INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LIGAS POROSAS DE Ti-13Nb-13Zr OBTIDAS POR METALURGIA DO PÓ

TAMIYE SIMONE GOIA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora:
Drª. Ana Helena de Almeida Bressiani

SÃO PAULO
2008

Ao meu marido e pesquisador Kalan pela paciência, compreensão, apoio, carinho e incentivo, durante todo este trabalho e em nossas vidas.

Às Famílias Goia, Hino, Violin e Oliveira
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Profª Drª. Ana Helena de Almeida Bressiani pela orientação, incentivo e amizade. A relação de respeito, carinho e confiança proporcionaram o crescimento da nossa relação no trabalho e na convivência.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto, pela grande ajuda nos experimentos *in vivo*, e pelo incentivo, disposição e principalmente pela amizade. Sua postura profissional deve ser um exemplo a ser seguido por muitos em nossa estimável profissão.

Ao Dr. Hidetoshi, pelo trabalho conjunto no processamento dos materiais, e pela amizade.

À Profª. Drª. Olga pelos ensinamentos, discussões dos ensaios *in vitro* e amizade, e ao Centro de Biotecnoligia com a cooperação da Drª. Andrea e da Neide.

Ao Dr. Luis A. Genova pelas sugestões dadas na dissertação ou durante o trabalho e amizade.

Aos Técnicos do CCTM Celso, Nildemar, Glauson, Renê, Edson, Pedro, Vanderlei pela extrema dedicação nas análises solicitadas e pelo suporte e amizade.

Ao laboratório de Análise de Imagens do Instituto de Patologia da Universidade Nacional de La Plata – Bs As /Argentina, pela colaboração na discussão das imagens histológicas.

Às amigas Christiane e Deiby que me acolheram no grupo de biomateriais e tiveram papeis fundamentais para o desenvolvimento e sucesso deste trabalho. O carinho e a amizade consolidaram nossa relação no trabalho e na vida.

.

Aos amigos do IPEN, principalmente a Ana Lucia, Carla, Carolina, Èliner, Erica, João Roberto, José Hélio, Juliana, Karolzinha, Graziela, Heveline, Rodrigo Mesquita, Rodrigo Souza, Suelanny e Ulisses pelo apoio carinhoso e estímulos constantemente dedicados.

À Profª Drª. Maria Lúcia Zaidan Dagli, responsável pelo Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela disponibilização do microscópio.

À Profª Drª. Denise T. Fantoni, pela ajuda com os protocolos anestésicos, analgésicos e antimicrobianos durante o procedimento *in vivo*, desenvolvidos para esta pesquisa.

Ao Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências Biomédica, da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade do microscópio para as análises de fluorescência.

Aos amigos Carola, Marisa e Fernando que participaram direta e indiretamente neste trabalho, porém ativamente na minha vida, com apoio constante e amizade.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LIGAS POROSAS DE Ti-13Nb-13Zr OBTIDAS POR METALURGIA DO PÓ

Tamiye Simone Goia

RESUMO

Estudos do titânio e suas ligas, como biomateriais, visam melhorar problemas relacionados com a interface osso-implante que podem determinar a qualidade, o tempo de reparação óssea e, por conseguinte o sucesso clínico do implante. O objetivo deste estudo foi avaliar, em ratos, a osteointegração de implantes macroporosos produzidos pelo método da metalurgia do pó (MP), com adição controlada de gelatina. Foram utilizadas, como grupo controle, amostras de titânio comercialmente puro (Ticp) e amostras da liga Ti-13Nb-13Zr obtida pelo processo de MP, sinterizadas a 1150°C / 14 horas (10^{-5} mBar). Para a obtenção das amostras porosas, foi adicionado até 15% em peso de gelatina aos pós metálicos (Ti, Nb e Zr), as amostras foram tratadas termicamente em forno a vácuo (10^{-2} mBar) a 300°C / 90 min e sinterizadas. Foi feita a caracterização física dos pós metálicos, da liga sinterizada e amostras porosas. A caracterização biológica iniciou-se pelo teste "*in vitro*" de citotoxicidade, de acordo com a norma ISO-10993-5 (1993), que permitiu a utilização dos implantes em teste "*in vivo*". A avaliação da osteointegração foi realizada em ratos Wistar, macho, em um período de 28 dias. As análises morfológicas, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), avaliaram qualitativamente a osteointegração. Como conclusão, a metodologia inédita do processo de MP modificado pela adição de gelatina, propiciou com êxito a obtenção de implantes metálicos porosos. A gelatina por ser um colágeno, não interferiu na característica final de não-citotoxicidade dos implantes. O tamanho dos poros obtidos por esta técnica permitiu a nutrição e manutenção necessária para a sobrevivência das células, comprovando que os poros e canais formaram uma rede de alta interconectividade comprovando assim o aspecto de osteointegração e osteocondução da liga porosa.

IN VITRO AND *IN VIVO* EVALUATION OF POROUS Ti-13Nb-13Zr ALLOYS OBTAINED BY POWDER METALLURGY

Tamiye Simone Goia

ABSTRACT

Studies of titanium and its alloys commonly used as biomaterials, aim to improve bone-implant interface related problems which may determine the quality, the bone repairing time and therefore the clinical success of the implant. The goal of this study was to evaluate, in rats, osteointegration of macroporous implants produced by powder metallurgy (PM) method, with controlled addition of gelatin. Were used as control group, samples of commercially pure titanium (cpTi) and samples of the Ti-13Nb-13Zr alloy obtained by the PM process, sintered at 1150ºC / 14 hours (10^{-5} mBar). To obtaining the porous samples, at most 15% in weight of gelatin was added to metallic powders (Ti, Nb and Zr), the samples were thermally treated in vacuum oven (10^{-2} mBar) at 300℃ / 90 min, and sintered. Physical characterization of metallic powders, sintered alloy and porous samples were made. The biological characterization began by *in vitro* cytotoxicity essay according with norm ISO-10993-5 (1993), which allowed uses the implants for *in vivo* testing. The osteointegration evaluation was performed in Wistar rats, males, for 28 days period. The morphological analyses, optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), evaluated qualitatively the osteointegration. Concluding, the unpublished new methodology of PM process modified by addition of gelatin, propitiate with success the obtaining of porous metallic implants. The gelatin as a collagen did not interfered in the final non-cytotoxic implant characteristic. Porous size obtained by this technique allowed the nourishing and necessary maintenance to cell survival, proving that the pores and channels formed a high interconnectable network showing thus the osteointegration and osteoconduction feature of the porous alloy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
2.1 Tecido ósseo 6
2.1.1 Funções do tecido ósseo 6
2.1.2 Classificações do osso 8
2.1.3 Tipos de organização óssea 9
2.1.4 Composição do osso 11
2.1.5 Células ósseas 13
2.1.6 O processo de reparação óssea 15
2.2 Biomateriais 16
2.2.1 Requisitos e aplicações dos biomateriais 17
2.2.2 Efeitos fisiológicos dos biomateriais 19
2.2.3 Avaliação da biocompatibilidade 20
2.2.4 Biomateriais metálicos 21
2.2.5 Estrutura cristalina 21
2.2.6 Titânio e suas ligas 22
2.2.7 Superfície do titânio 25
2.2.8 Tipos de superfícies de implantes 26
2.3 Osteointegração 28
2.3.1 Fixação de implantes 28
2.3.2 Estruturas metálicas porosas 29
2.3.3 Metalurgia do pó 30
2.3.4 Estruturas metálicas porosas para osteointegração 31
3. OBJETIVOS 34
4. MATERIAIS E MÉTODOS 36
4.1 Obtenção dos hidretos 37
4.2 Caracterização do material particulado 38
4.3 Obtenção de porosos 38
4.4 Processamento das amostras 38
4.5 Caracterização das amostras sinterizadas 39
4.6 Ensaio “in vitro” – teste de citotoxicidade 42

4.6.1 Preparação celular 43
4.6.2 Preparação dos extratos 43
4.6.3 Teste de citotoxicidade com células CHO-k1 44
4.7 Ensaio “in vivo” 46
4.7.1 Implantes 46
4.7.2 Animais, anestesia e medicação 46
4.7.3 Procedimento cirúrgico 47
4.7.4 Aplicação dos marcadores ósseos 48
4.7.5 Preparação das amostras 49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 Caracterização dos materiais particulados 54
5.2 Obtenção e caracterização de amostras sinterizadas 57
5.3 Ligas porosas 60
5.4 Caracterização por ensaio in vitro 72
5.5 Caracterização por ensaio in vivo 74
6. CONCLUSÕES 93
7. ANEXOS 94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do osso cortical e do osso trabecular. 9
Figura 2. Microestruturas do osso [1]. 10
Figura 3. Rede cristalina da HA [20]: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. 12
Figura 4. Composição do tecido ósseo [1].....14
Figura 5. Representação esquemática das estruturas cristalinas HC e CCC. 22
Figura 6. Resposta biológica à superfície de um biomaterial. 27
Figura 7. Fluxograma representativo das etapas para obtenção das amostras estudadas. 36
Figura 8. Dimensões da amostra. 39
Figura 9. Mensuração da área porosa pela utilização do programa ImagePro Plus. A – imagem capturada da superfície interna do implante; B – selecionada a porosidade na cor vermelha; C – inversão da imagem; D – seleção da área total mensurada; E – contabilização apenas da área densa. 42
Figura 10. Diluição seriada 1:2 dos extratos. 44
Figura 11. Esquema da microplaca no teste de citotoxicidade: 1º coluna – Branco; 2ª e 3ª coluna – controle de células totais; 4ª à 8ª coluna – diluições seriadas com células.....45
Figura 12. Coloração de microplaca de controle positivo (fenol) após adição de MTS/ PMS e incubação por 2 horas. 45
Figura 13. Ilustração da anatomia muscular do fêmur de ratos da raça Wistar . ..47
Figura 14. (A) – Leito cirúrgico; (B) – Implante posicionado. 48
Figura 15. (A) – Amostra de fêmur e implante osteointegrado; (B) e (C) - Radiografia da amostra após remoção para fixação do tecido. 50
Figura 16. Representação esquemática do corte histológico.....51
Figura 17. Representação esquemática das regiões analisadas por fluorescência, superior (S), inferior (I) e central (C). 52
Figura 18. DRX: das matérias primas após tratamento térmico de hidrogenação. 55
Figura 19. Distribuição Granulométrica do pó da liga - Cilas. 55

Figura 20. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do pó da liga.....56
Figura 21. Gráfico representando a pressão (µBar) do forno de sinterização em função do tempo (min), e o ciclo térmico utilizado. 57
Figura 22. MEV da amostra sinterizada contendo matriz (A), região escura (B) e (C) região clara. 58
Figura 23. A) EDS da matriz da região (A); B) EDS da região escura da amostra (B) e C) EDS da região clara da amostra (C).....59
Figura 25. Representação esquemática da remoção da gelatina e conseqüentemente a formação de poros. 61
Figura 26. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX do Ticp. ..62
Figura 27. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX do Ticp + 15%. 63
Figura 28. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga. ..64
Figura 29. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 5%.....65
Figura 30. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 10%.....66
Figura 31. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 15%.....67
Figura 32. Diagrama de fases do titânio. 68
Figura 33. Gráfico de citotoxicidade dos materiais particulados: Controle Positivo (Cpos) - solução fenol com concentração de 0,3%; Controle Negativo (Cneg) - Ticp; Titânio hidrogenado (TiH_2), Nióbio hidrogenado (NbH), Zircônio hidrogenado (ZrH_2), liga em pó (Ti-13Nb-13Zr) e liga sinterizada (liga sint). 73
Figura 34. Gráfico de citotoxicidade dos materiais sinterizados com diferentes porosidades: Controle Positivo (Cpos) - solução fenol com concentração de 0,5%; Controle Negativo (Cneg) - Ticp; Ticp + 15%, Liga, Liga +5%, Liga +10%, Liga +15%. 74
Figura 35. Formação de rede de fibrina e coágulo após a cirurgia. Situação representativa da amostra Liga + 10% (MEV). 75
Figura 36. Amostra Ticp: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 75

Figura 37. Amostra Ticp + 15%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 76
Figura 38. Amostra Liga: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 76
Figura 39. Amostra Liga + 5%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 76
Figura 40. Amostra Liga + 10%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 77
Figura 41. Amostra Liga + 15%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo. 77
Figura 42. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Ticp: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante. 79
Figura 43. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante. 80
Figura 44. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga + 5 %: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante. 81
Figura 45. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga + 15 %: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante. 82
Figura 46. A e B - Micrografia da lâmina histológica HE da amostra Liga + 15 %; C – Micrografia da lâmina histológica sem coloração com a presença de osteócitos dentro dos canais do implante. 83
Figura 47. Imagens de Fluorescência do Ticp. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 86
Figura 48. Imagens de Fluorescência do Ticp + 15%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 87

