silício.....	15
2.2. Resposta de Tecidos Duros aos Materiais Bioinertes.....	19
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.1 Materiais.....	23
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Preparação das Composições.....	24
3.2.1.1 Estudo de Densificação por Dilatometria.....	24
3.2.2 Preparação das Amostras de Composições SN1 e SN4.....	25
3.2.2.1 Compactação das Amostras.....	25
3.2.2.2 Sinterização.....	25
3.2.2.3 Caracterização das Amostras.....	26
3.2.2.3.1 Determinação da Densidade após Sinterização.....	26
3.2.2.3.2 Identificação das Fases por Difractometria de Raios X.....	26
3.2.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
3.2.2.3.4 Dureza e Tenacidade à Fratura.....	27
3.2.2.3.5 Testes de Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ”.....	28
3.2.2.3.6 Teste de Solubilidade.....	29
3.2.2.3.7 Biocompatibilidade “ <i>in vivo</i> ”.....	30
3.2.2.3.7.1 Preparação dos Corpos de Prova.....	30
3.2.2.3.7.2 Experimento em Animais.....	31
3.2.2.3.7.3 Preparação Histológica.....	33
3.2.2.3.7.4 Microscopia de Fluorescência.....	35
3.2.2.3.7.5 Morfometria.....	36

3.2.2.3.7.6 Microscopia de Luz (Azul de Toluidina).....	40
3.2.2.3.7.7 Microscopia de Luz de Polarização.....	41
3.2.2.3.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Estudo de Densificação por Dilatometria.....	43
4.2 Densidade após Sinterização.....	45
4.3 Fases Formadas após Sinterização.....	45
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
4.5 Dureza e Tenacidade à Fratura.....	49
4.6 Teste de Citotoxicidade “ <i>in vitro</i> ”.....	50
4.7 Teste de Solubilidade.....	51
4.8 Experimento em Animais.....	52
4.8.1 Microscopia de Fluorescência e Morfometria.....	52
4.8.2 Microscopia de Luz (Azul de Toluidina).....	61
4.8.3 Microscopia de Luz de Polarização.....	67
4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia.....	72
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1 Dilatometria.....	78
5.2 Microestrutura e Propriedades dos Materiais Estudados.....	79
5.3 Avaliações Biológicas “ <i>in vitro</i> ”.....	83
5.4 Avaliações Biológicas “ <i>in vivo</i> ”.....	84
6. CONCLUSÕES.....	90
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	92
8. ANEXOS.....	93
8.1 Certificado de Aprovação do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação no193/02.....	93
8.2 Área ( $\mu\text{m}^2$ ) de Osso Depositado Corada com Alizarina, Calceína e Tetraciclina....	95
8.3 Área Total ( $\mu\text{m}^2$ ) de Osso Depositado nas Quatro Regiões de Análise.....	100
8.4 Espectros Obtidos por EDS das Regiões de 1 a 7 Mostradas na Figura 33.....	102

9. GLOSSÁRIO DOS TERMOS BIOLÓGICOS.....	107
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Impressão Vickers gerada na superfície polida da amostra SN1 e observada por meio de MEV.....27
- Figura 2 - Amostras de nitreto de silício: 1) na forma inicial (barra); 2) após retífica e 3) após retífica e corte (nas dimensões específicas para o teste “*in vivo*”).....31
- Figura 3 - Implantes de nitreto de silício instalados no leito..... 33
- Figura 4 - Imagem obtida por microscópio estereoscópico de uma lâmina corada com azul de toluidina, mostrando as quatro regiões (R1, R2, R3 e R4) onde foram realizadas as mensurações morfométricas. CC = Cortical cirúrgica e CO = Cortical oposta.....36
- Figura 5 - (a): Micrografia de fluorescência do implante de nitreto de silício na região próxima à cortical cirúrgica, mostrando a deposição dos marcadores ósseos e (b): imagem da mesma região já tratada pelo programa IMAGE PRO PLUS 4.1: cor amarela = alizarina; cor azul = calceína; cor vermelha = tetraciclina. I = Implante.....37
- Figura 6 - Curvas de densificação obtidas por dilatométrica das amostras com as composições mostradas na Tabela 2. As Figuras 6a e 6b mostram a retração linear e a taxa de retração linear em função da temperatura para as composições contendo os óxidos de itérbio e de alumínio. As Figuras 6c e 6d mostram a retração linear e a taxa de retração linear em função da temperatura para as composições contendo os óxidos de ítrio e de alumínio. As curvas de densificação para a amostra SN1, que contém os três aditivos estudados estão mostradas nas Figuras 6a e 6b..... 44
- Figura 7 - Difrátograma de raios X do centro e da margem das amostras (a) SN1 (b) SN4, onde b é a fase  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Y é a fase Y<sub>3</sub>AlSi<sub>2</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>.....46
- Figura 8 - Micrografias eletrônicas de varredura por elétrons retroespalhados da superfície polida de amostras de composições (a) SN1 e (b) SN4, mostrando

as fases presentes. A fase preta são os poros, a fase cinza são os grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  e a fase mais clara é a fase secundária resultante da reação dos aditivos com a sílica da superfície do pó de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .....47

Figura 9 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície polida e atacada de amostras de composições (a) SN1 e (b) SN4, mostrando a distribuição e a forma dos grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ ..... 48

Figura 10 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície polida e atacada de uma amostra de composição SN1, mostrando a deflexão de uma trinca (seta) entre os grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ . A trinca foi induzida por meio de um indentador Vickers... 49

Figura 11 - Curva de supressão de colônias de amostras de nitreto de silício sinterizadas..... 50

Figura 12 - Micrografias de fluorescência da Região 1 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante (seta). A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante.....54

Figura 13 - Micrografias de fluorescência da Região 2 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante (seta). A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante..... 55

Figura 14 - Micrografias de fluorescência da Região 3 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante (seta). A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante.....56

Figura 15 - Micrografias de fluorescência da Região 4 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante (seta). A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante.....57

- Figura 16 - Micrografias de fluorescência da região da medular de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando a neoformação óssea. Observam-se “pontes ósseas”, contato direto osso/implante (setas na Figura b) e um espaço entre o osso e o implante (cabeça de seta ➤). C = calceína, I = implante, M = cavidade medular..... 60
- Figura 17 - Micrografia de fluorescência da região da medular mostrando a neoformação óssea, o contato direto osso/implante e a presença de calceína sobre a superfície endostal. C = calceína, T = tetraciclina, I = implante, M = cavidade medular..... 61
- Figura 18 – Ilustração obtida por microscópio estereoscópico de uma lâmina corada com azul de toluidina. Observa-se a formação óssea em torno do implante de nitreto de silício (SN1). O implante (I) se destacou durante a preparação. M = cavidade medular.....62
- Figura 19 - Micrografia óptica mostrando o remodelamento ósseo em torno do implante de nitreto de silício (I) na região da cortical cirúrgica. As setas vermelhas e brancas estão indicando a interface contendo um tecido não mineralizado e um contato ósseo direto, respectivamente. Pode-se observar o endóstio (E) e a cavidade medular (M).....63
- Figura 20 - Micrografia óptica da região da medular, mostrando contato direto entre o osso e o implante de nitreto de silício (I). Observa-se também a presença de osteócitos (Oc) próximos à superfície do implante.....63
- Figura 21 - Micrografia óptica da interface osso/implante. (a) Observa-se a neoformação óssea na região da medular onde se pode verificar, osteonas (Os), osteócitos (Oc) e a linha clamentante (LC), separando o osso novo do osso antigo. (b) Micrografia da região marcada em vermelho na Figura 21a, em maior aumento, mostrando a presença da matriz de osteóide (Ot) e da fileira de osteoblastos (Ob) entre o osso e o implante (I). O implante despreendeu-se durante a preparação..... 65
- Figura 22 - (a) Micrografia da região próxima à superfície do implante SN1 (I), mostrando a presença de osteonas (Os) e osteócitos (Oc). (b) e (c) micrografias em

- maiores resoluções da mesma região, onde pode-se notar os detalhes dos sistemas de osteonas. Canaliculos (C), canal de osteona (CH) e a linha cimentante (LC)..... 66
- Figura 23 - Ilustração obtida por microscópio estereoscópico de luz de polarização mostrando o padrão das fibras colágenas em toda a cortical e próximas à superfície do implante de nitreto de silício (I). Observa-se a cavidade medular (M)..... 67
- Figura 24 - Ilustração da mesma lâmina da Figura 23, mostrando a distribuição das fibras colágenas na região da cortical oposta. M = cavidade medular, I = implante e PO = ponte óssea. E = Endóstio.....68
- Figura 25 - Micrografia de luz de polarização de uma secção de um implante de nitreto de silício evidenciando o osso neoformado (R) e a compacta original (O). Observa-se a presença de osteonas (Os)..... 69
- Figura 26 - Micrografia de luz de polarização mostrando as diferentes birrefringências exibidas pelas osteonas. Os = osteona, Oc = osteócito e I = implante..... 70
- Figura 27 - Micrografia de luz de polarização de uma lâmina corada pelo método do picro sirius, mostrando neoformação óssea por condução (R) nas proximidades com o implante (I) e a compacta original (O). Verifica-se as osteonas (Os) e os diferentes tipos de colágeno: colágeno do tipo I corado em amarelo e vermelho e colágeno do tipo III corado em verde..... 71
- Figura 28 - Micrografia de luz de polarização de uma lâmina corada pelo método do picro sirius, mostrando o contato da superfície do implante com o colágeno do tipo I (amarelo ou vermelho) e com o colágeno de tipo III (verde). O = compacta original; R = tecido ósseo neoformado; Os = osteona; E = endóstio; M = cavidade medular e I = implante..... 72
- Figura 29 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando dois implantes de nitreto de silício instalados na região proximal (à esquerda) e na região distal (à direita) da tíbia do coelho. M = cavidade medular..... 73

- Figura 30 - Micrografia eletrônica de varredura do mesmo implante de nitreto de silício instalado na região proximal da tíbia, mostrado na Figura 29. Observa-se os forames nutritivos (setas brancas). A seta preta mostra a região onde se realizou a análise por EDS. I = implante, O = osso novo..... 73
- Figura 31 - Micrografias eletrônicas de varredura dos mesmos implantes de nitreto de silício mostrados na Figura 29, mostrando a região apical. (a) implante instalado na região proximal e (b) implante instalado na região distal. Em (b) observa-se uma “ponte” óssea a partir da cortical em direção ao implante. CO = cortical oposta..... 74
- Figura 32 - Micrografia eletrônica de varredura da interface osso/implante, mostrando as fibras colágenas presentes nessa região..... 75
- Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados de uma lâmina polida, mostrando a interface osso/implante. Os números de 1 até 7 indicam as regiões onde foram realizadas as análise química pontuais. I = implante, Oc = osteócitos..... 76
- Figura 34 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando os sítios dos osteoclastos (setas) na interface osso/implante..... 77
- Figura 35: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 1 da Figura 33. A Figura b mostra o espectro (a) ampliado, onde se pode observar a presença dos elementos Y, Yb e Al..... 102
- Figura 36: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 2 na Figura 33 A Figura b mostra o espectro (a) ampliado, onde se pode observar a presença dos elementos Y, Yb e Al e Ca..... 103
- Figura 37 - Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 3 da Figura 33..... 104
- Figura 38 - Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 4 da Figura 33..... 104

Figura 39 - Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 5 da Figura 33.....	105
Figura 40 - Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 6 da Figura 33.....	105
Figura 41 - Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 7 da Figura 33.....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área de superfície específica e diâmetro médio equivalente dos materiais de partida utilizados para a produção das amostras de nitreto de silício.....	23
Tabela 2 - Composições dos materiais estudados (% massa).....	24
Tabela 3 - Série de álcoois usados para desidratação das amostras contendo o osso e o implante de nitreto de silício.....	33
Tabela 4 - Procedimento para inclusão das amostras contendo osso e implante de nitreto de silício para posterior corte.....	34
Tabela 5 - Seqüência de injeção dos marcadores fluorescentes (RAHN, 1976).....	35
Tabela 6 - Análises estatísticas realizadas nos dados obtidos por meio da quantificação de osso neoformado realizada com o programa de computador IMAGE PRO PLUS 4.1.....	39
Tabela 7 - Densidade das amostras após sinterização ( $\rho$ ) e em relação à densidade teórica ( $\rho_T$ ).....	45
Tabela 8 - Dureza Vickers ( $H_V$ ) e tenacidade à fratura ( $K_{Ic}$ ) das amostras sinterizadas....	50
Tabela 9 - Teor de silício presente nas soluções geradas pela incubação de amostras de composições SN1 e SN4 em SBF por diferentes períodos de tempo.....	51
Tabela 10 - Comparação entre os postos médios das quantidades de osso depositado em $\mu\text{m}^2$ definidas pelos três marcadores teciduais (Teste de Kruskal-Wallis).....	58
Tabela 11 - Comparação múltipla entre os postos médios das quantidades de osso depositado determinadas pelos marcadores teciduais (Teste de Dunn).....	58

Tabela 12 - Comparação entre os postos médios das quantidades de osso depositado em $\mu\text{m}^2$ nas quatro regiões de análise (Teste de Kruskal-Wallis).....	58
Tabela 13 – Elementos presentes nas regiões indicadas na Figura 33.....	77

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A – Alizarina
- ANOVA – Análise de Variância
- ATTC - American Tissue Type Collection
- C – Calceína ou Canalículos
- c - Semi-diagonal da impressão Vickers + o comprimento da trinca
- CC – Cortical Cirúrgica
- CHO – Chinese Hamster Ovary
- CMC-Na – Carboxymethyl cellulose sodium salt
- CO – Cortical Oposta
- d – Diagonal da impressão Vickers
- E – Endósteo
- E - Módulo de Young
- EDS - Espectroscopia por Dispersão de Energia
- EP – Erro Padrão
- FC – Fator de correção para a estatística do teste de Kruskal-Wallis
- gl – graus de liberdade
- GPSSN – Gas Pressure Sintering Silicon Nitride
- H – estatística do teste de Kruskal-Wallis
- $H_{\text{corrig}}$  – Estatística do teste de Kruskal-Wallis corrigida em função dos postos empatados
- HIP – Hot Isostatic Pressing
- HIPSN – Hot Isostatic Pressed Silicon Nitride
- HPSN – Hot-Pressed Silicon Nitride
- $H_V$  – Dureza Vickers
- I – Implante
- IBM – International Business Machine
- $IC_{50(\%)}$  – Índice de citotoxicidade
- ICP-OES – Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy
- ISO – International Standarding
- k – número de grupos experimentais
- $K_{Ic}$  = Tenacidade à Fratura
- LC – Linha cimentante
- M – Cavidade medular
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- N – número total de indivíduos

$n_i$  – tamanho de cada amostra

O – compacta original

Ob – Osteoblasto

Oc – Osteócito

Os – Osteona

Ot – Osteóide

P - Carga aplicada no teste de Dureza Vickers

PEUAPM – Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular

PO – Ponte óssea

Q – estatística do teste de Dunn

R – Tecido ósseo remodelado

RBSN – Reaction Bonded Silicon Nitride

$R_i$  – soma dos postos em cada amostra

$\bar{R}_i$  - Postos médios

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

FCS –Fetal Calf Serum

SBF – Simulated Body Fluid

SN1 – Composição contendo 91 % em peso de  $Si_3N_4$ , 3 % em peso de  $Al_2O_3$ , 3 % em peso de  $Y_2O_3$  e 3 % em peso de  $Yb_2O_3$

SN2 - Composição contendo 90 % em peso de  $Si_3N_4$ , 4 % em peso de  $Al_2O_3$  e 6 % em peso de  $Y_2O_3$

SN3 - Composição contendo 90 % em peso de  $Si_3N_4$ , 4 % em peso de  $Al_2O_3$  e 6 % em peso de  $Yb_2O_3$

SN4 - Composição contendo 90 % em peso de  $Si_3N_4$ , 6 % em peso de  $Al_2O_3$  e 4 % em peso de  $Y_2O_3$

SN5 - Composição contendo 90 % em peso de  $Si_3N_4$ , 6 % em peso de  $Al_2O_3$  e 4 % em peso de  $Yb_2O_3$

SRBSN – Sintered after Reaction Bonding Silicon Nitride

SSN – Sintered Silicon Nitride

t – número de postos empatados

T – Tetraciclina

THR – Total Hip Replacement

WMW – Wilcoxon-Mann-Whitney

Y-TZP – Ytria-Tetragonal Zirconia Polycrystal

$\alpha$  - nível de significância

$\chi^2$  – Qui-quadrado

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com WILLIAMS (1987), o termo biomaterial se refere à qualquer substância, sintética ou natural quanto à origem, que pode ser utilizada de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Os biomateriais podem ser utilizados ainda como um material não biológico que interage com sistemas biológicos, como por exemplo os dispositivos médicos.

A combinação de propriedades, incluindo propriedades químicas, mecânicas, físicas e biológicas é a característica que diferencia os biomateriais dos demais, tornando-os hábeis para utilização em ambientes biológicos de forma confiável e eficiente. Essa característica, denominada de biocompatibilidade, foi definida por WILLIAMS (1973) como “a capacidade de um material de desempenhar uma resposta apropriada em uma função específica”. Outra interpretação do termo biocompatibilidade foi fornecida por RATNER (1993) como sendo “a exploração pelos materiais das proteínas e das células do corpo, para encontrar um objetivo específico”. A justificativa dada pelo autor para essa última definição é que tanto as proteínas interfaciais, como os processos celulares, influenciam à biocompatibilidade dos materiais.

Os biomateriais podem ser classificados em dois grupos. O primeiro deles está relacionado com substituições do tecido duro, como é o caso dos metais e das cerâmicas, e estão envolvidos na Ortopedia e na Implantodontia. O segundo grupo inclui os materiais que substituem o tecido mole - os polímeros – e estão freqüentemente associados a cirurgias plásticas e cardiovasculares. Entretanto, na prática, essa classificação está longe de ser ideal, uma vez que uma prótese pode conter diferentes tipos de materiais, como é o caso de uma válvula cardíaca que pode ser fabricada por polímeros e metais, enquanto uma articulação artificial de quadril pode também ser composta de metais, polímeros e cerâmicas (RATNER, 1996).

Uma maneira satisfatória de classificar os biomateriais considera sua interação com o tecido vivo. Há materiais que são indiferentes quando estão em contato com o tecido, podem ser essencialmente inertes no corpo, mas não apresentam efeitos negativos nem positivos. Esses materiais são denominados de bioinertes. Outros materiais quando instalados no corpo reagem com o tecido vivo formando ligações químicas com sua interface, sendo chamados de bioativos. E por fim, há os materiais reabsorvíveis que são aqueles que são substituídos lentamente pelo tecido vivo após um certo período de tempo (WILLIAMS, 1987a).

Considerando os biomateriais utilizados para reparação do tecido duro, pode-se utilizar uma classificação que está relacionada com o processo de osteogênese. Quando, na presença do implante, o osso novo se forma a partir da superfície do osso pré-existente, o biomaterial instalado é denominado de osteocondutor. Entretanto, se a osteogênese ocorre na interface osso/implante sem que necessariamente haja osso pré-existente, o biomaterial é denominado de osteoindutor (WILLIAMS, 1987a). Há materiais que são capazes de sustentar crescimento ósseo até sua superfície, promovendo um contato direto entre o osso e o implante. Esse processo, denominado de osteointegração, foi introduzido por BRÅNEMARK et al. (1969).

A seleção do tipo ou combinação de materiais para a execução de uma determinada função biológica deve considerar, além das propriedades, seu comportamento no ambiente biológico. Biomateriais metálicos, por exemplo, têm como principal aplicação em implantes temporários, cuja função é auxiliar na recuperação de lesões ósseas, funcionando como sustentação ou mesmo como substituto da parte óssea removida. Ligas metálicas também são extremamente utilizadas na Odontologia, na substituição de raízes dentais, no rearranjo das posições dos dentes e no preenchimento de cavidades dentais após sua perfuração para remoção de cárie. Na Ortopedia, ligas de titânio, Cr-Co-Mo e aço inoxidável têm sido usadas em próteses de quadril e de joelho (RAVAGLIOLI et al., 1991).

Os polímeros também apresentam grande importância como biomateriais, sendo muito usados em bolsas de sangue, seringas, lentes de contato e catéteres. A utilização de polimetilmetacrilato (PMMA) e polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) têm sido constante na Ortopedia, funcionando como cimento ósseo para fixação de próteses e na substituição do componente acetabular do quadril (RATNER, 1996).

Dentre os materiais utilizados para implantes, as cerâmicas têm se destacado por apresentarem boas propriedades mecânicas, alta resistência química e, em alguns casos, biocompatibilidade. Cerâmicas empregadas para esse fim são denominadas *biocerâmicas*, podendo ser bioativas (hidroxiapatita e biovidro), bioinertes (alumina, zircônia e cerâmicas carbonosas) ou reabsorvíveis (fosfatos de cálcio) (HENCH, 1998).

As cerâmicas bioinertes têm suas aplicações principais na Implantodontia e na Ortopedia, especialmente na substituição de articulações. Em ambos os casos, a biocerâmica deve apresentar propriedades mecânicas adequadas para suportar as cargas a que será submetida durante o trabalho. Em aplicações ortopédicas, devem-se ainda considerar as propriedades tribológicas do material de maneira a minimizar a liberação de partículas de desgaste dentro do corpo do paciente. A alumina ( $Al_2O_3$ ) é a cerâmica bioinerte mais utilizada, em virtude de sua excelente biocompatibilidade, estabilidade química e dimensional, alta resistência ao desgaste e baixo custo. Entretanto, esse material apresenta limitações devido a sua baixa tenacidade à fratura e alto módulo de Young, o que pode levar a falhas catastróficas dos implantes (HENCH, 1991).

Diferentes materiais vêm sendo estudados para substituir a alumina principalmente em próteses ortopédicas. A zircônia ( $ZrO_2$ ), por exemplo, parecia ser um material promissor para tais aplicações devido a sua alta resistência à flexão e alta tenacidade à fratura (CHRISTEL et al., 1989). Porém, as altas taxas de fratura de próteses fabricadas por esse óxido têm levado pesquisadores a duvidarem de seu desempenho clínico (HUMMER et al., 1995; Wrigt Medical Technology, 2002).

A busca por um material que possa substituir a alumina de forma apropriada tem sido constante, sendo o *nitreto de silício* ( $Si_3N_4$ ) um possível candidato. Essa cerâmica é capaz de apresentar melhor comportamento mecânico que a alumina e é a preferida para aplicações de alto desempenho (como ferramentas de corte, rolamentos e componentes de motores), em virtude de sua alta resistência ao desgaste, ao choque térmico, e às relativamente altas resistências mecânica e tenacidade à fratura (KUE et al., 1999).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o desempenho biológico de nitreto de silício contendo óxidos de ítrio, itérbio e alumínio como aditivos. Testes *“in vitro”* foram realizados a fim de se analisar a citotoxicidade do material e sua solubilidade em ambiente semelhante ao do organismo vivo (SBF – Simulated Body Fluid). Experimentos em animais possibilitaram estudar a osteointegração do nitreto de silício, pela verificação

da reação do tecido vivo na sua presença, bem como da neoformação e do remodelamento ósseo, após implantação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biocerâmicas

De um modo geral, as biocerâmicas são aplicadas como implantes em tecido duro do sistema músculo-esqueleto, tais como os ossos e os dentes. O mecanismo de fixação no tecido está diretamente relacionado ao tipo de resposta do tecido na interface com o implante. Nenhum material implantado em tecidos vivos é inerte, todos eles apresentam uma resposta diferente que permite diversas formas de serem fixados no sistema músculo-esqueleto. Como já mencionado no Item 1, as biocerâmicas podem ser classificadas como bioativa, reabsorvível ou bioinerte, de acordo com a maneira na qual a é fixada ao tecido (HENCH, 1998).

As cerâmicas bioativas formam ligações interfaciais com o tecido vivo, sendo os biovidros e a hidroxiapatita os exemplos mais comuns desses materiais (HENCH, 1998; KASUGA et al., 1999; CARBONARI, 2003). Já as cerâmicas reabsorvíveis, como por exemplo os fosfatos de cálcio, são substituídas lentamente pelo osso (PANJIAN et al., 1991).

As cerâmicas são ditas bioinertes quando são biologicamente inativas, ou seja, quase inertes. Nesse caso, o organismo desenvolve um tecido fibroso na interface com o tecido circunjacente, cuja espessura depende, dentre outros fatores, da carga aplicada sobre o implante durante o período de cicatrização. Se, nesse período, o implante for solicitado de forma que algum movimento ocorra na interface com o tecido, a cápsula fibrosa pode atingir uma espessura de centenas de micrometros, causando a falha do implante (HENCH, 1998).

Uma das principais vantagens das biocerâmicas em comparação aos demais biomateriais está na possibilidade de serem constituídas de elementos que são comuns aos ambientes biológicos. Além disso, algumas de suas propriedades, tais como condutividade térmica, densidade e cor, podem ser controladas por meio de seu processo de fabricação (LEMONS, 1996).

As biocerâmicas são também utilizadas como interface inerte a fim de modificar as características da superfície ou funcionar como uma barreira entre materiais estranhos e tecidos (LEMONS, 1996). Filmes finos de cerâmicas, como por exemplo de TiN, são usados como recobrimentos em próteses de ligas de titânio e de aço 316L, a fim de aumentar a dureza superficial, a resistência ao desgaste e limitar a liberação de partículas devido à corrosão (HÜBLER, 1999).

### **2.1.1 Cerâmicas Bioinertes: Alumina e Zircônia**

As cerâmicas bioinertes são bastante apreciadas por serem estáveis ao longo de todo o período de sua aplicação, por exibirem excelente biocompatibilidade, alta resistência à corrosão, alta resistência ao desgaste, suficiente resistência mecânica e por não produzirem efeitos citotóxicos (AGATHOPOULOS et al., 1996; FREDEL et al., 1996). Essas propriedades minimizam danos devido ao uso, e conseqüentemente, as falhas catastróficas dos implantes.

O exemplo mais comum de cerâmicas bioinertes é a alumina cuja principal aplicação clínica está nas substituições de quadril e de joelho. Para tais aplicações, as cerâmicas à base de alumina devem apresentar altas propriedades tribológicas que são atingidas pelo uso de  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> policristalina com uma distribuição estreita de tamanhos de grão menores que 4  $\mu$ m. MgO é utilizado como aditivo para limitar o crescimento de grão durante a sinterização (HENCH, 1998).

A utilização das cerâmicas à base de alumina na substituição de componentes de articulações foi introduzida por BOUTIN (1971), cujo interesse inicial foi justificado pelo baixo coeficiente de atrito do óxido, quando comparado com o dos metais, minimizando a liberação de partículas de desgaste.

Após a primeira aplicação da alumina em artroplastia total de quadril (THR – Total Hip Replacement), sua utilização se tornou comum como cabeça femoral articulando contra acetábulo de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM). Dessa forma, o termo “cerâmica “ em Ortopedia se refere às cerâmicas de alumina (WILLMANN, 2001).

Com o tempo, pesquisas mostraram que o sucesso dos pares alumina/PEUAPM em THR estava limitado ao desgaste do componente acetabular de PEUAPM. Assim, próteses com componentes acetabular de PEUAPM e femoral de alumina estão dando lugar aos pares alumina/alumina, por resultarem em menor coeficiente de atrito e em menor taxa de desgaste (ZHOU et al., 1997, MARTI, 2000). Já na década de 70, estudos relataram que a razão de desgaste de pares alumina/alumina em relação ao desgaste de alumina/PEUAPM é de 1:10 (BOUTIN, 1972).

O grande sucesso atingido pela alumina em pares cabeça femoral/componente acetabular em THR se deve, então, ao excelente desempenho clínico dessa cerâmica que está baseado na sua estabilidade dimensional, inércia química e na ausência de reações adversas aos tecidos (HENCH, 1998; BÉGIN-COLIN et al., 1998; PICONI et al., 1999; HEIMKE et al., 2002).

Além de ser freqüentemente utilizada em THR, a alumina pode ser aplicada na reconstrução maxilofacial, em parafusos ósseos, e em raízes dentais (HENCH, 1998). O Japão foi o primeiro país a usar a alumina como implante ósseo e como pinos ou parafusos de fixação óssea em cirurgia ortopédica (MART, 2000).

Foi também no Japão, em 1975, que os primeiros implantes endósseos de safira foram utilizados para substituições dentais (SCLAROFF et al., 1990).

Ainda que a alumina apresente biocompatibilidade comprovada em implantes dentais (AKAGAWA et al., 1986; HASHIMOTO et al., 1988; ANNEROHT et al., 1990), inclusive estabelecendo contato ósseo direto em sua superfície, falhas de implantes constatadas poucos meses após a instalação nos pacientes são factíveis de ocorrer em função da baixa tenacidade à fratura do material (ANNEROHT et al., 1990).

Falhas nas próteses de alumina têm sido observadas como consequência do seu elevado módulo de Young, que chega a ser 10 vezes maior que o do osso cortical (7-25 GPa) (HENCH, 1998). Porém, a principal limitação para o uso de componentes dessa cerâmica está em seu comportamento frágil, característico de materiais cuja

microestrutura não oferece mecanismos de tenacificação. Como resultado de tal comportamento, a taxa de falhas de cabeças femorais de alumina na década de 70 foi altíssima, chegando até 14 %, diminuindo apenas após a introdução da norma ISO 6474 em 1981. A produção de cabeças femorais de alumina, sem obedecer às características especificadas pela norma ISO 6474, resulta em falhas constantes desses componentes (PICONI et al., 1999).

Adicionalmente, a baixa resistência à flexão e a baixa tenacidade à fratura da alumina impedem seu uso em cabeças femorais com diâmetro menor que 22 mm. Tal limitação inviabiliza a aplicação da cerâmica em pacientes de baixa estatura que, pela sua própria anatomia, podem vir a necessitar de próteses menores (TEOH, 2000).

Diferentes materiais cerâmicos vêm sendo estudados e até desenvolvidos a fim de superar as limitações e falhas das próteses causadas pela baixa tenacidade à fratura da alumina, como por exemplo o  $ZrO_2$  (AGATHOPOULOS et al., 1996) e o compósito  $Al_2O_3-TiN$  (BÉGIN-COLIN et al., 1998).

Entre os vários mecanismos de tenacificação, aqueles relacionados à transformação de fase das partículas de zircônia têm se mostrado particularmente eficientes. CHIRSTEL et al. (1989) realizaram um estudo sobre (i) o comportamento mecânico de cerâmicas à base de zircônia com relação ao seu uso como cabeças de articulação de quadril e (ii) a resposta do tecido a curto prazo para zircônia parcialmente estabilizada com ítria (Y-TZP) em comparação com alumina. Para os testes *“in vivo”*, os implantes foram instalados nos músculos da região lombar de ratos. Os resultados mostraram que o material é viável para aplicação em cabeças de fêmur nas próteses de quadril, pois exibem uma tenacidade à fratura variando de 9 a 10  $MPa \cdot m^{1/2}$  e uma maior resistência à flexão (de 900 a 1200 MPa) que a alumina (cerca de 400 MPa), associada ao menor módulo de Young (200 GPa para a zircônia contra 350 GPa a alumina). Além disso, os estudos *“in vivo”* mostraram que, após 12 semanas de implantação, Y-TZP apresenta um comportamento semelhante ao da alumina.

Vários experimentos *“in vivo”* demonstraram que a zircônia apresenta boa compatibilidade com o tecido, indicando que é um material biocompatível (ICHIKAWA, et al., 1992; AKAGAWA et al., 1993; AKAGAWA et al., 1998; SCARANO et al., 2003).

Um outro atrativo da zircônia para aplicações dentais está em sua cor marfim, similar a cor do dente natural (ICHIKAWA, et al., 1992), o que a torna útil em áreas estéticas críticas da boca (AHMAD, 1998).

Na década de 90, discussões sobre radioatividade dos produtos de zircônia foram freqüentes, devido à presença de urânio e tório na matéria prima. Hoje, a pureza dos pós é elevada, sendo as máximas concentrações de elementos radioativos limitadas a 200 Bq/kg, não representando qualquer risco à saúde do paciente (MART, 2000).

Com base em sua constatada biocompatibilidade associada às propriedades mecânicas mais adequadas a substituições ósseas que a alumina, as cerâmicas de zircônia estabilizada com ítria (Y-TZP) foram introduzidas na Ortopedia nos últimos 20 anos como o biomaterial cerâmico da nova geração. A ISO 13356 padronizou os requisitos químicos e físicos para Y-TZP como um material para aplicações biomédicas. Entretanto falhas observadas em próteses de zircônia, demonstraram que o desempenho clínico desse material não é tão satisfatório quanto parecia inicialmente.

Fraturas nas próteses de zircônia estão associadas à própria transformação de fase que foi o primeiro fator que atraiu a atenção dos pesquisadores para sua utilização como biocerâmica. Mesmo com a adição do óxido de ítrio que estabiliza a estrutura cristalina tetragonal da zircônia, uma transformação de fase indesejável “*in vivo*” pode ser gerada nesse material. A redução na concentração do óxido de ítrio na superfície da cerâmicas sob condições hidrotérmicas leva à degradação do material, mesmo a temperaturas baixas (BURGER & RICHTER, 2001).

Em 14 de agosto de 2001, a Saint Gobain Desmarquest anunciou a maior chamada para revisão de cabeças femorais de zircônia para implantes de quadril. O fato envolveu nove lotes dessas peças, cujo núcleo estava comprometido pela indesejável transformação da fase tetragonal para monoclinica (FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2001).

## 2.1.2 Nitreto de Silício

### 2.1.2.1 Biocompatibilidade

As cerâmicas à base de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) são fortes candidatas para aplicações clínicas, principalmente como próteses ortopédicas e dentais, por apresentarem alta resistência ao desgaste, ao choque térmico, à tensão mecânica e relativamente alta tenacidade à fratura (GUEDES e SILVA, 2000). No entanto, o número limitado de trabalhos envolvendo estudos biológicos sobre nitreto de silício gera ainda resultados conflitantes sobre a biocompatibilidade do material.

Pesquisas utilizando testes *“in vivo”* realizadas em nitreto de silício contendo ferro e magnésio como aditivos mostraram que esse material é insatisfatório para aplicação como biomateriais (GRISS et al., 1980). Posteriormente, HOWLETT et al. (1989) realizaram testes *“in vivo”* e *“in vitro”* em discos porosos de nitreto de silício obtidos por sinterização reativa e observaram que, embora o material tenha favorecido o crescimento ósseo *“in vivo”*, não promoveu a propagação celular nos experimentos *“in vitro”*.