Figura 49. Imagens de Fluorescência da Liga. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 88
Figura 50. Imagens de Fluorescência da Liga + 5%. A – parte superior, B – parte central, C – parte inferior do implante e D – observação do tecido marcado no interior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 89
Figura 51. Imagens de Fluorescência da Liga + 10%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 90
Figura 52. Imagens de Fluorescência da Liga + 15%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das estruturas cristalinas do titânio [10].....22
Tabela 2. Propriedade do Ti e suas ligas [10]. 24
Tabela 3. Grupos estudados. 39
Tabela 4. Amostras avaliadas nos ensaios de citotoxicidade. 43
Tabela 5. Tempo de aplicação dos marcadores ósseos e dosagem. 49
Tabela 6. Composição do pó da liga, antes da sinterização, por EDXRF. 56
Tabela 8. Resultados de densidade e porosidades em valores porcentuais 69
Tabela 9. Mensuração da porcentagem de porosidade pela imagem do MEV. ...70
Tabela 10. Distribuição de tamanho de poros em µm. 70
Tabela 11. Picnometria de Hélio. 71

INTRODUÇÃO

A busca por saúde e qualidade de vida são fatores que impulsionam o desenvolvimento dos biomateriais. Os implantes metálicos são amplamente utilizados na Medicina ortopédica como também na Odontologia com o principal motivo de restabelecer função. Os possíveis insucessos destas próteses podem estar relacionados com diversas causas tais como o tipo de material escolhido, a forma de confecção, o design e a superfície do material, incluindo o procedimento cirúrgico para sua colocação e hospedeiro. Todos estes fatos mobilizam uma pesquisa multidiciplinar com o propósito de aumentar a taxa de sucesso dos implantes, visando o bem-estar do paciente.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é o principal responsável por fornecer ao organismo estabilidade e sustentação, sendo, desta maneira, o órgão receptor de todos os sistemas de implantes ortopédicos e dentais, e um dos responsáveis pelo sucesso de procedimentos de dispositivos implantados e protéticos. Além de ser um tecido de sustentação altamente especializado, é capaz de modificar a sua própria arquitetura para atender a fatores físicos e hormonais. O processo de remodelação óssea exige uma interação entre as células presentes no tecido, como osteoblastos e osteoclastos [1]. No processo de reparo, o periósteo e o endósteo são responsáveis pela nutrição e manutenção do fornecimento de osteoblastos, permitindo a regeneração e cicatrização do tecido ósseo [2, 3].

A pesquisa na área de biomateriais busca atender as necessidades de dispositivos que irão substituir ou reparar tecidos (órgãos) perdidos e/ou lesionados. No caso de um implante endósseo, o material deve apresentar como características: biocompatibilidade, habilidade de suportar e transferir cargas, cinética de superfície controlada, indutividade e condutividade na cicatrização, homeostase de tecidos peri-implantares, devendo ser passível de esterilização e ter longevidade "*in situ*" [4, 5, 6]. Hoje, polímeros, metais e cerâmicas são utilizados na Implantodontia oferecendo variedade de propriedades mecânicas, físicas e químicas, atendendo aos requisitos desejáveis para uma reabilitação duradoura [7]. Em geral, a análise da biocompatibilidade de um material é realizada por meio de dois tipos de ensaio: "*in vitro*" e "*in vivo*" [8]. Ambos apresentam limitações, sendo que os experimentos "*in vivo*" se mostram mais próximos da aplicação clínica em humanos, mesmo com as diferenças metabólicas significativas entre as espécies [9, 10].

Clinicamente, o sucesso de um implante metálico depende de vários fatores. A topografia da superfície do implante é um desses fatores e está relacionado ao processo de reparação óssea ao redor do implante. Embora implantes de superfície usinada tenham sido utilizados por muitos anos, estudos demonstram que a modificação do padrão topográfico tende a aumentar, não só o contato direto entre o osso e o implante, mas também a resistência de união da interface [11, 12, 13]. Dentre as modificações topográficas existentes, o implante poroso permite a ocorrência do fenômeno de invasão tecidual no interior dos

poros "*Bone Ingrowth*" [14]. Os implantes porosos devem apresentar porosidade interconectada, com espaços que permitam a manutenção vascular necessária para a mineralização contínua do tecido ósseo. Desta maneira, tanto os poros, como os canais de interconexão, devem apresentar tamanho suficiente que permita a infiltração das células responsáveis pela formação da matriz tecidual no interior do material [15, 16, 17, 18].

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de verificar questões relacionadas ao tamanho ideal de poros, grau de porosidade e a influência destes no aumento da resistência de união da interface osso-implante poroso. Alguns autores concordam que são necessários poros de aproximadamente 100µm, outros afirmam que poros com aproximadamente 30µm não impedem a ocorrência do crescimento ósseo [19]. A produção de estruturas porosas tem sido proposta por vários métodos, tais como: aditivos orgânicos, liofilização, replicação de esponjas poliméricas, entre outros [20].

Uma das técnicas de processamento de materiais metálicos que permite a obtenção de uma estrutura porosa é a metalurgia do pó (MP). Com esta técnica é possível utilizar material particulado de hidretos metálicos, processá-los com a composição desejada e realizar a sinterização, em temperatura e tempo de patamar adequado. A sinterização promove a união das partículas formando agregados de alta resistência mecânica. É vantagem desta técnica a produção de peças com formato e dimensões próximos aos finais "*Near-net shape*", evitando a etapa de usinagem [21]. A manipulação de materiais na forma de particulada permite a adição de componentes para alcançar uma satisfatória homogeneidade e porosidade controlada. É o caso de materiais cerâmicos que são acrescido de gelatina para obter tais características estruturais [22, 23].

O titânio e suas ligas são os principais metais utilizados para implantes devido as características de alta resistência mecânica, alta resistência à corrosão, baixo peso e propriedades não magnéticas. O titânio comercialmente puro (Ticp) é amplamente utilizado, porém suas características de módulo de elasticidade (~100GPa) em relação ao tecido ósseo (10~30GPa) deixam a desejar [24, 25, 26]. Sua rigidez promove a concentração de tensões no tecido ósseo adjacente aumentando o efeito de reabsorção, e conseqüentemente diminui o tempo de vida do implante. As ligas titânio-alumínio-vanádio (Ti-Al-V) são vastamente utilizadas em implantes ortopédicos, mas o acúmulo dos elementos alumínio e vanádio no

organismo podem causar desordens neurológicas e irritação do sistema respiratório, respectivamente [27].

Por estas razões, outras ligas de titânio vêm sendo pesquisadas para atender os quesitos de baixo módulo de elasticidade, elevada resistência à corrosão e nenhum potencial tóxico. Neste contexto, a liga de titânio-nióbio-zircônio (Ti-13Nb-13Zr) apresenta valores de módulo elástico de ~80 GPa, resistência mecânica da ordem de 1.300 MPa, resistência à corrosão superior às ligas Ti-Al-V e todos seus elementos biocompatíveis. Estas características despertaram o interessa pela liga no meio biomédico e permitiram a comercialização como material de implantes ortopédicos no início da década de 90 [28, 29, 30, 31, 32, 33, 34].

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conhecimento de diversas áreas correlatas ao estudo de biomateriais faz-se necessário, a fim de relacionar e explicar as possíveis interferências de um material sintético no sistema biológico. Neste capítulo, salienta-se a importância do conhecimento e elucidação da interação dos implantes metálicos com o tecido ósseo (responsável pelo suporte de tais implantes), abordando aspectos orgânicos, funcionais e fisiológicos. Outros fatores que serão destacados para dar maior embasamento teórico a este trabalho, referem-se à forma de obtenção de ligas porosas, variações de processamento, bem como características que influenciam na melhoria da osteointegração, tal qual a porosidade do implante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido de sustentação altamente especializado, capaz de modificar a sua própria arquitetura para atender a fatores físicos e hormonais. A manutenção deste tecido, como no processo de remodelação óssea, exige uma interação e o trabalho conjunto entre as células ósseas como: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos [1]. A nutrição e fornecimento de células osteoprogenitoras são responsabilidades do periósteo e endósteo, que em um processo de reparo, permitem a formação do tecido ósseo imaturo. Por proporcionar as características de osteointegração, o osso é o órgão receptor de todos os sistemas de implantes ortopédicos e dentais, mantendo a estabilidade e sustentação do organismo. O conhecimento da sua estrutura e propriedades são extremamente importantes quando se pretende desenvolver um biomaterial [35, 36].

2.1.1 Funções do tecido ósseo

O esqueleto, do ponto de vista biomecânico, é um sistema constituído por ossos individuais e por tecidos que permitem a ligação entre eles. O osso é um tecido altamente complexo sendo caracterizado pelo seu alto conteúdo de minerais, que combinados com a matriz orgânica oferecem ao organismo as principais funções de proteção e sustentação. Outra função importante do esqueleto é o funcionamento como alavanca e apoio para os músculos, aumentando a coordenação e a força do movimento proporcionado pela contração do tecido muscular [1, 37].

Para atender a função de suportar cargas, o osso apresenta características biomecânicas de rigidez e dureza. A matriz inorgânica ou mineralizada é responsável por estas qualidades por conter principalmente íons fosfato e cálcio, formando cristais de hidroxiapatita (HA). Esta estrutura inorgânica permite ao esqueleto dar sustentação ao sistema musculoesquelético mantendo a forma do

corpo; dar proteção aos órgãos internos vitais e medula óssea; e transmitir forças de contração muscular durante o movimento. Mecanicamente, os ossos são muito resistentes às forças de compressão, mas são frágeis às forças de tensão e deformação [1, 38].

A matriz orgânica, compostas de fibras colágenas, complementa as características de flexibilidade e elasticidade ao osso. Trata-se de um tecido conjuntivo especializado, formado por osteócitos, matriz extracelular de fibra orgânica (90% colágeno) e uma substância fundamental. Essa substância é produzida pelos osteócitos servindo de cimentação para o colágeno mineralizado; na qual é formada por glicosaminoglicanos [GAG] que são polissacarídeos protéicos em forma de proteoglicanos. A água representa 25% do total da constituição óssea, dos quais 85% encontram-se na matriz orgânica das células e hidratação em torno dos cristais [37].

Do ponto de vista metabólico, o osso é um reservatório de cálcio que trabalha para manter a hematopoiese (formação de células sangüíneas) e homeostase do corpo. O cálcio presente no organismo está majoritariamente no osso representando 98% do total, sendo os 2% restante encontrados na circulação sangüínea. O osso possui a característica de ser auto-reparador, no qual 40% do osso trabecular e 10% do osso cortical são reciclados anualmente. Esta habilidade capacita o osso a se adaptar a sua massa, forma e propriedades às mudanças mecânicas e metabólicas [20]. O osso funciona também como uma linha de defesa, absorvendo toxinas e metais pesados minimizando seus efeitos adversos nos outros tecidos do corpo [46].

Portanto, o esqueleto além de proteger os órgãos internos, facilita a ação muscular e o movimento corporal devido as propriedades mecânicas e estruturais. O esqueleto está entre as mais rígidas estruturas do corpo, é um dos tecidos mais dinâmicos e metabolicamente ativos, ricamente vascularizado e com enorme capacidade de auto-reparação por meio da "remodelação óssea". Ele pode alterar as suas propriedades e configurações em resposta às "exigências mecânicas", as quais podem afetar sua morfologia conforme o aumento do uso ou desuso, de acordo com a intensidade e freqüência exigida (exemplo: astronautas e atletas) [39].

2.1.2 Classificações do osso

A variação de tamanho e forma dificulta a classificação dos ossos do corpo humano. No geral eles podem ser divididos entre os grupos do esqueleto axial e esqueleto apendicular. O esqueleto axial é composto por 80 ossos, englobando crânio, coluna vertebral e costelas. O esqueleto é composto por 126 ossos que configuram os membros superiores e inferiores [37].

Pela variação considerável de tamanho e forma, quatro categorias gerais classificam os ossos quanto ao formato[40]:

- Ossos longos (ou tubulares) são formados por uma diáfise constituindo o corpo do osso (porção mais central), duas epífises (nas extremidades) e a metáfise ou disco epifisário (que representa a área de crescimento ativo). Compõem a estrutura do esqueleto apendicular.
- Ossos curtos (ou cubóides) são representados somente pelos ossos do carpo e do tarso, por terem um formato próximo a de um cubo. Possuem função de absorver impactos.
- Ossos planos (ou chatos) são achatados, como é o caso das escápulas, costelas e alguns ossos do crânio. Possuem a função de proteger os órgãos internos e os tecidos moles, além de proporcionarem inserções de músculos e ligamentos.
- Ossos irregulares possuem formas diferentes e funções específicas, como é o caso das vértebras.

Além da forma, os ossos podem ser classificados em relação à porosidade, como osso cortical e osso trabecular. O osso cortical também conhecido como compacto, lamelar ou denso, apresenta uma alta densidade com apenas 10% de porosidade, onde se encontram os osteócitos, canalículos e vasos sanguíneos. O osso trabecular (esponjoso), tem densidade bem baixa com porosidade variando entre 50 a 90%, propiciando valores de módulo de elasticidade e tensão máxima de compressão 10 vezes menores que o osso cortical (Figura 1) [41,37] .

A distribuição da quantidade de osso cortical e trabecular em um tecido ósseo variam conforme a função de cada um deles no sistema. Por exemplo, em um osso longo a diáfise é constituída principalmente por osso cortical, enquanto

que a epífise e a metáfise são compostas majoritariamente por osso esponjoso com uma fina camada exterior de osso cortical [1]. Em uma pessoa adulta aproximadamente 80% da massa do esqueleto é representada pelo osso cortical, responsável pelo suporte e proteção do esqueleto. Os restantes 20% de massa óssea dizem respeito ao osso esponjoso [42].

Figura 1. Morfologia do osso cortical e do osso trabecular.

É importante ressaltar que os ossos corticais e trabeculares são anisotrópicos, oferecendo diferentes graus de resistência e rigidez em resposta às forças aplicadas em diferentes direções [20].

2.1.3 Tipos de organização óssea

Os ossos corticais e trabeculares são constituídos dos mesmos tipos celulares e moléculas da matriz extracelular, secretados pelos osteoblastos. O que os distinguem é a organização estrutural para atender os requisitos fisiológicos [46].

O tecido ósseo esponjoso apresenta espaços medulares mais amplos, sendo formado por várias trabéculas, que dão aspecto poroso ao tecido

semelhante a um favo de mel. O tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canalículos, proveniente das lacunas preenchidas por osteócitos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sangüíneos: canais interosteônicos e canais das osteonas. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. Pela diferença entre os esforços que o osso está sujeito, a substituição metabólica é oito vezes maior no osso esponjoso que no compacto [1, 46].

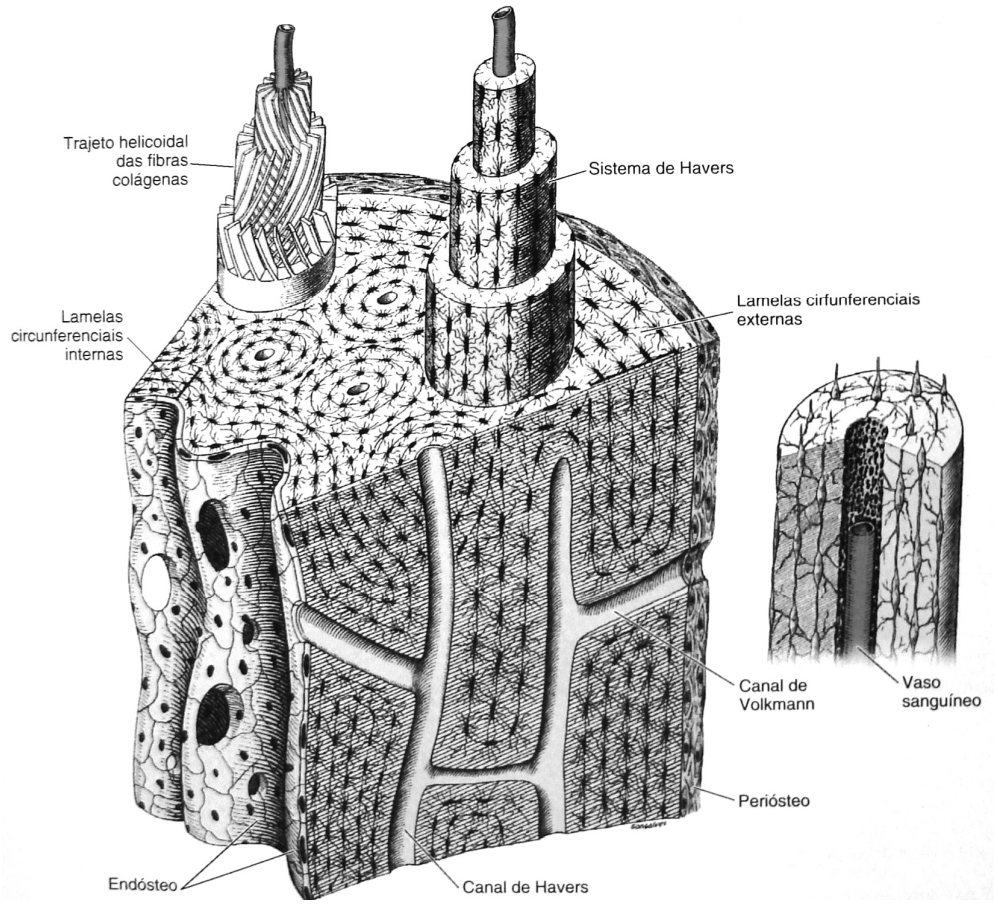


Figura 2. Microestruturas do osso [1].

Os canais de Volkmann partem da superfície do osso (interna ou externa), possuindo uma trajetória perpendicular em relação ao eixo maior do osso. Esses canais comunicam-se com os canais de Havers, que percorrem o osso longitudinalmente e que podem comunicar-se por projeções laterais. Ao redor de

cada canal de Havers, são observadas várias lamelas concêntricas de substância intercelular e de células ósseas, matriz mineralizada. Cada conjunto deste, formado pelo canal central e por lamelas concêntricas é denominado sistema de Havers, sistema haversiano ou osteona (Figura 2) [1, 46].

A atividade de remodelação óssea varia conforme a idade e o status reprodutivo. Quando criança, a formação de osso novo no periósteo é superior a destruição óssea do endósteo promovendo o aumento real no diâmetro externo do osso. No adolescente, existe o crescimento ósseo tanto no periósteo quanto no endósteo, promovendo um aumento na massa óssea total. No adulto jovem, a perda óssea endosteal começa a superar a deposição óssea indicando um decréscimo na massa óssea, resultando no estreitamento do osso cortical e expansão da cavidade medular. Esse efeito está relacionado com a idade e pode ser intensificado com doenças, como a osteoporose [46].

2.1.4 Composição do osso

A matriz óssea consiste em 65% de cristais de HA correspondendo a parte inorgânica, e 35% de material orgânico. Grande parte do material orgânico corresponde ao colágeno tipo I, ao lado de outras macromoléculas, como proteoglicanos, proteínas envolvidas na mineralização (osteocalcinas), proteínas ligantes de cálcio (osteonectina, sialoproteína), proteínas de adesão celular (osteopontina, fibronectina, etc.), citocinas, fatores de crescimento e enzimas, além da água. A matriz óssea que precede a mineralização é chamada osteóide, que consiste num conjunto de fibras colágenas embebidas em substância fundamental (um gel e complexos de glicoproteínas/proteína). A substância fundamental também contém numerosos fatores orgânicos (citocinas, fatores de crescimento) que ajudam a controlar a ativação celular, maturação da matriz e mineralização. Durante a mineralização, pequenos cristais de HA são densamente acondicionados em uma série ordenada, de acordo com a orientação das fibras colágenas. Dependendo das condições ambientais, o osso se forma como uma estrutura nitidamente ordenado, tanto em nível molecular quanto macroscópico [43].

A matriz inorgânica contém grandes quantidades de cátions e ânions principalmente o Ca^{2+}, PO_4^{3-}, CO_3^{2-}; e outros íons em pequenas quantidades, como Mg^{2+}, Fe^{2+}, F^- e Cl^-. Devido ao aporte celular, também estão presentes pequenas quantidades de Na^+ e K^+, ácido ascórbico, ácido cítrico e polissacarídeos. Estes elementos desempenham funções importantes, por exemplo, os íons Mg^{2+}, estão relacionados com o processo inicial da calcificação, o metabolismo e a fisiologia do corpo humano; os íons Fe^{2+} são indispensáveis à vida e contribuem para a prevenção da cárie dentária, assim como os íons F^- [44]. Os íons Na^+ e Cl^- existem no sangue e nos fluidos fisiológicos e estão associados com a homeostasia; os íons CO_3^{2-} existem inevitavelmente nos tecidos calcificados regulando o pH dos fluidos fisiológicos na forma de tampão de bicarbonato e estão relacionados com a resistência à cárie dental [20, 42].

Os íons cálcio e fosfato têm o papel principal na formação de sais, primeiramente fosfato tricálcio e HA – ambos presentes na fração mineral amorfa – enquanto que a fração mineral cristalizada é praticamente constituída por HA [20, 45].

A estrutura cristalina da HA é formada por átomos dos elementos químicos cálcio, fósforo, oxigênio, e hidrogênio; distribuídos em um arranjo cristalino hexagonal como mostra a Figura 3 [20].

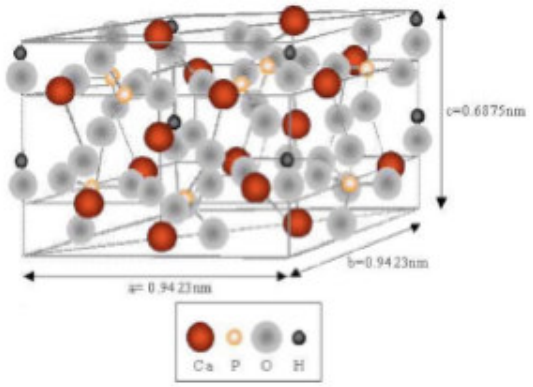


Figura 3. Rede cristalina da HA [20]: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Devido à similaridade química da HA sintética com a fase mineral dos tecidos ósseos, e à sua biocompatibilidade, ela é largamente utilizada. No geral, a HA é bioativa, por interagir com o organismo induzindo a proliferação celular. Pode ser classificada como osteocondutora, por favorecer o crescimento ósseo em locais que ela se encontra; e em alguns casos como osteoindutora, permitindo o crescimento de tecido ósseo em outros tecidos [20].

A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que as moléculas de água e, também, proteínas e colágeno, sejam adsorvidos na superfície, induzindo, assim, a regeneração tecidual [42].

2.1.5 Células ósseas

A nutrição das células é um fator muito importante para a sobrevivência, manutenção e remodelação constante do tecido. Os ossos apresentam na superfície externa e internamente, um tecido conjuntivo de revestimento denominado periósteo e endósteo respectivamente. Estas membranas são vascularizadas e fornecem ao tecido ósseo as células osteoprogenitoras, importantes para o crescimento dos ossos e reparo de fraturas. Além disto, nas regiões articulares encontram-se as cartilagens fibrosas. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. No interior dos ossos, a medula óssea vermelha é constituída por células e fibras reticulares, e é responsável por formar células do sangue e plaquetas (tecido reticular ou hematopoético). A medula amarela que aparece com o passar dos anos, não tem a mesma função de produção de células sanguíneas por ser constituída majoritariamente por tecido adiposo [46].

O mesênquima perivascular origina, entre outras células, a célula osteoprogenitora, que se diferenciará em pré-osteoblasto e, posteriormente em osteoblasto. Os osteoblastos se localizam na superfície dos ossos, sintetizando, organizando e transportando os diversos componentes da matriz óssea. Inicialmente essa matriz não é mineralizada, chamada osteóide, que sofrerá o processo de mineralização mediado pelo próprio osteoblasto, garantindo a dureza e rigidez características do osso. Quando o osteoblasto está totalmente envolto por esta matriz mineralizada, este passa a ser chamado de osteócito. Algumas

células derivadas de monócitos sanguíneos se diferenciam em osteoclastos e são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea [46] (Figura 4).

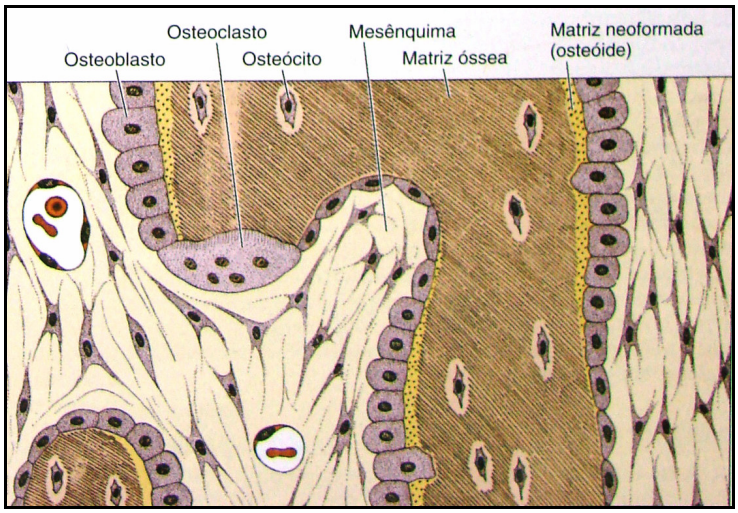


Figura 4. Composição do tecido ósseo [1].

Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea e não apresentam capacidade proliferativa, mas têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea. Destas lacunas, junções estabelecidas entre os prolongamentos de células adjacentes, tornam a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. Uma das principais funções do osteócito é usar a fase de mineralização da matriz como reservatório de cálcio e participar nos processos de formação, absorção, reparação de microfraturas [1].

Os osteoblastos são as células formadoras de tecido ósseo e, portanto, responsáveis pela estruturação do esqueleto [46.] Sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta principalmente por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos são cubóides ou piramidais, apresentando um núcleo grande, e destacam-se por apresentar muita basofilia (afinidade por corantes básicos). Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos [1].

Os osteoclastos desempenham importante função durante os processos de formação, manutenção e remodelação do tecido ósseo. São células móveis, gigantes e multinucleadas (de 4 a 50 núcleos), extensamente ramificadas, formadas a partir da fusão de células progenitoras mononucleares da linhagem dos monócitos/macrófagos. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma finalmente se torna acidófilo (com afinidade por corantes ácidos). São encontrados normalmente nas superfícies ósseas e através da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de Howship [1]. Devido seu tamanho e a atividade metabólica, um único osteoclasto pode reabsorver a matriz óssea depositada por 100 osteoblastos, justificando seu número reduzido, mesmo em áreas com intensa atividade de reabsorção [46].

2.1.6 O processo de reparação óssea

O osteóide (osso primário ou embrionário) normalmente é encontrado no esqueleto dos fetos, nas placas de crescimento e nos focos de consolidação de fraturas. Esse tecido ósseo primário é sintetizado rapidamente e resiste a forças oriundas de todas as direções. Durante o crescimento, o osteóide é substituído de modo gradual pelo osso lamelar (osso secundário ou adulto), que é depositado mais lentamente, sendo mais resistente do que o osteóide. No tecido ósseo adulto, as lamelas se organizam em quatro diferentes orientações. Três delas estão presentes apenas na região cortical do osso, são: as lamelas circunferênciais (internas e externas), concêntricas e intersticiais. O quarto tipo de lamela é chamado lamela longitudinal, e está presente no osso medular [46].

No processo de formação de matriz óssea, o fluído tecidual apesar de estar supersaturado de íons cálcio e fosfato, não sofre processo de calcificação. A presença de macromoléculas impede que os minerais adquiram sua estrutura cristalina. Na matriz óssea, entretanto, o osteoblasto secreta fatores que facilitam a deposição de grandes quantidades de minerais. Além disso, para que a matriz seja mineralizada, é preciso que ocorra o aumento de ligações cruzadas entre as fibras colágenas e a remoção enzimática dos proteoglicanos, com a conseqüente

liberação de cálcio. Os íons cálcio liberados irão se ligar às fosfoproteínas específicas do tecido ósseo, que simultaneamente se ligam às moléculas de colágeno. O componente inorgânico da matriz óssea acumula-se não apenas entre as fibrilas de colágeno, mas, na verdade, 70 a 80% do mineral ósseo são localizados dentro da própria fibrila [46].

2.2 Biomateriais

A substituição anatômica de partes do corpo, perdida ou danificada, tem relatos históricos desde a antiguidade egípcia, cujas próteses de madeira foram descobertas em múmias. A descrição mais antiga de uma prótese foi feita em 484 a.C, no relato de Heródoto que conta sobre a amputação do pé de um soldado persa aprisionado pelo inimigo, e mais tarde a substituição por um membro de madeira. Próteses de ferro foram construídas para os soldados durante a Idade Média com os mesmos artifícios que faziam as armaduras. No séc. XIX as próteses de madeira voltaram a ser utilizadas por serem muito mais leves que as de metal, e algumas já com movimento articulado [20].

As guerras tiveram grande influência no desenvolvimento desta área pelas inúmeras incidências de membros amputados. O governo americano depois da Guerra Civil Americana incentivou a pesquisa na área protética, ao mesmo tempo que a descoberta de anestésicos (como o clorofórmio e o éter) permitiram a realização de cirurgias mais demoradas, pela possibilidade de preparar melhor os membros amputados para a colocação das próteses [20].

No limiar do séc. XX foram realizados com sucesso implantes sintéticos na assistência a vítimas de fraturas. Depois da Segunda Guerra Mundial, houve um grande avanço nos estudos da biomecânica do movimento humano, melhorando o desenho dos membros artificiais. Nos anos 60 e 70 desenvolveu-se a primeira geração de materiais para utilização no interior do corpo humano. Procuravam-se materiais inertes, que minimizassem a resposta negativa do corpo humano a esses objetos estranhos. Em meados dos anos 80 surgiu a segunda geração de materiais, como os biovidros, cerâmicos e compósitos. Estes biomateriais foram

utilizados em várias próteses ortopédicas e dentais. A recuperação das funções fisiológicas dos órgãos internos é uma conquista recente na área médica [20].

2.2.1 Requisitos e aplicações dos biomateriais

O recente crescimento da população idosa no mundo aumenta a demanda de biomateriais para confecção de prótese, em particular os de uso na substituição de tecidos duros danificados como: próteses de quadril e implantes dentais [20]. Os implantes biomédicos são usados para resolver defeitos que não podem ser corrigidos pelo processo de cicatrização natural. O sucesso de um implante requer materiais com características específicas, de acordo com a aplicação para o qual é concebido [47]. A utilização de materiais artificiais em aplicações clínicas tem crescido muito nos últimos anos, tornando-se cada vez mais complexa e diversificada [20].

As propriedades e os requisitos são de fundamental importância para a escolha mais adequada de um biomaterial. A caracterização química, física, mecânica e biológica do material proporcionam o desenvolvimento e a viabilidade do uso. Biomaterial é definido como o material que é concebido para estar em contato com sistemas biológicos com o objetivo de diagnosticar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Dentre os materiais usados encontram-se: metais (aço inoxidável, platina, ligas Co-Cr-Mo ou titânio e suas ligas), cerâmicas (alumina, zircônia, HA, fosfato tricálcico, biovidros e vitrocerâmicas), polímeros sintéticos (poliuretanos e poliésteres) ou naturais (proteínas) e compósitos (resultado da combinação de alguns dos materiais anteriores) [20, 48].

Por estarem em contato com fluidos biológicos e tecidos vivos, os biomateriais devem apresentar certos requisitos fundamentais, como, biocompatibilidade e biofuncionalidade. A biocompatibilidade representa as características de um biomaterial em não provocar reações alérgicas ou inflamatórias exacerbadas, tóxicas ou carcinogênicas; quando implantados ou em contato com o tecido vivo. Um material biocompatível necessita desempenhar sua função em um período desejável, caracterizando biofuncionalidade [49, 50]. Outros requisitos relevantes estão relacionados às propriedades mecânicas adequadas, mecanismos de processamento, material passível de esterilização e custo

acessível. Assim, a seleção de um biomaterial deve ter início com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão [49].

Além das propriedades anteriormente descritas, uma característica importante de um biomaterial, após implantação, é o tipo de resposta biológica produzida pelo tecido hospedeiro na interface do material. Seguindo uma classificação que se refere apenas a reações teciduais in vivo, existem três mecanismos que permitem classificar os biomateriais de acordo com o comportamento fisiológico [51]: biotoleráveis, bioinertes e bioativos.

Os materiais biotoleráveis são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes devido à formação de uma cápsula de tecido fibroso. Os materiais bioinertes provocam uma resposta biológica sutil sendo tolerados pelo organismo, podem favorecer a formação de uma cápsula fibrosa mínima ou praticamente inexistente [51].

Os materiais bioativos permitem ligações de natureza química entre o material e o tecido, tendo como conseqüência o crescimento do tecido sobre o material. O mecanismo de ligação, a sua força e espessura da zona de ligação variam de acordo com cada material, podendo-se classificar a bioatividade de acordo com a velocidade de desenvolvimento da ligação interfacial. Em implantes ósseos uma interface mineralizada assegura a ligação entre o tecido vivo e o material de implante, devido a indução da superfície do material à formação de uma camada de apatita carbonatada biologicamente ativa, criando um ambiente compatível com a osteogênese (crescimento ósseo). A bioatividade dos materiais pode ainda ser dividida em osteoindutiva e osteocondutiva. A superfície de um material osteoindutivo é colonizada por células osteogênicas. Enquanto um material osteocondutivo apenas fornece uma superfície ao longo da qual o osso migra [51].

Os materiais reabsorvíveis após certo período sofrem degradação pelo organismo sendo substituídos por tecido adjacente. Os produtos de degradação devem ser metabolicamente aceitáveis e a velocidade de degradação deve ser semelhante à de reparação, pois o material necessita manter a resistência e estabilidade durante o período de substituição por tecido. Tem-se especial interesse nestes tipos de materiais para aplicações clínicas, uma vez que evita uma nova intervenção cirúrgica [20].

2.2.2 Efeitos fisiológicos dos biomateriais

A resposta inflamatória frente a um biomaterial é o primeiro passo para o sucesso da integração do mesmo com o organismo. A inflamação pode ser conceituada como um conjunto complexo de fenômenos celulares e vasculares específicos a qualquer estímulo, com objetivo de recuperar a homeostase do organismo como um todo [52]. Tudo que possa agredir o organismo pode ser considerado como eventual agente etiológico da inflamação. Dentre as causas endógenas são citadas as reações derivadas de degenerações ou necroses teciduais e as derivadas de alterações na resposta imunológica. As causas exógenas incluem desde a ação lesiva de alguns agentes físicos, de agentes químicos inorgânicos e orgânicos, assim como de agentes biológicos infecciosos [10].

A cirurgia de implantação de próteses representa um estímulo traumático, induzindo uma resposta inflamatória. Dependendo da natureza e características do biomaterial que compõe a prótese, assim como a topografia e forma, são observadas diferentes intensidades e duração da resposta inflamatória [10]. O tecido de granulação e células gigantes do tipo ”corpo estranho” poderão compor a reação quando o organismo reconhecer o implante como um corpo estranho. Por outro lado, se o implante for de material mais inerte e interagir adequadamente com os tecidos conjuntivos de sustentação da interface, a resposta inflamatória poderá ser mínima, com a rápida reabsorção por apoptose das células inflamatórias, geralmente só gerando uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso de espessura viável [10].

Os biomateriais apresentam reações biológicas variadas e complexas com o hospedeiro. Induzem respostas que podem formar uma interface com vários tipos de tecidos e células para o desenvolvimento e manutenção da estabilidade biomecânica. Pode proporcionar a ocorrência de uma seqüência de eventos que envolvem a adesão, migração e diferenciação celular; desencadeando fenômenos físico-químicos na superfície ao redor do implante [10].

A interação células/biomateriais pode determinar a liberação de mediadores solúveis como proteínas, citocinas e a ativação de macrófagos e linfócitos. No tecido ósseo, esses mediadores atuam no processo de remodelação

do osso, destacando-se a interleucina 1 (IL-1), que estimula o desenvolvimento de osteoclastos e promoção da proliferação e manutenção das células ósseas; a linfotoxina e o fator de necrose tumoral (TNF) possuem funções semelhantes e sinérgicas com a IL-1[10].

2.2.3 Avaliação da biocompatibilidade

A biocompatibilidade é uma propriedade fundamental dos biomateriais, pois é o que definirá se o material desenvolvido poderá ser utilizado em sistemas biológicos (vivos) ou não. Sendo assim, fica evidente a necessidade de estudos *in vitro* e *in vivo* que caracterizem o comportamento desses materiais antes da utilização dos mesmos em seres humanos. A escolha correta de modelos animais são imprescindíveis para coletar informações sobre as reações biológicas frente a um implante. Devido a complexibilidade dos animais mamíferos e seus eventos celulares a interpretação de resultados em nível celular, se tornam dificultadas. Desta forma, testes *in vitro* superam essas limitações e constituem um sistema válido de análise de resposta celular quanto à morfologia, dano, secreção e proliferação[10].

Em cultura celular freqüentemente se utilizam diferentes células de tecidos variados, cada qual para avaliar a compatibilidade e resposta biológica quando em contato com diferentes biomateriais. Estes estudos antes de avaliar qualquer função celular elaborada, avaliam primeiramente a citotoxicidade nas células. As células diferenciadas são avaliadas quanto à morfologia, adesão e viabilidade, tanto por ensaios de contato direto como indireto, ou pela adição de extratos (diluição do biomaterial) em meio de cultura. O estudo *in vitro* com células diferenciadas é importante uma vez que estas são representativas de tecidos que circundam. Os danos são observados e classificados conforme normas de organizações internacionais, como *American Society for Testing Materials* (ASTM), *International Standards Organization* (ISO) e *United States Pharmacopeia* (USP) [10].