Novas pesquisas com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade do nitreto de silício foram inicializadas uma década após o trabalho de HOWLETT et al. (1989). A primeira delas, foi feita por WANG et al. (1999) com o objetivo de utilizar nitreto de silício como recobrimento para implantes dentais de titânio a fim de evitar problemas de aderência entre o titânio e a porcelana. No mesmo ano, KUE et al. (1999) realizaram um estudo *“in vitro”* em nitreto de silício também sem aditivos, utilizando a linhagem celular MG-63, que exibe características semelhantes as dos osteoblastos, tais como produção de colágeno do tipo I e de osteocalcina. As superfícies de discos polidos e não polidos de nitreto de silício foram avaliadas quanto à proliferação celular, utilizando poliestireno como controle. Os discos foram obtidos por duas técnicas: i) sinterização reativa (RBSN – Reaction – Bonded Silicon Nitride) e ii) sinterização reativa seguida de sinterização (SRBSN – Sintered after Reaction – Bonding Silicon Nitride). Após 48 horas de incubação, os autores observaram que as células propagadas sobre a superfície dos discos não polidos de nitreto de silício obtidos por ambas as técnicas apresentaram baixo rendimento quando comparadas às células propagadas sobre a superfície do controle. Além disso, com os discos não polidos, houve uma redução na produção de osteocalcina. No caso dos discos polidos, as células apresentaram capacidade proliferativa igual ao do controle, produzindo maiores níveis de osteocalcina que os discos não polidos. Análises

por microscopia eletrônica de varredura mostraram que as células propagadas sobre discos polidos de SRBSN tinham a forma bem delineada e com extensões citoplasmáticas, enquanto aquelas propagadas sobre a superfície de discos polidos de RBSN eram mais esféricas.

SOHRABI et al. (2000) avaliaram a biocompatibilidade de partículas de nitreto de silício bem como de discos polidos de RBSN e SRBSN também por meio de células da linhagem MG-63, usando poliestireno como controle. Embora tenha sido observada a propagação das células sobre a superfície de todos os materiais, verificaram-se variações quanto à liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . As partículas de nitreto de silício não ativaram a citocina IL-1 $\beta$ , porém, as altas concentrações provocam liberação da citocina TNF- $\alpha$ . As células propagadas sobre a superfície de discos de nitreto de silício obtidos por sinterização reativa seguida de sinterização (SRBSN) apresentaram comportamento semelhante às do controle com relação à liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Já os discos de nitreto e silício obtidos por sinterização reativa (RBSN) resultaram em um aumento das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em comparação ao controle de poliestireno.

SANTOS et al. (2000) prepararam um compósito cerâmico bioativo, por prensagem a quente, com matriz de nitreto de silício, utilizando como aditivo de sinterização um biovidro de composição em % peso: 45,0SiO<sub>2</sub>-24,5Na<sub>2</sub>O-24,5CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Testes para avaliação da bioatividade, usando um fluido com concentração iônica similar ao plasma sanguíneo, mostraram a formação de uma camada de hidroxiapatita sobre a superfície do material, o que é uma indicação de bioatividade. Estudos posteriores (AMARAL et al., 2002) mostraram que esses biocompósitos apresentam uma alta força de adesão sobre um fluido biológico empregado para simular estudos de compatibilidade com proteínas.

Testes “*in vitro*” em compósitos Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-biovidro foram realizados, utilizando células MG-63 - simulando osteoblastos – e células de medula óssea humana. Os resultados desse estudo mostraram que o compósito apresenta efeito indutivo sobre a proliferação de células MG-63. A proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana, também foram constatadas, o que permite a formação de uma matriz mineralizada, evento que contribuiria para uma osteointegração mais rápida do material (AMARAL et al., 2002a).

SORRELL et al. (2004) relataram resultados de um estudo clínico de 15 anos utilizando espaçadores intervertebrais de nitreto de silício. Para a inicialização dos estudos no final da década de 80, trinta pacientes apresentando degeneração espinhal foram submetidos à fusão intercorpórea anterior da espinha inferior usando nitreto de silício obtido por sinterização reativa (RBSN). Uma população de controle de 10 pacientes foi submetida ao mesmo procedimento usando osso autógeno. Um ano após a cirurgia, 14 pacientes relataram redução significativa de dor, sete pacientes relataram redução moderada e quatro pacientes relataram que não houve nenhuma variação de dor.

Cinco anos após a cirurgia, observou-se deslizamento do implante em um dos casos analisados, indicação de reação com o implante em dois casos e perda do implante em um caso. A fusão óssea foi constatada em todos os casos, com exceção de apenas um. Avaliações subjetivas com relação a dor indicaram que dois pacientes se mantiveram com o mesmo nível de dor e um paciente relatou um aumento significativo. Nenhuma diferença no nível de satisfação ou nas taxas de união entre os enxertos ósseos autógenos e os implantes cerâmicos foi verificada. A satisfação global foi alta, com 15 pacientes satisfeitos, quatro indiferentes e três insatisfeitos.

A revisão realizada 10 anos após a cirurgia mostrou que não houve deslizamento do implante, nem reação. A fusão óssea foi mantida em todos os casos. A percepção de dor permaneceu aproximadamente constante comparada com a revisão dos cinco anos, com um paciente relatando aumento significativo e dois casos relatando redução significativa. A satisfação global dos pacientes diminuiu quando comparada à revisão dos cinco anos, com nove pacientes satisfeitos, três indiferentes e quatro insatisfeitos. Entretanto, degeneração progressiva foi observada em nove dos 13 casos avaliados. Os autores sugeriram que a razão para as degenerações está na grande diferença entre o módulo de Young do nitreto de silício e o do osso.

#### **2.1.2.2. Estrutura, Propriedades e Processamento de Nitreto de Silício**

O nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) é uma cerâmica covalente que exibe dois estados polimórficos:  $\alpha$  e  $\beta$ . Ambas as estruturas podem ser descritas como um empilhamento das camadas Si-N na seqüência ...ABCDABCD... para  $\alpha$ -  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ou ...ABAB... para  $\beta$ -  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . A camada AB é a mesma tanto em  $\alpha$  quanto em  $\beta$ -  $\text{Si}_3\text{N}_4$  e a camada CD em  $\alpha$ -

$\text{Si}_3\text{N}_4$  está relacionada com a camada AB pelo plano de escorregamento  $c$  (ZIEGLER et al., 1987; WANG et al., 1996).

As excelentes propriedades mecânicas do nitreto de silício dependem da microestrutura e da densidade do material final, que são função da técnica de fabricação utilizada e dos aditivos, empregados, na maioria das vezes, para auxiliar no processo de sinterização.

Nitreto de silício denso pode ser produzido pela sinterização de um compacto, com ou sem aplicação de pressão. É muito difícil sinterizar  $\text{Si}_3\text{N}_4$  via mecanismo de difusão em estado sólido, devido ao alto grau de ligações covalentes de seus elementos constituintes e à sua alta pressão de vapor a temperaturas elevadas. Por isso, é comum o uso de aditivos de sinterização em quantidades variáveis, dependendo da técnica de fabricação utilizada (GUEDES e SILVA, 2000).

Os aditivos de sinterização reagem com a sílica ( $\text{SiO}_2$ ) da superfície do pó de  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ , formando uma fase líquida que viabiliza a sinterização em três estágios, sendo o primeiro deles caracterizado pelo rearranjo das partículas de  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  (SHAW, 1993). O segundo estágio envolve a dissolução do material a partir da fase  $\alpha$ , seguida pela difusão dos átomos de silício e nitrogênio e posterior precipitação da fase  $\beta$ , termodinamicamente mais estável. No terceiro estágio, denominado de coalescência, ocorre o crescimento dos grãos da fase  $\beta$  e eliminação da porosidade fechada residual (HAMPSHIRE, 1991).

O tipo e a quantidade de aditivos utilizados exercem grande influência nas propriedades do material final, pois após o resfriamento, a fase líquida permanece nos contornos de grão como uma fase amorfa ou como uma fase cristalina (ZIEGLER, 1987). Além disso, as características da fase líquida na temperatura de sinterização, tais como quantidade e viscosidade, influenciarão na densificação do material, bem como a morfologia dos grão de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  (GUEDES e SILVA, 2000).

Vários aditivos óxidos e não óxidos vêm sendo utilizados para auxiliar no processo de sinterização do nitreto de silício. Os exemplos mais comuns são  $\text{MgO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , sendo a mistura  $\text{Y}_2\text{O}_3 + \text{Al}_2\text{O}_3$  a mais empregada (DUALIBI FILHO, 1994). Outros aditivos alternativos estão sendo usados para substituir o  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , como por exemplo  $\text{CeO}_2$  (SILVA, 1994; SIGULINSKI & BOSKOVIC, 1999),  $\text{La}_2\text{O}_3$  (MITOMO et al., 1982; OLSSON

& EKSTRÖM, 1990; GUEDES e SILVA, 2000),  $Gd_2O_3$  (GUEDES e SILVA, 2000) e  $Yb_2O_3$  (PARK et al., 1997; LEE et al., 1999). Os óxidos de terras raras têm se mostrado muito eficientes como aditivos de sinterização de  $Si_3N_4$  por promoverem a densificação, formarem fases de alta viscosidade nos contornos de grão, favorecerem o desenvolvimento de grãos de  $\beta-Si_3N_4$  finos, com elevada razão de aspecto (razão entre o comprimento e o diâmetro do grão), e por possibilitarem a formação de fases cristalinas durante o processo de resfriamento ou após tratamentos térmicos específicos (SANDERS & MIESKOWSKI, 1985; SILVA, 1994; WANG et al., 1996).

As principais técnicas de obtenção de componentes de nitreto de silício são: sinterização reativa (Reaction Bonded Silicon Nitride - RBSN), prensagem a quente (Hot-Pressed Silicon Nitride - HPSN), prensagem isostática a quente (Hot Isostatic Pressed Silicon Nitride - HIPSN), sinterização assistida por pressão (Gas Pressure Sintering Silicon Nitride – GPSSN) e sinterização normal (Sintering Silicon Nitride - SSN) (HAMPSHIRE, 1991; ZIEGLER et al., 1987).

Nitreto de silício sinterizado ou prensado a quente, por exemplo, exibe grãos aciculares e entrelaçados gerando uma microestrutura com alta resistência mecânica e alta tenacidade à fratura. Já nitreto de silício produzido por sinterização reativa (RBSN) apresenta porosidade de aproximadamente 20% em volume (WÖTTING & ZIEGLER, 1984).

Conforme mencionado anteriormente, as propriedades e características do material final não são função exclusiva dos aditivos de sinterização utilizados, mas também das técnicas de fabricação. O módulo de Young para essas cerâmicas pode variar desde de 120 GPa (RBSN) até 330 GPa (HPSN e HIPSN), enquanto a resistência à flexão à temperatura ambiente pode variar de 150 MPa (RBSN) até 1200 MPa (HPSN, HIPSN e SSN) e a tenacidade à fratura de  $1,5 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$  (RBSN) até  $8,5 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$  (SSN, HPSN e HIPSN) empregadas (ZIEGLER et al., 1987; HAMPSHIRE, 1991; BAUCCIO, 1994).

Na sinterização reativa (RBSN), o pó de silício é primeiramente conformado por prensagem uniaxial, isostática a frio, moldagem por injeção ou colagem de barbotina. Na maioria das vezes, o compacto de silício é submetido a uma pré-sinterização em atmosfera inerte a cerca de  $1200^\circ\text{C}$ , a fim de atingir a resistência mecânica necessária para o acabamento da peça. A reação de nitretação é realizada numa temperatura entre  $1200$  e  $1450^\circ\text{C}$  em atmosfera de nitrogênio (WÖTTING & ZIEGLER, 1984)

Na prensagem a quente (HPSN), a mistura de pós formada de nitreto de silício e aditivos, é colocada em uma matriz de grafite e prensada a temperaturas entre 1700 e 1800°C. Entretanto, essa técnica tem limitações quanto ao formato da peça a ser produzida, além de gerar produtos com propriedades anisotrópicas devido à orientação preferencial dos grãos, perpendicular à direção de prensagem (WÖTTING & ZIEGLER, 1984).

Ao contrário da prensagem a quente (HPSN), a prensagem isostática a quente (HIPSAN) resulta em materiais com propriedades isotrópicas devido à forma uniforme de aplicação da pressão. A pressão é aplicada via gás para consolidar um compacto poroso ou para remover a porosidade residual de um material pré-sinterizado.

A sinterização assistida por pressão (GPSN) e a prensagem isostática a quente (HIPSAN) são duas técnicas muito similares do ponto de vista de processamento, mas os mecanismos de sinterização são totalmente diferentes. Na GPS, o maior contribuinte para a densificação é a alta temperatura, sendo a pressão, que varia de 0,2 a 10MPa, aplicada apenas para suprir a decomposição do nitreto de silício. Já na HIP, o maior contribuinte para a densificação é a alta pressão (100 a 200MPa), havendo necessidade de pré-sinterização ou encapsulamento da amostra. Além disso, enquanto na GPS a quantidade de aditivos pode ser reduzida, na HIP os aditivos podem até ser eliminados (TAJIMA, 1993; PULLUM & LEWIS, 1996).

A sinterização normal (SSN) é o método mais econômico de obtenção de nitreto de silício para produção de componentes de forma complexa. A temperatura de sinterização varia na faixa entre 1700 e 1800°C e maiores quantidades de aditivos devem ser empregadas (HAMPSHIRE, 1991).

### **2.1.2.3 Tribologia do Nitreto de Silício**

As cerâmicas bioinertes, conforme já mencionado, são utilizadas em diferentes situações onde se requer substituições ósseas. Sua aplicação como componentes de articulações artificiais exige que essas cerâmicas apresentem boas propriedades tribológicas, com baixo coeficiente de atrito e baixa taxa de desgaste. Por isso, é importante relacionar o comportamento tribológico das articulações naturais com o das

articulações artificiais, bem como avaliar as propriedades de atrito e de desgaste dos materiais que serão utilizados.

A natureza tribológica das articulações implantadas é diferente daquela das articulações naturais, pois as primeiras não são completamente lubrificadas. As articulações naturais são dotadas por um sistema de lubrificação que satisfaz às imposições de atrito e desgaste. Além disso, embora as articulações naturais, como todas as superfícies em contato submetidas a atrito, também sejam sujeitas ao desgaste, as partículas geradas por esse processo são reabsorvidas pelo corpo (BEUTLER et al., 1975).

No caso das articulações artificiais, as condições acima citadas estão ausentes, e a lubrificação durante o uso das próteses é insuficiente. Com isso, um dos maiores problemas associados às próteses de articulações é o grande volume de partículas de desgaste que será gerado durante a implantação. Assim, a combinação de materiais cujas superfícies entrarão em contato influenciam a quantidade de partículas gerada e, conseqüentemente, o desempenho da prótese.

Uma grande variedade de materiais para THR estão sendo estudados, a fim de suprir os problemas gerados pelo desgaste dos componentes durante o uso. Estudos comprovaram que os materiais cerâmicos são, de fato, os mais apropriados para a aplicação em questão, por poderem atingir baixos coeficientes de atrito, quando deslizados sobre eles mesmo (SCHOLLES et al. 2000).

A elevada resistência ao desgaste e o baixo coeficiente de atrito do nitreto de silício tornam esse material promissor em aplicações tribológicas, inclusive como componentes de articulação. Mesmo que a literatura não apresente resultados de ensaios de desgaste de nitreto de silício em condições semelhantes às das articulações, as propriedades desse material podem ser avaliadas por meio dos resultados disponíveis, obtidos de testes realizados em dispositivos comuns (pino-sobre-placa, pino-sobre-disco, entre outros). Estudos utilizando tribômetros que simulam movimentos complexos, como os exercidos durante o caminhar, e que submetem o material a cargas dinâmicas (SAIKKO, 1993; HALL & UNSWORTH, 1997) forneceriam uma informação mais realística sobre o comportamento do nitreto de silício *"in vivo"*.

Como exemplo do bom desempenho do nitreto de silício em condições de atrito, cita-se o trabalho realizado por SAITO et al. (1997), que demonstrou que esse material

pode atingir um coeficiente de atrito de 0,01, quando água destilada é empregada como lubrificante. Nesse caso, os testes foram realizados em pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  por meio de um dispositivo pino-sobre-placa.

Anteriormente, SASAKI (1989) avaliou o atrito e o desgaste de alumina, zircônia, carbeto de silício e nitreto de silício em diferentes atmosferas ( $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , nitrogênio saturado com vapores de compostos orgânicos, ar seco misturado com ar saturado a níveis selecionados de umidade relativa e água deionizada). Nas atmosferas de  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , o nitreto de silício atingiu o menor coeficiente de atrito. Em  $\text{N}_2$  misturado com vários tipos de compostos orgânicos, cada composto afetou o comportamento de atrito e de desgaste de forma diferente. Por exemplo, a atmosfera contendo o composto  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  exibiu boas características lubrificantes para alumina, mas não para zircônia, para a qual houve aumento do desgaste. Em  $\text{N}_2 + \text{C}_6\text{H}_6$  e algumas vezes em  $\text{N}_2 + \text{C}_6\text{H}_{14}$  e  $\text{N}_2 + (\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , um composto lubrificante foi formado na superfície deslizante dos quatro tipos de cerâmicas. Em ar úmido, um aumento na umidade relativa reduziu os coeficientes de atrito de todas as cerâmicas. Em água, houve uma redução das taxas de desgaste para alumina, carbeto de silício e nitreto de silício com o aumento da distância de deslizamento. No caso de carbeto de silício e do nitreto de silício, o coeficiente de atrito atingiu um valor de 0,01. Já a zircônia apresentou comportamento contrário em água, desgaste severo ocorreu e as taxas de desgaste aumentaram com o aumento da distância de deslizamento.

Os baixos coeficientes de atrito e as baixas taxas de desgaste atingidos para pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  em água são atribuídos à formação de sílica na superfície do material, que é um material mole e, portanto, age como um lubrificante sólido (SAITO et al., 1997; XU et al., 2000).

Cerâmicas não-óxidas, como o nitreto de silício, formam filmes óxidos sobre suas superfícies de deslizamento, quando estão em contato com o ar. Na presença de água, a oxidação pode ser seguida de hidratação, de forma que o filme superficial formado sobre nitreto de silício é controlado por ambas as reações (Equações 1 e 2) (HUTCHINGS, 1992):



e



O efeito da umidade e da microestrutura de nitreto de silício quando essa cerâmica está em contato deslizante sobre outra superfície de nitreto de silício ou de outros metais foi analisado por TAKADOUM et al. (1998). Esferas de nitreto de silício sem porosidade foram deslizadas sobre discos de amostras policristalinas de cobre, níquel, titânio e alumínio, utilizando-se um tribômetro do tipo esfera-sobre-disco, em atmosfera controlada a 19°C, com vários níveis de umidade relativa. Pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  também foram avaliados, sendo utilizados dois tipos de nitreto de silício para os discos: (i) sem porosidade e (ii) com 20 % de porosidade. Para os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{metal}$  a carga aplicada foi de 5 N, enquanto para os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  a carga foi de 30 N. Os resultados demonstraram que com o aumento do nível de umidade, há uma redução no valor do coeficiente de atrito para os pares contendo cobre e alumínio, mas para os pares contendo alumínio e titânio o coeficiente de atrito não é influenciado pelo nível de umidade. Sob baixo nível de umidade relativa, nitreto de silício sem porosidade mostra melhor resistência ao desgaste, mas a altos níveis de umidade não há diferença entre a resistência ao desgaste de nitreto de silício denso ou poroso. Os resultados indicaram que há uma redução do atrito e do desgaste para os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  com o aumento do nível de umidade devido à formação de um filme superficial lubrificante de hidróxido de silício.

Ensaio utilizando uma solução contendo soro bovino como lubrificante foram realizados em alumina, carbetto de silício e nitreto de silício por KUSAKA et al. (1999). Durante o estado estacionário, pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  apresentam maior valor de coeficiente de atrito (de cerca de 0,2) e maior taxa de desgaste que os pares  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiC}/\text{SiC}$ . Os resultados insatisfatórios obtidos para os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  foram justificados justamente à adesão do tribofilme de dióxido de silício hidratado na superfície do nitreto de silício durante o teste, o que contraria os demais resultados relatados na literatura.

A influência da rugosidade superficial dos pares cerâmicos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2/\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SiC}/\text{SiC}$  e  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  sobre os valores de coeficiente de atrito foi avaliada por ZHOU et al. (1997). O equipamento utilizado nos testes foi do tipo pino-sobre-disco e o lubrificante, uma solução aquosa contendo 1% em peso de CMC-Na (carboxymethyl cellulose sodium salt). Os pinos de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SiC}$  e  $\text{Si}_3\text{N}_4$  apresentavam rugosidade superficial ( $R_a$ ) de 10, 10, 40 e 40 nm, respectivamente, enquanto que os discos de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SiC}$  e  $\text{Si}_3\text{N}_4$  apresentavam rugosidade superficial ( $R_a$ ) de 4, 6, 8 e 43 nm, respectivamente. Como consequência das condições de superfície das amostras, os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$  foram os que apresentaram maiores valores de coeficiente de atrito, enquanto que os menores foram atingidos pelos pares  $\text{SiC}/\text{SiC}$ .

No mesmo ano, ZHOU et al. (1997a) também estudando o coeficiente de atrito e as taxas de desgaste de pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$ , concluíram que esse material pode ser muito eficiente para substituição de componentes de articulação. Os experimentos realizados em uma máquina do tipo pin-on-disc e utilizando água como lubrificante mostraram que, quando as superfícies de nitreto de silício são ultra lisas, suas propriedades tribológicas são superiores as de alumina. Portanto, mesmo que a velocidade de deslizamento de articulações não seja suficiente para causar polimento triboquímico durante o uso, as superfícies de contato podem ser polidas antes do material ser instalado dentro do corpo humano.

WONG et al. (1998) também realizaram um estudo para avaliar o efeito da rugosidade superficial sobre o atrito de três materiais cerâmicos. Os pares  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{SiC}/\text{SiC}$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$  testados em água, apresentavam contato conforme e diferentes rugosidades superficiais. Menor rugosidade superficial resultou em menor coeficiente de atrito para todos os pares avaliados. Além disso, observou-se uma redução na rugosidade superficial com o aumento da distância de deslizamento. O menor valor de coeficiente de atrito, de 0,002, foi obtido pelo nitreto de silício, seguido pelo carbeto de silício, com  $\mu = 0,006$  e pela alumina, com  $\mu = 0,007$ .

## 2.2 Resposta de Tecidos Duros aos Materiais Bioinertes

O osso pode entrar em contato com um biomaterial de três maneiras: (i) como uma placa, pino ou outro dispositivo para unir fragmentos, auxiliando o processo de reparação de uma lesão devido a uma fratura; (ii) para auxiliar o processo de reparação de um defeito ósseo, resultante da ação de bactérias, processos de envelhecimento, traumas ou intervenção cirúrgica e (iii) para auxiliar na reconstrução dos tecidos adjacentes, sendo que o osso receptor age como um ponto de fixação seguro. Exemplos incluem: fixação intramedular de próteses articulares, parafusos ósseos e implantes dentais na mandíbula ou na maxila (WILLIAMS, 1987).

O preenchimento da interface osso/implante é dependente do tempo. Sob algumas circunstâncias, o defeito será completamente preenchido com osso tal que haja um íntimo contato osso/implante (WILLIAMS, 1987). O desenvolvimento desse contato é complexo e envolve vários fatores relacionados não apenas às características do

implante, tais como material empregado, forma, topografia e composição superficial, mas também à carga mecânica aplicada, à técnica cirúrgica e às próprias condições do paciente, como qualidade e quantidade de osso (PUELO & NANCI, 1999).

Quando um objeto sólido é inserido na cavidade óssea, a reparação ocorrerá entre o osso e o implante e, se o vazio nessa região for pequeno, haverá uma tendência do novo osso se formar na interface (WILLIAMS, 1987).

Inicialmente, há a formação de um coágulo sangüíneo em torno do implante, seguida pela proliferação de células osteoprogenitoras a partir do periósteo (WILLIAMS, 1987; SIKAVITSAS et al., 2001). Células mesenquimais indiferenciadas também migram para a área lesada e se diferenciam em células osteoprogenitoras, que se depositam nas proximidades do implante. Fibroblastos, osteoblastos e capilares penetram no coágulo sangüíneo, substituindo-o e preenchendo o espaço entre o osso e o implante (RYÄNEN, 1999).

Os osteoblastos sintetizam uma matriz extracelular rica em colágeno (osteóide) contendo vesículas que representam foco de mineralização. A presença de vesículas na matriz extracelular rica em colágeno no início do processo é um sinal de boa adaptação (RYÄNEN, 1999).

Além das fibras colágenas, o tecido osteóide é composto por uma substância formada por um gel viscoso, contendo água e complexos à base de polissacarídeos e proteínas (ROBERTS et al., 1987).

O tecido caracterizado pela presença de fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, pouca quantidade de minerais e baixa porcentagem de osteócitos é denominado de tecido ósseo primário (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999) e se forma numa taxa de 30 a 50  $\mu\text{m}/\text{dia}$ . Entretanto, o tecido ósseo primário tem pouca capacidade de suportar cargas mecânicas (SIKAVITSAS et al., 2001).

Quando a membrana das vesículas contidas no tecido osteóide se rompe, os cristais de apatita – fosfatos de cálcio - se unem, de forma a se tornarem densamente empacotados em um arranjo ordenado de acordo com a orientação das fibras colágenas (ROBERTS et al., 1987), gerando estruturas calcificadas (RYÄNEN, 1999). Ao mesmo tempo, os osteoblastos impregnados na matriz óssea são então convertidos em osteócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Trabéculas crescem e continuam a se mineralizar e algumas atingem a superfície do implante. Em uma situação ótima, o material é coberto por osso e não por cápsula fibrosa, porém os materiais bioinertes geralmente formam um tecido fibroso entre o osso e o implante (RYÄNEN, 1999).

O remodelamento ósseo tem início em duas semanas após a implantação e continua por toda a vida do indivíduo (RYÄNEN, 1999). O tecido ósseo primário é pouco a pouco substituído por tecido ósseo secundário ou lamelar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; SIKAVITSAS et al., 2001), em uma taxa de 0,6  $\mu\text{m}/\text{dia}$  (ROBERTS et al., 1987).

Embora o osso lamelar seja formado pelos mesmos componentes que o tecido primário, sua maturação completa pode levar de seis a 12 meses (ROBERTS, 1988). Tal tecido tem como principal característica a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos sangüíneos, formando os sistemas de Havers ou osteonas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Esses sistemas são os responsáveis pela elevada resistência do osso lamelar. Em um sistema com lamelas concêntricas, o vaso sangüíneo fica dentro de um canal central, denominado de canal de Havers. Canaliculos se estendem a partir do canal central para nutrir os osteócitos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, denominados de canais de Volkmann (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; SIKAVITSAS et al., 2001) e, desse modo, com o perióstio.

Além de acelerar o fenômeno de reparação normal, os implantes devem resultar em uma matriz interfacial com uma composição e estrutura características de osso. A presença de tecido conjuntivo fibroso na interface tende a gerar um foco de baixa resistência, causando micromovimentos nessa região, o que favorece o desencadeamento de reações inflamatórias e a propagação de bactérias (ALBREKTSSON et al., 1981). Entretanto, dois tipos de movimentos são reconhecidos existir: o “micromovimento tolerável” e o “micromovimento prejudicial”. O primeiro, tende a estimular a aposição óssea em torno do implante, enquanto o segundo favorece, de fato, a formação de tecido fibroso (SZMUKLER-MONCLER et al., 1998).

A matriz óssea formada deve ter propriedades biomecânicas adequadas, o que permite uma rápida recuperação do paciente e uma fixação estável entre o osso e o

implante, possibilitando a aplicação de cargas o mais cedo possível (PUELO & NANJI, 1999). Adicionalmente, segundo DOREMUS (1992), um implante eficiente deve apresentar, ainda, ausência de toxicidade, não deve estimular reações químicas indesejáveis, nem se dissolver ou mesmo sofrer corrosão dentro do organismo.

Implantes utilizados na reparação dos tecidos duros devem, então, envolver todos os requisitos relatados, ancorando-se ao osso sem qualquer intermediário ou tecido mole, ou seja, promovendo a osteointegração (ALBREKTSSON et al., 1981; BRANEMARK, 1983).

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiais

Os materiais de partida utilizados nesse trabalho foram:  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (M11, Hermann C. Starck) com 92,7% de  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  e 1,14% de oxigênio;  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (99,9% de pureza, A16 SG da Alcoa);  $\text{Y}_2\text{O}_3$  (99,9% de pureza, Hermann C. Starck) e  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  (99,9% de pureza, Aldrich Chemical).

O tamanho médio de partículas/aglomerados de cada insumo (Tabela 1) foi determinado por meio do equipamento CILAS modelo 1064, que permite a determinação de tamanho médio de partículas na faixa entre 0,1 e 500  $\mu\text{m}$ , pela passagem de um feixe de laser. Enquanto que as áreas de superfície (BET) dos materiais (Tabela 1) foram analisadas por meio do equipamento AREA METER – STRÖELLEIN.

Tabela 1: Área de superfície específica e diâmetro médio equivalente dos materiais de partida utilizados para a produção das amostras de nitreto de silício

Material	Diâmetro médio equivalente ( $\mu\text{m}$ )	Área de superfície ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
$\text{Si}_3\text{N}_4$	0,87	14,5
$\text{Al}_2\text{O}_3$	0,70	8,1
$\text{Y}_2\text{O}_3$	0,73	14,1
$\text{Yb}_2\text{O}_3$	4,08	0,9

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação das Composições

Composições contendo diferentes concentrações de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  juntamente com  $\text{Y}_2\text{O}_3$  e  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  (Tabela 2) foram preparadas a fim de se obter materiais com densidade após sinterização, próxima da densidade teórica. A moagem de cada uma delas foi realizada em moinho Atritor durante 4 horas a 400 rpm, utilizando-se esferas, vaso e haste de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  e álcool isopropílico como meio líquido. Após moagem, os pós foram secos e desaglomerados, em peneira malha 100 (0,149mm de abertura).

Tabela 2: Composições dos materiais estudados (% massa)

composição	$\text{Si}_3\text{N}_4$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{Y}_2\text{O}_3$	$\text{Yb}_2\text{O}_3$
SN-1	91	3	3	3
SN-2	90	4	6	-
SN-3	90	4	-	6
SN-4	90	6	4	-
SN-5	90	6	-	4

Após moagem, os pós atingiram área de superfície de cerca de  $13 \text{ m}^2/\text{g}$  e diâmetro médio equivalente de cerca de  $0,4 \mu\text{m}$ .

#### 3.2.1.1 Estudo de Densificação por Dilatometria

A fim de determinar as melhores condições de sinterização e identificar quais das composições mostradas na Tabela 2 promovem maior densificação, foi realizado um estudo dilatométrico com amostras obtidas por meio dos pós preparados de acordo com o Item 3.2.1. Pastilhas com 6 mm de diâmetro e cerca de 10 mm de comprimento foram

compactadas, a partir desses pós, por prensagem uniaxial (50 MPa) e isostática a frio (200 MPa).

O equipamento utilizado foi um dilatômetro NETZSCH\*, com taxa de aquecimento e de resfriamento de 20°C/min, fixando-se o patamar a 1750°C por 1 hora, em atmosfera de N<sub>2</sub>.

Com base nesse estudo, selecionou-se as composições SN1 e SN4 para dar continuidade ao trabalho (Item 4.1).

### **3.2.2 Preparação das Amostras de Composições SN1 e SN4**

#### **3.2.2.1 Compactação das Amostras**

Pós de composições SN1 e SN4 preparados seguindo o procedimento do Item 3.2.1 foram compactados em forma de barras de 7mmx12mmx50 mm e pastilhas de 25 mm de diâmetro, por prensagem uniaxial (50 MPa) e isostática a frio (200 MPa).

A densidade a verde das amostras, determinada pelo método geométrico variou entre 54 e 55% da densidade teórica de cada composição, calculada pela regra das misturas.

#### **3.2.2.2 Sinterização**

As amostras já compactadas foram sinterizadas a 1750°C, com o patamar de 1 hora, em forno de resistência de grafite (NUKEM GMBH 645), utilizando atmosfera controlada de nitrogênio. A taxa de aquecimento e de resfriamento foi de cerca de 20°C/min.

---

\*Laboratório de Materiais Nucleares - CTMSP

### 3.2.2.3 Caracterização das Amostras

#### 3.2.2.3.1 Determinação da Densidade após Sinterização

A densidade do material, após sinterização, foi determinada pelo método de Arquimedes, utilizando-se água destilada como líquido de imersão. Para a determinação da densidade relativa, a densidade teórica dos materiais foi calculada pela regra das misturas.

#### 3.2.2.3.2 Identificação das Fases por Difratomia de Raios X

A técnica de difratometria de raios X foi empregada para verificação da ocorrência de fases cristalinas nos contornos de grão e da transformação  $\alpha \rightarrow \beta$  do  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , na margem e no centro das amostras sinterizadas. O equipamento utilizado foi um difratômetro SIEMENS D5000\*.

#### 3.2.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Micrografias eletrônicas de varredura foram utilizadas para analisar a distribuição das fases formadas após sinterização nas amostras estudadas, bem como o tamanho e a forma dos grãos de  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$ .

Para a observação da distribuição das fases formadas, e posterior ensaio de dureza (Item 3.2.2.3.4), as amostras foram previamente cortadas e polidas com pastas de diamante de 15, 9, 6, 3, e 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

A fim de se verificar o tamanho e forma dos grãos, as amostras tendo suas superfícies já polidas foram submetidas a ataque por plasma com mistura dos gases  $\text{CF}_4$  e  $\text{O}_2$ .

\*Laboratório de Difração de Raios X de Instituto de Geociências - USP

O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura JEOL – JXA – 6400\*.

### 3.2.2.3.4 Dureza e Tenacidade à Fratura

A dureza e a tenacidade à fratura dos materiais foram determinadas por meio do método da impressão Vickers, utilizando-se um durômetro AMSLER OTTO WOLPERT – WERKE GMBH\*. Pesquisas mostraram que a carga crítica para cerâmicas à base de nitreto de silício é de cerca de 70 N (RUIZ, 2000). Dessa forma, as penetrações foram realizadas nas amostras polidas, utilizando-se uma carga de 100 N durante 20 segundos (Figura 1).

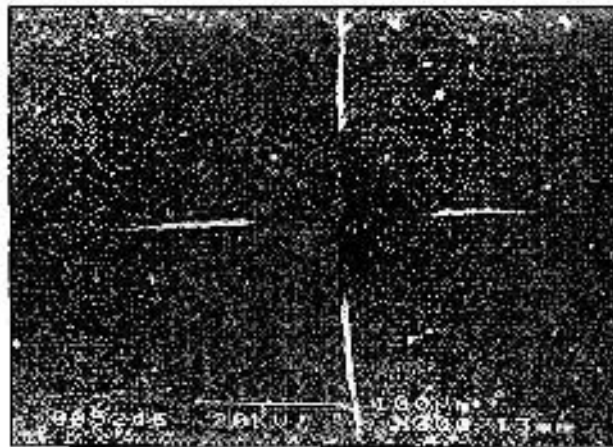


Figura 1: Impressão Vickers gerada na superfície polida da amostra SN1 e observada por meio de MEV

Para a medida da dureza ( $H_V$ ), utilizou-se a Equação 3 (CHANTIKIUL et al., 1981).

$$H_V = 1,8544 \cdot \left( \frac{P}{d^2} \right) \quad (3)$$

Onde:

P = carga aplicada (N);

d = diagonal da impressão Vickers (m).