2.2.4 Biomateriais metálicos

Os materiais metálicos são principalmente usados na confecção de implantes devido a suas propriedades mecânicas, destacam-se boa resistência mecânica e elevada tenacidade, facilidade de fabricação e baixo custo. Elementos metálicos como Fe Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo, são utilizados na confecção de implantes por serem tolerados pelo corpo, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas. Entretanto, em quantidades elevadas, aumentam-se as chances de ocorrer corrosão metálica em ambiente fisiológico altamente agressivo. O potencial de corrosão e os produtos de corrosão são os principais fatores que limitam o tipo de metal que pode ser empregado como biomaterial. A corrosão pode ainda levar à deterioração das propriedades mecânicas do material, comprometendo o desempenho da função [10].

Os biomateriais metálicos, como, os aços inoxidáveis, principalmente os austeníticos do tipo 316L (ASTM F138), ligas Co-Cr-Mo (ASTM F75, F799), Co-Ni-Cr-Mo (ASRM F562), titânio puro e Ti-6Al-4V (ASTM F67 e F136), são os mais usados em Ortopedia, principalmente na confecção de próteses articuladas, ainda como elementos estruturais na fixação de fraturas nas osteossínteses e implantes dentais [10]. O titânio e as suas ligas são os que têm recebido maior atenção devido à sua vasta gama de aplicação, principalmente na Odontologia [53, 54].

2.2.5 Estrutura cristalina

Nos materiais metálicos, os átomos se ligam em arranjos geométricos distintos que se repetem através do material formando uma estrutura organizada, chamada de estrutura cristalina. O tipo de estrutura cristalina de cada material depende dos átomos presentes, do tipo de ligação atômica, do tamanho dos átomos (ou íons) e da carga elétrica dos íons [10].

As estruturas cristalinas mais comuns, presentes em dois terços dos metais, são a cúbica de face centrada (CFC), a cúbica de corpo centrado (CCC) e a hexagonal compacta (HC). O fator de empacotamento é definido como a razão entre o volume ocupado pelos átomos em uma célula e o volume da célula. As estruturas CFC e HC apresentam o valor máximo para arranjos organizados de

74%, e para a estrutura CCC o fator de empacotamento é de 68%. Os sistemas CFC e HC, por serem mais densos apresentam maiores números de coordenação e números de átomos por célula unitária [10].

O titânio, por apresentar mais de uma estrutura cristalina é considerado polimórfico ou alotrópico. A forma cristalina mais estável depende da temperatura e pressão, em temperatura ambiente o titânio se apresenta como HC e acima de 885° C, a estrutura cristalina do titânio passa a ser CCC [10].

Tabela 1. Características das estruturas cristalinas do titânio [10].

Estruturas	HC (Ti-β)	CCC (Ti-α)
Temperatura	25°C	+ 885°C
Parâmetro de rede x Raio atômico	2r	4r/3
Átomos por células	4	2
Número de coordenação	12	8
Fator de empacotamento	0,74	0,68

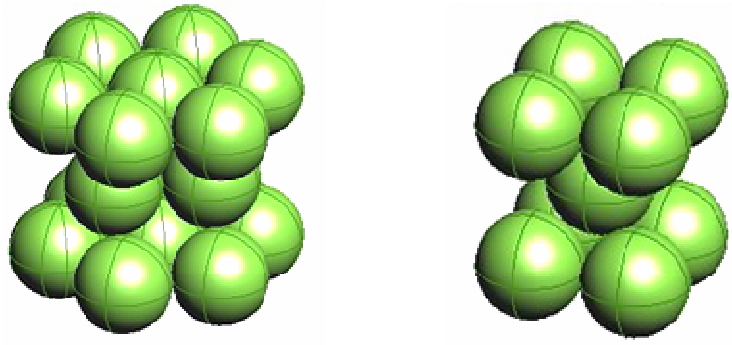


Figura 5. Representação esquemática das estruturas cristalinas HC e CCC.

2.2.6 Titânio e suas ligas

O titânio e suas ligas são particularmente adequados para o trabalho em ambiente corrosivo ou para aplicações em que seja fundamental o seu baixo peso. Possui alta relação resistência-peso e propriedades não-magnéticas [10]. O titânio puro é um metal branco, brilhante e de boa ductilidade; possui massa

específica de 4,45 g/cm^3, ponto de fusão de 1668°C e sua ebulição ocorre a 3.260° C. Apesar de ser o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, o custo de obtenção é relativamente elevado devido à complexibilidade do processo de redução e purificação que envolve sua produção [55, 77].

A maioria dos materiais não são de alta pureza, possuem diversos elementos ou compostos formando ligas. A adição de elementos é intencional para se obter as características desejadas, ou por serem mais fáceis de produzir e não terem suas propriedades alteradas. Comumente, a adição de elementos de liga é feita para se melhorar a resistência mecânica ou a resistência à corrosão. Em uma liga, o elemento presente em maior quantidade é denominado solvente, e os elementos em menores concentrações denominados soluto. A adição do soluto em um material pode resultar na formação de uma solução sólida ou na formação de uma nova fase, dependendo do tipo de átomo, da concentração e da temperatura [10].

Os elementos de liga são adicionados ao titânio puro, alterando a temperatura de transformação de fase e a proporcionalidade entre elas. Os elementos denominados α - estabilizadores (Al, C, O e N) promovem o aumento da temperatura de transformação de fase $\alpha \rightarrow \beta$, e a adição de metais β - estabilizadores (Mo, V, Ta, Nb, Zr, Cr, Mn, Fe, Si, Co, Ni e Cu) tendem a diminuir a temperatura de transformação [77].

A quantidade e o tipo de elementos β – estabilizadores podem modificar as curvas de transformação em equilíbrio, alterando distribuição e morfologia das fases, alterando o comportamento mecânico da liga e sua resposta a tratamentos térmicos. A presença de β – estabilizadores possibilita a liga apresentar uma faixa de temperatura na qual coexistam as duas fases, α e β. Portanto existem três tipos estruturais de ligas de titânio [10, 77]:

- Ligas α: sua resistência mecânica varia de baixa a média, tem boa tenacidade ao entalhe, boa ductilidade e possui excelentes propriedades mecânicas em temperaturas criogênicas. As ligas alfa e próximas de alfa oferecem ótima resistência à fluência em altas temperaturas, assim como resistência à oxidação.

- Ligas α + β: com níveis de resistência variando entre médio e alto, são adequadas para conformação à quente, mas sua resistência à fluência em altas temperaturas não é tão boa quanto à das ligas α.
- Ligas β, ou próximas de β: respondem bem a tratamento térmico e possuem alta resistência à fluência a médias temperaturas.

A liga Ti-6Al-4V e o titânio puro são os mais utilizados para confecção de implantes, e apesar de muito empregados como biomateriais, estudos têm mostrado certa toxicidade neurológica associada ao alumínio (mal de Alzheimer), e vanádio presentes na liga Ti-6Al-4V. Há formação de óxidos de vanádio na superfície da liga, que segundo algumas pesquisas, podem irritar o sistema respiratório, chegando até mesmo a comprometer o funcionamento dos pulmões [10, 34, 56].

Atualmente tem-se estudado a substituição, na liga Ti-Al-V, de vanádio por nióbio, resultando na liga Ti-6Al-7Nb, esta liga foi aprovada em 1987 pela FDA (Food and Drugs Admisnistration) para utilização em implantes cirúrgicos, e normatizada pela ASTM em 1992 (ASTM F1295). Outra tendência é o desenvolvimento de ligas sem os elementos citotóxicos, como a liga Ti-13Nb-13Zr, estudada neste trabalho. Além da vantagem de ser completamente biocompatível, a liga Ti-13Nb-13Zr apresenta baixo módulo de elasticidade aliados a elevados valores de resistência mecânica e corrosão [57, 74]. Na Tabela 2 são apresentadas ligas de titânio utilizadas como biomaterial e suas propriedades mecânicas [10].

Tabela 2. Propriedade do Ti e suas ligas [10].

Denominação	Limite de resitência a tração (MPa)	Limite de escoamento (MPa)	Alongamento (%)	Módulo de elasticidade (GPa)
Ti puro grau 1	240	170	24	102,7
Ti puro grau 2	345	275	24	102,7
Ti puro grau 3	450	380	20	103,4

Ti puro grau 4	550	485	18	104,1
Ti-6Al-4V	860-965	795-875	15	101-110
Ti-6Al-4V	895-930	825-869	10-15	110-144
Ti-6Al-7Nb	900-1050	880-950	6-10	114
Ti-5Al-2,5Fe	102	895	8-15	112
Ti-5Al-3Mo-4Zr	925-1080	820-930	15	110
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0,2Pb	860-1109	790	15-17	89-103
Ti-5Zr-4Nb-2Ta-0,2Pb	715-919	1020	10-21	94-99
Ti-13Nb-13Zr	973-1037	693-806	18-28	79-84
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	1060-1100	836-908	10-16	74-85
Ti-15Mo	874	1000-1060	18-22	78
Ti-16Nb-10Hf	851	544-736	10	81
Ti-15Mo-5Zr-3Al	852-1100	838-1060	22-25	80
Ti-15Mo-2,8Nb-0,2Si	979-999	945-987	16-18	83
Ti-35,3Nb-5,1Ta-7,1Zr	596	547	19	55
Ti-29Nb-4,6Zr	911	864	13,2	80

2.2.7 Superfície do titânio

O desgaste do titânio e suas ligas pode ser solucionado por modificações das características da superfície [58]. De acordo com as necessidades que se aplicam, são propostas várias técnicas de revestimento com o intuito de melhorar a resistência ao desgaste do titânio e suas ligas, como: evaporação, “sputtering” reativo, deposição reativa auxiliada por feixe de íons, deposição à laser pulsátil, processo sol-gel, deposição química de vapor e oxidação térmica [58]. Entre estas,

a oxidação térmica se mostra promissora na produção de superfícies duras em titânio e suas ligas [59].

Acredita-se que as propriedades da superfície são responsáveis pelo desempenho favorável dos implantes de titânio, em particular a presença de uma película quimicamente estável, que protege o material da corrosão. Os tratamentos de superfície e os revestimentos são desenvolvidos com o objetivo de promover uma rugosidade micrométrica, de modo a garantir a melhor possibilidade de osteointegração, ancoragem e estabilidade [60].

A resistência ao desgaste, a resistência à corrosão e a biocompatibilidade do titânio e suas ligas podem ser melhoradas por oxidação térmica da sua superfície [58]. A elevada afinidade entre o oxigênio e o titânio promove, à temperatura ambiente, a formação de uma camada superficial de óxido, que é fina, muito estável, contínua e aderente [59]. O óxido de titânio é conhecido por ter várias estequiometrias e os compostos comuns são Ti_3O, Ti_2O, Ti_3O_2, TiO, Ti_2O_3, Ti_3O_5 e TiO_2 [58].

Entre estes óxidos, o rutilo (TiO_2), tem recebido especial atenção por suas propriedades físicas, químicas, mecânicas e biomédicas, que o tornam adequado para uma grande gama de aplicações [58]. O rutilo é também conhecido pelas suas propriedades ópticas e elétricas, como, elevado índice de refração, excelente transmitância óptica, elevada constante dielétrica e excelente desempenho fotocatalítico [61]. Mais recentemente, descobriu-se que o rutilo além de boa resistência ao desgaste, tem boa biocompatibilidade e boas propriedades lubrificantes, fato que diminui o coeficiente de atrito entre as partes em contato. Com tal potencialidade, ele tem sido explorado para melhorar as propriedades tribológicas do titânio e suas ligas por oxidação térmica controlada [62].

2.2.8 Tipos de superfícies de implantes

Um fator importante a ser considerado na maioria das aplicações dos biomateriais é a forma como o material influencia, e é influenciado, pela resposta resultante do seu contato com o sistema biológico. Há uma escassez de conhecimento que impossibilita a compreensão das interações material-

biossistema, principalmente as que ocorrem em nível molecular. Vários cenários são propostos para as reações que podem ocorrer quando a superfície de um material é colocada em contato com o sistema biológico. Acredita-se que tudo começa com a adsorção de moléculas de água, íons (hidratados), e biomoléculas, formando um "filme condicionante" na superfície do biomaterial. É com este revestimento biomolecular hidratado que as células dos tecidos nativos interagem. Com efeito, a estrutura e a composição da camada de proteínas adsorvidas determinam o tipo e a extensão das reações biológicas subseqüentes: a ativação da coagulação, a resposta imune e a osteointegração (Figura 6) [63]. Assim, as propriedades da superfície de um material implantável constituem uma condição importante para a dinâmica da interface [20].