\*Laboratório de Caracterização de Materiais - CTMSP

Para o cálculo dos valores de tenacidade à fratura, utilizou-se a equação de ANSTIS et al. (1981) (Equação 4), uma vez que o perfil da trinca foi identificado, em trabalhos anteriores, como sendo do tipo radial-mediano (GUEDES e SILVA, 2000).

$$K_{Ic} = 0,016 \left( \frac{P_{0.95}}{W^2} \right)^{1/2} \left( \frac{P}{c^{3/2}} \right) \quad (4)$$

Onde:

$K_{Ic}$  = tenacidade à fratura do material (MPa.m<sup>1/2</sup>);

$E_0$  = módulo de Young do material (GPa), sendo usado valores de 300 GPa para o material denso (SILVA, 1994; SIGULINSKI & BOSKOVIC, 1999);

$c$  = semi-diagonal da impressão Vickers + o comprimento da trinca (m).

As diagonais e as trincas de cada impressão (Figura 1) foram medidas com o auxílio de um microscópio óptico (LEICA – METALLOPLAN).

### 3.2.2.3.5 Testes de Citotoxicidade “*in vitro*”

Testes de citotoxicidade “*in vitro*” foram realizados em colaboração com o Centro de Biologia Molecular (IPEN) nas amostras SN1 e SN4 de acordo com a norma ISO 10993-parte 5.

O teste foi realizado, utilizando-se as barras de nitreto de silício sinterizadas. A fim de se obter uma área de superfície de cerca de 35 cm<sup>2</sup>, foram utilizadas 2 barras e meia de cada composição que foram imersas em um meio de cultura celular RPMI-FCS (RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina). Solução fenólica (0,02%) e alumina foram usadas como controle positivo (citotóxico) e negativo (não-citotóxico), respectivamente.

O nitreto de silício (SN1 e SN4) e a alumina foram previamente esterilizados em autoclave a uma temperatura de cerca de 120°C por 20 minutos. Extratos de cada composição e dos controles positivo e negativo foram preparados, incubando os materiais, separadamente, no meio de cultura RPMI-FCS, por 48 horas a 37°C. Após esse período, os sobrenadantes de cada extrato foram filtrados e, em seguida, diluídos e

homogeneizados com RPMI-FCS, para obtenção de concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100%.

Células K-1 de ovário de hamster chinês (CHO - Chinese Hamster Ovary) da American Tissue Type Collection (ATTC) foram cultivadas em RPMI-FCS 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a propagação confluyente de uma monocamada celular, 0,2% de solução de tripsina foi adicionada para remoção de células das paredes do recipiente. A suspensão celular foi ajustada a uma concentração de 100 células/ml e, então, colocada em placas de Petri, sendo incubadas por 5 horas. Depois da adesão celular sobre as placas, o meio de cultura foi removido e substituído por 5ml do meio puro (para controle) e extratos diluídos. Foram preparadas amostras em triplicata. A incubação foi realizada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por oito dias. O meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas com 10% de formol em solução salina 0,9% e coradas com Giemsa. As colônias visíveis foram contadas e comparadas em número com as colônias presentes na placa de controle CHO.

Para esses experimentos, o potencial de citotoxicidade do material avaliado é geralmente expresso como índice de citotoxicidade (IC<sub>50(%)</sub>), que representa a concentração do extrato que mata 50% da população celular formada.

#### 3.2.2.3.6 Teste de Solubilidade

Medidas de solubilidade de amostras de composição SN1 e SN4 em SBF (Simulated Body Fluid) foram realizadas por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy), em colaboração com a Universidade de Erlangen-Nuernberg (Alemanha), com base no teor de silício presente na solução.

Inicialmente, cada amostra, apresentando área superficial de cerca de 2 cm<sup>2</sup>, foi imersa em 45 ml de SBF (pH=7,54) por 14 dias. Dessa forma, a razão entre a superfície da amostra e o volume de SBF foi mantida em aproximadamente 0,044 cm<sup>-1</sup>.

O teor de silício foi, então, analisado nos intervalos de três, sete e 14 dias nas soluções seguintes:

1. **solução de controle:** SBF puro

2. **SBF+SN1**: solução resultante da imersão da amostra SN1 em SBF
3. **SBF+SN4**: solução resultante da imersão da amostra SN4 em SBF.

Para a realização das análises, o equipamento foi previamente calibrado com solução padrão aquosa de silício.

### **3.2.2.3.7 Biocompatibilidade “*in vivo*”**

Com a finalidade de se minimizar a quantidade de animais a serem utilizados, essa etapa do trabalho foi realizada com as amostras de composição SN1. Essa composição foi selecionada por conter como aditivo o óxido de itérbio, além dos óxidos de alumínio e de ítrio presentes também na composição SN4 (Tabela 2).

A avaliação “*in vivo*” de cerâmicas à base de nitreto de silício, contendo óxido de itérbio como aditivo de sinterização, é importante, uma vez que esse é um óxido de terras raras. Os óxidos de terras raras são muito eficientes como aditivos de sinterização do nitreto de silício, pois promovem o desenvolvimento de um material cuja microestrutura é formada por grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  alongados, com boas propriedades mecânicas, como descrito no Item 2.1.2.2.

#### **3.2.2.3.7.1 Preparação dos Corpos de Prova**

Barras sinterizadas de nitreto de silício de composição SN1, obtidas de acordo com o Item 3.2.2, foram retificadas e cortadas, a fim de se obter amostras cilíndricas de cerca de 3 mm de diâmetro e 7 mm de comprimento (Figura 2). Após a limpeza das peças em ultra-som com acetona e água destilada, essas foram esterilizadas a uma dose de 25 kGy, por meio de uma Fonte de  $^{60}\text{Co}$ , tipo Gammacell modelo 220 da ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED\*.

---

\*Centro de Tecnologia das Radiações e Serviços - IPEN



Figura 2: Amostras de nitreto de silício: 1) na forma inicial (barra); 2) após retífica e 3) após retífica e corte (nas dimensões específicas para o teste “*in vivo*”)

A rugosidade ( $R_a$ ) das peças já nas dimensões finais, que variou de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , foi determinada utilizando-se um rugosímetro Taylor – Hobson – Sutronic 3P.

### 3.2.2.3.7.2 Experimento em Animais

Experimento em animais foi realizado em colaboração com o Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo, seguindo as diretrizes e regulamentações desse Instituto (Protocolo para uso de animais em experimentos n° 193/02, ver Item 8.1).

Para tanto, amostras cilíndricas de nitreto de silício, de composição SN1, com as características descritas no Item 3.2.2.3.7.1 foram instaladas em tíbias de coelhos Nova Zelândia fêmeas, albinas e adultas pesando cerca de 3,0 kg. Nesse estudo, foram utilizados cinco coelhos, sendo instalados dois implantes na porção médio-proximal da diáfase de cada tíbia, um proximal e outro distal, distantes em cerca de 7 mm entre si. Durante todo o estudo, os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

No período pré-operatório, foi administrado como terapia preventiva antibiótico (1.200.000 de benzilpenicilina benzatina para cada 60 kg de massa) e, para impedir patologias cutâneas, utilizou-se IVOMEK subcutâneo numa dosagem de 1ml/50kg.

Para a intervenção cirúrgica, utilizou-se como anestésico geral, cloridrato de ketamina (KETALAR, ACHÊ, Brasil) numa dosagem de 35 mg/kg; hidrocloreto de xilazina (ROMPUM, BAYER, Brasil) como anestésico geral intramuscular, numa dosagem de 5,0 mg/kg; e acepromazina (ACEPRAN 1% - UNIVET, Brasil) como neuroléptico e tranquilizante, numa dosagem de 0,75 mg/kg. Em complemento, 0,8 ml de anestésico local (cloridrato de xilocaína-felipressina a 3% (BIOPRESSIN, DENTSPLY, Brasil), foi administrado.

Após a anestesia, realizou-se a tricotomia da região da tíbia do coelho e antiseptia com álcool iodado. Em seguida, iniciou-se a incisão da pele, com posterior seccionamento da fáscia de revestimento, atingindo o periósteo.

Com o tecido ósseo já exposto, procedeu-se a preparação do leito dos implantes, utilizando-se brocas helicoidais de diâmetros sucessivos de 1,5 mm e de 3,0 mm. Duas perfurações por tíbia, com distância de cerca de 7 mm, foram realizadas de forma a atravessar o componente cortical e atingir a substância esponjosa. Durante todo o procedimento cirúrgico, utilizou-se irrigação externa abundante com soro fisiológico a fim de evitar o superaquecimento do tecido ósseo (ERIKSSON & ALBREKTSSON, 1984).

Após a instalação do implante (Figura 3), iniciou-se o procedimento de sutura por camadas: no plano profundo, fáscia, músculo e periósteo; e no superficial, subcutâneo e pele.

Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam uma dose intramuscular de benzilpenicilina/dihidroestreptomicina (BENZETACIL, WYETH, Brasil). Como analgésico, adicionou-se 10 gotas de dipirona sódica (NOVALGINA, AVENTIS PHARMA, Brasil) a cada 500 ml da água dos animais e seis dias após a cirurgia, mais uma dosagem antibiótica foi administrada em cada um deles.

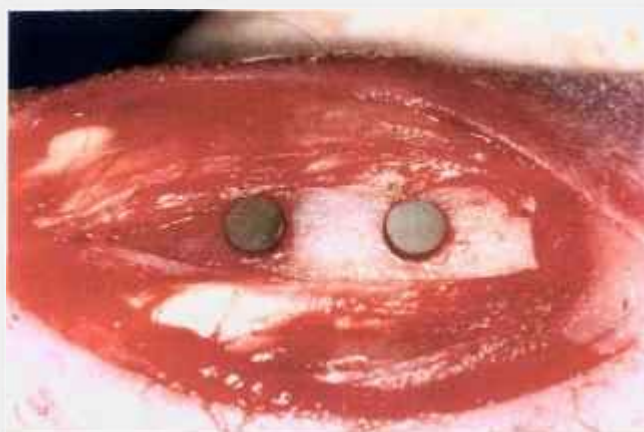


Figura 3: Implantes de nitreto de silício instalados no leito

### 3.2.2.3.7.3 Preparação Histológica

No período de oito semanas pós-operatórias, os animais foram sacrificados por meio de uma dosagem excessiva de pentobarbitol sódico (HYPINOL A 3%, FONTOVERTER, Brasil, 40 mg/kg). Os implantes juntamente com o tecido ósseo adjacente foram retirados com serra montada para obtenção de amostras e posterior preparação histológica.

As amostras foram fixadas em solução neutra de formalina a 10% durante 30 dias e desidratadas em uma série gradual de etanol absoluto e água destilada por períodos de 24 horas, segundo a seqüência mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Série de álcoois usados para desidratação das amostras contendo o osso e o implante de nitreto de silício

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

A fim de incluir o material (implante e osso) em resina de polimetilmetacrilato (TECHNOVIT 7200 VLC – KULTZER & Co), iniciou-se o procedimento de embebição, no qual as amostras foram imersas por 72 horas em cinco diferentes soluções contendo álcool etílico e resina (Tabela 4), sob agitação constante (agitador EXAKT 510 DEHYDRATION AND INFILTRATION SYSTEM – IKA SCHETTLER 510 HS 501 Digital\*).

Após o quinto banho, o material foi submetido à polimerização em equipamento apropriado (EXAKT 520 LIGHT POLYMERIZATION UNIT\*). Para isso, as amostras foram inseridas em recipientes adequados que foram preenchidos com resina de polimetilmetacrilato (100 % em volume). A polimerização da resina ocorreu por meio de sua exposição a luz (3 horas em luz branca e 96 horas em luz azul).

Tabela 4: Procedimento para inclusão das amostras contendo osso e implante de nitreto de silício para posterior corte

Banho	% em volume de etanol	% em volume de resina	Tempo (h)
1	70	30	72
2	50	50	72
3	30	70	72
4	-	100	72
5	-	100	72

A partir dos blocos de resina contendo as amostras, iniciou-se o processo de obtenção das lâminas. Primeiramente, os blocos foram cortados longitudinalmente, utilizando-se uma máquina de corte (ISOMET 2000) e disco diamantado a uma carga de 1000 g, de forma a se obter cerca de três amostras de aproximadamente 700 µm por bloco. As amostras foram coladas com resina (TECHNOVIT 7210 VCL – KULTZER & Co, Alemanha) em placa de acrílico e submetidas à desgaste e polimento (100 µm), em politriz metalográfica (STRUERS, DP 10), portando lixas de carbeto de silício de granulações sucessivas (800, 1000, 1200, 2400 e 4000). Finalmente, as lâminas foram polidas com pasta de diamante de 1 µm.

\*Laboratório de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP

\*Projeto FAPESP 96/10221-7

As lâminas de 100  $\mu\text{m}$  foram observadas em microscópio de fluorescência e em microscópio de luz de polarização. Para observação em microscopia de luz de lâminas coradas pelo método do azul de toluidina, as mesmas foram lixadas até uma espessura de cerca de 40  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2.3.7.4 Microscopia de Fluorescência

A técnica de microscopia de fluorescência foi empregada a fim de quantificar a neoformação óssea, nas regiões próximas à superfície do implante. Para tanto, foi empregado um microscópio NIKON (ECLIPSE E 1000)\* equipado com câmera digital (NIKON FDX 35) e programa de computador (IMAGE PRO PLUS, 4.1, Media Cybernetics), conectado a um computador IBM.

Esse microscópio de fluorescência contém uma fonte de luz fluorescente que quando excita substâncias fluorescentes, essas absorvem energia e emitem luz na faixa do espectro visível. Dessa forma, mediante o uso de marcadores teciduais que se fixam na apatita do osso novo é possível observar os diferentes estágios de deposição óssea.

Os marcadores teciduais utilizados foram alizarina, calceína e tetraciclina, sendo administrados nos animais, durante o período de oito semanas após o ato cirúrgico, seguindo um procedimento padrão (RAHN, 1976) e a seqüência mostrada na Tabela 5. A ordem de aplicação foi preconizada aleatoriamente e mantida constante durante o período de acompanhamento.

Tabela 5: Seqüência de injeção dos marcadores fluorescentes (RAHN, 1976)

	<b>Dias após cirurgia</b>	<b>Dose por kg de animal</b>
<b>Alizarina</b>	14	30 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Alizarina</b>	21	30 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Calceína</b>	28	10 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Calceína</b>	35	10 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Tetraciclina</b>	42	60 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Tetraciclina</b>	49	60 mg + 1 ml de soro + 2 mg $\text{NaHCO}_3$
<b>Óbito</b>	56	

\*Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas – USP

Como as substâncias se apresentavam inicialmente na forma de pó, essas foram previamente dissolvidas em soro fisiológico e solução tampão de  $\text{NaHCO}_3$ , para que pudessem ser aplicadas nos animais.

Quatro regiões (R1, R2, R3 e R4), mostradas na Figura 4, de 34 lâminas polidas com cerca de  $100\ \mu\text{m}$ , preparadas de acordo com o item 3.2.2.3.7.3 foram analisadas por microscopia de fluorescência. Os corantes alizarina, calceína e tetraciclina são registrados em marrom-tijolo, verde e laranja, respectivamente, conforme pré-estabelecido em estudo piloto (KÖNIG & LOPES, 2002), e indica os estágios de deposição óssea, uma vez que a época de administração dos corantes nos animais é conhecida.

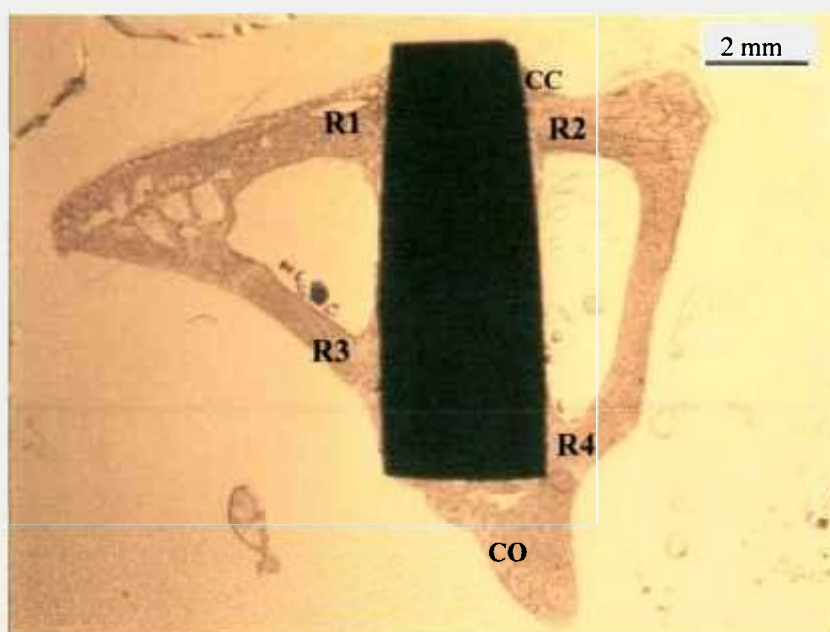


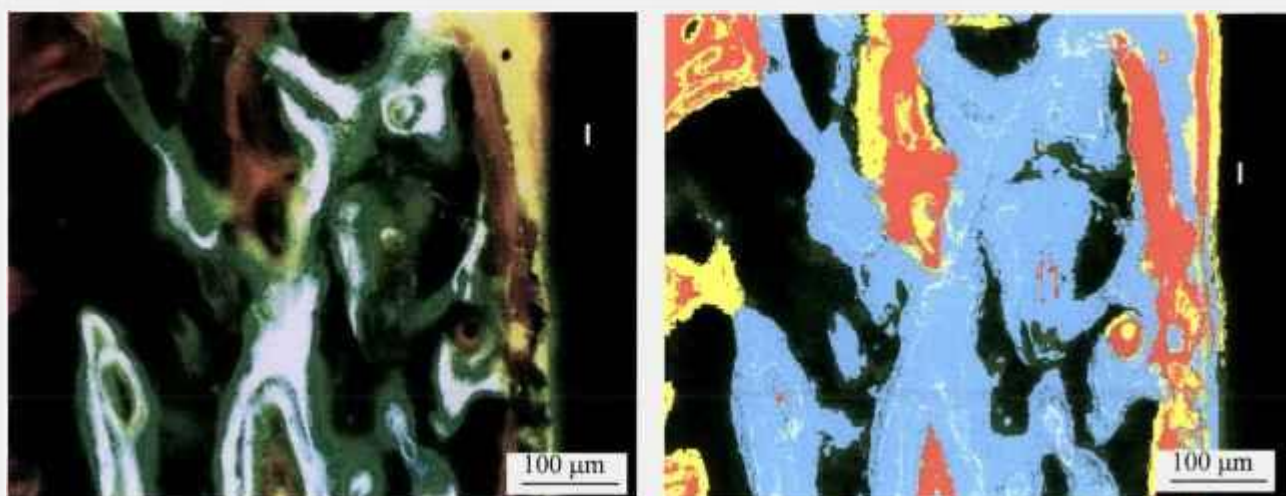
Figura 4: Imagem obtida por microscópio estereoscópico de uma lâmina corada com azul de toluidina, mostrando as quatro regiões (R1, R2, R3 e R4) onde foram realizadas as mensurações morfométricas. CC = Cortical cirúrgica e CO = Cortical oposta

### 3.2.2.3.7.5 Morfometria

Após a obtenção de cada imagem digitalizada obtida pela análise de fluorescência, iniciou-se o procedimento de quantificação das áreas de diferentes

colorações por meio do analisador de imagem (IMAGE PRO PLUS, 4.1, Media Cybernetics), conectado a um computador IBM e ao microscópio de fluorescência NIKON (ECLIPSE E 1000)\*. O programa de computador classificou automaticamente as cores dos marcadores fluorocromáticos impressas nas fotografias digitais. Para cada registro individual foi selecionada aleatoriamente uma classe de cor (alizarina, calceína e tetraciclina). A associação entre as cores dos marcadores e as classes pré-estabelecidas, gerou uma graduação definida como dicionário de cores, conforme exposta na Figura 5b.

A quantificação foi então realizada por meio de diversas imagens obtidas das quatro regiões (R1, R2, R3 e R4) sempre com relação aos marcadores fluorocromáticos empregados. Ao final da análise, obteve-se os valores das áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupadas por cada marcador em cada região para as 34 lâminas.



(a)

(b)

Figura 5: (a) Micrografia de fluorescência do implante de nitreto de silício na região próxima à cortical cirúrgica, mostrando a deposição dos marcadores ósseos e (b) imagem da mesma região já tratada pelo programa IMAGE PRO PLUS 4.1: cor amarela = alizarina; cor azul = calceína; cor vermelha = tetraciclina. I =Implante

A área total de tecido ósseo depositado para cada região nas 34 lâminas, bem

\*Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas – USP

como as áreas para cada marcador foram analisadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis que é uma alternativa não paramétrica para a ANOVA (Análise de Variância). O teste de Kruskal-Wallis foi considerado o mais adequado para esse caso porque os dados obtidos violaram as pressuposições de normalidade e de homocedasticidade.

Por ser uma generalização do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW), o teste de Kruskal-Wallis serve para se compararem duas ou mais populações quanto à tendência central dos dados e é iniciado ordenando os valores observados de todas as  $k$  amostras juntas. Postos empatados recebem o valor do posto médio. A seguir, somam-se os postos atribuídos a cada valor e calcula-se  $H$  (Equação 5) (CALLEGAR-JACQUES, 2004).

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1) \quad (5)$$

onde:

$n_i$  = tamanho de cada amostra

$N = \sum n_i$  = número total de indivíduos

$R_i$  = soma dos postos em cada amostra

O empate entre os postos é corrigido, utilizando-se um fator de correção (FC), de acordo com a Equação 6.

$$H_{\text{corrig}} = \frac{H}{FC} \quad (6)$$

onde:

$$FC = 1 - \frac{CE}{N^3 - N}$$

$$CE = \sum (t^3 - t)$$

$t$  = número de postos empatados

Nesse trabalho, duas situações foram testadas seguindo o procedimento descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Análises estatísticas realizadas nos dados obtidos por meio da quantificação de osso neoformado realizada com o programa de computador IMAGE PRO PLUS 4.1

	(I)	(II)
Análise	Comparação entre os postos médios das quantidades totais de osso depositado nas quatro regiões de análise.	Comparação entre os postos médios das quantidades de osso depositado definidas pelos três marcadores teciduais.
Número de grupos experimentais	4	3
Tamanho de cada amostra ( $n_i$ )	34	136
Número total de indivíduos (N)	136	408
Hipóteses estatísticas	Hipótese Nula ( $H_0$ ) = Não há diferença entre as quatro regiões de análise quanto a quantidade de osso depositado.	Hipótese Nula ( $H_0$ ) = Não há diferença entre os três estágios de deposição óssea analisados por meio dos marcadores teciduais.
	Hipótese Alternativa ( $H_1$ ): A quantidade de osso depositado varia entre as regiões de análise.	Hipótese Alternativa ( $H_1$ ): A quantidade de osso depositado varia entre os três estágios analisados.

Assumindo-se um nível de significância de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ), o valor de  $H_{corrig}$  é comparado com o  $\chi^2_{\alpha;gl}$  com (k-1) graus de liberdade, sendo  $\chi^2$  o Qui-quadrado, k o número de tratamentos e gl o grau de liberdade. Se  $H_{corrig}$  for maior que  $\chi^2_{\alpha;gl}$ , a hipótese nula é rejeitada e a hipótese alternativa é aceita, concluindo-se que há diferença entre os grupos. Se isso acontece, deve-se identificar entre quais grupos ocorrem as diferenças, utilizando-se um procedimento não paramétrico de comparações múltiplas semelhante ao teste de Tukey, denominado teste de Dunn (CALLEGAR-JACQUES, 2004).

No teste de Dunn os postos médios ( $\bar{R}_i = R_i/n_i$ ) são ordenados do maior ao menor. Em seguida, calculam-se as diferenças entre dois a dois desses valores para que o parâmetro  $Q_{calc}$  possa ser determinado pela Equação 7 (CALLEGAR-JACQUES, 2004).

$$Q_{calc} = \frac{R_A - R_B}{EP} \quad (7)$$

Onde:

$\bar{R}_A$  e  $\bar{R}_B$  = postos médios de duas amostras diferentes

$$EP = \text{erro padrão, ou seja, } EP = \sqrt{\left( \frac{N(N+1)}{12} - \frac{CE}{12(N-1)} \right) \left( \frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}$$

$n_A$  e  $n_B$  = tamanhos das duas amostras que estão sendo comparadas.

Cada valor de  $Q_{calc}$  é comparado com um valor crítico  $Q_{\alpha,k}$ . Se o valor calculado for igual ou maior que o tabelado, rejeita-se a hipótese de igualdade entre os grupos que estão sendo comparados.

### 3.2.2.3.7.6 Microscopia de Luz (Azul de Toluidina)

A fim de se verificar os processos de neoformação e remodelamento ósseo, a ocorrência de possíveis reações adversas e o tipo de tecido interfacial desenvolvido entre o osso receptor e o implante de nitreto de silício, lâminas coradas com o azul de toluidina foram analisadas por meio de um microscópio estereoscópico ZEISS (STEMI SV 11)\* e pelos microscópios ópticos NIKON (ECLIPSE E 1000)\*\* e ZEISS (AXIOPLAN 2)\*.

Para que as lâminas pudessem ser coradas com azul de toluidina, as mesmas foram primeiramente hidratadas numa série de álcoois, a partir de uma concentração de etanol a 100 % em volume, até, 96, 90, 80 e 70 %, respectivamente, permanecendo imersas nas soluções por 2 minutos. As lâminas foram então imersas, por 25 minutos, numa solução contendo 0,5 g de azul de toluidina dissolvido em 100 ml de água destilada e, em seguida, lavadas em água corrente.

\*Laboratório de Petrografia Sedimentar do Instituto de Geociências – USP

\*\*Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

### 3.2.2.3.7.7 Microscopia de Luz de Polarização

A técnica de microscopia de luz de polarização permite visualizar moléculas ou estruturas anisotrópicas e, portanto, birrefringentes. Quando submetidas à luz de polarização, as estruturas birrefringentes modificam o eixo da luz, aparecendo como redes brilhantes em um fundo escuro (WOLMAN, 1975).

Nesse trabalho, a disposição das fibras colágenas presentes no osso novo foi avaliada utilizando-se lâminas polidas, por meio de um microscópio estereoscópico ZEISS (STEMI SV 11)\* e um microscópio óptico ZEISS (AXIOPLAN 2)\*, ambos com filtro para polarização.

Além disso, microscopia de luz de polarização foi empregada em lâminas coradas pelo método do picro sirius para se qualificar o tipo de colágeno presente no osso adjacente ao implante. Para tanto, as lâminas foram inicialmente hidratadas numa série de álcoois de diferentes concentrações em volume (100, 96, 90, 80 e 70 %), lavadas em água destilada e coradas por meio de uma solução contendo 0,1 g de picro sirius dissolvido em 100 ml de água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas em ácido clorídrico por 45 minutos, lavadas em água destilada e, finalmente, desidratadas.

Quando lâminas histológicas são coradas por esse método, as fibras de colágeno maduro (tipo I) aparecem como estruturas amarelas ou vermelhas e as fibras de colágeno imaturo (tipo III) aparecem como estruturas verdes (VIDAL et al., 1982).

As análises foram feitas, utilizando-se um microscópio ZEISS – AXIOPLAN 2\* com filtro de polarização.

### 3.2.2.3.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia

Análises por microscopia eletrônica de varredura de amostras contendo o implante e o tecido ósseo adjacente foram realizadas, utilizando-se os equipamentos PHILIPS (XL 30) e JEOL (JXA – 6400)\*\* , para se verificar (a) o crescimento ósseo próximo ao implante, (b) a interação do implante com o osso e (c) as fibras colágenas em contato

---

\*Laboratório de Petrografia Sedimentar do Instituto de Geociências – USP

\*\*Laboratório de Caracterização de Materiais - CTMSP

com o implante. Para isso, realizou-se a fixação das amostras em solução Karnovsky, imediatamente após sua remoção dos animais. Em seguida as amostras foram lavadas em água corrente por 2 hora e desidratadas na série de álcoois descrita na Tabela 3.

Após a desidratação, as amostras foram tratadas com solução de tetróxido de ósmio a 2% e secas pelo método do ponto crítico.

Lâminas recobertas com carbono, preparadas de acordo com o procedimento descrito no Item 3.2.2.3.7.3, foram utilizadas para a análise do perfil químico na interface osso/implante, por meio da técnica de espectroscopia por dispersão de energia (EDS). O equipamento utilizado foi um espectroscópio da NORAN INSTRUMENTS\*, acoplado a um microscópio eletrônica de varredura da JEOL (JXA – 6400)\*.

## 4. RESULTADOS

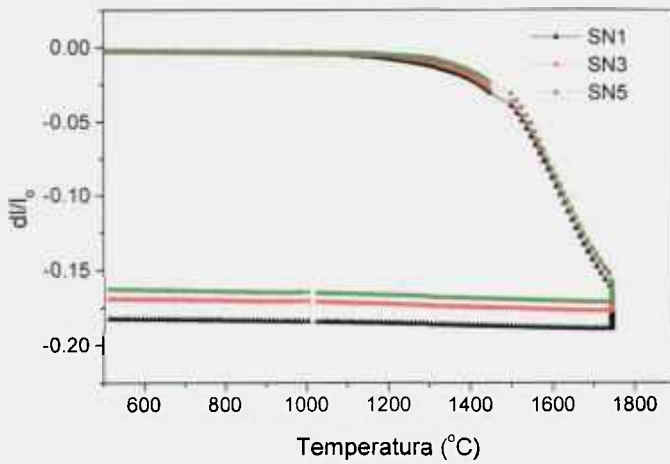
### 4.1 Estudo de Densificação por Dilatometria

O estudo de densificação por dilatometria foi realizado utilizando as composições mostradas na Tabela 2, a fim de selecionar aquelas mais adequadas para dar continuidade ao estudo. Nessa etapa do trabalho, selecionou-se também as condições para posterior sinterização das amostras.

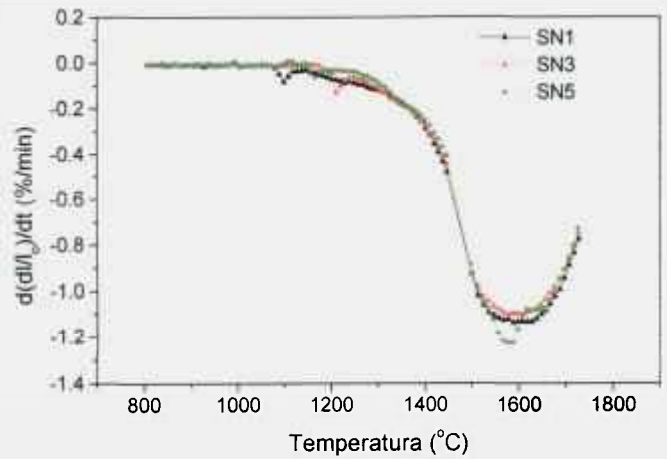
A Figura 6 mostra as curvas obtidas por dilatometria para as cinco composições estudadas. A partir dessa figura, pode-se verificar que a amostra SN4 foi aquela que apresentou maior retração linear, seguida pelas amostras SN2 e SN1. Dessa forma, a composição SN4 foi a primeira a ser selecionada para a realização do estudo biológico em cerâmicas à base de nitreto de silício. A segunda composição a ser selecionada foi a SN1, por ter resultado em maior retração linear dentre aquelas contendo óxido de itérbio como aditivo.

Ainda a partir da Figura 6, observa-se que, para todas as composições, o processo de densificação foi iniciado entre 1150 e 1200°C, o que corresponde ao primeiro pico na curva de taxa de densificação em função da temperatura (Figuras 6b e 6d). A retração continuou até 1750°C, sendo que a cerca de 1600°C um pico de máxima taxa de retração pode ser notado.

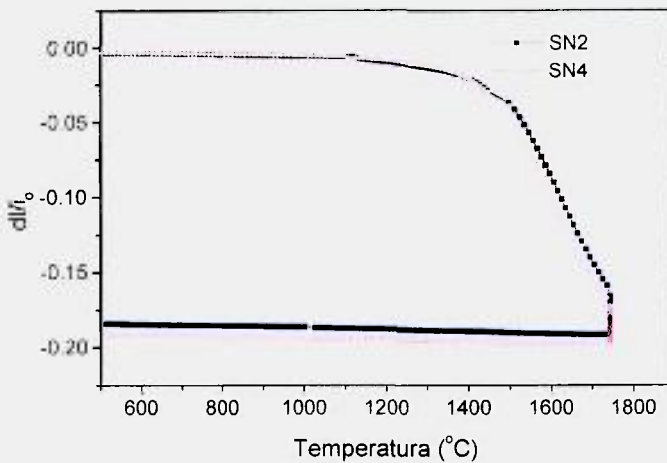
Quando a temperatura atingiu 1750°C praticamente toda a retração já havia ocorrido e, durante o patamar de 1 hora a 1750°C, completou-se o processo de densificação.



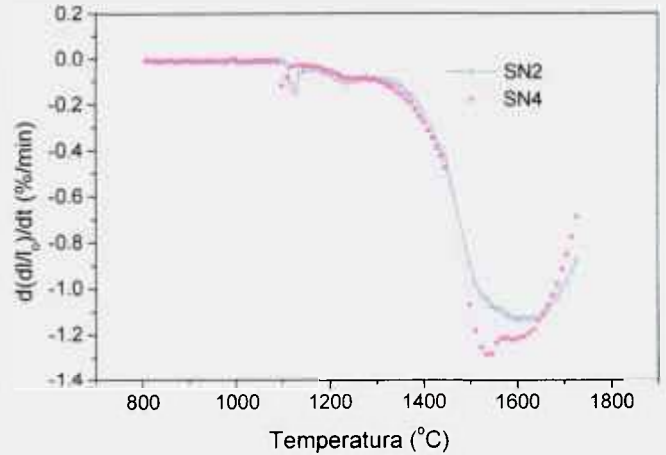
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6: Curvas de densificação obtidas por dilatometria das amostras com as composições mostradas na Tabela 2. As Figuras 6a e 6b mostram a retração linear e a taxa de retração linear em função da temperatura para as composições contendo os óxidos de itérbio e de alumínio. As Figuras 6c e 6d mostram a retração linear e a taxa de retração linear em função da temperatura para as composições contendo os óxidos de ítrio e de alumínio. As curvas de densificação para a amostra SN1, que contém os três aditivos estudados estão mostradas nas Figuras 6a e 6b

## 4.2 Densidade após Sinterização

A partir da Tabela 7, pode-se observar os valores de densidade absoluta das amostras SN1 e SN4 após sinterização em forno de resistência de grafite, bem como seus valores de densidade em relação à densidade teórica, calculada pela regra das misturas.

Tabela 7: Densidade das amostras após sinterização ( $\rho$ ) e em relação à densidade teórica ( $\rho_T$ )

Amostra	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_T$ (%)
SN1	3,05 ± 0,05	93 ± 1
SN4	3,07 ± 0,02	94 ± 1

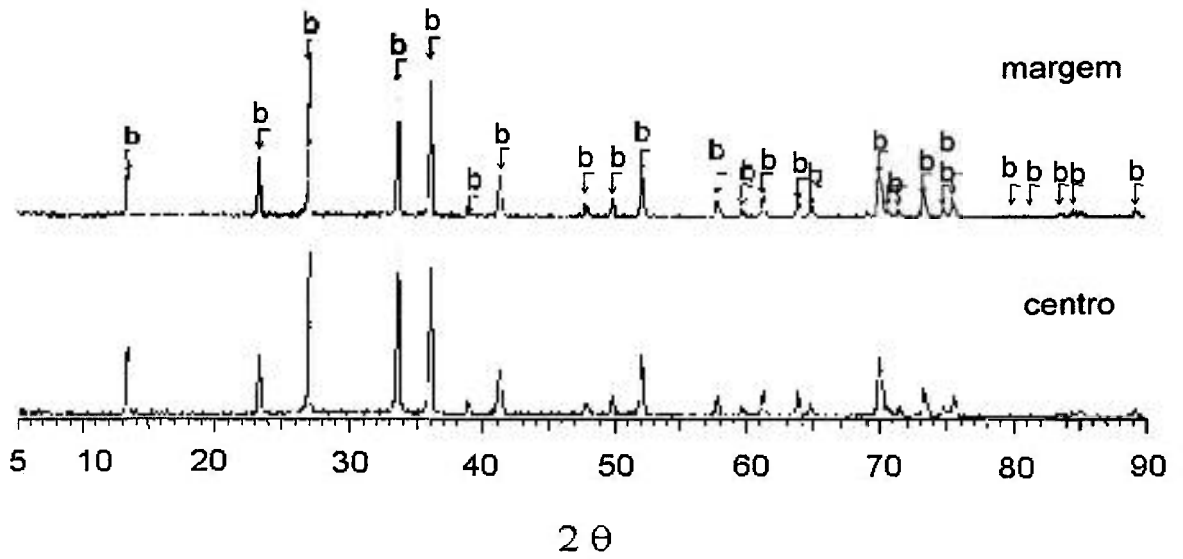
Os resultados demonstram que as amostras de diferentes composições apresentam valores de densidade relativa semelhantes.

## 4.3 Fases Formadas após Sinterização

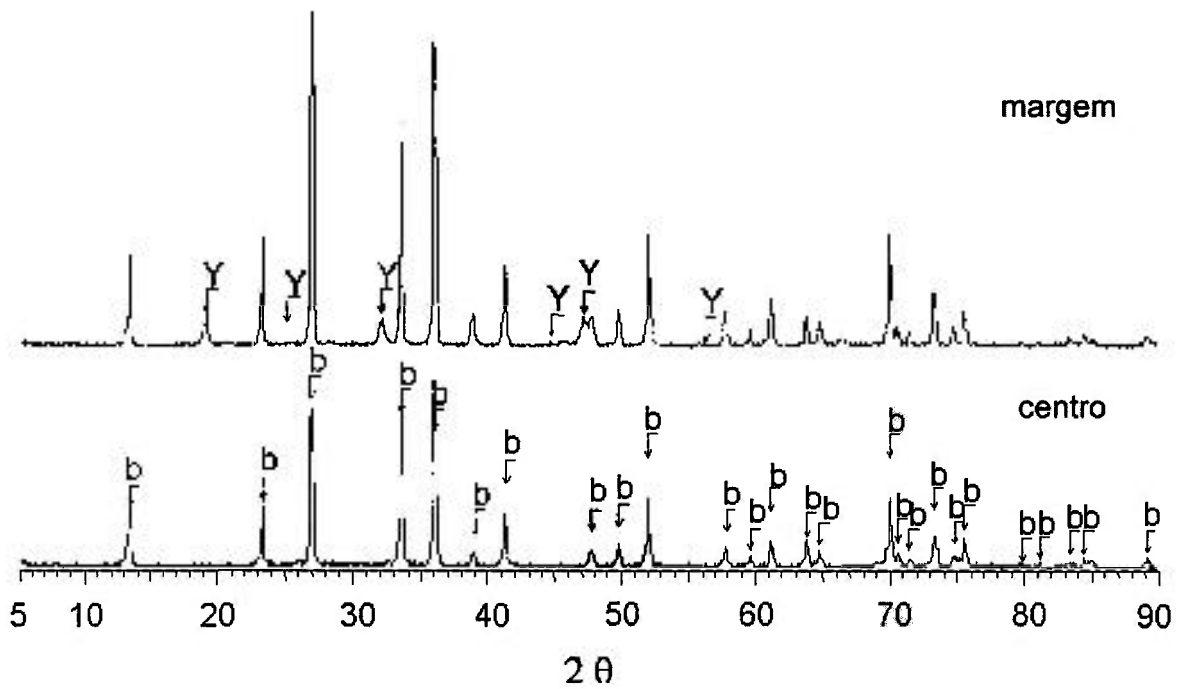
Com base nas análises por difratometria de raios X realizadas em amostras sinterizadas (Figura 7), verificou-se tanto na margem como no centro da amostra de composição SN1, a presença exclusiva da fase  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

A fase  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> foi igualmente identificada na margem e no centro da amostra SN4. Além disso, os maiores teores dos óxidos de ítrio e de alumínio na composição SN4, em comparação com a composição SN1, resultou na cristalização da fase Y<sub>3</sub>AlSi<sub>2</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>, de estrutura hexagonal, na margem da amostra, durante o processo de resfriamento (Figura 7b).

A presença da fase  $\alpha$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, bem como dos óxidos de ítrio, itérbio e alumínio, não foi identificada em nenhuma das amostras estudadas.



(a)

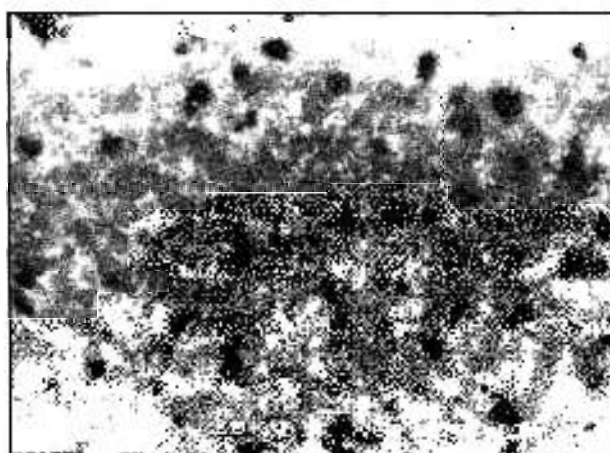


(b)

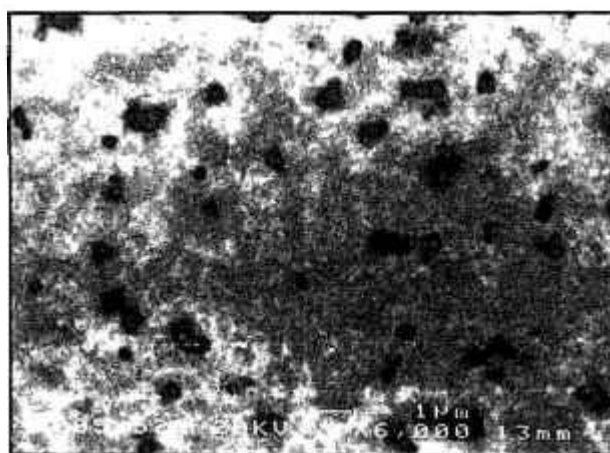
Figura 7: Difratoograma de raios X do centro e da margem das amostras (a) SN1 (b) SN4 , onde b é a fase  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  e Y é a fase  $\text{Y}_3\text{AlSi}_2\text{O}_7\text{N}_2$

#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies polidas das amostras SN1 e SN4 sinterizadas (Figura 8) mostram que a fase  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  (fase cinza) está dispersa numa fase clara, em ambas as amostras estudadas. O tom mais claro dessa fase, em comparação com a fase  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  (fase cinza da Figura 8), deve-se à presença dos cátions dos óxidos de terras raras adicionados, que apresentam maior número atômico que o silício.



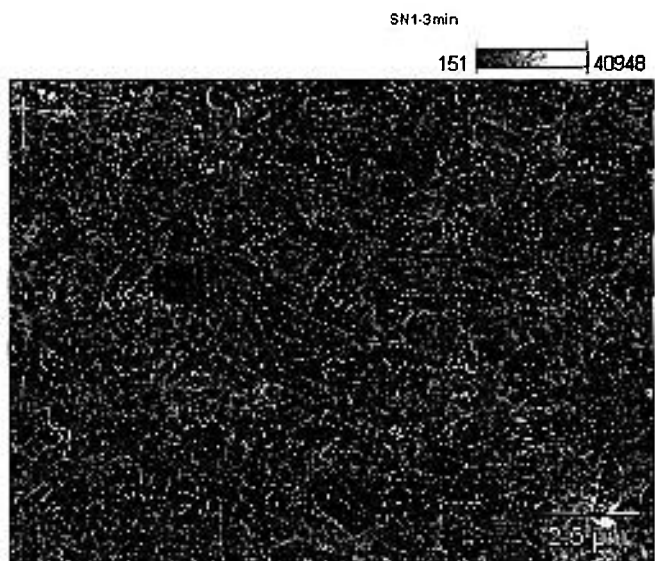
(a)



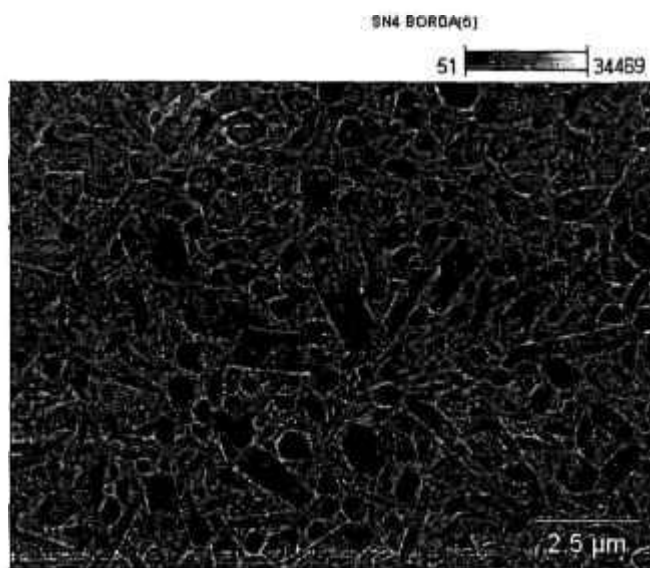
(b)

Figura 8: Micrografias eletrônicas de varredura por elétrons retroespalhados da superfície polida de amostras de composições (a) SN1 e (b) SN4, mostrando as fases presentes. A fase preta são os poros, a fase cinza são os grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  e a fase mais clara é a fase secundária resultante da reação dos aditivos com a sílica da superfície do pó de  $\text{Si}_3\text{N}_4$

A partir das análises realizadas nas amostras atacadas (Figura 9), verifica-se a forma alongada dos grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Comparando-se as micrografias mostradas na Figura 9, observa-se que a composição SN1 (Figura 9a) gerou uma microestrutura mais fina que a composição SN4, com grãos relativamente menores.



(a)



(b)

Figura 9: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície polida e atacada de amostras de composições (a) SN1 e (b) SN4, mostrando a distribuição e a forma dos grãos de  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$

A Figura 10 ilustra a propagação de uma trinca na superfície da amostra SN1, induzida por meio de um teste de dureza Vickers (Item 3.2.2.3.4). A trinca está se propagando ao longo dos contornos de grãos de  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, promovendo uma fratura intergranular, típica em materiais compostos por grãos com elevada razão de aspecto, como o nitreto de silício.

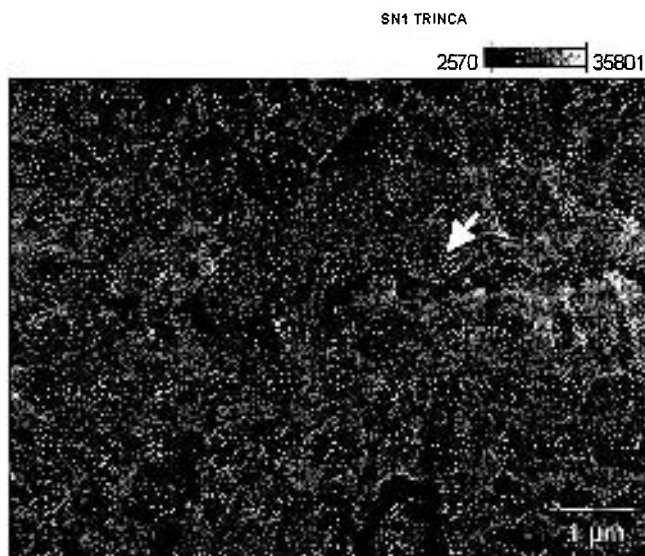


Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura da superfície polida e atacada de uma amostra de composição SN1, mostrando a deflexão de uma trinca (seta) entre os grãos de  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. A trinca foi induzida por meio de um indentador Vickers

#### 4.5 Dureza e Tenacidade à Fratura

Características microestruturais, tais como, porosidade, composição e teor da fase intergranular, tamanho e forma de grão, que afetam tanto a dureza como a tenacidade à fratura de cerâmicas à base de nitreto de silício são dependentes da composição utilizada (GUEDES e SILVA, 2000).

A Tabela 8 mostra a dependência da dureza com a composição do material, sendo o maior valor atingido pela amostra de composição SN4. Nesse trabalho, não foi possível observar a influência da composição do material na sua tenacidade à fratura, pois foram encontrados valores semelhantes dessa propriedade para as duas amostras analisadas.

Tabela 8: Dureza Vickers ( $H_V$ ) e tenacidade à fratura ( $K_{Ic}$ ) das amostras sinterizadas

composição	$H_V$ (GPa)	$K_{Ic}$ (MPa.m <sup>1/2</sup> )
SN1	11,1 ± 0,2	5,0 ± 0,4
SN4	13,2 ± 0,2	4,5 ± 0,2

#### 4.6 Teste de Citotoxicidade “*in vitro*”

Testes de citotoxicidade “*in vitro*” foram realizados com o intuito de avaliar tanto a toxicidade devido ao próprio nitreto de silício e às fases intergranulares presentes, como a toxicidade devido a possíveis contaminações durante as etapas de processamento dos materiais (moagem, compactação e sinterização).

A Figura 11 ilustra a porcentagem de colônias formadas em cada placa de Petri em relação ao controle de CHO em função da concentração dos extratos. A partir de tais curvas, observa-se que as amostras analisadas apresentam um índice de citotoxicidade maior que 100 % ( $IC_{50\%} > 100$ ), semelhante ao do controle negativo, ou seja ao da alumina, indicando que as amostras nas composições estudadas são não citotóxicas.

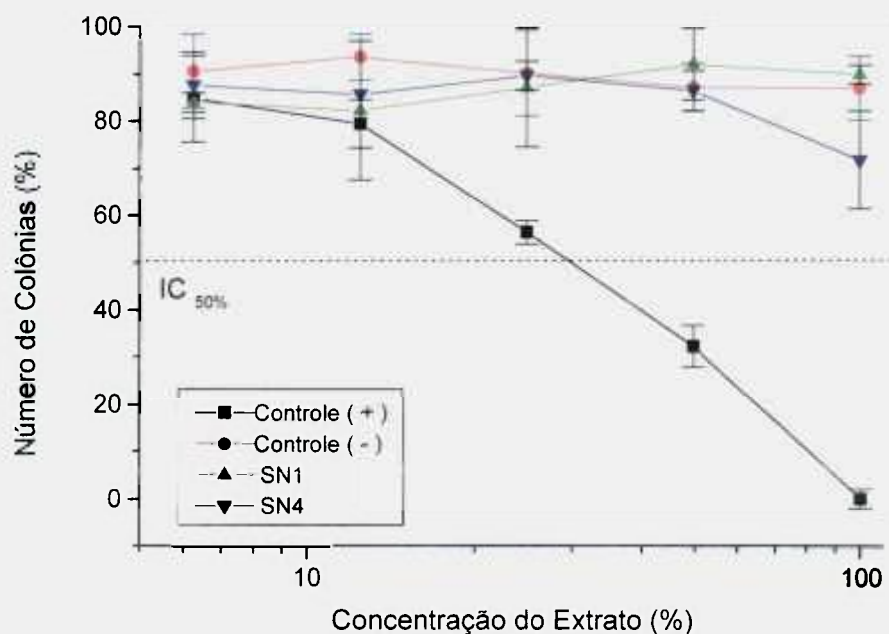


Figura 11: Curva de supressão de colônias de amostras de nitreto de silício sinterizadas

#### 4.7 Teste de Solubilidade

A Tabela 9 mostra o teor de silício presente na solução de controle (SBF puro) e naquelas resultantes da imersão das amostras SN1 e SN4 em SBF por 3, 7 e 14 dias. Com base nesses dados, pode-se notar que a medida do teor de silício na solução de controle é de 0,2 mg/l. Assim, a concentração de silício identificada nas soluções analisadas sugere que as amostras de nitrato de silício apresentam baixa solubilidade em SBF.

Tabela 9: Teor de silício presente nas soluções geradas pela incubação de amostras de composições SN1 e SN4 em SBF por diferentes períodos de tempo

	<b>Tempo de imersão (dias)</b>	<b>Teor de silício (mg/l)</b>
controle	3	0,15
	7	0,20
	14	0,20
SBF+SN1	3	0,22
	7	0,25
	14	0,53
SBF+SN4	3	0,19
	7	0,20
	14	0,23

É possível observar também que, após 14 dias de imersão em SBF, a amostra SN1 resultou em uma solução com um teor de silício de 0,53 mg/l, ou seja, com solubilidade superior à amostra SN4 nas mesmas condições.

## 4.8 Experimento em Animais

Todos os animais sobreviveram sem complicações pós-operatórias durante o período de oito semanas, não sendo observado macroscopicamente nenhum tipo de infecção na região operada.

### 4.8.1 Microscopia de Fluorescência e Morfometria

Os estágios de deposição óssea durante o período de oito semanas, no qual os implantes foram mantidos nos animais, foram analisados por microscopia de fluorescência. As diferentes colorações mostradas nas micrografias exibidas nesse item evidenciam indícios de osteogênese por meio da união dos marcadores fluorocromáticos à apatita: o corante alizarina surgiu em cor marrom-tijolo, a calceína em verde e a tetraciclina em laranja.

Nas quatro regiões de análise (Figura 4), a coexistência de áreas marcadas pelos três corantes utilizados pôde ser freqüentemente vista. Entretanto as áreas marcadas pela calceína apareceram mais intensamente na maioria das lâminas, sendo a deposição de alizarina observada geralmente em áreas mais distantes da margem do implante (Figura 12 a 15).

A diferença quantitativa entre as áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) coradas pelos três marcadores nas quatro regiões estudadas foi comprovada por análises morfométricas associadas ao teste estatístico de Kruskal-Wallis (Tabela 10). O teste, realizado a partir dos dados mostrados no Item 8.1, demonstrou que  $H_{\text{corr}} = 99,831$  é maior do que  $\chi^2$  crítico para um nível de significância de 0,05 ( $\chi^2_{0,05;2} = 5,99$ ). Assim, a hipótese nula foi rejeitada, ou seja, a quantidade de osso depositado variou entre os três estágios analisados caracterizados pelas áreas marcadas com alizarina, calceína e tetraciclina.

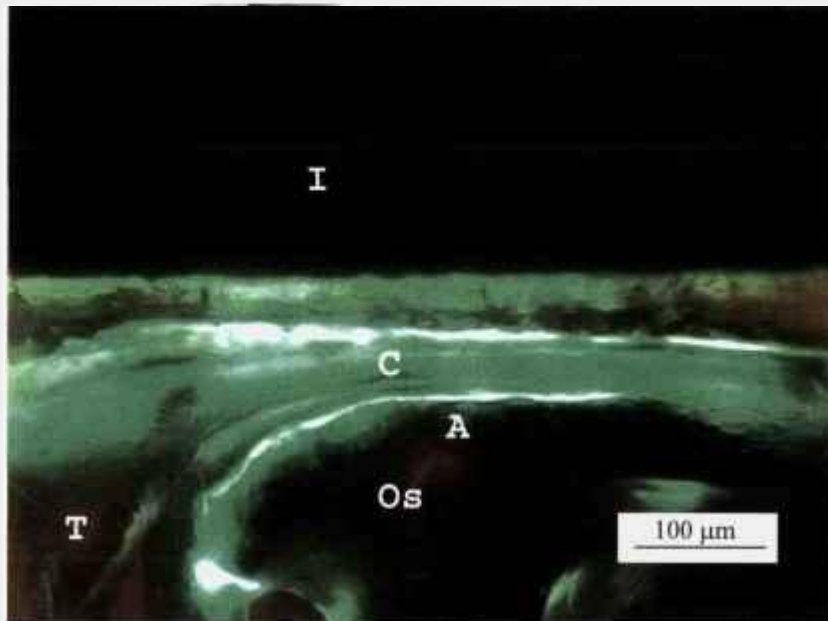
Na Tabela 11, são apresentados os testes (teste de Dunn) realizados para identificar as diferenças entre as áreas marcadas por alizarina, calceína e tetraciclina, comparando-se duas a duas. Os valores calculados na comparação entre alizarina e calceína ( $Q_{\text{calc}} = 7,94$ ) e na comparação entre calceína e tetraciclina ( $Q_{\text{calc}} = 9,63$ ) foram maiores que o tabelado ( $Q_{0,05;3} = 2,39$ ). Pode-se afirmar, então, que a quantidade em

área ( $\mu\text{m}^2$ ) de osso depositado foi diferente no período de aplicação da alizarina com relação ao da calceína, bem como no período de aplicação da calceína com relação ao da tetraciclina. Associando-se esses resultados com as imagens obtidas (Figuras 12 a 15), conclui-se que embora o processo de neoformação óssea tenha abrangido os três estágios nos quais os marcadores fluorocromáticos foram administrados nos animais, tal processo ocorreu com maior intensidade entre a quinta e a sexta semanas, período no qual a calceína foi aplicada. Adicionalmente, por meio da Tabela 10, verifica-se que não houve diferença na quantidade de osso depositado nos períodos de aplicação da alizarina e da tetraciclina.

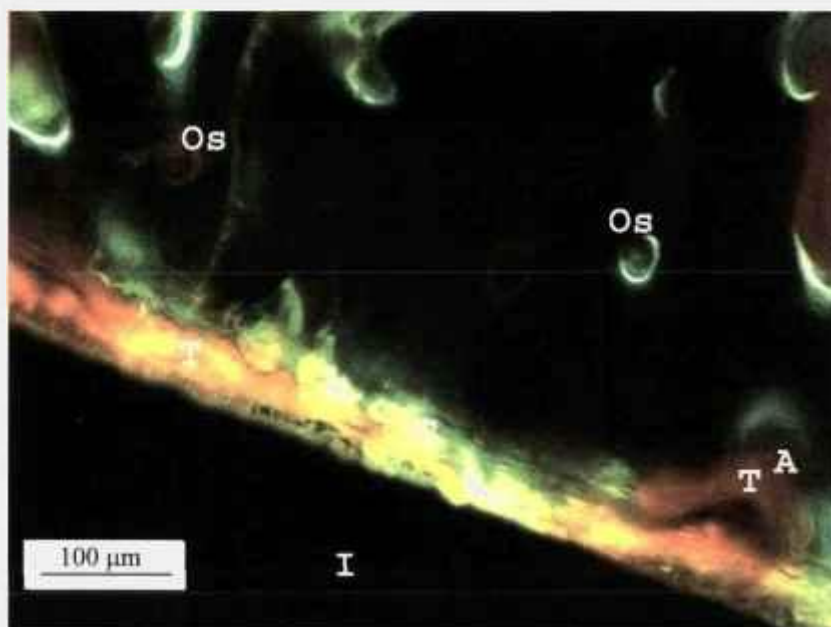
Os resultados obtidos mostraram ainda que a mineralização do tecido ósseo diretamente sobre a superfície do implante ocorreu após o período de aplicação da calceína (Figuras 12 a 15). Outrossim, a presença de uma osteona bem próxima à superfície do implante, pode ser notada pela Figura 13b.

Em todas as regiões de análise (Figura 4), foi constatada a presença de osteonas marcadas pelos três corantes utilizados (Figuras 12b, 13, 14a e 15a), confirmando que sua formação se deu nos diferentes períodos de remodelamento ósseo.

As semelhanças qualitativas observadas nas quatro regiões por meio das micrografias de fluorescências foram comprovadas pelos resultados do teste estatístico de Kruskal-Wallis, realizado a partir dos dados mostrados no Item 8.3. O teste demonstrou que  $H_{\text{corr}} = 2,404$  é menor que  $\chi^2$  crítico, para um nível de significância de 0,05 e 3 graus de liberdade ( $\chi^2_{0,05;3} = 7,81$ ). Assim, a hipótese nula foi aceita, ou seja, as quatro regiões de análise são iguais quanto a quantidade total de osso depositado (Tabela 12).

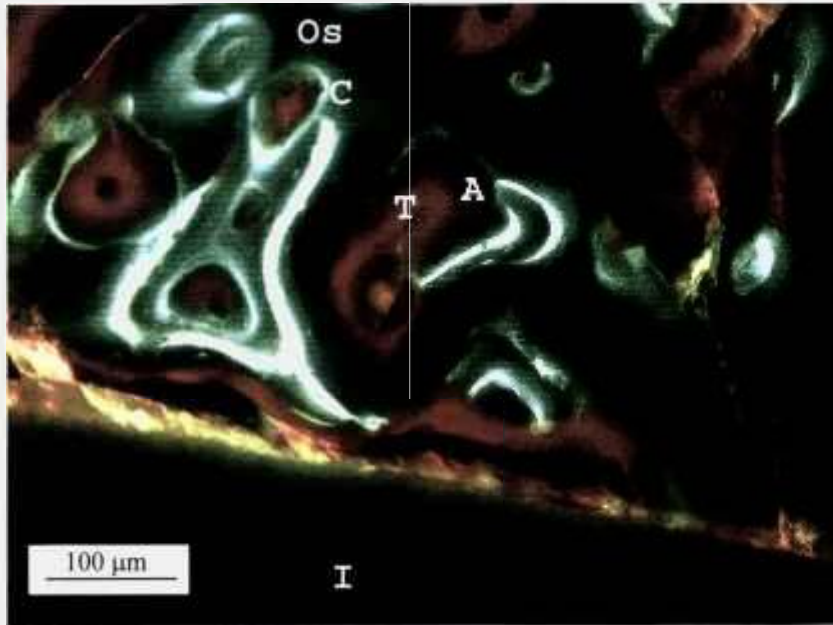


(a)

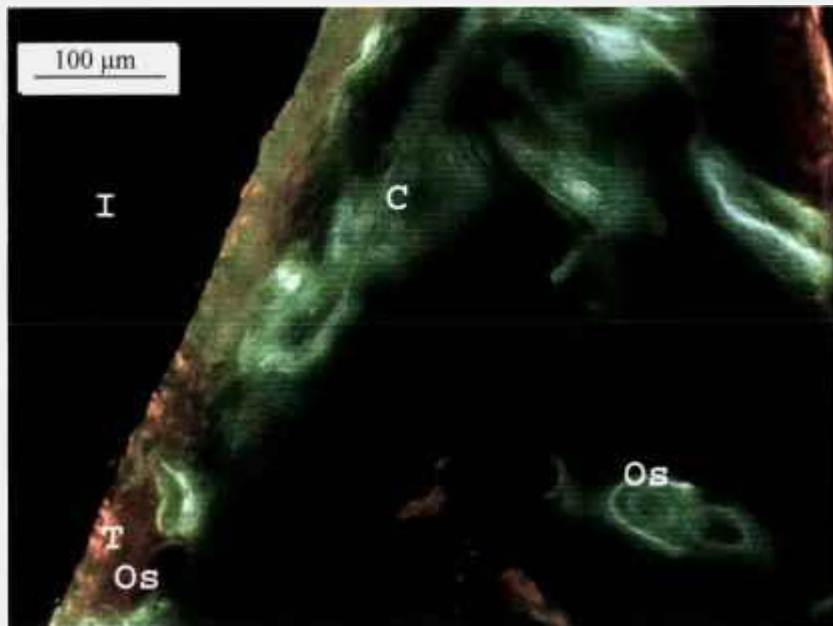


(b)

Figura 12: Micrografias de fluorescência da Região 1 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante. A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante

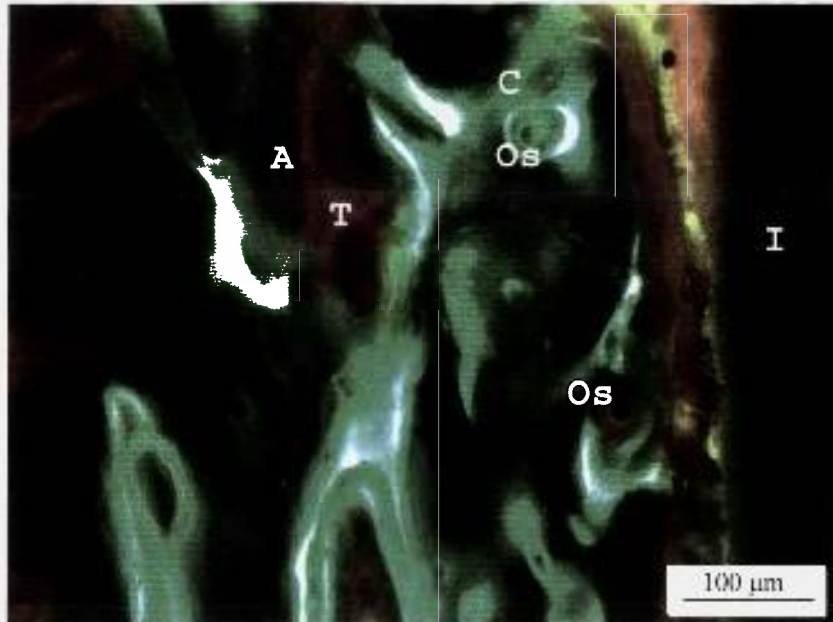


(a)

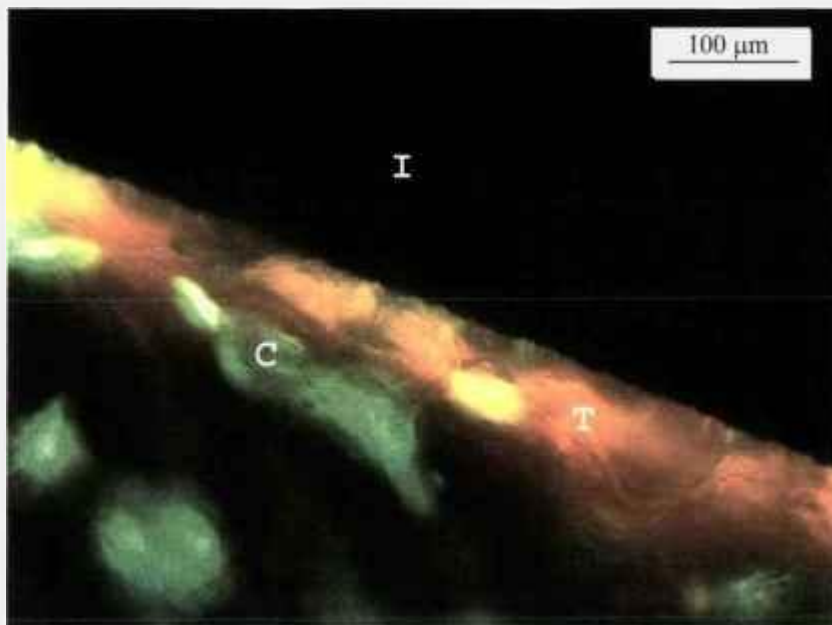


(b)

Figura 13: Micrografias de fluorescência da Região 2 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante. A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante

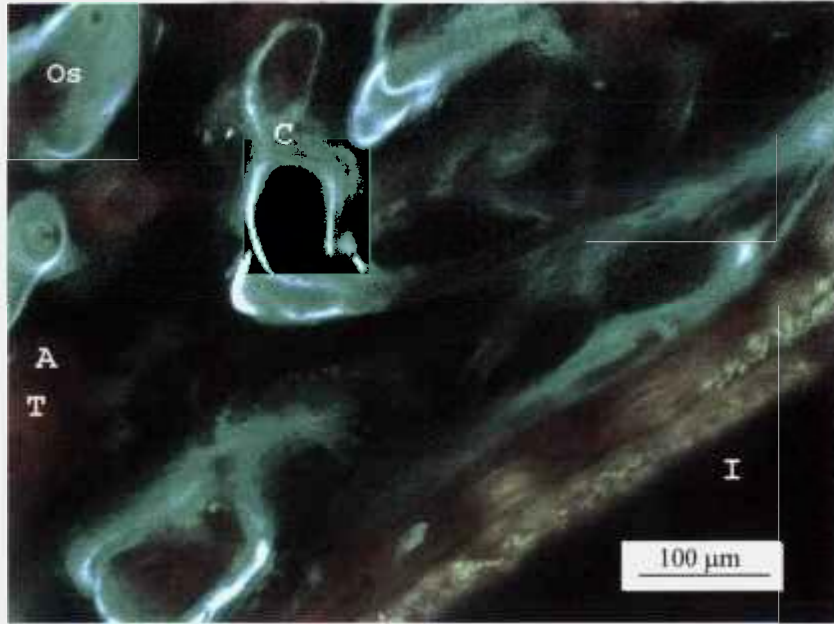


(a)



(b)

Figura 14: Micrografias de fluorescência da Região 3 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante. A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante



(a)



(b)

Figura 15: Micrografias de fluorescência da Região 4 de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando o remodelamento ósseo e contato direto osso/implante. A = alizarina, C = calceína, T = tetraciclina, Os = osteona, I = implante

Tabela 10: Comparação entre os postos médios das quantidades de osso depositado em  $\mu\text{m}^2$  definidas pelos três marcadores teciduais (Teste de Kruskal-Wallis)

	Alizarina	Calceína	Tetraciclina
<b>Soma dos Postos (<math>R_i</math>)</b>	23775	39106,5	20362,5
<b>Posto Médio (<math>\bar{R}_i</math>)</b>	174,816	287,548	150,833
<b>Número de empates no posto 35,5</b>	70		
<b>CE</b>	44703,375		
<b>H</b>	99,766		
<b>FC</b>	0,999		
<b><math>H_{\text{corrig}}</math></b>	99,831		
$\chi^2_{0,05;2}$ (CALLEGAR-JACQUES, 2004)	5,99		

Tabela 11: Comparação múltipla entre os postos médios das quantidades de osso depositado determinadas pelos marcadores teciduais (Teste de Dunn)

Comparação	$\bar{R}_A - \bar{R}_B$	$n_A; n_B$	EP	$Q_{\text{calc}}$	$Q_{0,05;3}$
<b>Alizarina x Calceína</b>	112,732	136;136	14,296	7,886	2,39
<b>Alizarina x Tetraciclina</b>	23,983	136;136	14,296	1,678	2,39
<b>Calceína x Tetraciclina</b>	136,714	136;136	14,296	9,563	2,39

Tabela 12: Comparação entre os postos médios das quantidades de osso depositado em  $\mu\text{m}^2$  nas quatro regiões de análise (Teste de Kruskal-Wallis)

	Região1	Região2	Região 3	Região 4
<b>Soma dos Postos (<math>R_i</math>)</b>	2330	2042	2511	2433
<b>Posto Médio (<math>\bar{R}_i</math>)</b>	68,530	60,059	73,853	71,559
<b>Número de empates no posto 12</b>	23			
<b>CE</b>	12144			
<b>H</b>	2,393			
<b>FC</b>	0,995			
<b><math>H_{\text{corrig}}</math></b>	2,404			
$\chi^2_{0,05;3}$ (CALLEGAR-JACQUES, 2004)	7,81			

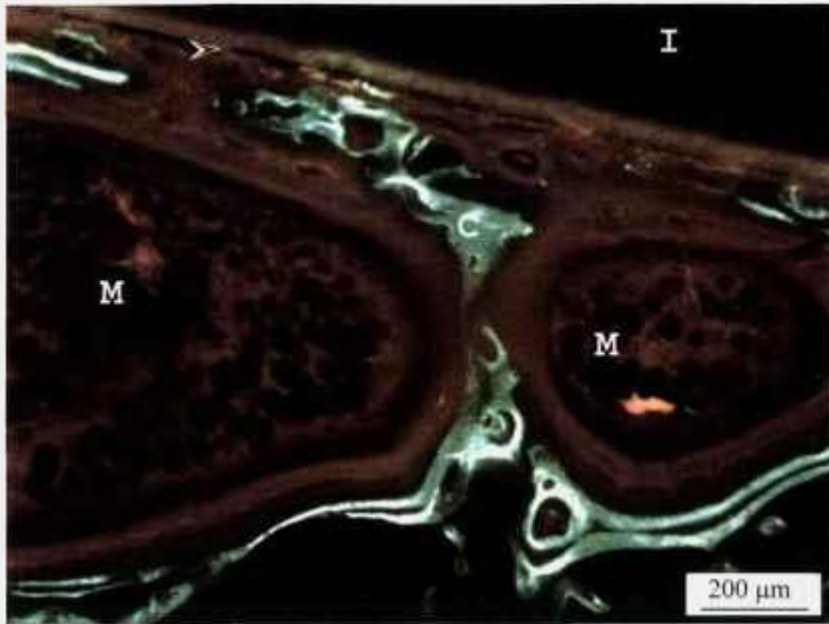
Além de ter sido notada a ocorrência de remodelamento ósseo nas proximidades dos implantes de nitreto de silício estudados, algumas lâminas analisadas por microscopia de fluorescência mostraram que deposição óssea por condução também pode ocorrer (Figuras 16 e 17). Esse fato também foi verificado pelas técnicas de microscopia de luz e microscopia de luz de polarização (Figuras 18, 23 e 24), demonstrando o processo de osteocondução.