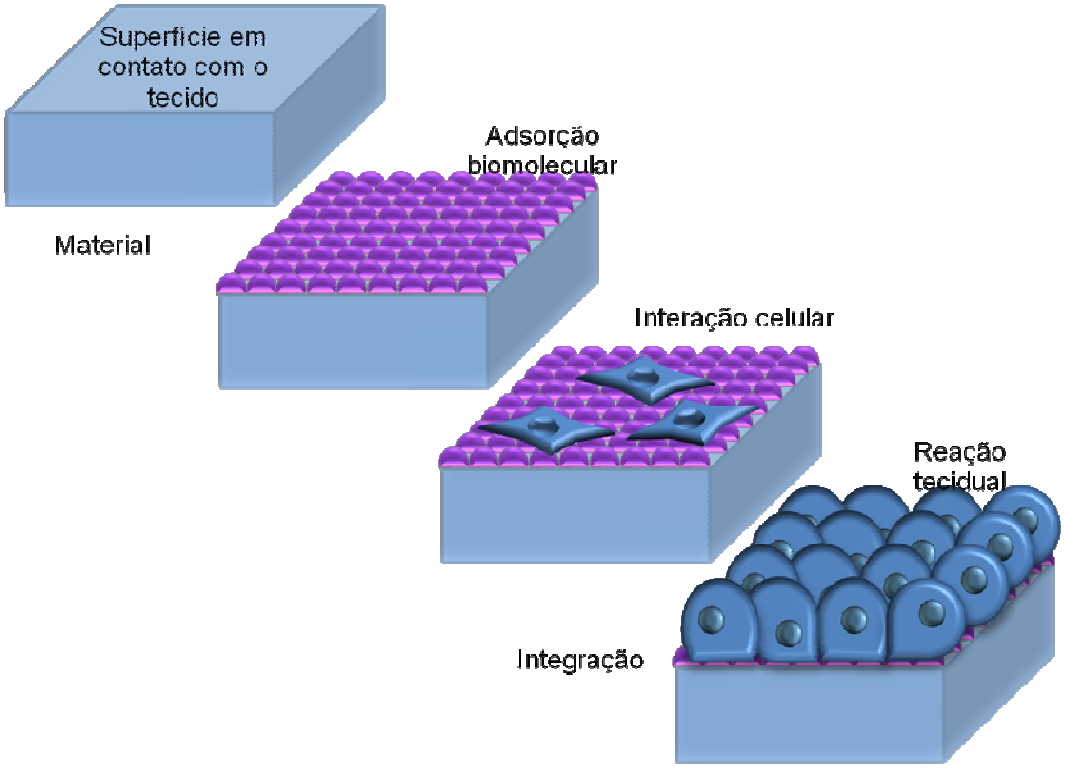


Figura 6. Resposta biológica à superfície de um biomaterial.

Com base em argumentos e conhecimentos gerais das interações molécula-superfície, as propriedades de superfície relevantes devem incluir, quer

propriedades químicas, quer propriedades estruturais desde o nível macroscópico até o nível atômico. Este tipo de raciocínio acentua a importância das propriedades da superfície na resposta biológica dos biomateriais. Devido a tal concepção passou-se a atribuir uma particular atenção à preparação e caracterização da superfície dos biomateriais [63]. Métodos para revestir materiais metálicos com cerâmicas bioativas, como, fosfato de cálcio (CaP), TCP (β-$Ca_3(PO_4)_2$), CCP (β-$Ca_2P_2O_7$) e HA, têm sido propostos [43].

2.3 Osteointegração

A comprovação clínica da eficiência do princípio básico da osteointegração levou à consideração do tratamento do edentulismo unitário, parcial e total em todas as áreas da boca, e nesse sentido, houve a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas científicas, com o intuito de melhorar metodologias de aumento ósseo, diversidade dos implantes, dos componentes protéticos, estabelecimento de novos conceitos biomecânicos, e estudo das enfermidades periimplantares. O resultado final permite tratar, com individualidade, situações clínicas anteriormente renegadas [64].

Clinicamente o conceito de osteointegração é a estabilidade assintomática de um material aloplástico, conseguida e mantida no organismo sob carga funcional por longos períodos de tempo. Histologicamente este modo de ancoragem é traduzido, à microscopia de luz, como uma conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo organizado e a superfície que carrega a carga do implante sem a intervenção de tecido mole [64, 65, 66].

2.3.1 Fixação de implantes

Os implantes dentais diferem significantemente dos dentes naturais por sua interface com o osso alveolar e com as fibras do tecido conjuntivo. Uma vez que os implantes não apresentam uma superfície como o cemento para a inserção de fibras do ligamento periodontal e do tecido conjuntivo gengival, o sucesso dos implantes depende do contato direto com o osso alveolar. O tecido conjuntivo e a aderência epitelial são as principais barreiras contra invasão

bacteriana. Clinicamente o sucesso do implante depende da saúde da mucosa, do suporte ósseo, da ausência de infecção e sem desconforto/mobilidade durante a função [66].

A cicatrização da interface osso/implante em um implante estável passa pelos mesmos passos que a cicatrização de uma fratura óssea direta, seguindo uma seqüência ordenada de eventos. Após a estabilização primária, quando a interface osso/implante apresentar espaço menor que 0,5mm, a cicatrização inicial começa com a formação do coágulo entre o osso e o implante, com subseqüente substituição do coágulo por vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras. As células osteoprogenitoras se proliferam e diferenciam-se em osteoblastos, promovendo a deposição de osso na superfície do implante [66].

Na instalação de implantes dentais, a porcentagem de osso cortical em contato com os implantes aumenta durante o primeiro ano, devido à remodelação do osso associada à adaptação funcional. Quando ativada, a osteointegração segue um programa comum biologicamente determinado de cicatrização, que é subdividido em três estágios: incorporação de osso reticular, adaptação de massa óssea à carga (deposição óssea de fibras lamelar e paralela) e adaptação da estrutura óssea à carga (remodelação óssea) [66].

A taxa de sucesso de um implante depende da diferença na qualidade do osso entre os arcos (maxila e mandíbula) e da localização no interior de cada arcada. A taxa de sucesso acima de cinco anos é um pouco mais alta na mandíbula (94%) do que na maxila (90%), assim como as regiões anteriores são mais favoráveis que as regiões posteriores [66].

2.3.2 Estruturas metálicas porosas

As aplicações do titânio, suas ligas e esponjas metálicas são bastante variadas, uma vez que são de grande interesse na área biomédica por apresentarem propriedades metálicas como força, tenacidade e deformabilidade; com as vantagens estruturais, como leveza, dureza e elevada área superficial, nos materiais porosos.

Existem alguns métodos de obtenção de materiais metálicos porosos que produzem uma estrutura celular fechada, como no caso do processo Gasar. Este processo consiste no resfriamento do metal líquido sob atmosfera de hidrogênio, produzindo no interior do metal gás, como uma fase separada. A mistura de um hidreto metálico e metal fundido é um exemplo de adição de agentes formadores de bolhas. Com a decomposição do hidreto até o ponto de fusão do metal, originando a formação e liberação de gás. A agitação mecânica consiste em um processo simples de formação de bolhas, que durante o resfriamento originam uma estrutura porosa [76].

A infiltração de grânulos de material orgânico ou inorgânico podem ser retirados por queima ou lixiviação da estrutura metálica, deixando os espaços vazios ocupados pelos grânulos. Um fator importante deste processo é a formação de estrutura celular aberta. Outro processo que permite esta característica de porosidade aberta é pelo recobrimento por eletrodeposição de um substrato de esponja polimérica com metal em pó mais ligante. O polímero é removido por pirólise e a sinterização consolida a estrutura esponjosa. Esta técnica propiciou a produção de esponjas metálicas reticuladas com 88% de porosidade para liga Ti-6Al-4V [67].

A formação de poros pode ser observada na técnica da metalurgia do pó (MP) pelas variações de temperatura e tempo de patamar durante o processo de sinterização. Dependendo da temperatura empregada, são formados poros abertos ou fechados [21].

2.3.3 Metalurgia do pó

Esta técnica produz artefatos metálicos ou cerâmicos pela consolidação do pó por pressão e calor. Entre outras etapas na produção do pó, estão envolvidas as fases de obtenção e moagem. A conformação do particulado sob pressão facilita a obtenção de peças próximas ao formato final desejado "*near-net shape*". A sinterização finaliza o processo de consolidação pela aplicação de calor sob temperaturas abaixo do ponto de fusão, do elemento de maior concentração. As características finais do pó são fatores de aspecto relevante para a escolha do método de obtenção. Esses métodos variam entre físicos e/ou químicos como:

redução de óxidos, processo hidrometalúrgico, decomposição térmica de carbonilas, hidrogenação metálica e atomização [74, 76].

Apesar da etapa de compactação ser muito importante na técnica da metalurgia do pó, a sinterização determina a microestrutura e propriedades do material. No processo de sinterização, a força motriz consiste na redução da área e energia superficial das partículas pela formação do contorno de grão, crescimento de pescoços entre as partículas e densificação. Como conseqüência da redução de energia livre do sistema, tem-se a diminuição de poros na peça e aumento da densificação [76].

2.3.4 Estruturas metálicas porosas para osteointegração

O titânio e suas ligas são os biomateriais metálicos mais utilizados para aplicações em Ortopedia e Odontologia devido às suas excelentes propriedades mecânicas e interação biológica [68]. Contudo, existem problemas técnicos associados ao uso do titânio como material de implante. A elevada rigidez quando comparada com a do osso circundante, pode originar problemas de blindagem de tensões e subseqüente luxação do implante [69]. Assim, a diferença de módulo de elasticidade entre o osso (10 - 30 GPa) e os biomateriais metálicos maciços (entre 100 GPa, para o Ticp e 230 GPa, para as ligas Co-Cr) tem sido identificado como a maior razão para a perda do implante [18].

Para fazer frente a estes problemas têm-se desenvolvido materiais com uma superfície porosa tridimensional osteocondutiva para a regeneração óssea [69, 70]. A vantagem da utilização de materiais com a estrutura anteriormente descrita é a capacidade de permitir uma ancoragem biológica para os tecidos circundantes através do crescimento ósseo no interior dos seus poros [70]. Além disso, o valor do módulo elástico pode ser ajustado de modo a equiparar-se ao do osso trabecular, prevenindo assim a reabsorção óssea na interface do implante [69].

A obtenção de materiais porosos é investigada ativamente desde 1943, quando B. Sosnik [18] tentou obter espuma metálica acrescentando mercúrio ao alumínio fundido. Em aplicações biomédicas o conceito do uso de materiais porosos foi investigado mais tarde, o trabalho de Weber e White de 1972 [18] foi um dos primeiros a mencionar o uso de metais porosos para osteointegração.

Numerosas investigações em materiais porosos iniciaram-se na década de 1970 envolvendo materiais porosos cerâmicos, poliméricos e metálicos, que mostraram, em estudos em animais, ser potenciais candidatos a implantes porosos permitindo o crescimento ósseo. Embora os materiais cerâmicos possuam excelente resistência à corrosão, as estruturas cerâmicas porosas não podem ser usadas em condições sujeitas a cargas, devido à sua fragilidade intrínseca. Os sistemas poliméricos porosos enfrentam as mesmas dificuldades em relação aos esforços mecânicos, isto levou os pesquisadores a se concentrem em metais porosos, principalmente o titânio, devido sua superior resistência à fratura e fadiga, propriedades requeridas para aplicações sob carga [18, 69, 70].

A matriz porosa tem que ser desenhada satisfazendo determinados requisitos, de modo a mimetizar a arquitetura do osso natural. A estrutura porosa deve possuir elevada porosidade aberta e interligada, de modo a permitir espaço suficiente para a migração celular, ancoragem e proliferação de novo tecido ósseo, vascularização e transporte dos fluidos corporais [68]. Uma vez que a vascularização não ocorre em poros de diâmetro inferior a 100 μm, o tamanho de poro adequado à reorganização óssea e vascularização é reportado como ótimo no intervalo de 100-500 μm [20, 70].

OBJETIVOS

Os objetivos compreendem as metas propostas para este trabalho e serão descritos a seguir.

3. OBJETIVOS

A primeira parte do trabalho tem como objetivo avaliar a adição de gelatina durante o processamento de MP para formação de poros e canais interconectados na liga Ti-13Nb-13Zr.

Em seguida, a caracterização biológica dos implantes porosos será avaliada pelos testes *in vitro* e *in vivo*, as características de citotoxicidade e osteointegração dos implantes, respectivamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste estudo especifica as técnicas e materiais para obtenção do Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr, com variações de porosidade. A caracterização biológica dos materiais estudados é descrita detalhadamente nos testes *in vitro* e *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A liga Ti-13Nb-13Zr avaliada nesta pesquisa foi comparada ao Ticp que possui propriedades e características conhecidas, principalmente a biocompatibilidade. Portanto, o Ticp foi utilizado como grupo controle na maioria dos experimentos. O fluxograma a seguir representa resumidamente as etapas de obtenção das amostras (Figura 7).