Na região da medular mostrada na Figura 16, áreas marcadas por calceína podem ser facilmente notadas, não sendo possível de se identificar alizarina e tetraciclina. Já na Figura 18 onde também se observa deposição óssea na região da medular, verifica-se a presença de áreas coradas com tetraciclina e calceína, ainda que a deposição da calceína tenha sido verificada mais intensamente.

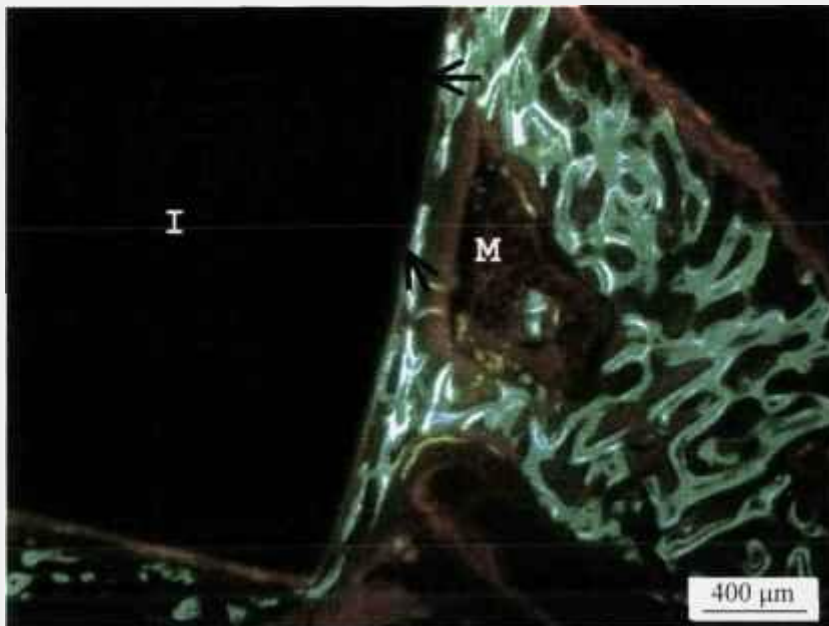
A Figura 16a ilustra uma “ponte” óssea partindo da tábua óssea em direção ao implante, como aquela verificada por microscopia de luz de polarização (Figura 23). A Figura 17 mostra áreas coradas com calceína acompanhando a superfície endostal.

O contorno de coloração esverdeada envolvendo o implante também pode ser observado com base na Figura 16. Além disso, nota-se a existência de um espaço entre o osso e a superfície do implante.

Em algumas áreas indicadas por setas na Figura 16b e em toda a interface da região mostrada na Figura 17, observa-se que houve deposição óssea direta sobre a superfície da cerâmica, caracterizada pela coloração verde típica da calceína.



(a)



(b)

Figura 16: Micrografias de fluorescência da região da medular de duas diferentes lâminas (a) e (b), mostrando a neoformação óssea. Observam-se “pontes ósseas”, contato direto osso/implante (setas na Figura b) e um espaço entre o osso e o implante (cabeça de seta ➤). C = calceína, I = implante e M = cavidade medular

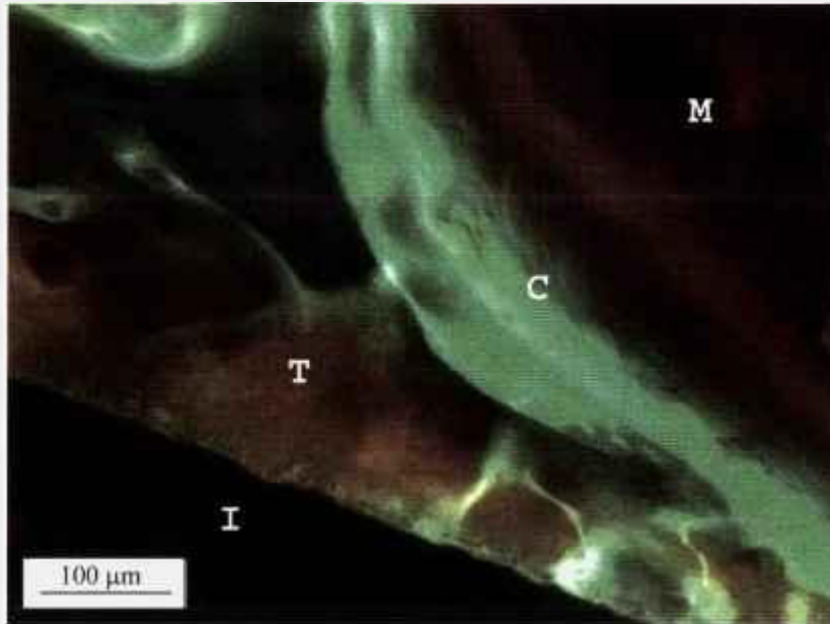


Figura 17: Micrografia de fluorescência da região da medular mostrando a neoformação óssea, o contato direto osso/implante e a presença de calceína sobre a superfície endostal. C = calceína, T = tetraciclina, I = implante, M = cavidade medular

#### 4.8.2 Microscopia de Luz (Azul de Toluidina)

Microscopia de luz foi utilizada em lâminas previamente coradas com azul de toluidina, a fim de se observar o processo de neoformação óssea na interface com o implante, os tipos de interface desenvolvidos, a qualidade do osso novo e a possível presença de reações adversas.

A neoformação óssea, já observada por microscopia de fluorescência (Figuras 12 a 15), também foi verificada ao longo de toda a superfície do material instalado na região da cortical (Figura 18) e, em alguns casos, constatou-se também a sua ocorrência na cavidade medular, como pode ser visto na Figura 18.

Dois tipos de interface foram observados, sendo caracterizados por: (i) contato direto entre o osso e o implante e (ii) tecido não mineralizado (Figura 19). A presença de tecido ósseo lamelar diretamente sobre a superfície do implante (Figuras 12 a 15) pode ser observada mais detalhadamente na Figura 20. Esse tecido contém osteócitos e apresenta lamelas orientadas paralelamente à superfície do material. Os osteócitos,

envolvidos numa matriz de colágeno densamente mineralizada, estão localizados a uma distância mínima de 4  $\mu\text{m}$  a partir da superfície do material implantado e apresentam uma morfologia esférica.

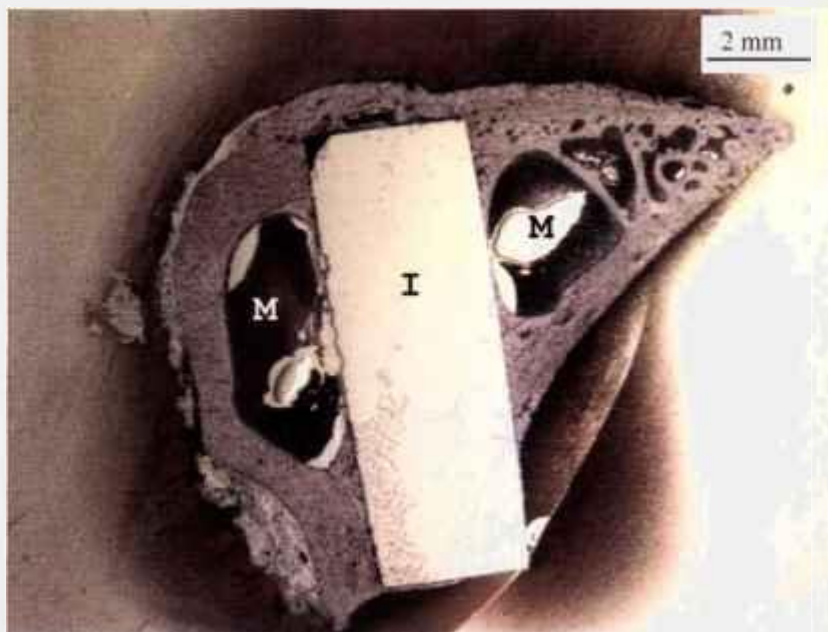


Figura 18: Ilustração obtida por microscópio estereoscópico de uma lâmina corada com azul de toluidina. Observa-se a formação óssea em torno do implante de nitreto de silício.

(SN1) O implante (I) se destacou durante a preparação. M = cavidade medular

As micrografias obtidas mostram que os osteócitos, presentes no tecido ósseo em contato direto com o implante, estão orientados com seu eixo longitudinal paralelos à superfície do material, enquanto que aqueles presentes no tecido ósseo antigo estão orientados perpendicularmente (Figuras 20 e 21), indicando também que as fibras colágenas estão orientadas paralelamente à superfície do implante.



Figura 19: Micrografia óptica mostrando o remodelamento ósseo em torno do implante de nitreto de silício (I) na região da cortical cirúrgica. As setas vermelhas e brancas estão indicando a interface contendo um tecido não mineralizado e um contato ósseo direto, respectivamente. Pode-se observar o endóstio (E) e a cavidade medular (M)

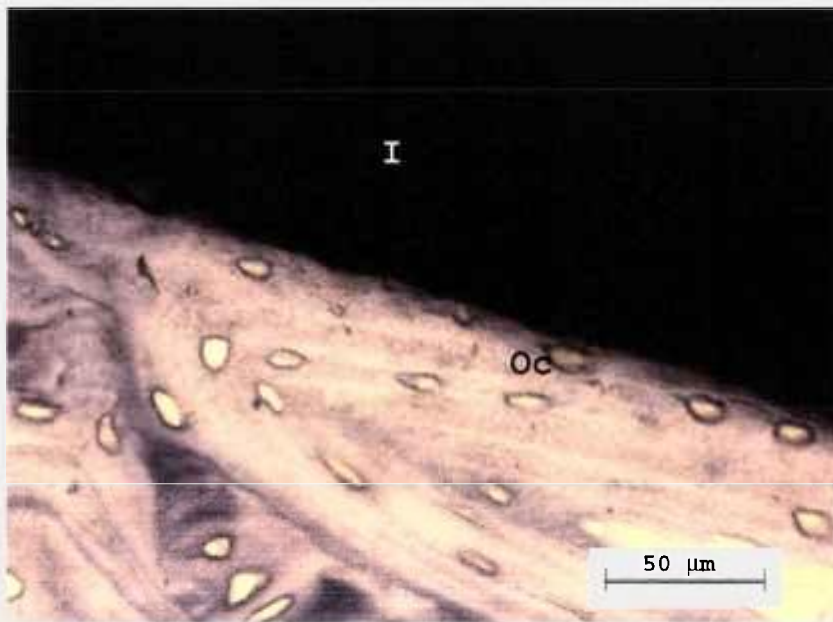


Figura 20: Micrografia óptica da região da medular, mostrando contato direto entre o osso e o implante de nitreto de silício (I). Observa-se também a presença de osteócitos (Oc) próximos à superfície do implante

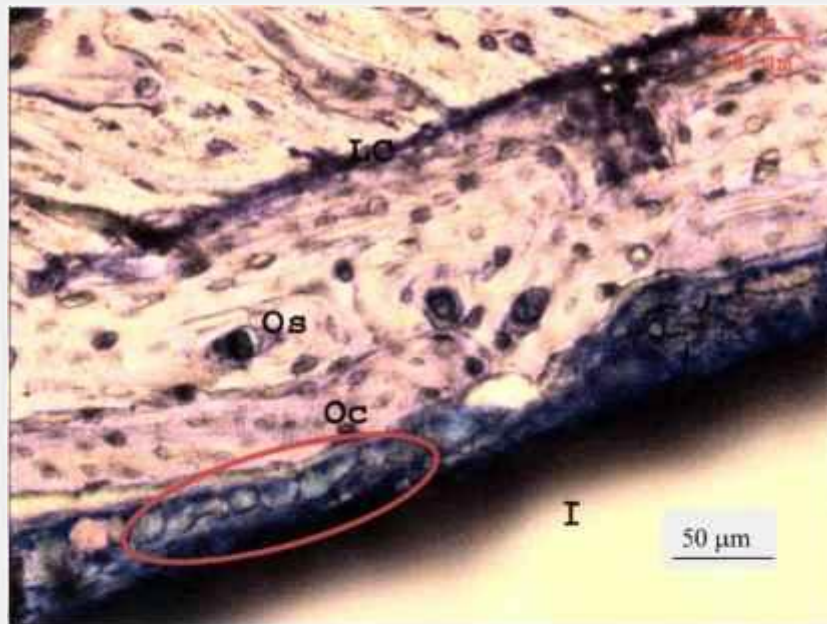
O segundo tipo de interface observado é caracterizado por um tecido não mineralizado, contendo um colar de osteoblastos dispostos ordenadamente (Figura 21), paralelos à superfície do implante.

Nas regiões entre o osso receptor e a interface contendo osteoblastos dispersos numa matriz não mineralizada, observou-se a presença de tecido ósseo lamelar, contendo osteonas e osteócitos (Figura 21), similar àquele desenvolvido diretamente sobre a superfície do implante verificado na Figura 20.

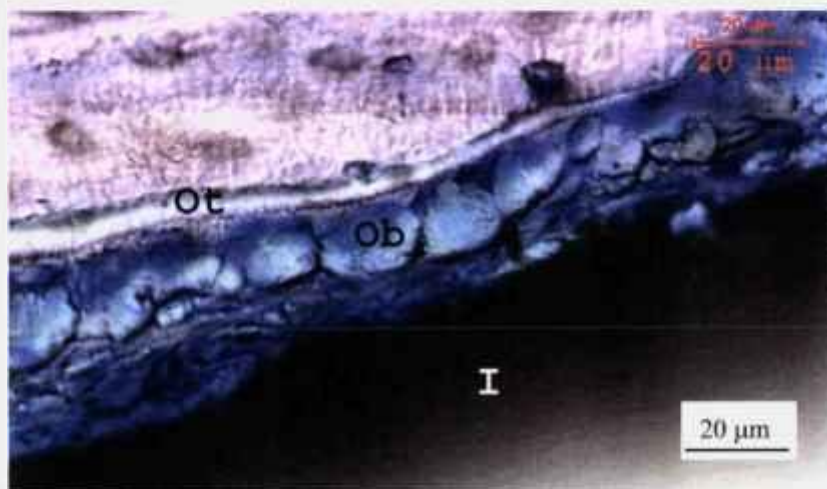
A ancoragem entre o osso novo e o osso pré-existente ocorre por meio de uma linha cimentante, rica em polissacarídeos (ROBERTS et al., 1987), que aparece na Figura 21 como uma linha de coloração azul mais intenso devido à grande quantidade de tecido orgânico que favorece a fixação do corante.

A afinidade do corante azul de toluidina a material orgânico pode ser verificada comparando-se a região do osso pré-existente, mais mineralizada e por isso caracterizada por um uma coloração rósea na Figura 21, com a região do osso novo que é menos mineralizada e contém maior quantidade de tecido orgânico, apresentando uma coloração azul.

Osteonas (Figura 21) também foram freqüentemente encontradas nas proximidades do implante, concordando com os resultados obtidos por microscopia de fluorescência (Figuras 12 a 15). Com base na Figura 22, pode-se observar uma osteona, bem como os canalículos que estabelecem a comunicação entre as lacunas e entre essas e o canal da osteona. O canal da osteona, no centro do cilindro, contém vasos e nervos, enquanto as lacunas contém os osteócitos. Os grupos de lamelas que formam o sistema de osteonas são separados por uma substância cimentante, semelhante àquela identificada na Figura 20 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).



(a)



(b)

Figura 21: Micrografia óptica da interface osso/implante. (a) Observa-se a neoformação óssea na região da medular onde se pode verificar, osteonas (Os), osteócitos (Oc) e a linha clmentante (LC), separando o osso novo do osso antigo. (b) Micrografia da região marcada em vermelho na Figura 21a, em maior aumento, mostrando a presença da matriz de osteóide (Ot) e da fileira de osteoblastos (Ob) entre o osso e o implante (I). O implante despreendeu-se durante a preparação

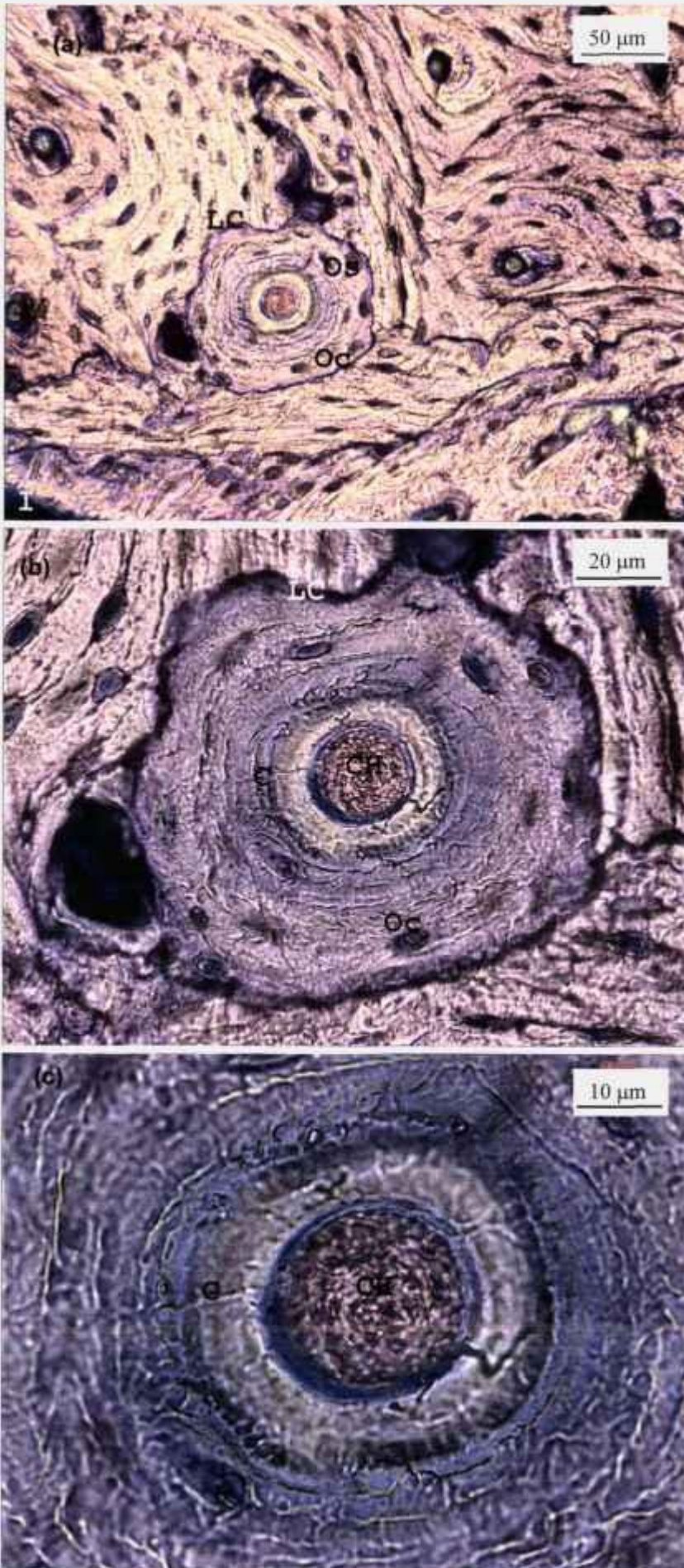


Figura 22: (a) Micrografia da região próxima à superfície do implante SN1 (I), mostrando a presença de osteonas (Os) e osteócitos (Oc). (b) e (c) micrografias em maiores resoluções da mesma região, onde pode-se notar os detalhes dos sistemas de osteonas. Canaliculos (C), canal de osteona (CH) e a linha cimentante (LC)

### 4.8.3 Microscopia de Luz de Polarização

Com base no fenômeno da birrefringência exibido pela matriz colágena que constitui o tecido ósseo, observou-se, por microscopia de luz de polarização, o padrão das fibras colágenas tanto no osso novo próximo à superfície do implante quanto naquele pré-existente.

A distribuição das fibras colágenas ao longo de uma secção transversa da tíbia contendo o implante pode ser verificada na Figura 23, e aparecem como estruturas brilhantes sobre um fundo escuro. A presença dessas fibras pode ser notada pela mesma figura, dentro da cavidade medular, caracterizando o tecido ósseo novo já constatado em outras áreas de secções por microscopia de fluorescência (Figura 16) e por microscopia de luz (Figura 18).

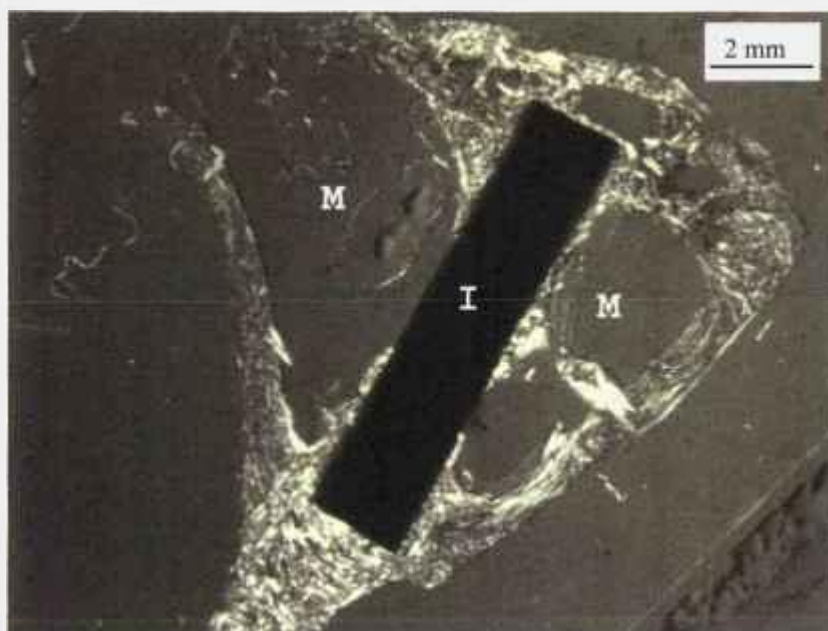


Figura 23: Ilustração obtida por microscópio estereoscópico de luz de polarização mostrando o padrão das fibras colágenas em toda a cortical e próximas à superfície do implante de nitreto de silício (I). Observa-se a cavidade medular (M)

Acompanhando o processo de formação óssea, é possível verificar ainda na Figura 23, que a direção do colágeno indica em crescimento ósseo ocorrido a partir da

tábua óssea em direção à superfície do implante gerando as “pontes” ósseas anteriormente notadas na Figura 16a.

Contato direto das fibras colágenas com a superfície do implante pode ser observado na Figura 24, que ilustra uma vista mais panorâmica da mesma lâmina mostrada na Figura 23 em maior resolução. O tipo de tecido em contato com o implante é diferenciado, por essa técnica, pela orientação das fibras colágenas e pela intensidade do brilho das estruturas.

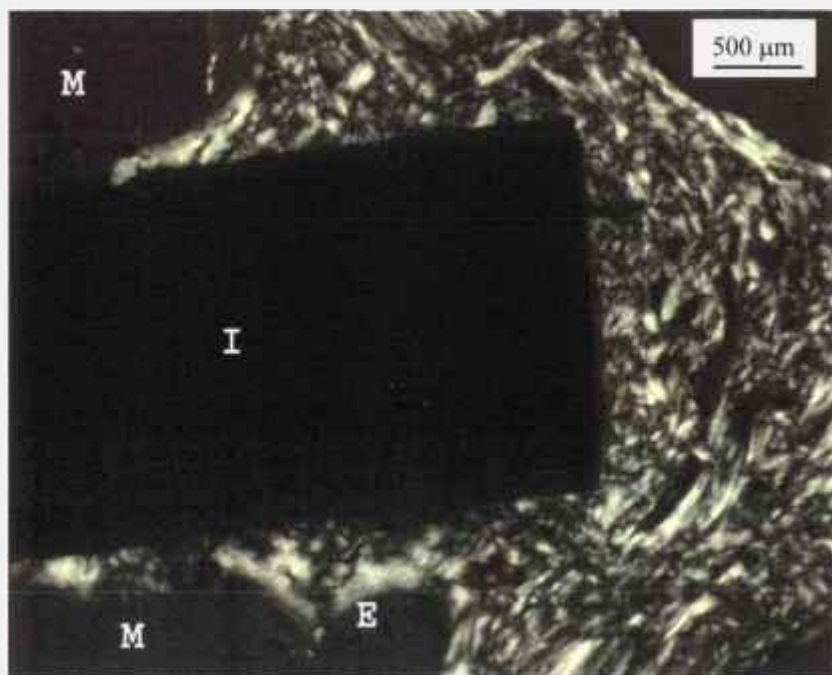


Figura 24: Ilustração da mesma lâmina da Figura 23, mostrando a distribuição das fibras colágenas na região da cortical oposta. M = cavidade medular, I = implante e PO = ponte óssea. E = Endóstio

A diferença na organização das fibras colágenas próximas ao implante e ao osso lamelar pré-existente é mostrada na Figura 25. Nas proximidades do implante, as fibras colágenas são orientadas aleatoriamente, enquanto em áreas mais distantes, as fibras se apresentam como uma estrutura organizada, orientada perpendicularmente à superfície do material. Pela mesma figura, observa-se as osteonas no osso pré-existente.

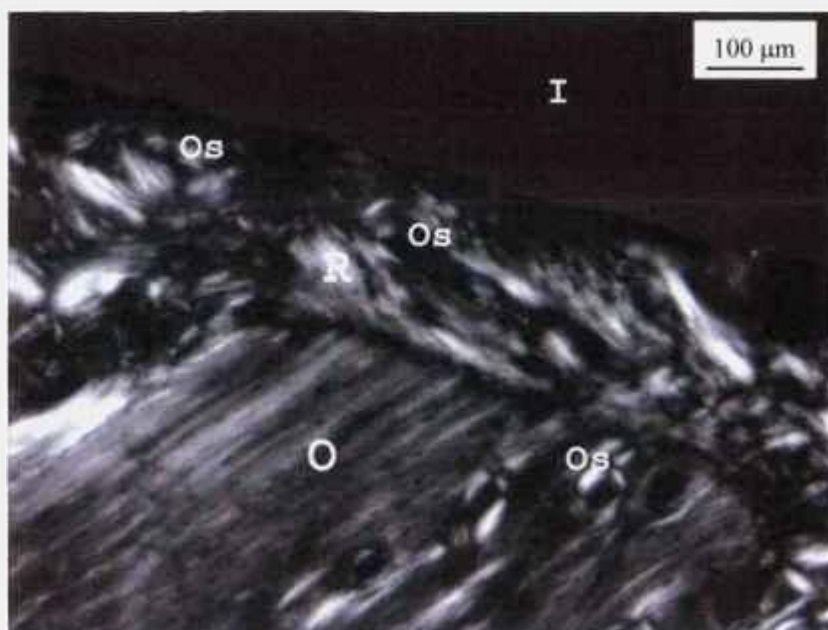


Figura 25: Micrografia de luz de polarização de uma secção de um implante de nitreto de silício evidenciando o osso neoformado (R) e a compacta original (O). Observa-se a presença de osteonas (Os)

Variações na intensidade do brilho das estruturas também são constatadas na Figura 25, onde se verifica que o tecido em contato direto com o nitreto de silício apresenta-se menos brilhante que os demais.

A linha cimentante analisada por microscopia de luz (Figura 21) é mostrada na Figura 25 como uma linha escura separando o osso novo do osso antigo, o que constata que a composição da matriz orgânica influencia no fenômeno de birrefringência.

A partir da Figura 26, notam-se osteonas escuras e com lamelas alternantes, também devido à orientação das fibras colágenas que as constituem. Os canais de osteonas aparecem como zonas escuras no centro do cilindro, por se tratarem de vazios contendo tecido mole, que permite a passagem da luz (MARTIN, et al. 1996).



Figura 26: Micrografia de luz de polarização mostrando as diferentes birrefringências exibidas pelas osteonas. Os = osteona, Oc = osteócito e I = implante

O tipo de colágeno que constitui o tecido ósseo nas proximidades do implante pôde ser identificado pela microscopia de luz de polarização de lâminas coradas pelo método do picro sirius. O colágeno do tipo I, formador do tecido ósseo lamelar é exibido por uma coloração vermelha ou amarela, enquanto o colágeno do tipo III, típico do tecido ósseo primário, apresenta coloração verde (VIDAL et al. 1982).

Dessa forma, o método do picro sirius juntamente com a microscopia de luz de polarização permitiram relacionar o tipo de colágeno existente com: (a) as diferenças na birrefringência, quando as lâminas isentas de tratamento químico foram analisadas e com (b) as diferentes colorações exibidas pelos tecidos quando amostras coradas com azul de toluidina são observadas por microscopia de luz.

A coloração esverdeada do colágeno tipo III (Figura 27) é observada preferencialmente na interface com o implante, sugerindo que as regiões menos brilhantes na Figura 25 e que as regiões coradas com azul intenso contendo osteoblastos, observadas por microscopia de luz na Figura 21, devem-se a esse tipo de colágeno. A ocorrência do colágeno do tipo III também pode ser verificada nos canais das osteonas, pelos mesmos serem revestidos por endósteo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

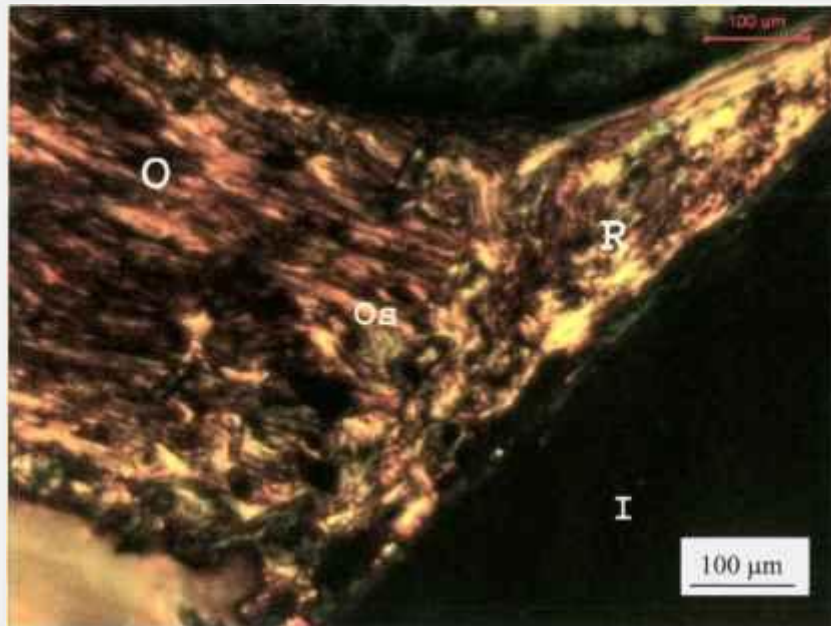


Figura 27: Micrografia de luz de polarização de uma lâmina corada pelo método do picrosirius, mostrando neoformação óssea por condução (R) nas proximidades com o implante (I) e a compacta original (O). Verifica-se as osteonas (Os) e os diferentes tipos de colágeno: colágeno do tipo I corado em amarelo e vermelho e colágeno do tipo III corado em verde

O colágeno do tipo I pode ser notado tanto no tecido ósseo receptor quanto no tecido ósseo neoformado (Figuras 27 e 28). A presença desse tipo de colágeno é constatada também nas lamelas ósseas concêntricas características dos sistemas de osteonas.

Contato direto de colágeno do tipo I com a superfície do implante (Figura 28) também foi constatado, demonstrando que há ocorrência de aposição óssea típica de implantes osteointegrados. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por microscopia de fluorescência e por microscopia de luz, que demonstraram a existência de tecido ósseo maduro em contato com o implante (Figuras 12 a 15, 19 e 20).

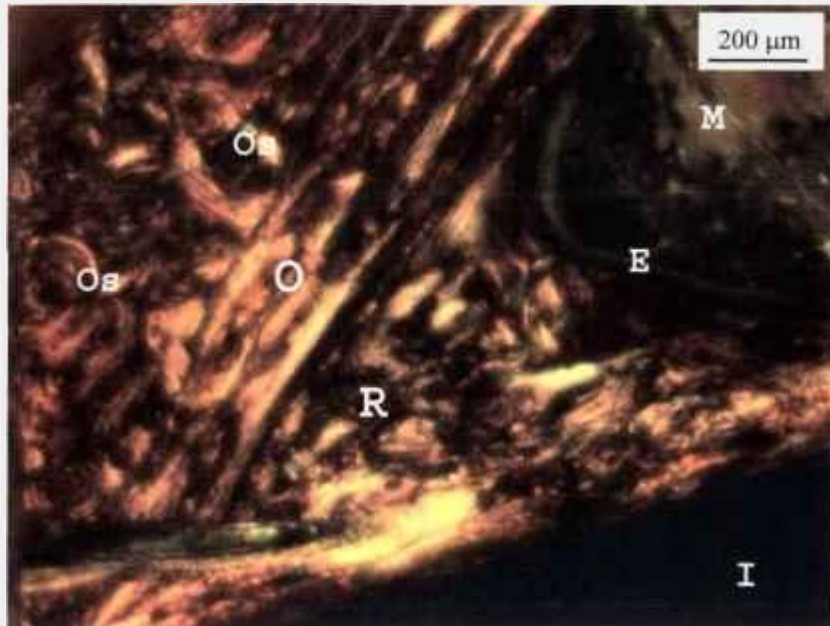


Figura 28: Micrografia de luz de polarização de uma lâmina corada pelo método do picrosirius, mostrando o contato da superfície do implante com o colágeno do tipo I (amarelo ou vermelho) e com o colágeno de tipo III (verde). O = compacta original; R = tecido ósseo neoformado; Os = osteona; E = endóstio; M = cavidade medular e I = implante

#### 4.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia

O crescimento ósseo nas proximidades do implante pôde também ser verificado por microscopia eletrônica de varredura de um bloco contendo dois implantes e o tecido ósseo vizinho (Figura 29). A partir dessas análises, observou-se o osso novo envolvendo a cerâmica instalada principalmente na região da cortical, bem como seu crescimento em direção à cavidade medular. A presença de forames nutrícios no osso novo, responsáveis por conduzirem as artérias nutrícias ao interior de canais nutrícios, pode ser observada na Figura 30 .

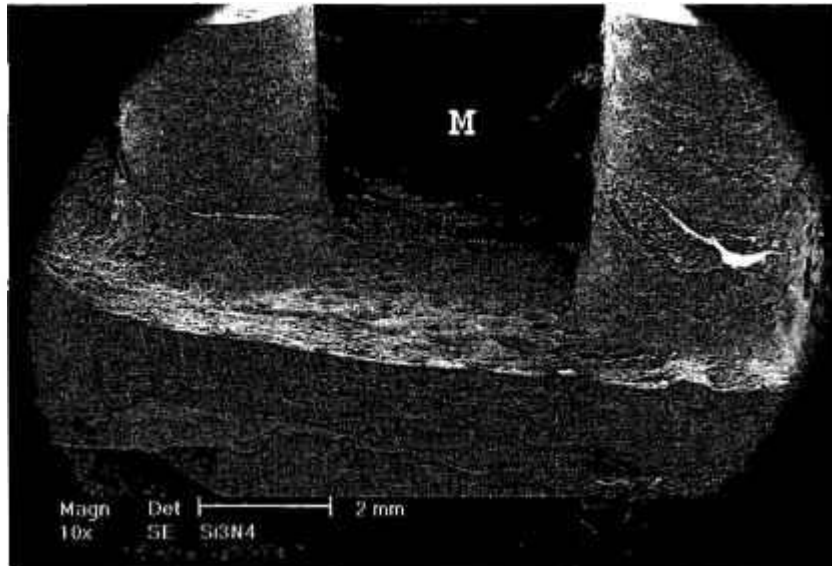


Figura 29: Micrografia eletrônica de varredura mostrando dois implantes de nitreto de silício instalados na região proximal (à esquerda) e na região distal (à direita) da tíbia do coelho. M = cavidade medular

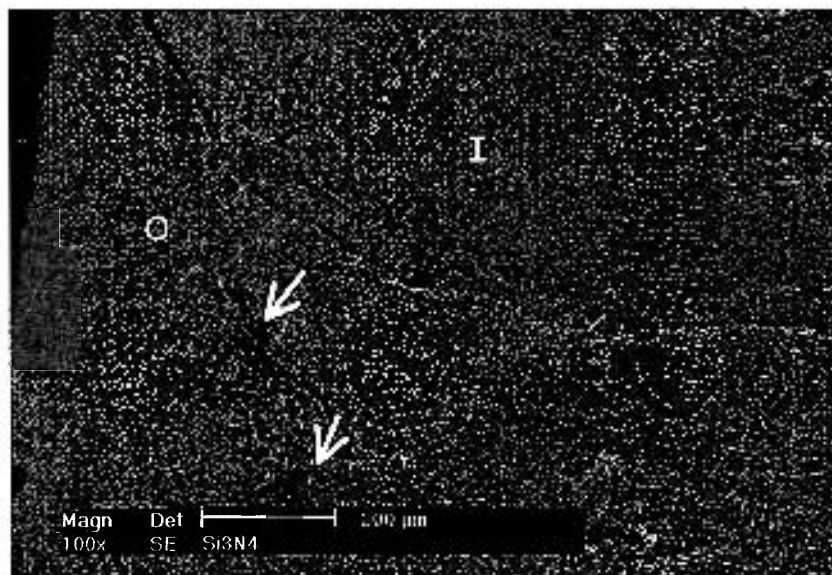
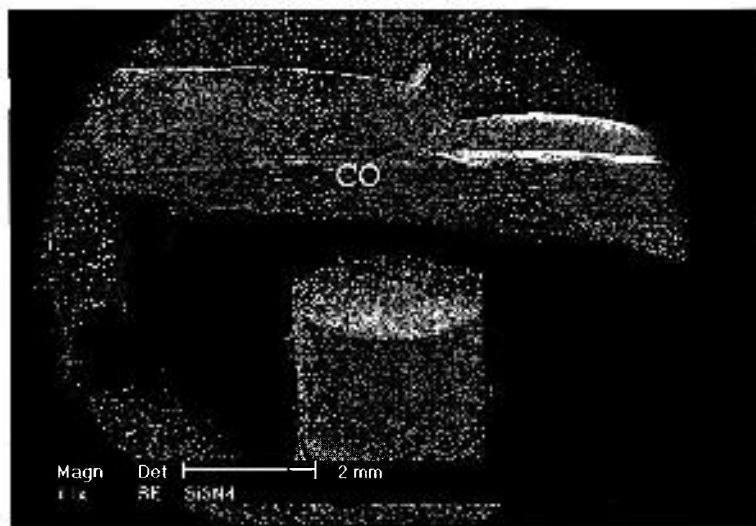
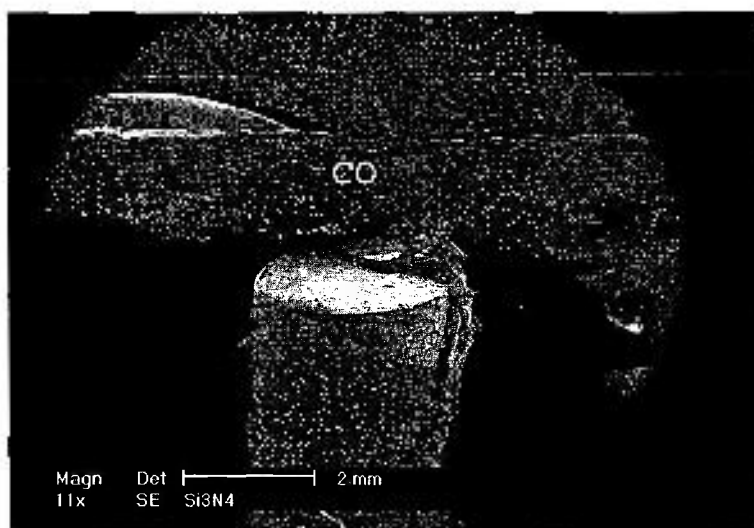


Figura 30: Micrografia eletrônica de varredura do mesmo implante de nitreto de silício instalado na região proximal da tíbia, mostrado na Figura 29. Observa-se os forames nutritivos (setas brancas). A seta preta mostra a região onde se realizou a análise por EDS. I = implante, O = osso novo

No caso dos implantes analisados por essa técnica, nota-se na Figura 31 que a ancoragem realizada durante a cirurgia se deu apenas na cortical cirúrgica. Observa-se ainda que houve diferença com relação ao crescimento ósseo em torno dos implantes instalados na região distal e na região proximal. Na região distal, onde a distância entre o implante e a cortical oposta é menor que na região proximal, observa-se a presença de uma “ponte” óssea a partir da cortical em direção ao implante.



(a)



(b)

Figura 31: Micrografias eletrônicas de varredura dos mesmos implantes de nitreto de silício mostrados na Figura 29, mostrando a região apical. (a) implante instalado na região proximal e (b) implante instalado na região distal. Em (b) observa-se uma “ponte” óssea a partir da cortical em direção ao implante. CO = cortical oposta

Análises realizadas na região indicada pela seta preta na Figura 30 permitiram a observação de fibras colágenas aderidas à superfície do implante (Figura 32). As fibras colágenas estão associadas à matriz não calcificada demonstrada, por microscopia de luz (Figura 21), estarem em contato com o implante. A mesma matriz não calcificada também pôde ser avaliada por microscopia de luz de polarização de lâminas coradas pelo método do picro sirius (Figura 27), aparecendo, nesse caso, como estruturas verdes, características do colágeno tipo III, ainda imaturo.

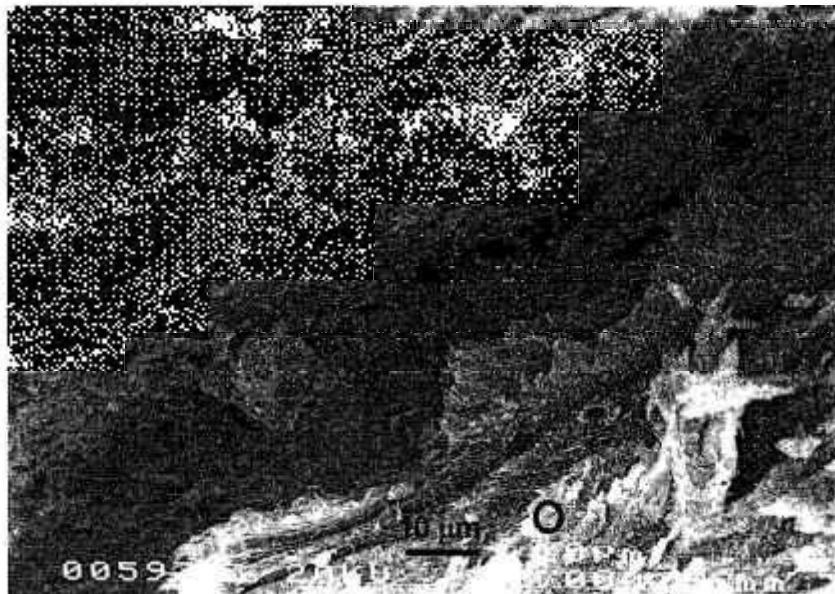


Figura 32: Micrografia eletrônica de varredura da interface osso/implante, mostrando as fibras colágenas presentes nessa região. I = Implante e O = tecido ósseo

Cavidades de osteócitos próximas à superfície do implante podem ser observadas por microscopia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados das mesmas lâminas utilizadas para a realização das análises de microscopia de fluorescência (Figura 33). Ainda por meio da Figura 33, notam-se regiões de diferentes tonalidades nas proximidades do implante de nitreto de silício. Essas regiões foram analisadas por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) (Item 8.4) quanto à sua composição química (Figura 33), sendo os resultados de tal análise mostrados de forma resumida na Tabela 13.

Como as regiões 1 e 2 de análise correspondem ao implante de nitreto de silício cuja composição SN1 é mostrada na Tabela 2, os elementos identificados por EDS foram

silício, alumínio, ítrio e itérbio, como esperado. Entretanto, na região 2 mais próxima da região da interface, identificou-se também a presença de cálcio proveniente do tecido ósseo novo.

A região 3 constitui parte da interface osso/implante, sendo caracterizada pela presença de silício, alumínio, fósforo, enxofre, potássio e cálcio. Os elementos ítrio e itérbio não foram identificados nessa região devido à sua baixa concentração.

A região 4 também pertence à interface. Nesse caso, o carbono é o elemento principal, estando acompanhado de silício, enxofre, cloro e cálcio o que confirma que o tecido presente se trata de um tecido orgânico não mineralizado (Figura 33).

Embora as regiões 5 e 6 apresentem tonalidades diferentes, ambas correspondem a tecido ósseo, diferindo apenas com relação à quantidade dos elementos cálcio e fósforo. A menor razão entre cálcio e fósforo na região 6 está associada à presença de átomos de silício, proveniente provavelmente do material instalado e das lixas de SiC utilizadas durante a preparação das lâminas. Finalmente, a região 7 analisada contém apenas cálcio e fósforo.

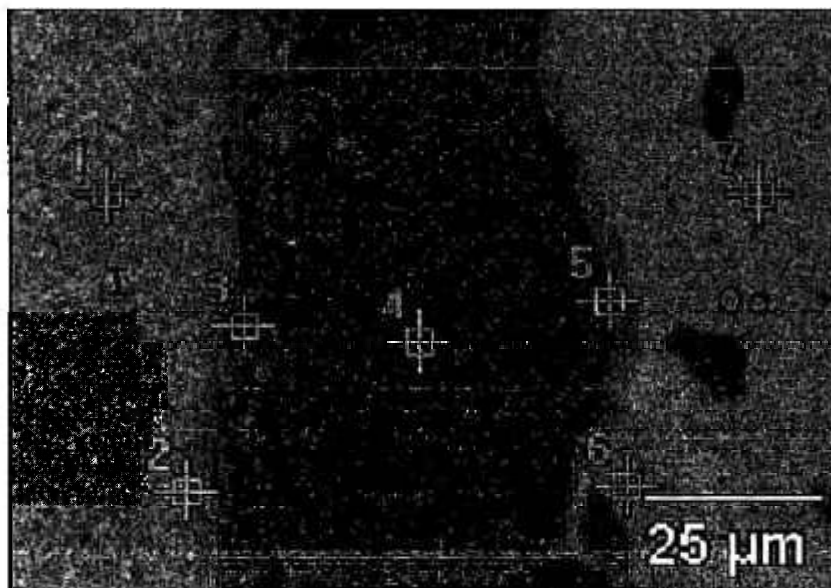


Figura 33: Micrografia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados de uma lâmina polida, mostrando a interface osso/implante. Os números de 1 até 7 indicam as regiões onde foram realizadas as análises químicas pontuais. I = implante, Oc = osteócitos

Tabela 13: Elementos presentes nas regiões indicadas na Figura 33

Região	Elementos
1	Si, Al, Y, Yb e C (devido ao recobrimento)
2	Si, Al, Y, Yb, Ca e C (devido ao recobrimento)
3	Si, Al, P, S, K, Ca e C (devido ao recobrimento)
4	Si, S, Cl, Ca e C
5	P, Ca e C (devido ao recobrimento)
6	Si, P Ca e C (devido ao recobrimento)
7	P, Ca e C (devido ao recobrimento)

Ainda que não tenha se observado a presença de osteoclastos próximos ao implante, cavidades resultantes da atividade osteoclástica na zona de transição entre o implante e o osso hospedeiro pode ser vista na Figura 34.

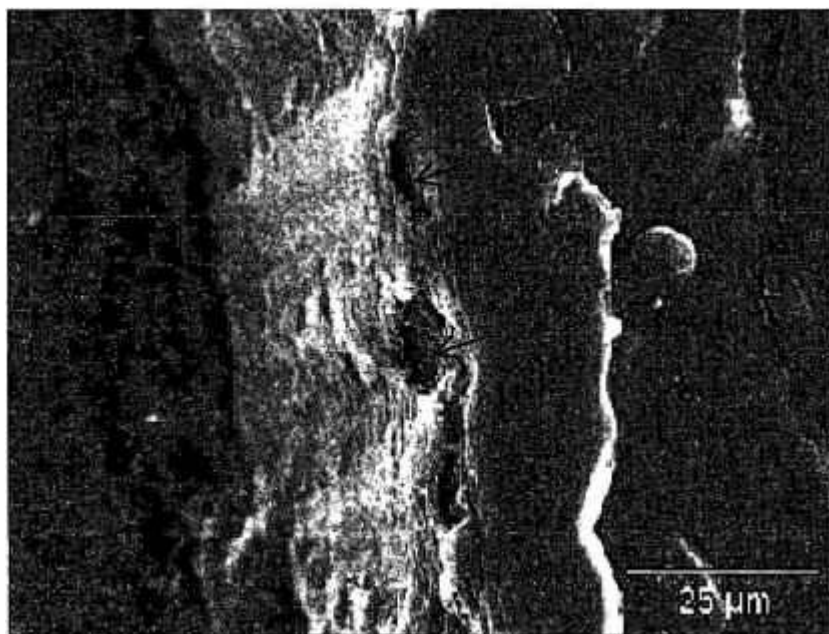


Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura mostrando os sítios dos osteoclastos (setas) na interface osso/implante

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Dilatometria

Com base nas análises de densificação por dilatometria (Figura 6), que demonstraram que os materiais contendo adições dos óxidos de ítrio e de alumínio (SN1, SN2 e SN4) resultam em maior retração linear dentre as composições mostradas na Tabela 2, as amostras SN1 e SN4 foram selecionadas para a realização dos estudos biológicos .

Embora os resultados dilatométricos apresentados indicassem que a composição SN2 também poderia ser selecionada para os estudos posteriores, sua semelhança com a composição SN4, em relação aos componentes presentes, não justificava sua utilização.

Preferiu-se utilizar a composição SN1 que, embora contenha os óxidos de ítrio e alumínio também presentes na composição SN4, contém o óxido de itérbio, que é um óxido de terras raras. Conforme já mencionado, os óxidos de terras raras são muito eficientes como aditivos de sinterização do nitreto de silício, gerando componentes com excelentes propriedades mecânicas (GOTO & THOMAS, 1995; SANDERS & MIESKOWSKI, 1985). Assim, a continuidade do estudo utilizando amostras de composição SN1 forneceu uma oportunidade para avaliar a biocompatibilidade de cerâmicas de nitreto de silício contendo esses óxidos

O estudo dilatométrico mostrou ainda a presença de dois picos diferentes nas curvas de taxa de densificação em função da temperatura (Figuras 6b e 6d). O primeiro pico se deve ao início da retração em virtude do rearranjo das partículas e está relacionado à formação de líquido, como resposta da reação dos aditivos com a sílica da superfície do nitreto de silício (BRANKO et al., 2004). A partir da mesma figura, é possível

observar que a temperatura de início de retração, ou de formação de líquido, varia em função das composições utilizadas. Para as amostras de composições SN1, SN2 e SN4 a retração teve início a cerca de 1100°C, enquanto que para aquelas de composições SN3 e SN5, o início da retração se deu a cerca de 1200°C. Esses resultados mostram que quando se adiciona  $Y_2O_3$  em conjunto com  $Al_2O_3$  ao nitreto de silício, a fase líquida se forma a temperaturas menores que quando adições exclusivas de  $Yb_2O_3$  e  $Al_2O_3$  são utilizadas. Tal comportamento está relacionado ao tamanho do cátion de terras raras presente na composição, pois quanto menor for o raio do cátion de terras raras utilizado (como é o caso do  $Yb^{3+}$ ), maior será a temperatura de formação de líquido (GUEDES E SILVA, 2000).

O segundo pico nas curvas de taxa de retração (Figura 6b e 6c) que ocorre a cerca de 1600°C (PEILLON & THEVENOT, 2002) está associado à segunda etapa do processo de sinterização do nitreto de silício: a solução-reprecipitação. A partir dessa temperatura, a retração continua até 1750°C, porém sob taxas decrescentes. Após o patamar de 1 hora, o processo de densificação é completado.

## 5.2 Microestrutura e Propriedades dos Materiais Estudados

Total transformação  $\alpha \rightarrow \beta$  do  $Si_3N_4$  foi observada para as amostras de composição SN1 e SN4, após sinterização (Figura 7). Essa transformação é desejável, uma vez que a fase  $\beta$ -  $Si_3N_4$  resulta em materiais com melhores propriedades mecânicas que a fase  $\alpha$ , em virtude da forma alongada dos grãos (FABER & EVANS, 1983), como pode ser visto na Figura 9.

A fase  $Y_3AlSi_2O_7N_2$  também identificada na margem da amostra SN4 (Figura 7b) é resultante da cristalização, durante o processo de resfriamento, da fase líquida formada pela reação dos óxidos adicionados com a sílica da superfície do pó de nitreto de silício, na temperatura de sinterização (IZHEVSKIY et al., 2000). A cristalização de fases secundárias nos contornos de grão do nitreto de silício é de grande importância quando esse material é submetido a temperaturas elevadas, por aumentar sua resistência mecânica. No caso de aplicações biomédicas, onde a temperatura de utilização do material é de cerca de 37°C, a cristalização da fase vítrea é irrelevante.

A identificação exclusiva da fase  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$  em ambas as superfícies da amostra SN1 (margem e centro) e no centro da amostra SN4 indica que a fase líquida formada durante o processo de sinterização, após o resfriamento, formou uma fase vítrea nos contornos de grãos do material.

Micrografias eletrônicas de varredura por elétrons retroespalhados (Figura 8) mostraram que a fase  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$  (cinza), está uniformemente distribuída numa fase secundária (fase clara) que, no caso da amostra SN1, consta de uma fase amorfa formada devido à adição dos óxidos, como já descrito anteriormente. No caso da amostra SN4, a fase clara é composta por uma fase amorfa e, eventualmente, por uma fase cristalina, identificada por difratometria de raios X como sendo a fase  $\text{Y}_3\text{AlSi}_2\text{O}_7\text{N}_2$  (Figura 7b).

Ambas as composições estudadas geraram microestruturas compostas por grãos de  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$  alongados (Figura 9). Entretanto, a microestrutura mais fina desenvolvida pela composição SN1, em comparação com a composição SN4 (Figura 9), pode ser atribuída à utilização do óxido de itérbio como aditivo de sinterização. Óxidos de terras raras formados por cátions com pequeno raio, como é o caso do  $\text{Yb}^{3+}$ , tendem a favorecer o desenvolvimento desse tipo de microestrutura, por promoverem a formação de uma fase líquida mais viscosa na temperatura de sinterização (GUEDES e SILVA, 2000).

Grãos fibrosos como os da fase  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$  induzem uma variedade de mecanismos de tenacificação, agindo após a iniciação de uma trinca que se propaga a partir de uma falha inicial (ONJI et al., 1995). A fratura intergranular demonstrada ocorrer na superfície da amostra SN1 (Figura 10) deve-se, dentre outros fatores, a esses mecanismos. Quanto mais alongados forem os grãos de  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$ , ou seja, quanto maior for sua razão de aspecto, maior a amplitude de deflexão da trinca, o que resulta em valores de tenacidade à fratura relativamente altos (FABER & EVANS, 1983), como os mostrados na Tabela 8.

Além disso, é importante considerar que para o modo de fratura intergranular ocorrer, deve haver descolamento entre os grãos de  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$  e a fase ou fases secundárias presentes nos contornos de grão (SUN, et al., 1998). Segundo NAKAYASU et al. (1998), um dos fatores que reduz a resistência da ligação da interface e, conseqüentemente, promove a fratura intergranular é a presença de íons de terras raras de raio grande, indicando que óxidos de terras raras com maior raio iônico seria mais conveniente para utilização como aditivo de sinterização do nitreto de silício. No entanto,

a adição de óxidos de terras raras de cátions de maior raio diminui a viscosidade da fase líquida durante o processo de sinterização, resultando na redução da razão de aspecto dos grãos.

Valores de tenacidade à fratura de cerca de  $5,0 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ , como os obtidos pelas composições SN1 e SN4 (Tabela 8), são significantes quando comparados com aqueles relatados por CHIANG et al. (1997) para alumina policristalina, que podem variar de  $3,5\text{-}4,0 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ . Embora cerâmicas de zircônia, tais como Y-TZP, possam atingir valores de tenacidade à fratura (de até  $11,0 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ ) bastante superiores aos obtidos pelas amostras de nitreto de silício estudadas, essa propriedade pode ser comprometida em determinados ambientes, como em ambientes biológicos (SWAB, 1991).

Os resultados satisfatórios de tenacidade à fratura obtidos para as amostras estudadas podem ser ainda melhorados pelo emprego de técnicas, como prensagem a quente e prensagem isostática a quente, que promovem o desenvolvimento de microestruturas mais tenazes. Como exemplo disso, KLEMMER & PEZZOTTI (1994) obtiveram cerâmicas densas de nitreto de silício contendo  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$  e  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  por prensagem isostática a quente, cuja tenacidade à fratura atingiu valores tão altos quanto  $7,5 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ .

A diferença nos valores de dureza das amostras observada na Tabela 8 pode ser atribuído às variações microestruturais, como por exemplo, tamanho de grão de  $\beta\text{-Si}_3\text{N}_4$ , quantidade e dureza da própria fase intergranular presente. (GRESKOVICH & YEH, 1983).

Um inconveniente da utilização de nitreto de silício para substituições ósseas está em seu módulo de Young (de cerca de 300 GPa) consideravelmente maior que o do osso cortical (de 7 a 25 GPa) (HENCH, 1998). O ideal seria que o material apresentasse módulo de Young similar ao do osso de forma que, quando a solicitação mecânica ocorresse, o implante e o osso circunjacente pudessem se deformar elasticamente da mesma maneira. O problema é que os materiais cerâmicos que apresentam essa similaridade com o osso, como por exemplo a hidroxiapatita, apresentam também as demais propriedades mecânicas (resistência à flexão, à tração e à compressão) pobres (HENCH, 1998).

No caso das próteses de quadril, uma maneira de se reduzir o efeito da diferença entre o módulo de Young da cerâmica e do osso é utilizando-se o componente acetabular de PEUAPM.

Ainda assim, o nitreto de silício apresenta vantagem quando se compara seu módulo de elasticidade com o da alumina. Enquanto valores de 300 GPa são obtidos para componentes de nitreto de silício densos, para as cerâmicas de alumina atingirem o mesmo valor dessa propriedade, sua concentração de poros deve ser de cerca de 10 % em volume (MIYAYAMA & KOUMOTO, 1991), o que tende a resultar na degradação das demais propriedades mecânicas.

Dados da literatura mostram que nitreto de silício obtido por sinterização normal pode atingir valores de resistência à flexão de 600 até 1200 MPa (HAMPSHIRE, 1991), similares àqueles observados para cerâmicas à base de zircônia, de 900 até 1200 MPa, e superiores àqueles relatados na literatura para cerâmicas de alumina, de cerca de 400 MPa (CHIRSTEL et al., 1989).

Quando se considera aplicações para substituições dentais e para substituições ósseas, nas quais o material será submetido a cargas biomecânicas constantes, o nitreto de silício apresenta comportamento intermediário entre a alumina e a zircônia. Seus valores de tenacidade à fratura e de resistência à flexão são, muitas vezes, menores que os da zircônia, porém maiores que os da alumina (CHIANG et al., 1997); e o módulo de Young, por sua vez, tende a ser menor que o da alumina e maior que o da zircônia (cerca de 200 GPa) (HAMPSHIRE, 1991; MIYAYAMA & KOUMOTO, 1991; STEVENS, 1991).

Já com relação às características tribológicas das cerâmicas, muitos outros fatores estão envolvidos, como o tipo de teste realizado, o lubrificante utilizado, a rugosidade superficial dos corpos de prova, entre outros. Porém, há relatos de que nitreto de silício pode atingir maior resistência ao desgaste que alumina, desde que as superfícies de contato sejam previamente polidas (ZHOU et al., 1997a). Uma confirmação das propícias características tribológicas do nitreto de silício está na sua utilização como ferramentas para usinagem de diversos materiais.

### 5.3 Avaliações Biológicas “*in vitro*”

As amostras estudadas apresentaram resultados similares quanto à formação de colônias celulares, em relação ao controle CHO, para as várias concentrações de extratos utilizadas (Figura 11). A quantidade de colônias formadas não variou, sendo considerada igual àquela formada na solução de controle CHO, mesmo nas soluções contendo 100% dos extratos, como no caso do controle negativo (alumina).

Adicionalmente, a semelhança das curvas de supressão de colônias em função da concentração dos extratos das amostras de nitreto de silício com aquela obtida, nas mesmas condições, para a alumina (controle negativo) indica que tanto os materiais estudados como o processamento utilizado para sua obtenção são não citotóxicos (GUEDES e SILVA et al., 2004).

A baixa solubilidade das amostras SN1 e SN4, com relação à solução de controle, foi constatada pelo teor de silício presente em soluções obtidas pela imersão das amostras por 3, 7 e 14 dias de imersão em SBF (Tabela 9). No entanto, após 14 dias de imersão em SBF, o teor de silício foi significativamente maior na solução que continha amostras de composição SN1 que naquela que continha amostras de composição SN4. Para justificar esse resultado, é importante considerar que dentre as duas fases principais ( $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  e uma fase vítrea composta basicamente de Si, Al, Y e/ou Yb, O e N) contidas nos materiais estudados, aquela que apresenta maior tendência a se solubilizar em SBF é a fase vítrea, uma vez que a fase  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  é conhecida ser altamente inerte em meio fisiológico. Dessa forma, as diferenças nos teores de silício em SBF resultante da exposição das amostras SN1 e SN4 por 14 dias devem estar relacionadas à fase vítrea presente, embora estudos com períodos mais longos sejam necessários para confirmar essa afirmação.

A composição SN1 difere da SN4 (Tabela 2) por conter  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  e menor teor de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , o que pode ter levado à formação de uma fase vítrea mais solúvel. Em vidros bioativos, a forma tradicional de se controlar a solubilidade é por meio de adições de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (BLENCKE et al., 1978; GROSS & STRUNZ, 1980). Embora vidros solúveis sejam desejáveis por resultarem em bioatividade, alta solubilidade pode reduzir sua confiabilidade a longo prazo. Estudos “*in vivo*” sobre o comportamento de vidros do sistema  $\text{SiO}_2$ - $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ - $\text{B}_2\text{O}_3$  demonstraram que teores de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  menores

que 1,5 % em massa são toleráveis, diminuindo a solubilidade excessiva, sem perda da bioatividade (ANDERSSON et al., 1990).

Os resultados biológicos satisfatórios obtidos pelos testes “*in vitro*” associados às ótimas propriedades mecânicas dos materiais, são uma demonstração inicial de que nitreto de silício pode ser usado como biomaterial, como na substituição de articulações, de raízes dentais e de espaçadores de vértebras.

A continuidade do estudo por meio dos experimentos em animais foi então necessária para avaliar a resposta do tecido vivo na presença de nitreto de silício, sendo justificada pelos resultados positivos acima relatados.

#### **5.4 Avaliações Biológicas “*in vivo*”**

Os resultados obtidos por meio dos experimentos “*in vivo*” demonstraram que a presença de nitreto de silício não prejudicou o processo de formação óssea. Ao contrário, fatores como ausência de reações adversas nas proximidades do implante, crescimento ósseo intenso na região da cortical (Figuras 12 a 15, 18 e 19), e aposição óssea sobre a superfície da cerâmica (Figuras 12 a 15, 17, 19 e 20), comprovaram sua biocompatibilidade.

Esses resultados satisfatórios se devem não só às características do material em estudo, mas também à utilização de um procedimento cirúrgico adequado e à preservação do periósteo durante a cirurgia. RHINELANDER (1982) demonstrou que um periósteo intacto mantém a capacidade do osso de gerar osteoblastos e de, conseqüentemente, formar osso novo.

Um intenso metabolismo ósseo na região da cortical, avaliado quanto a quantidade total de osso depositado por histomorfometria, foi observado nas quatro regiões de análise mostradas na Figura 4. Osteonas marcadas pelos corantes utilizados (Figuras 12 a 15) confirmam que o remodelamento ósseo se deu ao longo desses três estágios de administração dos corantes. No entanto, tal metabolismo foi comprovadamente mais intenso entre a quinta e a sexta semana após a cirurgia, ou seja, no período de aplicação da calceína. A baixa deposição óssea no período de aplicação da alizarina (terceira e quarta semanas após a cirurgia) também pôde ser verificada,

sendo conseqüência do trauma cirúrgico gerado nos tecidos adjacentes ao implante. Já com relação à deposição óssea por condução na região da medular, observou-se qualitativamente que o processo foi semelhante.

A presença de osteócitos, osteonas (Figuras 12 a 15, 20, 22, 25 a 27 e 33) e forames nutritivos (Figura 30) adjacentes ao implante demonstra a qualidade do tecido ósseo novo. A morfologia esférica dos osteócitos nesse tecido (Figura 20) está relacionada à formação recente do osso e, às pequenas distâncias dessas células com relação à superfície do implante, mostram sua interação com a cerâmica.

A interação do osso novo com o nitrato de silício foi comprovada por espectroscopia por dispersão de energia, por meio da identificação dos elementos cálcio e fósforo na superfície do implante. Esses resultados sugerem que houve uma migração dos elementos formadores do osso em direção ao nitrato de silício.

A formação óssea sobre toda a superfície do implante dentro da cavidade medular observada em algumas situações analisadas (Figuras 16 a 18 e 20) indica que o material em estudo apresenta capacidade osteocondutora. Comparando-se as regiões à esquerda e à direita ao implante na Figura 18, verifica-se, ainda, que esse fato está também associado à localização do implante no osso. À direita, onde a distância entre o implante e o endóstio é consideravelmente menor que à esquerda, houve um favorecimento da formação óssea dentro da cavidade medular.

CHANG et al. (1996) estudando a neoformação óssea na superfície de implantes de hidroxiapatita, alumina e zircônia, mostraram que a formação óssea é muito mais influenciada pela localização anatômica do implante que pelo tipo de material usado. Os autores observaram que pode haver formação abundante de osso novo na cavidade medular tanto sobre a superfície de implantes de hidroxiapatita, quanto sobre a superfície de implantes de alumina e de zircônia, desde que haja contato com o endóstio. A diferença entre cerâmicas bioativas e bioinertes não está na quantidade de osso formado, mas sim na ausência de tecido fibroso entre o implante bioativo e o osso novo.