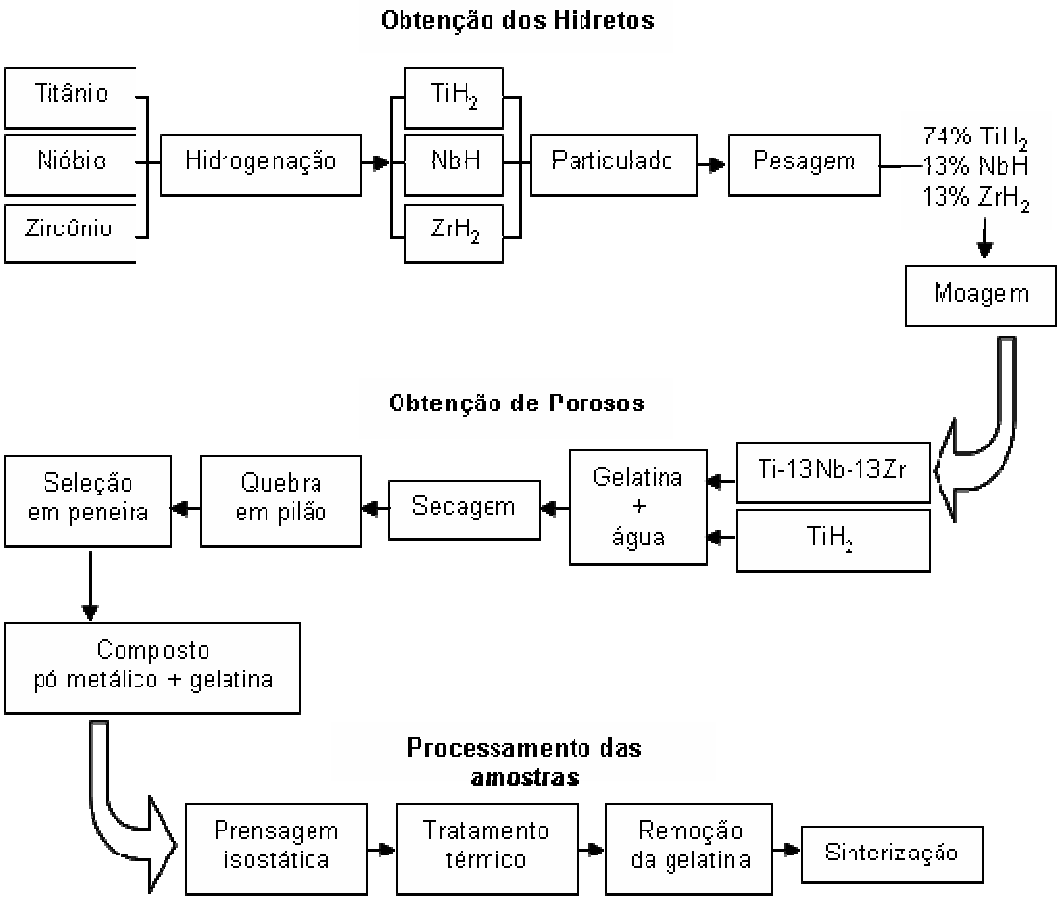


Figura 7. Fluxograma representativo das etapas para obtenção das amostras estudadas.

4.1 Obtenção dos hidretos

O titânio comercialmente puro (Ticp) foi cedido pela empresa Brats Indústria e Comércio Ltda ME, já na forma particulada (200 mesh ou 75 µm) e hidrogenada, pronto para o processamento. Para a obtenção dos pós de nióbio (Nb) e zircônio (Zr), os materiais em sua forma inicial (nióbio em cavaco e zircônio em esponja) foram submetidos separadamente ao processo de hidrogenação.

Após um banho ultra-sônico, para remover impurezas, os metais foram secos em estufa e colocados em cadinho de aço inox, e em seguida em uma retorta. O conjunto foi posicionado no forno, e feito vácuo até atingir a pressão de 10^{-2} mbar, em temperatura ambiente injeta-se gás hidrogênio (H_2) até a pressão de 800mbar, restabelecendo-se o vácuo em seguida. A temperatura do sistema é elevada até 300ºC, mantendo-se nesse patamar durante 5 minutos e sendo resfriado até a temperatura ambiente.

Com o sistema livre de outros gases, injeta-se hidrogênio novamente em quantidades controladas. A temperatura é então elevada até 600° C para o nióbio e 500° C para o zircônio. Atingida a temperatura do patamar, as condições do processo foram mantidas por uma hora e o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, encerrando o processo de hidrogenação dos materiais.

Os metais hidrogenados (NbH e ZrH_2), apresentando características de fragilidade, foram quebrados manualmente em pilão revestido com aço inox e selecionados em peneira de malha 20 (850 µm) e malha 40 (400 µm).

Os materiais passaram por processo de decapagem, para remoção dos óxidos e impurezas presentes, em solução de 100 ml de água destilada e 10 ml de ácido nítrico. Sucessivas lavagens com água destilada foram feitas até que o pH da água estivesse neutro. Após a secagem dos pós em estufa, estes foram pesados em balança analítica na estequiometria da liga e colocados em moinho com bolas de tungstênio para a etapa da moagem. O meio líquido utilizado no processo foi ciclohexano (C_6H_{12}). A moagem foi realizada em moinho de bolas convencional, por 30 horas. Após a moagem, o ciclohexano foi removido em vácuo (2.10^{-1} mbar), devido sua alta volatilidade.

4.2 Caracterização do material particulado

A caracterização do pó da liga foi feita por: espectrometria de fluorescência de Raios-X (FRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), distribuição granulométrica e difração de Raios X (DRX).

4.3 Obtenção de porosos

Foram adicionados 15 % em peso de gelatina em pó (CAAL®) ao titânio comercialmente puro particulado, antes do processo de sinterização. Ao pó da liga Ti-13Nb-13Zr foram adicionados 5, 10 e 15 % com a intenção de obter diferentes graus de porosidade. A gelatina foi dissolvida em água fervente e o metal adicionado à solução, até apresentarem alta viscosidade. A pasta formada foi acondicionada em papel-manteiga em estufa a 30°C, por 24 horas. Após a secagem, o papel foi removido e o material foi quebrado em pilão revestido de aço inox e selecionado em peneira de malha 20.

4.4 Processamento das amostras

Os pós em suas diferentes composições foram submetidos à prensagem isostática a frio em molde de silicone cilíndrico, com pressão de 140 MPa. Antes da sinterização, as amostras foram tratadas termicamente em forno a vácuo (10^{-2} mBar) à 300°C por 90 minutos; para que ocorresse a decomposição da gelatina e remoção do carbono proveniente da mesma. As amostras, em cadinho de alumina (Al_2O_3) e tubo de quartzo foram sinterizadas a 1150°C, por 14 horas, e 10^{-5} mBar. A caracterização foi feita por MEV e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Foram analisados 6 grupos, apresentados na Tabela 3:

Tabela 3. Grupos estudados.

Amostra	Composição	Gelatina
Ticp	Ti cp	Sem adição
Ticp + 15%	Ti cp	15%
Liga	Ti-13Nb-13Zr	Sem adição
Liga + 5%	Ti-13Nb-13Zr	5%
Liga + 10%	Ti-13Nb-13Zr	10%
Liga + 15%	Ti-13Nb-13Zr	15%

Após a sinterização, as amostras em formato cilíndrico apresentavam dimensões aproximadas de 5mm de comprimento por 2 mm de diâmetro, como mostra a Figura 8:

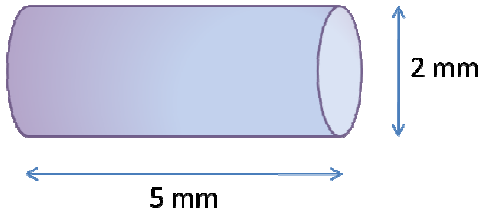


Figura 8. Dimensões da amostra.

4.5 Caracterização das amostras sinterizadas

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização microestrutural foi feita utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e difração de Raios-X (DRX). Para a análise por MEV as amostras foram seccionadas transversalmente em máquina de corte de precisão (Isomet). A análise do interior das amostras teve por objetivo avaliar a homogeneidade microestrutural, a formação das fases α e β da liga Ti-13Nb-13Zr e a porosidade.

A preparação das amostras seguiu o procedimento padrão utilizada em metalografia, que consiste em: embutimento, lixamento e polimento da amostra. As amostras foram embutidas em baquelite e após a remoção dos excessos das

peças com lixas, segue a fase de polimento da superfície metálica com lixas de acabamento de carbeto de silício (400, 600, 800, 1000, 2500). O polimento final é realizado em sílica coloidal por 90 minutos, finalizando o processo com uma superfície lisa e brilhante.

A análise do material é realizada em MEV, sendo as micrografias obtidas utilizando-se elétrons secundários e retroespalhados, e a técnica de EDS - MEV proporciona uma análise semi-quantitativa dos elementos que compõem a amostra nas regiões observadas.

- Difração de Raios-X (DRX)

Complementando a identificação das fases α e β da liga Ti-13Nb-13Zr, foram feitas análises de DRX com radiação Cukα (λ=0,1542nm). Como a liga não apresenta registros na ficha JCPDS, foram comparadas as fases α e β do titânio comercialmente puro (Ticp).

- Determinação da densidade e porosidade

Os valores médios de densidades geométrica e hidrostática das amostras são representados em porcentagem em relação à densidade teórica do Ticp (4,51 g/cm^3) e da liga Ti-13Nb-13Zr (5,01 g/cm^3), e obtidas pelas seguintes equações:

Densidade geométrica

$$dg = \frac{ms}{volume}$$

Densidade hidrostática

$$dh = d_{Líquido} \times \frac{ms}{(mu - mi)}$$

Onde: mu = massa úmida; ms = massa seca; mi = massa imersa.

Foram calculados os valores de porosidade aparente das amostras porosas seguindo as normas de ASTM C20-00, pela equação [71]:

Porosidade Aparente: $P_{AP} = (mu - ms)/(mu - mi) \times 100$

O meio líquido utilizado para o cálculo de densidade hidrostática foi o querosene, que na temperatura de 25°C possui uma densidade de 0,76 g/cm^3.

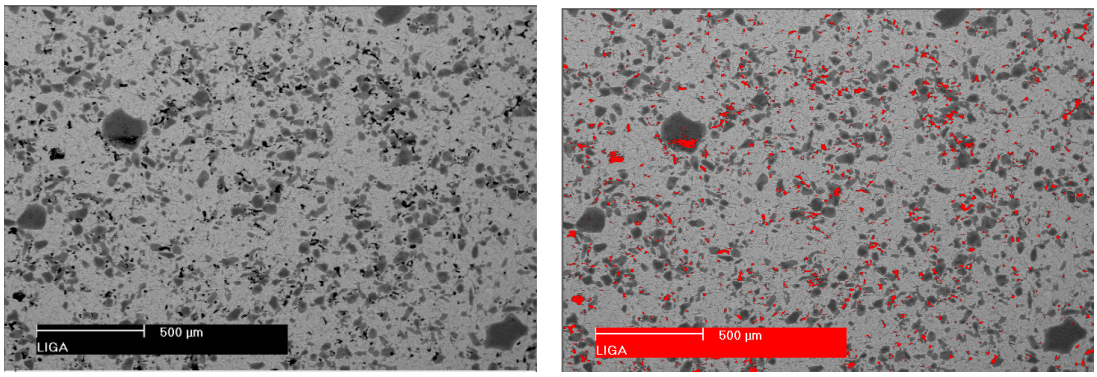
- Porosidade

A mensuração da área porosa foi realizada baseada nas imagens das micrografias, e foi calculada em relação à área desejada em porcentagem. Foram selecionadas imagens de 50x (500µm) e 250x (100µm) de uma amostra por grupo para comparação. O programa utilizado foi o ImagePro Plus 4.1, e o mesmo procedimento foi seguido para todas as medidas.