A capacidade osteogênica do endóstio é observada, ainda, quando se notam as fibras colágenas e as "pontes" ósseas partindo da tábua óssea em direção à superfície do implante por condução (Figuras 23 e 16, respectivamente) bem como a deposição óssea

sobre a superfície da camada, evidenciada na Figura 17 pela coloração verde típica da calceína.

Dois tipos de interface osso/implante foram verificados nesse trabalho, denominados de interface tipo I e tipo II. A interface tipo I foi caracterizada pelo contato direto osso/implante; enquanto a interface tipo II pela presença de tecido osteóide contendo osteoblastos. Embora nitreto de silício seja considerado um material bioinerte, tecido fibroso não foi verificado na interface osso/implante. Ao contrário, em algumas regiões, observou-se contato ósseo direto sobre a superfície do material, caracterizando o primeiro tipo de interface que é a mais adequada para promover osteointegração (BRANEMARK et al., 1977).

GRISS et al. (1980) por meio de seu estudo de biocompatibilidade em cerâmicas de alumina, nitreto de silício e biovidro, observaram a presença de uma cápsula de tecido mole com espessura de cerca de 30  $\mu\text{m}$  na interface osso/nitreto de silício. O resultado insatisfatório obtido pelos autores em comparação com os relatados nesse trabalho pode ser atribuído à composição do material por eles usada, cujos aditivos de sinterização foram  $\text{MgO}$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{FeO}$ , ou mesmo ao pequeno número de amostras analisadas.

Pesquisas têm demonstrado que a formação de cápsula fibrosa envolvendo materiais bioinertes está relacionada à movimentação do implante. Akagawa et al. (1986), estudando implantes de safira instalados em mandíbulas de cães, constataram que a formação de uma camada densa de tecido fibroso na interface osso/implante ocorre quando o implante é submetido a cargas mastigatórias, logo após a implantação. Os implantes mantidos imóveis durante todo o período de cicatrização apresentaram uma interface isenta de tecido fibroso, caracterizada pelo contato direto osso/implante, como no caso desse trabalho.

Os mesmos resultados foram encontrados por FARTASH et al. (1990), quando estudaram a resposta do tecido para implantes de alumina por meio de experimentos com cães. Os implantes mantidos imóveis durante a fase de cicatrização, desenvolveram contato direto com a superfície da cerâmica, enquanto os implantes móveis foram envolvidos por um tecido fibroso denso, isento de células ósseas.

SCARANO et al. (2003) estudando implantes de zircônia, encontraram resultados semelhantes àqueles aqui relatados obtidos para implantes de nitreto de silício. Os estudos conduzidos em coelhos seguindo um procedimento similar ao desse trabalho,

mostraram que houve contato direto osso/implante, com desenvolvimento de tecido ósseo lamelar contendo osteócitos, próximo à superfície do material.

A presença de um tecido pobremente mineralizado sobre a superfície do implante de nitreto de silício (Figuras 21) caracteriza a interface tipo II. As fibras colágenas que compõem esse tipo de interface foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 32) e aparecem, quando observadas por microscopia de luz de polarização (Figura 25), como uma estrutura com baixa intensidade de brilho. Esse resultado está relacionado a dois fatores principais: à pequena quantidade de cristais de apatita depositada, que também são birrefringentes (WOLMAN, 1975), e à orientação das fibras colágenas, que devem estar orientadas perpendicularmente ao plano de polarização, gerando zonas de extinção aparente (ASCENZI & BONUCCI, 1967; 1968). O aumento da birrefringência é causado pelo aumento do teor de apatita e do número de fibras colágenas orientadas paralelamente ao plano da secção, ou seja, com a calcificação e com o carregamento mecânico, a birrefringência é alterada pelo aumento do teor de apatita e pela introdução de deslocamentos permanentes nas fibras colágenas (MARTIN et al. 1996).

Análises do perfil químico na interface osso/implante (Figura 33) mostraram que, muitas áreas dessa região têm o carbono como elemento principal, comprovando que as mesmas são, de fato, uma matriz orgânica. Outrossim, a identificação do enxofre junto ao carbono, indica a presença de proteoglicanas que são macromoléculas compostas por glicosaminoglicanas sulfatadas ligadas por covalência às proteínas colágenas. Essas macromoléculas, sintetizadas pelos osteoblastos, participam da aderência entre as células, fibras e macromoléculas de matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

A matriz orgânica da interface tipo II, anteriormente descrita, foi reconhecida ser um tecido osteóide por conter osteoblastos dispersos (Figura 21) e por exibir uma coloração verde quando analisada por microscopia de luz de polarização associada ao método do picro sirius (Figura 27). Pelos conhecimentos atuais, os osteoblastos dispersos à matriz de osteóide foram originados pela diferenciação de células mesenquimais provenientes do perióstio e do endóstio.

Conforme descrito no Item 2.2 desse trabalho, a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos é uma das etapas iniciais para posterior formação de tecido ósseo sobre a superfície do implante. Com a continuação do processo de

remodelamento ósseo, a matriz de osteóide tende a se mineralizar e englobar alguns osteoblastos que se transformarão em osteócitos, gerando o tecido ósseo lamelar, que irá ocupar todo o espaço entre o osso pré-existente e o implante (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; GUNG et al., 2003). A própria orientação dos osteócitos no tecido ósseo novo confirma esse fenômeno (Figura 20), uma vez que seu eixo longitudinal orientado paralelamente à superfície do implante nesse tecido pode ser atribuído à orientação das células osteogênicas que os geraram (Figura 21).

Além disso, os osteoclastos que estavam contidos nas cavidades mostradas na Figura 34 sugerem que, posteriormente, o osso de organização aleatória (Figura 25), de baixo teor mineral, excessiva quantidade de células e de resistência mínima, na interface tipo II, será substituído pelo tecido ósseo maduro, que contém menor quantidade de células e é estruturalmente mais organizado (ROBERTS et al. 1987).

Esses resultados concordam com aqueles relatados por CARBONARI (2003) que, investigando a osteointegração de vidros nióbio fosfato bioativos, constatou a existência de um tecido não mineralizado na interface osso/implante, também contendo células osteogênicas, referenciado pelo autor como tecido conjuntivo de transição.

MURAI et al. (1996) por meio de suas pesquisas sobre a interface osso/titânio em tíbias de coelhos jovens e maduros, igualmente constataram que células osteoblásticas orientadas paralelamente à superfície do material estavam em contato com o titânio via uma fina camada amorfa.

Por fim, um espaço entre o osso e o implante de nitreto de silício também foi constatado (Figura 16). Pesquisas têm demonstrado que esse tipo de interface também pode ser notado quando se utiliza implantes de alumina e de titânio e está geralmente associado à preparação dos cortes histológicos (KORN et al., 1997).

Diferentes morfologias de interface osso/implante também foram constatadas por STEFLIK et al. (1993, 1993a) para implantes cerâmicos e de titânio. Segundo os autores, para qualquer sistema de implante há áreas onde a interface inclui outros tipos de tecido como tecido conjuntivo, osteóide e outros tecidos não mineralizados. KOO (2004) concordou com STEFLIK et al. (1993, 1993a) por observar a presença de contato direto osso/implante, bem como de um tecido não mineralizado, quando implantes de titânio foram instalados em tíbias de coelhos.

CARLSSON et al. (1986) analisaram reações em tecidos induzidas por implantes de titânio em articulações caninas e humanas. Os estudos clínicos demonstraram que houve contato direto osso/implante ao longo de toda a superfície do material, mas nas pesquisas realizadas em animais os autores obtiveram resultados diferentes. Embora tecido ósseo ancorado às espiras do implante tenha sido formado, houve regiões interfaciais onde se constatou a presença de tecido fibroso, cuja espessura variava de 60 a 250  $\mu\text{m}$ .

Mesmo implantes de alumina envolvem vários tipos de reações. FARTASH et al. (1990), por meio de seu estudo experimental em cães da raça Beagle, encontraram a presença de tecido conjuntivo entre o osso e o implante. Outras pesquisas encontraram osso mineralizado na interface (BOUTIN et al., 1988; ANNEROTH et al., 1990; ZETTERQVIST et al., 1991; STEFLIK et al., 1993).

Dessa forma, as diferentes respostas do tecido aos implantes de nitreto de silício aqui relatadas sugerem que o processo de formação óssea desse material ocorre de duas maneiras: a primeira delas, e provavelmente a principal, ocorre a partir da superfície endostal crescendo em direção ao implante. O segundo tipo de formação óssea parece ocorrer na interface com o implante, a partir do tecido não mineralizado contendo osteoblastos (Figura 21). SENNERBY et al. (1993;1993a) estudando implantes de titânio em coelhos, encontraram resultados similares a esses, concluindo que o principal processo de neoformação óssea quando implantes de titânio são usados ocorre sobre a superfície endostal, embora também tenha identificado tecido pobremente mineralizado contendo osteoblastos enfileirados próximo à superfície do implante.

## 6. CONCLUSÕES

- As características físicas dos materiais estudados, tais como densidade relativa de cerca de 94 % da densidade teórica e presença de grãos de  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> alongados, associadas aos satisfatórios resultados de dureza (de até 13 GPa) e de tenacidade à fratura (de cerca de 5 MPa.m<sup>1/2</sup>) obtidos, mostram que nitreto de silício é um material promissor para determinadas aplicações clínicas.
- As amostras avaliadas por meio de testes de citotoxicidade *“in vitro”* apresentaram comportamento semelhante ao da alumina, o que demonstra a não citotoxicidade do material, bem como do processamento utilizado.
- A baixa solubilidade de cerâmicas de nitreto de silício em ambiente fisiológico foi comprovada por testes de solubilidade em SBF. Tanto as amostras de composição SN1 (contendo os óxidos de ítrio, itérbio e alumínio) quanto aquelas de composição SN4 (contendo os óxidos de ítrio e alumínio) resultaram em soluções com baixo teor de silício dissolvido. No entanto, amostras de composição SN4 apresentaram solubilidade ainda menor que as de composição SN1, demonstrando que essa característica pode estar associada à composição do material.
- Os testes de biocompatibilidade *“in vivo”* realizados em amostras de composição SN1 mostraram que implantes de nitreto de silício não causaram reações adversas aos tecidos adjacentes.
- Crescimento ósseo em torno do implante ocorreu preferencialmente na região da cortical da tíbia do coelho. Entretanto, sempre que a distância entre o implante e o endóstio era pequena, observava-se crescimento ósseo por condução, associado muitas vezes à presença de “pontes” ósseas partindo do endóstio em direção ao implante.

- Neoformação óssea ocorreu durante todo o período em que os implantes foram mantidos nos animais, sendo esse fato comprovado pela identificação dos três marcadores teciduais utilizados quando análises por microscopia de fluorescência foram realizadas. O período em que ocorreu atividade óssea mais intensa na região da cortical se deu no período de aplicação da calceína. Os resultados observados para a região da medular sugeriram que o processo de neoformação óssea foi semelhante àqueles relatados para a região da cortical, porém é importante considerar que nesse caso os resultados obtidos foram apenas qualitativos.
- Dois tipos de interface foram identificadas, denominadas de tipo I e tipo II. A interface tipo I apresentou tecido ósseo mineralizado, enquanto a interface tipo II foi caracterizada por um tecido pobremente mineralizado, contendo células osteoprogenitoras e fibras colágenas de organização aleatória passíveis de calcificação.
- A presença de um espaço entre o osso e o nitreto de silício também foi identificada por meio de algumas micrografias.
- A neoformação óssea se deu preferencialmente a partir do endóstio, mas a presença da interface tipo II indicou que esse processo também pode ocorrer sobre a superfície do material.
- Os resultados obtidos demonstraram que nitreto de silício obtidos nas condições experimentais seguidas por esse trabalho é um material biocompatível.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o comportamento tribológico de cerâmicas de nitreto de silício, simulando as condições das articulações sinoviais. Os experimentos deverão ser realizados utilizando um simulador de articulação e um lubrificante com características reológicas semelhantes às do plasma sanguíneo.
- Estudar a possível deposição de hidroxapatita na superfície de cerâmicas de nitreto de silício por diferentes métodos.
- Estudar a obtenção de nitreto de silício poroso para utilização como espaçadores de vértebras.

## **8. ANEXOS**

### **8.1. Certificado de Aprovação do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 193/02**



**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) 3813-0900 - telefax : (55) (011) 3818-7438

e-mail: [ibic@usp.br](mailto:ibic@usp.br)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 193/02, sobre o projeto intitulado "Estudo da Biocompatibilidade de Nitreto de Silício obtido por Sinterização Normal", sob a responsabilidade de **José Carlos Bressiani**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **22/08/2002**.

(We certify that the protocol nº 193/02, about "*Biocompatibility Study of Silicon Nitride Processed by Normal Sintering*" agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **22/08/2002** meeting.)

São Paulo, 22 de agosto de 2002.

Prof. Dra. Sônia Malheiros L. Sanioto  
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Corqueira Leite Seclander  
Secretária da CEEA



Alizarina		Calceína		Tetraciclina	
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
2462,21	90	16123,52	246	1138,84	79
3292,88	97	16176,89	248	1272,28	81
3333,54	98	17443,55	259	1341,92	82
3875,86	104	17982,52	262	1415,73	84
3964,26	105	20789,8114	273	1754,13	85
4182,15	107	20931,3787	274	1779,78	86
4335,397	110	22242,45	279	2183,83	87
4380,85	111	24173,81	282	2200,33	88
4505,33	114	24922,96	285	2570,63	91
4738,85	116	25205,90	286	2662,16	92
4814,74	118	26290,53	289	2833,34	93
5209,23	123	26366,42	291	3129,63	94
5263,652	124	27331,58	293	3191,34	95
5284,71	125	27735,24	298	3214,07	96
5301,81	126	28599,07	299	3362,11	99
5445,88	129	28687,69	300	3419,44	100
5701,92	133	29474,5736	302	3667,15	101
5821,61	139	29546,92	303	3769,52	102
5997,17	141	30014,18	304	3874,61	103
6041,99	142	32178,227	309	4150,25	106
6195,45	143	33234,09	311	4198,20	108
6939,18	153	33305,60	312	4384,81	112
7164,78	154	33394,64	314	4483,85	113
8059,26	160	34142,11	316	4532,85	115
8078,23	161	34592,70	317	4805,99	117
8174,14	162	35097,27	318	4815,16	119
8208,75	163	35173,58	319	4866,66	120
8231,06	164	35535,96	322	5024,08	121
8314,671	166	35554,72	323	5147,52	122
8436,02	169	35874,08	324	5369,36	127
8842,81	172	36379,56	325	5394,80	128
8863,24	173	36935,63	326	5446,72	130
8970,83	175	37868,47	328	5487,58	131

Alizarina		Calceína		Tetraciclina	
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
9046,93	177	38511,0842	330	5640,83	132
9217,072	178	39508,14	333	5727,99	134
9273,37	179	39545,044	334	5733,41	135
9281,60	180	39693,29	335	5760,30	136
9301,10	181	39959,35	336	5780,53	137
9393,67	182	40467,67	337	5808,05	138
9554,012	185	41138,01	338	5858,93	140
9694,13	187	42789,14	340	6303,25	144
9796,08	188	42941,7682	341	6305,12	145
10468,51	193	43136,30	342	6372,89	146
10899,48	195	43175,29	343	6428,14	147
10933,47	196	43240,96	344	6508,83	148
10948,48	197	43736,37	345	6574,09	150
11087,13	198	44095,40	346	6860,57	152
11141,55	200	44262,22	347	7297,60	155
11190,34	201	44280,77	348	7462,52	156
11213,07	202	44367,51	349	7784,66	157
11329,20	205	44415,67	350	7825,11	158
11330,46	206	44786,18	351	8037,78	159
11497,05	208	46168,35	352	8241,70	165
11581,29	211	46583,68	253	8317,17	167
12336,06	216	47989,82	355	8427,05	168
12341,90	217	48604,29	356	8494,82	170
12494,74	219	48776,71	357	8535,89	171
12854,82	220	48918,49	358	8963,32	174
13010,36	221	49286,30	359	9004,61	176
13211,78	222	49848,42	360	9479,78	183
13497,01	223	50114,47	361	9494,59	184
13696,96	225	50621,13	362	9677,24	186
13738,25	226	51063,77	363	10148,04	189
13943,62	228	51239,97	364	10194,95	190
14214,47	232	51569,60	365	10250,62	191
14225,93	233	51871,11	366	10424,51	192

Alizarina		Calceína		Tetraciclina	
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
14595,61	236	53051,8501	367	10721,42	194
15805,34	239	53056,86	368	11136,97	199
15964,22	241	53157,77	369	11276,24	203
16097,45	243	53455,72	370	11313,77	204
16105,17	244	53973,44	371	11411,98	207
16123,52	247	56293,24	372	11527,49	209
16227,35	250	56525,30	373	11570,44	210
16306,37	251	57315,31	374	11668,02	212
17070,95	254	57392,26	375	11876,32	213
17117,66	255	57849,29	376	11976,81	214
17284,46	256	58704,98	378	12216,18	215
17608,89	260	58833,22	379	12365,88	218
17638,29	261	59224,37	380	13623,33	224
18259,00	263	59414,73	381	13837,08	227
18443,74	264	60737,89	382	13948,62	229
18934,76	265	60930,55	383	13979,69	230
18955,61	266	62689,27	384	13990,33	231
19553,39	268	63707,18	385	14353,75	234
20555,04	270	65890,41	386	14587,06	235
20568,58	271	66046,58	387	15447,13	237
20745,19	272	66831,18	388	15769,06	238
20939,10	275	67202,52	389	16202,33	249
21017,29	276	67298,01	390	16457,54	252
22194,91	278	70164,93	391	17060,53	253
22509,54	280	70866,12	392	17412,48	257
24496,78	283	73601,05	393	17417,07	258
24922,54	284	73794,96	394	19411,40	267
26322,01	290	74771,16	395	19811,72	269
26492,98	292	74847,47	396	21353,18	277
27363,69	294	75114,15	397	23655,89	281
27465,65	295	76528,85	398	25602,88	287
27515,90	296	78691,23	399	26184,19	288
27575,53	297	78744,61	400	28943,52	301

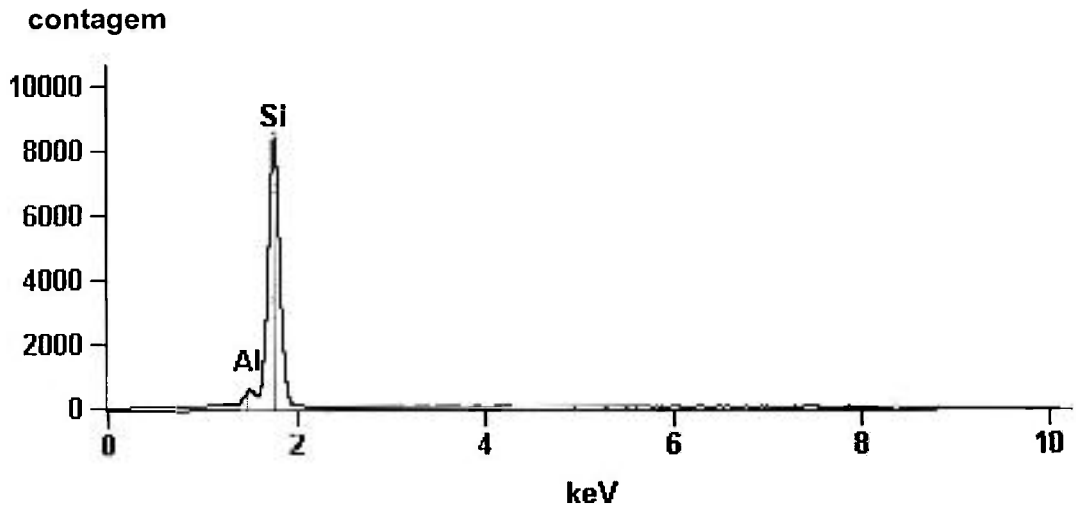
	Alizarina		Calceína		Tetraciclina	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
	30268,13	305	78765,25	401	33356,69	313
	30498,74	306	80607,37	402	35433,79	320
	30909,07	307	82046,46	402	37470,87	327
	30943,48	308	84687,14	404	38282,36	329
	32500,57	310	90644,48	405	39047,98	332
	33506,80	315	94553,70	406	42113,80	339
	35526,99	321	95881,65	407	47485,46	354
	38941,85	331	107122,46	408	58105,34	377
<b>Soma dos Postos (<math>R_i</math>)</b>	23775		39106,5		18432	
<b>Número de Indivíduos (<math>n_i</math>)</b>	134		134		134	
<b>Posto Médio (<math>\bar{R}_i</math>)</b>	177,42		291,84		137,55	

8.3: Área Total ( $\mu\text{m}^2$ ) de Osso Depositado nas Quatro Regiões de Análise

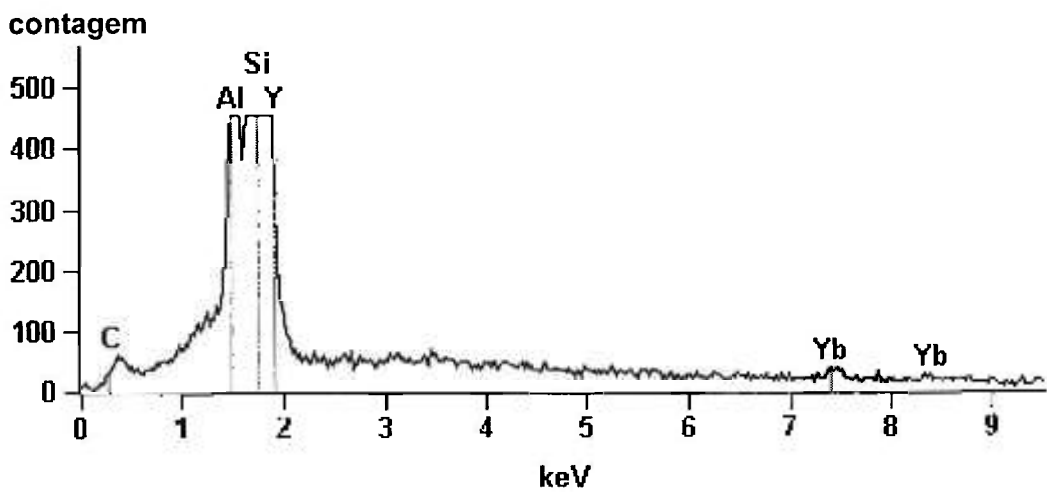
R1		R2		R3		R4	
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
0.00	12	0.00	12	0.00	12	0.00	12
0.00	12	0.00	12	0.00	12	0.00	12
0.00	12	0.00	12	0.00	12	0.00	12
32523.72	28	0.00	12	0.00	12	0.00	12
38950.19	30	0.00	12	0.00	12	0.00	12
42902.56	34	0.00	12	39529.62	31	0.00	12
43191.76	35	0.00	12	42811.25	33	0.00	12
44525.14	36	22067.51	24	47523.41	40	0.00	12
49119.50	43	23726.56	25	48337.81	42	31346.30	27
49212.07	44	26544.28	26	49903.67	45	36464.01	29
50149.09	47	45149.39	39	53611.47	49	40364.25	32
54412.34	50	50012.30	46	56925.42	54	44693.18	37
54607.91	51	53055.19	48	60238.32	61	44961.11	38
55005.52	53	54892.10	52	61682.83	64	47944.79	41
58779.01	60	57854.09	55	64448.40	67	58444.37	57
64639.60	68	58108.25	56	67882.65	75	61455.77	62
64671.71	69	58578.84	58	67894.33	76	66887.68	72
64895.44	70	58766.29	59	68023.81	77	67693.53	74
65196.30	71	61610.06	63	71041.06	78	72632.56	84
71329.84	79	62245.99	65	71735.37	82	78315.92	93
73718.23	85	63695.29	66	75833.28	89	78495.44	94
74301.82	86	67183.33	73	77692.49	91	82333.15	100
75201.11	87	71362.36	80	78558.83	95	85804.71	104
76308.46	90	71443.46	81	82104.41	99	86686.06	106
77808.84	92	72417.38	83	89070.91	110	95026.14	120
80521.67	96	75788.87	88	89297.76	111	98431.64	123
80770.20	97	82552.28	101	91432.83	115	98927.67	124
81537.70	98	83572.28	102	93885.46	116	100832.76	127

	R1		R2		R3		R4	
	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Posto
	84083.11	103	87689.80	107	94104.17	118	100851.53	128
	86026.14	105	88483.76	108	94718.84	119	103659.64	129
	90346.32	112	88590.74	109	100213.09	125	109127.84	131
	95753.00	121	90837.97	113	100728.71	126	115101.02	134
	98188.53	122	90913.45	114	104112.51	130	126068.26	135
	110871.12	132	93966.13	117	113888.79	133	131545.02	136
<b>Soma dos Postos (<math>R_i</math>)</b>		2330		2042		2511		2433
<b>Número de Indivíduos (<math>n_i</math>)</b>		34		34		34		34
<b>Posto Médio (<math>\bar{R}_i</math>)</b>		68.5294		60.0588		73.8529		71.559

#### 8.4. Espectros Obtidos por EDS das Regiões de 1 a 7 Mostradas na Figura 33

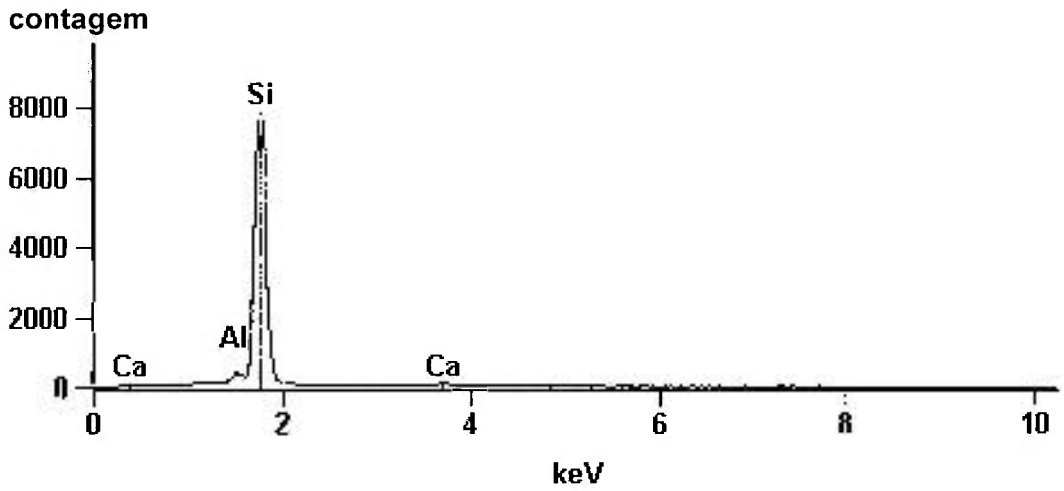


(a)

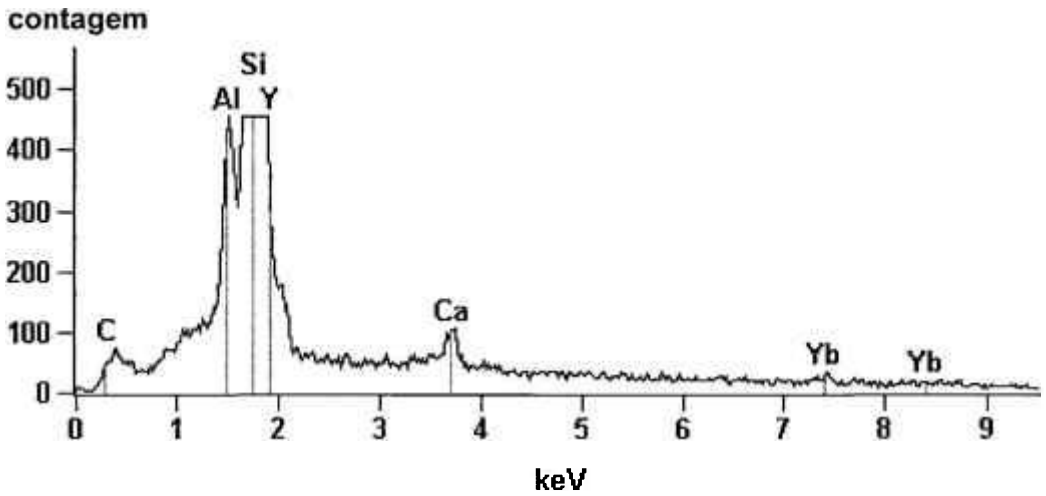


(b)

Figura 35: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 1 da Figura 33. A Figura b mostra o espectro (a) ampliado, onde se pode observar a presença dos elementos Y, Yb e Al



(a)



(b)

Figura 36: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 2 na Figura 33 A Figura b mostra o espectro (a) ampliado, onde se pode observar a presença dos elementos Y, Yb e Al e Ca

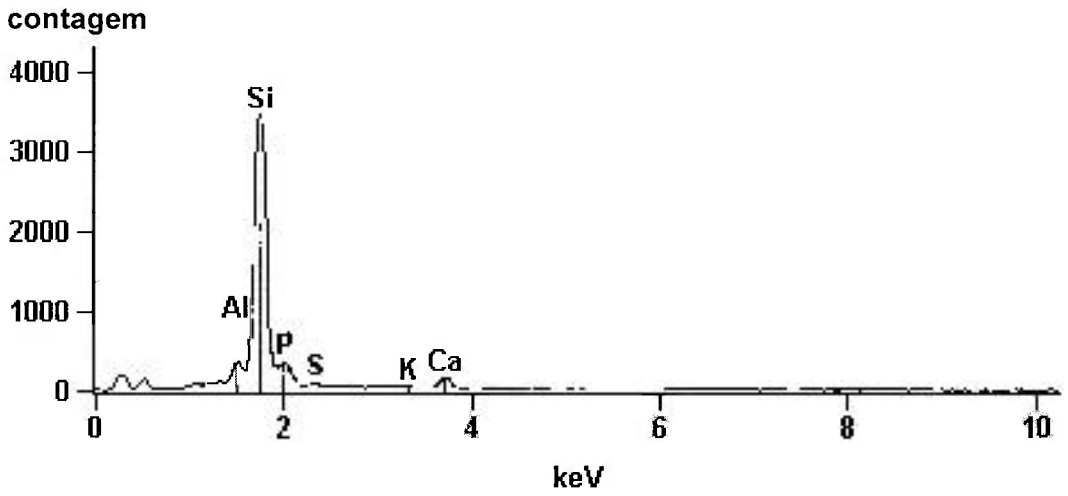


Figura 37: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 3 na Figura 33

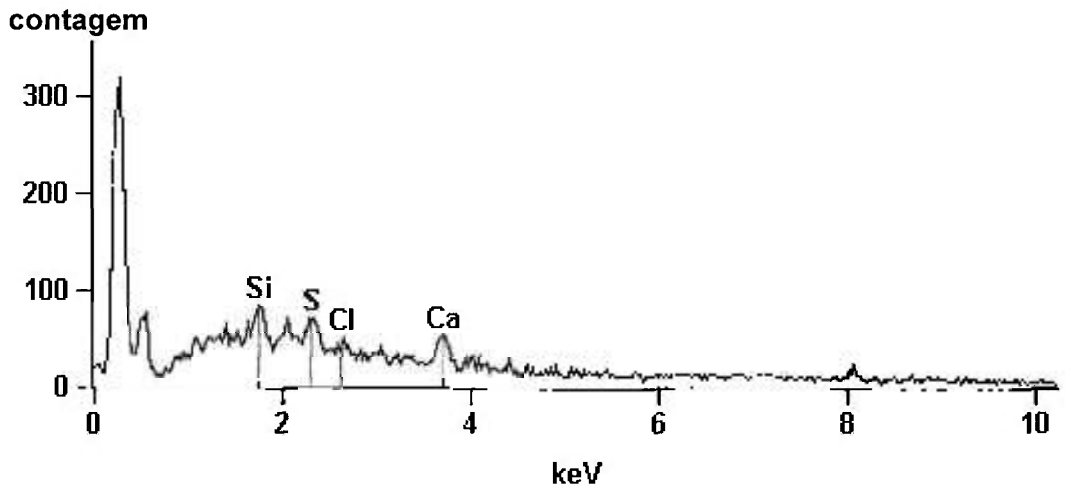


Figura 38: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 4 na Figura 33

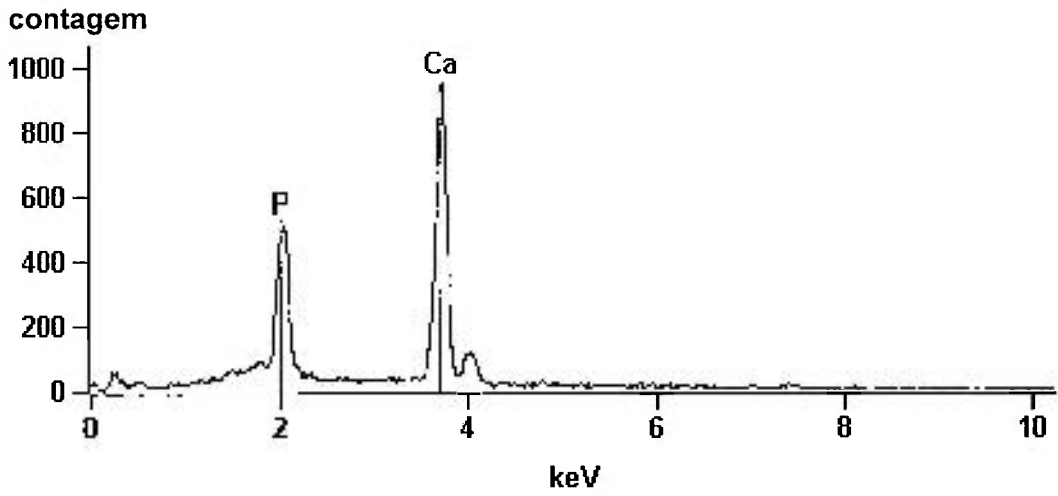


Figura 39: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 5 na Figura 33

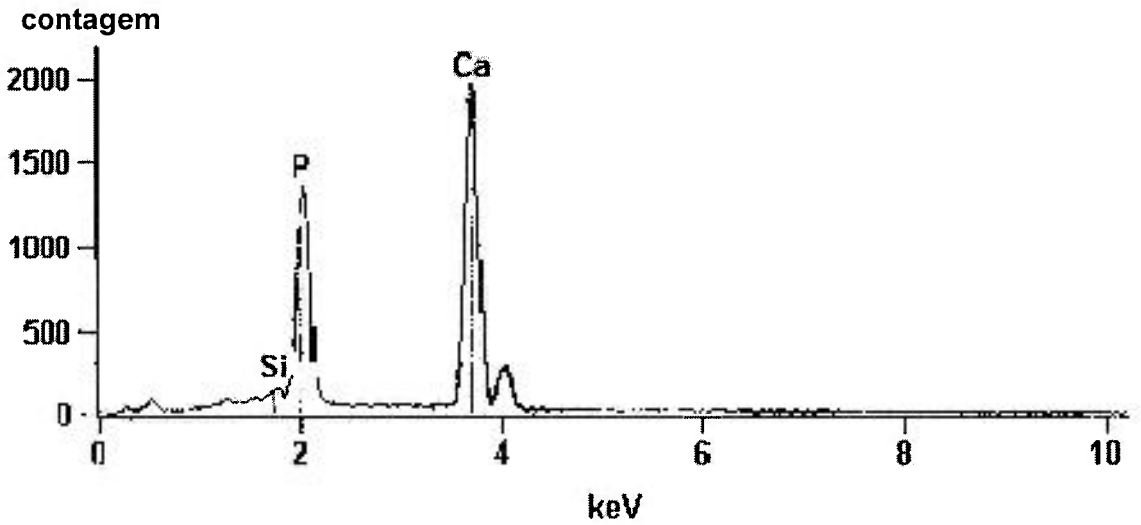


Figura 40: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 6 na Figura 33

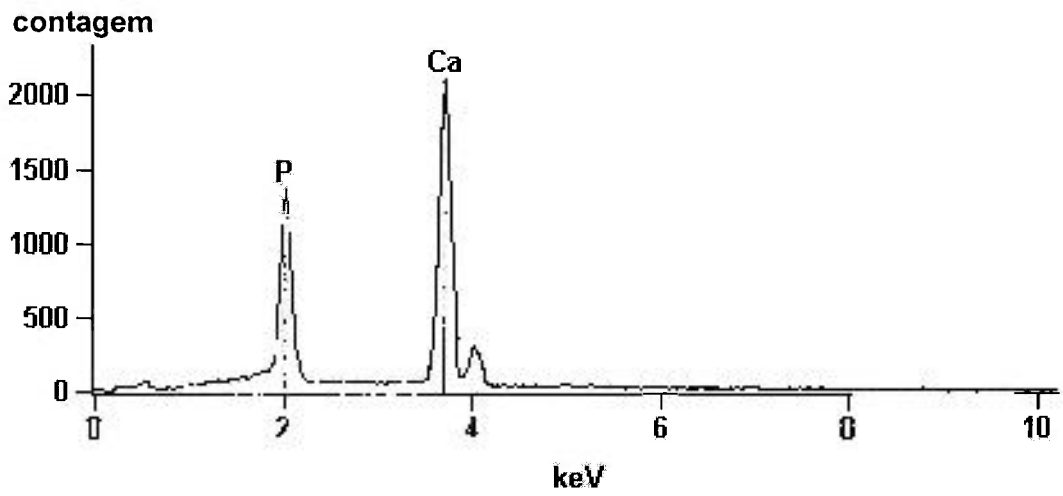


Figura 41: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química da região 7 na  
Figura 33

## 9. GLOSSÁRIO DOS TERMOS BIOLÓGICOS

**Canais de Havers** – Canais condutores de vasos nutritivos dos ossos (REY, 2003).

**Canais de Volkman** – Canais condutores de arteríolas e vênulas nos ossos compactos (REY, 2003).

**Células mesenquimais** – Células estreladas e pseudo-anastomosadas que se originam do mesoblasto ou da crista neural, que conservam a capacidade de se diferenciarem em elementos diversos, como fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, fibras musculares, etc. (REY, 2003).

**Células osteoprogenitoras** – Células de natureza mesenquimal que dão origem aos osteoblastos e condroblastos, segundo o microambiente em que se encontram (REY, 2003).

**Citocinas** – Moléculas protéicas produzidas pelo sistema imunitário (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

**Colágeno** – Superfamília de escleroproteínas complexas da matriz extracelular com função essencialmente estrutural (REY, 2003).

**Colágeno tipo I** - É o principal colágeno da pele, dos ossos e tendões, dotando esses e outros tecidos de sua força tênsil (REY, 2003).

**Colágeno tipo III** - Um dos colágenos fibrilares mais importantes da pele e tecidos vasculares (REY, 2003).

**Cortical** – Que se relaciona a córtex (REY, 2003).

**Distal** – Diz-se do que está mais longe do início ou do ponto de inserção de um órgão; ou mais longe do centro do corpo (REY, 2003).

**Endóstio** – Camada osteogênica que reveste internamente os ossos, sendo constituída por osteoblastos achatados aplicados diretamente sobre o tecido ósseo, de maneira a lembrar um epitélio (REY, 2003).

**Fibroblasto** – A célula mais comum do tecido conjuntivo, apresentando-se com citoplasma abundante, núcleo redondo ou ovóide, grande quantidade de retículo endoplasmático granuloso e complexo de Golgi desenvolvido (REY, 2003).

**Implantação** - Processo cirúrgico destinado a restabelecer a continuidade de um conduto obstruído, mediante excisão da parte obstruída e inserção do coto em lugar adequado (REY, 2003).

**Implante:** Enxerto ou fragmento de tecido destinado a uma implantação (REY, 2003).

**Medula óssea** – tecido que preenche os espaços livres no interior dos ossos e que se apresenta sob dois aspectos: 1) A medula óssea vermelha, sede da hematopoese, que histologicamente, é uma rede de células reticulares e fibras reticulares, constituindo uma trama frouxa, preenchida por capilares sinusóides, células adventícias, macrófagos, células adiposas e todas as populações de elementos formadores de hemácias, granulócitos, monócitos e plaquetas. 2) A medula óssea amarela, que ocupa os espaços deixados nos ossos pela vermelha, devendo sua cor à riqueza de células adiposas (REY, 2003).

**Osteoblasto** – Tipo de células, que formam tecido ósseo, metabolicamente muito ativas, derivadas do mesênquima, que forram, interna e externamente os ossos, sob o perióstio (REY, 2003).

**Osteocalcina** – Proteína de baixo peso molecular encontrada nos ossos, dentes e possivelmente, em outros tecidos mineralizados (FORTES & PACHECO, 1968).

**Osteócito** – Célula fundamental e mais abundante do tecido ósseo, que resulta de um osteoblasto, depois de ter este segregado o componente da matriz óssea (REY, 2003).

**Osteoclasto** – Célula grande e multinucleada do tecido ósseo que, no osso em crescimento ou na reparação de uma fratura, concorre para destruir o material antigo, abrir canais novos, etc. (REY, 2003).

**Osteóide** – Ou pré-osso, é o tecido que se assemelha ao tecido ósseo. Matriz não calcificada, junto aos osteoblastos ativos (REY, 2003).

**Osteona** – Unidade estrutural de tecido ósseo compacto, constituído por um sistema haversiano (FORTES & PACHECO, 1968). Unidade estrutural do osso constituída pelos canais de Havers em lamelas concêntricas (REY, 2003).

**Periósteo** – Camada de tecido conjuntivo denso que envolve externamente os ossos, sendo muito fibrosa em sua parte mais externa, porém mais celular e vascular internamente, inclusive com a camada de osteoblastos revestindo diretamente o tecido ósseo (REY, 2003).

**Proximal** - Diz-se do que está mais perto do início ou do ponto de inserção de um órgão; ou mais perto do centro do corpo (REY, 2003).

**Sistema de Havers** – O mesmo que osteona.

**Trabécula** – Pequena parte óssea que concorre para formar a trama da parte esponjosa de um osso (REY, 2003).

**Vesícula** – Estrutura microscópica ou submicroscópica envolvida por membrana, encontrada no citoplasma das células (REY, 2003).

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATHOPOULOS, S.; NIKOLOPOULOS, P.; SALOMONI, A.; TUCCI, A.; STAMENKOVIC, I. Preparation and properties of binary oxide bioceramics. **J. Mater. Sci. – Mater. Med.**, v.7, p. 629-636, 1996.
- AHMAD, I. Yttrium-partially stabilized zirconium dioxide posts: an approach to restoring coronally compromised nonvital teeth. **Int. Periodont. Restor. Dent.**, v. 18, p. 455-465, 1998.
- AKAGAWA, Y; HASHIMOTO, M; KONDO, N.; SATOMI, K.; TAKATA, T.; TSURU, H. Initial bone-implant interfaces of submergible and supramergible endosseous single-crystal sapphire implants. **J. Prosthetic Dentistry.**, v. 55, p. 96-100, 1986.
- AKAGAWA, Y.; ICHIKAWA, Y.; NIKAI, H.; TSURU, H. Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. **J. Prosthetic Dentistry**, v. 69, n. 6, p. 599-604, 1993.
- AKAGAWA, Y.; HOSOKAWA, R.; SATO, Y.; KAMAYAMA, K.; Comparison between freestanding and tooth-connects partially stabilized zirconia implants after two years' function in monkeys: a clinical and histologic study. **J. Prosthetic Dentistry**, v. 80, n. 5, p. 551-558, 1998.
- ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P.-I.; HANSSON, H.-A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated titanium implants. **Acta Orthop. Scand.**, v. 52, p. 155-170, 1981.
- AMARAL, M.; COSTA, M.A.; LOPES, M.A.; SILVA, R.F.; SANTOS, J.D.; FERNANDES, M.H. Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-bioglass composites stimulate the proliferation of MG63 osteoblast-like

cells and support the osteogenic differentiation of human bone marrow cells. **Biomaterials**, v. 23, p. 4897-4906, 2002.

AMARAL, M.; LOPES, M.A.; SANTOS, J.D.; SILVA, R.F. Wettability and surface charge of  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -bioglass composites in contact with simulated physiological liquids. **Biomaterials**, v. 23, p. 4123-4129, 2002.

ANDERSSON, Ö.H.; LIU, G.; KARLSSON, K.H.; NIEMI, L.; MIETTINEN, J.; JUHANOJA, J. In vivo behaviour of glasses in the  $\text{SiO}_2$ - $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ - $\text{B}_2\text{O}_3$  system. **J. Mater. Sci. – Mater. Med.**, v. 1, p. 219-227, 1990.

ANNEROTH, G.; ERICSSON, A.R.; ZETTERQVIST, L. Tissue integration of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ceramic dental implants (Frialit®) – a case report. **Swed. Dent. J.**, v. 14, n.2, p. 63-70, 1990.

ANSTIS, G.R.; CHANTIKUL, P.; LAWN, B.R.; MARSHALL, D.B. A critical evaluation of indentation techniques for measuring fracture toughness: I, Direct crack measurements. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 64, n. 9, p. 533-542, 1981.

ASCENZI, A.; BONUCCI, E. The tensile properties of single osteon. **Anat. Rec.**, v. 158, p. 375-386, 1967.

ASCENZI, A.; BONUCCI, E. The compressive properties of single osteon. **Anat. Rec.**, v. 161, p. 377-392, 1968.

BARSOUM, M. **Fundamentals of ceramics**. New York: McGraw-Hill, 1997.

BAUCCIO, M. **ASM Engineering materials reference book**. [S.I.]: Materials Park, 1994.

BÉGIN-COLIN, S.; MOCELLI, A.; VON STEBUT, J.; BORDJI, K.; MAINARD, D.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -TiN wear resistance in a simulated biological environment. **J. Mater. Sci.**, v. 33, p. 2837-43, 1998.

BEUTLER, H.; LEHMANN, M.; STÄHLI, G. Wear behaviour of medical engineering materials, **Wear**, v. 33, p. 337-350, 1975.

- BLENCKE, B.A.; BRÖMER, H.; DEUTSCHER, K.K. Compatibility and long-term stability of glass ceramic implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 12, p. 307-316, 1978.
- BOUTIN, P. L'alumine et son utilisation en chirurgie de la hanche. **Presse Méd.**, v. 79, p. 639-650, 1971.
- BOUTIN, P. Arthroplastie de la hanche par prothèse en alumine frittée. Etude expérimentale et premières applications cliniques. **Rev. Chir. Orthop.**, v. 58, p; 229-246, 1972.
- BOUTIN, P.; CHRISTEL, P.; DORLOT, J.-M.; MEUNIER, A.; de ROQUANCOURT, A.; BLANQUAERT, D.; HERMAN, S.; SEDEL, L.; WITVOET, J. The use of dense alumina-alumina ceramic combination in total hip replacement. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 22, p. 1203-1232, 1988.
- BRÅNEMARK, P.J.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRON, J.; LLEN, O.; ÖMANN, A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J. Plast. Reconstruction Surg. Suppl.** 3:81, 1969.
- BRÅNEMARK, P.-I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; ÖHMAN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconst. Surg. Suppl.** 16, p.1-132, 1977.
- BRÅNEMARK, P.-I. Osseointegration and its experimental background. **J. Prosthetic Dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983.
- BRANKO, M.; RIXECKER, G.; ALDINGER, F. Densification of  $\text{Si}_3\text{N}_4$  with  $\text{LiYO}_2$  additive. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 87, n. 4, p. 546-549, 2004.
- BURGER, W.; RICHTER, H.G. High strength and toughness alumina matrix composites by transformation toughening and 'in situ' platelet reinforcement (ZPTA) – the new generation of bioceramics. . In: INT. SYMP. ON CERAMICS IN MEDICINE, November 22-26, 2000, Bologna. **Proceedings...** Switzerland: Trans Tech Publications, 2001.p. 545-548.

- CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística – princípios e aplicações*. São Paulo, S.P.: Artmed Editora S.A., 2004.
- CARBONARI, M.J. *Desenvolvimento de Vidros Niobofosfato Bioativos*. São Paulo: 2003. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP.
- CARLSSON, L.; RÖSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T. ; BRÅNEMARK, P.-I. Osseointegration of titanium implants. **Acta Orthop. Scand.**, v. 57, 285-289, 1986.
- CHANG, Y.-S; OKA, M.; NAKAMURA, T.; GU, H.-O. Bone remodeling around implanted ceramics. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 30, n.1, p. 117-124, 1996.
- CHANTIKUL, P.; ANSTIS, G.R.; LAWN, B.R.; MARSHALL, .B. A critical evaluation of indentation techniques for measuring fracture toughness: II, Strength method. **J. Amer. Ceram. Soc.**, v. 64, p. 539-543, 1981.
- CHIANG, Y.M.; BIRNIE III, D.; KINGERY, W.D. *Physical ceramics*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- CHRISTEL, P.; MEUNIER, A.; HELLER, M. Mechanical properties and short-term in-vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 23, p. 45-61, 1989.
- DOREMUS, R.H. Review – bioceramics. **J. Mater. Sci.**, v. 27, p. 285-297, 1992.
- DUAILIBI FILHO, J. *Efeito da adição do ferro e do silício na densificação, microestrutura e propriedades mecânicas do nitreto de silício*. São Paulo: 1994. Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP.
- ERIKSSON, R.A.; ALBREKTSSON, T. The effect of heat on bone regeneration: Na experimental study in the rabbit using the bone growth chamber. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 42, p. 705-711, 1984.
- FABER, K.T.; EVANS, A.G. Crack deflection process – I. Theory. **Acta Metall.**, v. 31, n. 4, p. 565-576, 1983.

- FARTASH, B.; ARVIDSON, K.; ERCSSON, I. Histology of tissues surrounding single crystal sapphire endosseous dental implants. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 1, p. 13-21, 1990.
- FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Medical device recalls - Recall of zirconia ceramic femoral heads for hip implants, 2001. Disponível em <http://www.fda.gov/cdrh/recalls/zirconiahip>. Acesso em: 28 set. 2004
- FORTES, H.; PACHECO, G. **Dicionário médico**. Rio de Janeiro, 1968.
- FREDEL, M.C.; BOCCACCINI, A.R. Processing and mechanical properties of biocompatible Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> platelet-reinforced TiO<sub>2</sub>. **Mater. Sci.**, v. 31, p. 4375-80, 1996.
- GOTO, Y.; THOMAS, G. Microstructure of silicon nitride ceramics sintered with rare-earth oxides. **Acta. Metall. Mater.**, v. 43, n. 3, p. 923-930, 1995.
- GRESKOVICH, C.; YEH, H.C. Hardness of dense  $\beta$ -Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. **J. Mater. Sci. Lett.**, v. 2, p. 657-659, 1983.
- GRISS, P.; WENER, E.; HEIMKE, G. Alumina ceramic, bioglass, and silicon nitride: a comparative biocompatibility study. In: **Mechanical Properties of Biomaterials**. Edited by HASTING, G.W. and WILLIAMS, D.F., pp. 217-226, 1980.
- GROSS, U.M.; STRUNZ, V. The anchoring of glass-ceramics of different solubility in the femur the rat. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 14, p. 607-618, 1980.
- GUEDES e SILVA, C.C. **Estudo de Sinterização de Nitreto de Silício com Adições dos Óxidos de Lantânio, Gadolínio e Alumínio**. São Paulo: 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP.
- GUEDES e SILVA, HIGA, O.Z.; BRESSIANI, J.C. Cytotoxic evaluation of silicon nitride based ceramics. **Materials Science & Engineering C**, v. 24, n. 5, pp. 643-646, 2004.
- GUNG, Y.W.; CHENG, C.K.; SU, C.Y. A stereomorphologic study of bone matrix apposition in HÁ-implanted cavities observed with SEM, being prepared by a microvascular cast and freeze-fracture method. **Medical Engineering Physics**, v. 25, p. 565-571, 2003.

- HALL, R.M.; UNSWORTH, A. Review – friction in hip prostheses. **Biomaterials**, v. 18, p. 1017-1026, 1997.
- HAMPSHIRE, S. **Engineering properties of nitrides**. In: SCHNEIDER, S.J. *Ceramics and glasses*. [S.I.]: ASM International, 1991, p. 813-820 (*Engineered Materials Handbook*, 4).
- HASHIMOTO, M. AKAGAWA, Y.; NIKAI, H. Single-crystal sapphire endosseous dental implant loaded with functional stress-clinical and histological evaluation of peri-implant tissues. **J. Oral Rehabilitation**, v. 15, p. 65-76, 1988.
- HEIMKE, G.; LEYEN, S.; WILMANN, G. Knee arthroplasty: recently developed ceramics offer new solutions. **Biomaterials**, v. 23, p. 1539-1551, 2002.
- HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 74, n. 7, p. 1487-14510, 1991.
- HENCH, L.L. Bioceramics, a clinical success. **Ceram. Bull.**, p. 67-74, 1998.
- HOWLETT CR, MCCARTNEY E, CHING W. The effect of silicon nitride ceramic on rabbit skeletal cells and tissue. An in vitro and in vivo investigation. **Clin. Orthop.**, v. 244, p. 293–304, 1989.
- HÜBLER, R. Hardness and corrosion protection enhancement behaviour of surgical implant surfaces treated with ceramic thin films. **Surf. Coat. Technol.**, v. 116-119, p. 1111-1115, 1999.
- HUMMER, C.D.; TOTHMAN, R.H.; HUZACK, W.J. Catastrophic failure of modular zirconia – ceramic femoral head components in total hip arthroplasty. **J. Arthroplasty**, v. 10, p. 848-850, 1995.
- HUTCHINGS, I.M. **Tribology – Friction and wear of engineering materials**. London: Edward Arnold, 1992.
- ICHIKAWA, Y.; AKAGAWA, Y.; NIKAI, H.; TSURU, H. Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo. **J. Prosthetic Dentistry**, v. 68, n.2, p. 322-326, 1992.

IZHEVSKIY, V.A.; GÊNNOVA, L.A.; BRESSIANI, J.C.; ALDINGER, F. Progress in SiAlON ceramics. **J. Europ. Ceram. Soc.**, v.20, p. 2275-2295, 2000.

INTERNATIONAL STANDARD: IMPLANTS FOR SURGERY: Ceramic materials based on high purity alumina. **ISO 1981; 6474.**

INTERNATIONAL STANDARD: BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES. Part 5. Tests for Citotoxicity: In vitro Methods. **ISO 1993; 10993-5.**

INTERNATIONAL STANDARD: IMPLANTS FOR SURGERY: Ceramic materials based yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP). **ISO 1997; 13356**

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro, R.J.: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999.

KASUGA, T.; SAWADA, M.; NOGAMI, M.; ABE, Y. Bioactive Ceramics Prepared by Sintering and Crystallization of Calcium Phosphate Invert Glasses. **Biomaterials**, v. 20, p. 1415-20, 1999.

KLEMMER, H.; PEZZOTTI, G. Fracture toughness and time-dependent strength behavior of low-doped silicon nitrides for applications at 1400°C. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 77, n. 2, p. 553-561, 1994.

KOO, S. **Avaliação morfológica e morfométrica da bioatividade do pirofosfato de cálcio na osteointegração dos implantes de titânio em coelhos**. São Paulo: 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

KÖNIG JR, B.; AND LOPES, C. C. Bone remodeling analysis after placement of dental implants using polyfluorochrome sequential labeling. **Annals of Anatomy**, v.184, p. 241-244, 2002.

KORN, D.; SOYEZ, G.; ELSSNER, G.; PETZOW, G.; BRÈS, E.F.; d'HOEDT, B.; SCHULTE, W. Study of interface phenomena between bone and titanium and alumina surfaces in the case of monolithic and composite dental implants. **J. Mater. Sci. – Mater. Med.**, v. 8, p. 613-620, 1997.

- KUE, R.; SOHRABI, A.; NAGLE, D.; FRONDOZA, C.; HUNGERFORD, D. Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-Like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs. **Biomaterials**, v. 20, p. 1195-1201, 1999.
- KUSAKA, J.; TAKASHIMA, K.; YAMANE, D.; IEKEUCHI, K. Fundamental study for all-ceramic artificial hip joint. **Wear**, v. 225-229, p. 734-742, 1999.
- LEE, M.; LEE, W.; KOH, Y.; CHOI, J.; KIM, H. Microstructural evolution and mechanical properties of gas-pressure-sintered  $\text{Si}_3\text{N}_4$  with  $\text{Yb}_2\text{O}_3$  as a sintering aid. **J. Mater. Res.**, v. 14, n.5, p. 1904-1909, 1999.
- LEMONS, J.E. Ceramics: past, present, and future. **Bone**, v. 19, p. 121S-128S, 1996.
- MARTI, A. Inert bioceramics ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ) for medical application. **Injury, Int. Care Injured**, v. 31, p. S-D33-36, 2000.
- MARTIN, R.B.; LAU, S.T.; MATHEWS, P.V.; GIBSON, V.A.; STOVER, S.M. Collagen fiber organization is related to mechanical properties and remodeling in equine bone. A comparison of two methods. **J. Biomechanics**, v. 29, v. 12, p. 1515-1521, 1996.
- MITOMO, M.; IZUMI, F. F.; HORIUCHI, S.; MATSUI, Y. Phase relationships in the system  $\text{Si}_3\text{N}_4$ - $\text{SiO}_2$ - $\text{La}_2\text{O}_3$ . **J. Mater. Sci.**, v. 17, p. 2359-2364, 1982.
- MIYAYAMA, M.; KOUMOTO, K.; YANAGIDA, H.. **Engineering properties of single oxides**. In: SCHNEIDER, S.J. Ceramics and glasses. [S.I.]: ASM International, 1991, p. 748-757 (Engineered Materials Handbook, 4).
- MURAI, K.; TAKESHITA, F.; AYUKAWA, Y.; KIYOSHIMA; SUETSUGU, T.; TANAKA, T. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibia of young and mature rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 30, n. 4, p. 523-533, 1996.
- NAKAYASU, T.; YAMADA, T.; TANAKA, I.; ADACHI, H.; GOTO, S. Calculation of grain-boundary in rare-earth-doped  $\beta$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ . **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 81, n. 3, p. 565-570, 1998.
- OLSSON, O.; EKSTRÖM, T. HIP-sintered  $\beta$ - and mixed  $\alpha$ - $\beta$  sialons densified with  $\text{Y}_2\text{O}_3$  and  $\text{La}_2\text{O}_3$  additions. **J. Mater. Sci.**, v. 25, p. 1824-1823, 1990.

- ONJI, T.; HINAO, K.; KANZAKI, S. Fracture resistance behavior of highly anisotropic silicon nitride. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 78, n. 11, p. 3125-3128, 1995.
- PANJIAN, L.; GROOT, K.D. A Way to Improve Understanding of the Physiological Response of Tissue to Implant Bioceramics: the Thermodynamics of Irreversible Processes. **J. Mater. Sci. – Mater. Med.**, v. 2, p. 125-28, 1991.
- PARK, H.; KIM, H.; NIIHARA, K. Microstructure evolution mechanical properties of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> with Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a sintering additive. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 80, n.3, p. 750-756, 1997.
- PEILLON, F.C.; THEVENOT, F. Microstructural designing of silicon nitride related toughness. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 22, p. 271-278, 2002.
- PICONI, C.; LABANTI, M.; MAGNANI, G.; CAPORALE, M.; MACCAURO, G.; MAGLIOCCHETTI, G. Analysis of a failed alumina THR ball head. **Biomaterials**, v. 20, p. 1637-1646, 1999.
- PULEO, D.A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**, v. 20, p. 2311-2321, 1999.
- PULLUM, O.J.; LEWIS, M.H. The effect of process atmosphere on the intergranular phase in silicon nitride ceramics. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 16, p. 1271-1275, 1996.
- RAHN, B.A. **Die polychrome sequenzmarkierung**. Freiburg i. Br., Habilitations – Schrift, 1976.
- RATNER, B.D.; Society for biomaterials 1992 presidential adress – New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 27, p. 837-850, 1993.
- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science – an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.
- RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A.; HULBERT, S.F. **Bioceramics: materials, properties, applications**. New York, N.Y.: Chapman & Hall, 1991.

- REY, L. *Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde*. Rio de Janeiro: R.J.: Guanabara Koogan S.A., 2003.
- RHINELANDER, F.W. *Physiological responses of bone to implants*. IN: Williams, D.F. (editor): Biocompatibility of orthopedic implants, Boca Raton, Fla., 1982, CRC Press, v. 1, pp. 51-74.
- ROBERTS, W.E.; TURLEY, P.K.; BREZNIAK, N.; FIELDEN, P.J. Bone physiology and metabolism. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v. 15, p. 54-61, 1987.
- ROBERTS, W.E. Bone Tissue Interface. **J. Dental Education**, v. 52, p. 804-809, 1988.
- RUIZ, I.R. Obtenção e caracterização de  $\beta$ -SiAlON utilizando concentrado de terras raras como aditivo de sinterização. São Paulo: 2000. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - USP.
- RYHÄNEN, J. *Biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy*. Oulu: 1999. Tese (Doutoramento). Universidade de Oulu.
- SAIKKO, V. *Tribology of total replacement hip joints studied with new hip joint simulators and a materials-screening apparatus*. In: RANTA, M. Mechanical Engineering Series. Helsinki: Acta Poytechica Scandinavica, 1993.
- SAITO, T.; IMADA, Y.; HONDA, F. An analytical observation of the tribochemical reaction of silicon nitride sliding with low friction in aqueous solutions. **Wear**, v. 205, p. 153-159, 1997.
- SANDERS, W.A.; MIESKOWSKI, D.M. Strength and microstructure of sintered  $\text{Si}_3\text{N}_4$  with rare-earth oxide additions. **Am. Ceram. Soc. Bull.**, v. 64, p. 304-309, 1985.
- SANTOS, J.D.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, S.M.; LOPES, M.A.; SILVA, R.F. Silicon nitride-bioglass<sup>®</sup> composite for biomedical applications. In: INT. SYMP. ON CERAMICS IN MEDICINE, November 22-26, 2000, Bologna. **Proceedings...** Switzerland: Trans Tech Publications, 2001.P. 589-592.
- SASAKI, S. The effect of the surrounding atmosphere on the friction and wear of alumina, zirconia, silicon carbide and silicon nitride. **Wear**, v. 134, p. 185-200, 1989.

- SCARANO, A.; DI CARLO, F.; QUARANTA, M.; PIATTELLI, A. Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. **J. Oral Implantology**, v. 29, n. 1, p. 8-12, 2003.
- SCHOLES, S.C.; UNSWORTH, A.; HALL, R.M.; SCOTT, R. The effects of material combination and lubricant on the friction of total hip prostheses. **Wear**, v. 241, p. 209-213, 2000.
- SCLAROFF, A.; EL-MOFTY, S.; GUYER, E. Clinical evaluation of a single crystal sapphire tooth implant in human beings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 70, n. 2, p. 141-146, 1990.
- SENNERBY, L.; THOMSEN, P.; ERICSON, L.E. Early tissue response to titanium implants insert in rabbit cortical bone – Part I light microscopic observations. **J. Mater. Sci. – Mater. Med**, v.4, p. 240-250, 1993.
- SENNERBY, L.; THOMSEN, P.; ERICSON, L.E. Early tissue response to titanium implants insert in rabbit cortical bone – Part II Ultrastructural observations. **J. Mater. Sci. – Mater. Med**, v.4, p. 494-502, 1993a.
- SIGULINSKI, F.; BOSKOVIC, S. Phase composition and fracture toughness of  $\text{Si}_3\text{N}_4\text{-ZrO}_2$  with  $\text{CeO}_2$  additions. **Ceram. Int.**, v. 25, p. 41-47, 1999.
- SHAW, T.M. Model for effect of powder packing on the driving force for liquid-phase sintering. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 76, n. 3, p. 664-670, 1993.
- SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2001.
- SILVA, R.R. F. **Cinética de sinterização e desgaste de pastilhas de corte do sistema  $\text{Si}_3\text{N}_4\text{-CeO}_2\text{-AlN}$** . Portugal: 1994. Tese (Doutoramento) - Universidade de Aveiro
- SOHRABI, A.; HOLLAND, C.; KUE, R., NAGLE, D.; HUNGERFORD, D.S.; FRONDOZA, C.G. proinflammatory cytokine expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by human osteoblast-like MG-63 cells upon exposure to silicon nitride in vitro. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2000.

- SORRELL, C.; HARDCASTLE, P.H.; DRUITT, R.K.; HOWLETT, C.R.; McCARTNEY, E.R. Results of 15-years clinical study of reaction bondend silicon nitride intervertebral spacers. IN: 7th WORD BIOMATERIAL CONGRESS, May 17-21, 2004, Sydney. **Proceedings...**Sydney: Australian Society for Biomaterials, 1004, p. 1872.
- STEFLIK, D.E.; SISK, A.L.; LAKE, F.T. HANES, P.J. Experimental studies of the implant-tissue interface. **J. Oral. Impl.**, v. 19, n. 12, p. 90-94, 1993.
- STEFLIK, D.E.; PARR, G.R.; SISK, A.L.; HANES, P.J.; LAKE, F.T.; GARDNER, L.K.; BERKERY, D.J.; GA and ALBANY, A. Morphology of the bone that supports endosteal dental implants. **Oral Surg. Oral Med. Oral Path.**, v. 76, n. 4, p. 467-475, 1993a.
- STEVENS, R. **Engineering properties of zirconia**. In: SCHNEIDER, S.J. Ceramics and glasses. [S.I.]: ASM International, 1991, p. 775-786 (Engineered Materials Handbook, 4).
- SUN, E.Y.; BECHER, P.F.; PLUCKNETT, K.P.; HSUEH, C.; ALEXANDER, K.B.; WATERS, S.B.; HIRAO, K.; BRITO, M.E. Microstructural design of silicon nitride with improved fracture toughness: II, Effects of ittria and alumina additives. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 81, n. 11, p. 2831-2840, 1998.
- SWAB, J.J. Low temperature degradation of Y-TZP materials. **J. Mater. Sci.**, v. 26, p. 6707-6714, 1991.
- SZMUKLER-MONCLER, S.; SALAMA, H.; REINGEWIRTZ, Y.; DUBRUILLE, J.H. Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: Review of experimentla literature. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 43, n. 2, pp. 192-203, 1998.
- TAJIMA, Y. Development of high performance silicon nitride ceramics and their applications. In: **Mater. Res. Soc. Symp. Proc.**, v. 287, p. 189-196, 1993.
- TAKADOUM, J. HOUMID-BENNANI, H.; MAIREY, D. The wear characteristic of silicon nitride. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 18, p. 553-556, 1998.
- TEOH, S.H. Fatigue of biomaterials: a review. **Int. J. Fatigue**, v. 22, p. 825-837, 2000.

- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.; PIMENTEL, E.R. polarization microscopy and microspectrophotometry of sirius red, picro sirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochemical Journal**, v. 14, p. 857-878, 1982.
- WANG, C.M.; PAN, X.; RÜHLE, M. Review-silicon nitride crystal structure and observations of lattice defects. **J. Mater. Sci.**, v. 31, p. 5281-5298, 1996.
- WANG, R.R.; WELSCH, E.G.; MONTEIRO, O. Silicon nitride coating on titanium to enable titanium-ceramic bonding. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 46, n.2, p.262-270, 1999.
- WILLIAMS, D.F. **Definition in biomaterials in proceedings of a consensus conference of European society for biomaterials**, Cherter, England, 1986.
- WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. **Progress in biomedical engineering**, v. 4, 1987.
- WILLIAMS, D.F. Review: Tissue-biomaterial interactions. **J. Mater. Sci. – Mater. Med**, v. 22, p. 3421-3445, 1987a.
- WILLMANN, G. Design of ceramic acetabular components: a retrospective. In: INT. SYMP. ON CERAMICS IN MEDICINE, November 22-26, 2000, Bologna. **Proceedings...** Switzerland: Trans Tech Publications, 2001.P. 525-528.
- WOLMAN, M. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology – A review. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 21-50, 1975.
- WONG, H.C.; UMEHARA, N.; KATO, K. The effect of surface roughness on friction of ceramics sliding in water. **Wear**, v. 218, p. 237-243, 1998.
- WÖTTING, G.; ZIEGLER, G. Influence of powder properties and processing conditions on microstructure and mechanical properties of sintered  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . **Ceram. Int.**, v. 10, n.1, p. 18-22, 1984.
- WRIGHT MEDICAL TECHNOLOGY, INC. – Comparative analysis: Alumina ceramic versus zirconia ceramic, 2002. Disponível em <http://www.wmt.com/download>

XU, J.; KATO, K. Formation of tribochemical layer of ceramics sliding in water and its role for low friction. **Wear**, v. 245, p. 61-75, 2000.

ZETTERQVIST, L.; ANNEROTH, G.; NORDENRAM, A. Tissue integration of  $Al_2O_3$ -ceramic dental implants: an experimental study in monkeys. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 6, p. 285-293, 1991.

ZHOU, Y.S.; IKEUCHI, K.; OHASHI, M. Comparison of the friction properties of four ceramic materials for joint replacements. **Wear**, v. 210, p. 171-177, 1997.

ZHOU, Y.S.; OHASHI, M.; TOMITA, N.; IKEUCHI, K.; TAKASHIMA, K. Study on the possibility of silicon nitride-silicon nitride as a material for hip prostheses. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 5, p. 125-129, 1997a.

ZIEGLER, G.; HEINRICH, J.; WÖTTING, G. Review-relationships between processing, microstructure and properties of dense and reaction-bonded silicon nitride. **J. Mater. Sci.**, v. 22, p. 3041-3085, 1987.