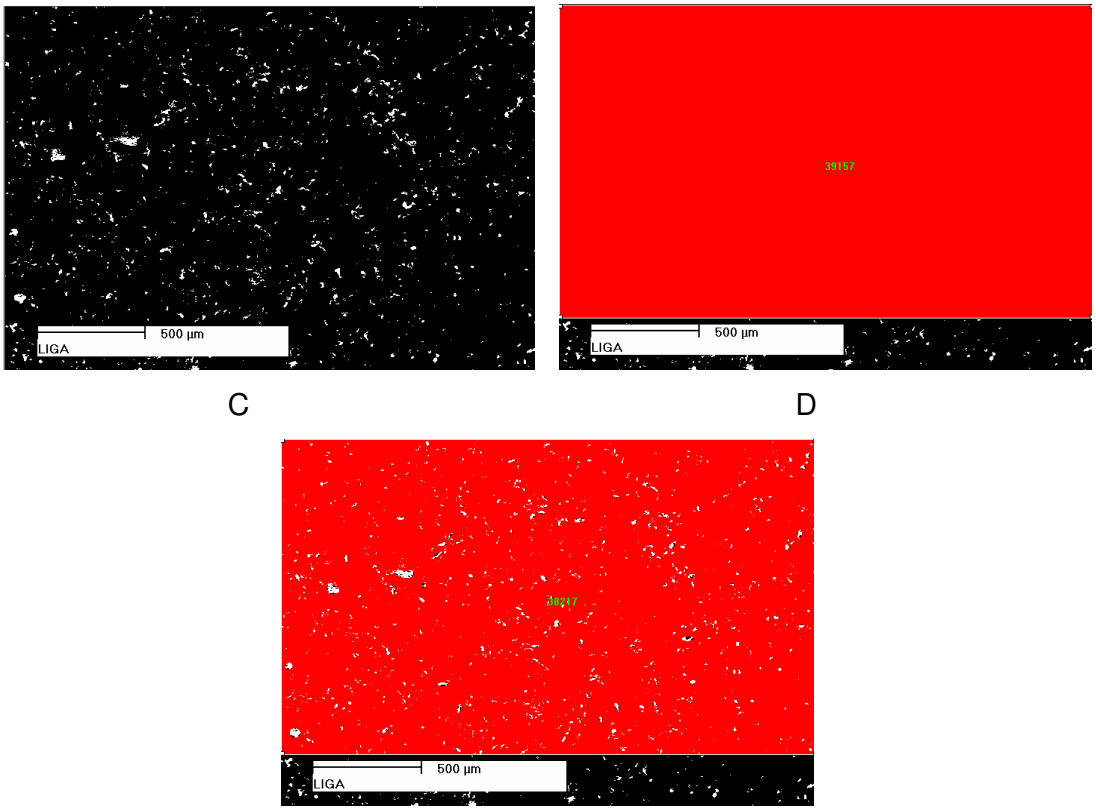
Primeiramente foi selecionada a imagem (Figura 9A) e os poros foram demarcados em cor vermelha para melhor visualização (Figura 9B). Em seguida, a imagem foi invertida para homogeneizar as diferentes tonalidades de cinza, transformando objetos vermelhos em brancos (porosidade), e toda a escala de cinza em preto (área densa), proporcionando delimitação, com clareza, da porosidade (Figura 9C). Antes da fase de mensuração, foi necessário estabelecer uma área, excluindo a barra de escala para não interferir no resultado final (Figura 9D). Para a mensuração da área porosa foi contabilizada toda a área escura (preta) subtraindo-se o valor da área total selecionada. O cálculo para a porcentagem de porosidade foi obtida por meio da equação:

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{(At - Ad) \times 100}{At}$$

Onde: At = área total; Ad = área densa



A B



C D E

Figura 9. Mensuração da área porosa pela utilização do programa ImagePro Plus. A – imagem capturada da superfície interna do implante; B – selecionada a porosidade na cor vermelha; C – inversão da imagem; D – seleção da área total mensurada; E – contabilização apenas da área densa.

4.6 Ensaio “in vitro” – teste de citotoxicidade

Dois grupos de ensaios foram realizados para avaliar a citotoxicidade dos materiais seguindo as normas da ISO-10993-5 (1993), sendo que o primeiro avaliou os pós hidrogenados, e o segundo, as amostras sinterizadas.

A esterilização das amostras foi feita com uma dose de 25kGy de radiação gamma (Co60, Gammacell modelo 220 do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares), para a preparação de extratos para o teste.

Tabela 4. Amostras avaliadas nos ensaios de citotoxicidade.

Ensaio	1º (particulados)	2º (sinterizados)
Controle positivo	sol. Fenol 0,3%	sol. Fenol 0,5%
Controle negativo	Ticp	Ticp
Amostras avaliadas	TiH_2	Ticp + 15%
	NbH	Liga
	ZrH_2	Liga + 5%
	Ti-13Nb-13Zr	Liga + 10%
	Liga sinterizada	Liga + 15%

4.6.1 Preparação celular

Para o processo de preparação celular, as células CHO-k1 (linhagem de células de ovário de hamster chinês) foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina100 unidades/mL, estreptomicina100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO_2 até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura, de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4. Após a tripsinização, a suspensão foi centrifugada (1500 RPM/5min) e ressuspensa em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino para contagem das células (câmara de Neubauer) e preparação de uma concentração de 60.000 células/ml.

4.6.2 Preparação dos extratos

Na preparação dos extratos das amostras em forma de pó (particulados) seguiu-se a proporção de 0,2g/mL de meio de cultura, e das amostras densas (sinterizadas), 2 cm^2/mL de meio de cultura. As amostras foram mantidas em incubadora a 37º C, atmosfera úmida de 5% de CO_2, por 48 horas. Como controle negativo foi utilizado titânio comercialmente puro (Ticp) denso, na proporção de 2 cm^2/mL de meio de cultura. Como controle positivo, foi preparada uma solução fenol 0,3% e 0,5% v/v de meio de cultura.

Após a incubação, os extratos foram filtrados através de membrana de acetato de celulose com poros de 0,45µm, e diluídos até 6,25% v/v com meio de cultura RPMI para realização do teste de viabilidade celular, como mostrado na Figura 10.

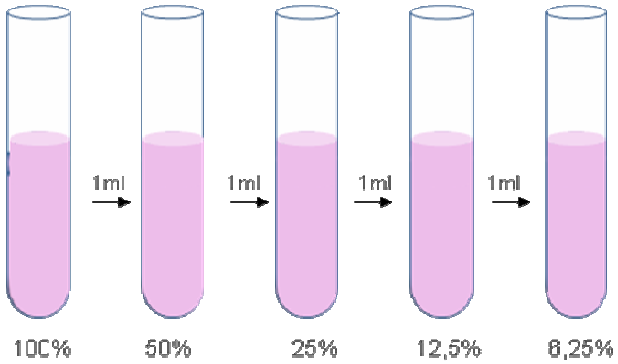


Figura 10. Diluição seriada 1:2 dos extratos.

4.6.3 Teste de citotoxicidade com células CHO-k1

Para o teste de citotoxicidade, em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL da suspensão de células CHO-k1, na concentração final de 3000 células por poço, sobre 50µL do extrato em suas diluições, em quadruplicata (Figura 11). A placa foi mantida na incubadora úmida com 5% de CO_2 , por 72 horas, a 37°C. A viabilidade celular foi visualizada com a adição de 20 µL de solução de MTS (corante supravital de composto tetrazolico) /PMS (agente acoplador de elétrons), na razão 20:1, e incubado por mais 2 horas (Figura 12). Após o período de incubação, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para leitura de placas de 96 poços) com filtro de 495 nm para leitura das densidades ópticas como mostrado na Figura 11. A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC(\%) = \left(\frac{DOamostra}{DOcontrole}\right) x100$$

Onde: VC = viabilidade celular (%); DOamostra = densidade óptica da amostra; DOcontrole = densidade óptica do controle de células totais.

O Índice de Citotoxicidade - IC_{50}, concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

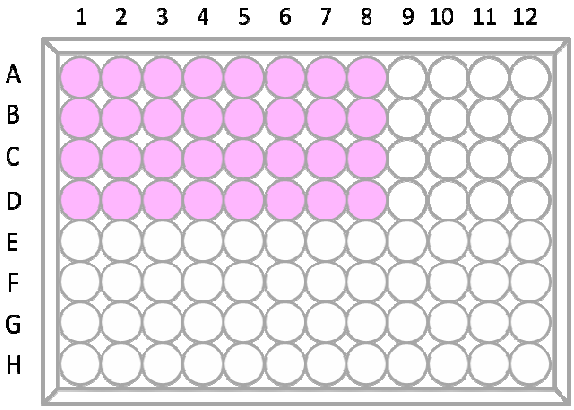


Figura 11. Esquema da microplaca no teste de citotoxicidade: 1º coluna – Branco; 2ª e 3ª coluna – controle de células totais; 4ª à 8ª coluna – diluições seriadas com células.

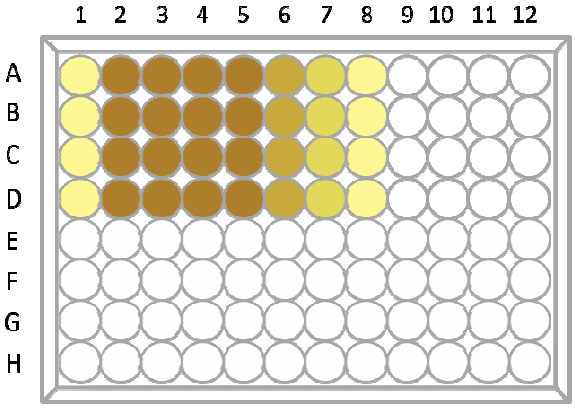


Figura 12. Coloração de microplaca de controle positivo (fenol) após adição de MTS/ PMS e incubação por 2 horas.

4.7 Ensaio “in vivo”

4.7.1 Implantes

Os implantes foram obtidos em formato cilíndrico, nas dimensões (5mm x 2mm) desejadas, sem efetuar usinagem. Devidamente identificados e acondicionados, os implantes foram esterilizados com uma dose de 25kGy por meio de radiação gamma (Co60, Gammacell modelo 220 - IPEN). O Ticp por apresentar características conhecidas de biocompatibilidade foi utilizado como grupo controle neste experimento.

4.7.2 Animais, anestesia e medicação

Dezoito ratos (*Rattus norvergicus),* machos, da raça Wistar, com aproximadamente 10 semanas de idade e 300 g em massa, foram designados como modelo animal neste estudo, sendo atribuídos 3 animais por grupo. Os animais foram alocados no biotério do IPEN, em sala climatizada com temperatura constante (21°C), isentos de estresse, sob iluminação em intervalos de 12 horas (claro/escuro) controlada por temporizador, com 3 animais por gaiolas, tratados com dieta à base de ração seca e água *Ad libitum.*

A experimentação animal seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) [72], e aprovada pela comissão de ética experimental do IPEN (ANEXO I). O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo estes princípios. Desta forma, os materiais implantados foram instalados apenas no fêmur direito do animal.

Antes do procedimento cirúrgico, foi realizada a anestesia com 75mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener 10%®, Agener) e 10mg/kg Cloridrato de Xilazina (Calmiun®, Agener) administradas por via intraperitonial. Nas áreas cirúrgicas o anestésico local utilizado foi o Cloridrato de Lidocaína a 2% sem vaso constritor (Lidostesim® SV), apresentação em tubetes de 1,8 ml. Após o procedimento cirúrgico uma dose única de Morfina (10mg/kg) foi aplicada com a finalidade de promover analgesia, diminuindo o estresse da dor pós-cirurgia e melhorando o bem-estar dos animais. Para evitar complicações infecciosas

causadas por contaminação bacteriana durante o evento cirúrgico, foi administrado em dose única, intra-muscular, Pentabiótico (0,2 ml/animal) composto de cinco antimicrobianos (Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Diidroestreptomicina e Estreptomicina), combinados para ampliar o espectro de ação, reduzir a toxicidade e evitar o aparecimento de resistência bacteriana.

4.7.3 Procedimento cirúrgico

A região do fêmur dos animais foi tricotomizada e feita anti-sepsia com gluconato de clorhexidina a 2% e iodopovidona. Após a anti-sepsia, foi realizada exérese da pele expondo as fáscias musculares, com bisturi (nº 5) munido de lâmina 15. A exposição do fêmur foi obtida com o rebatimento dos músculos vasto lateral e bíceps femoral até o periósteo, que foi deslocado com objetivo de proporcionar o acesso e visão à área operatória (Figura 13).

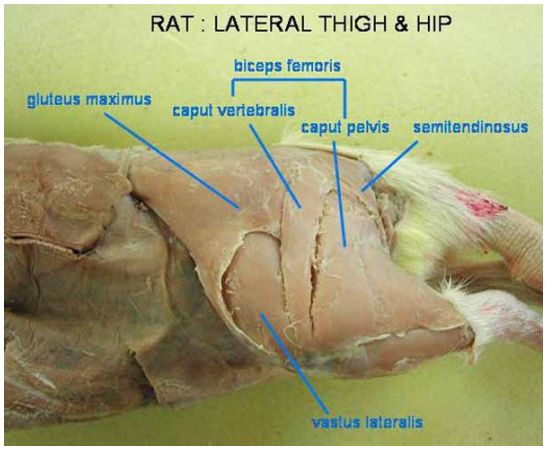
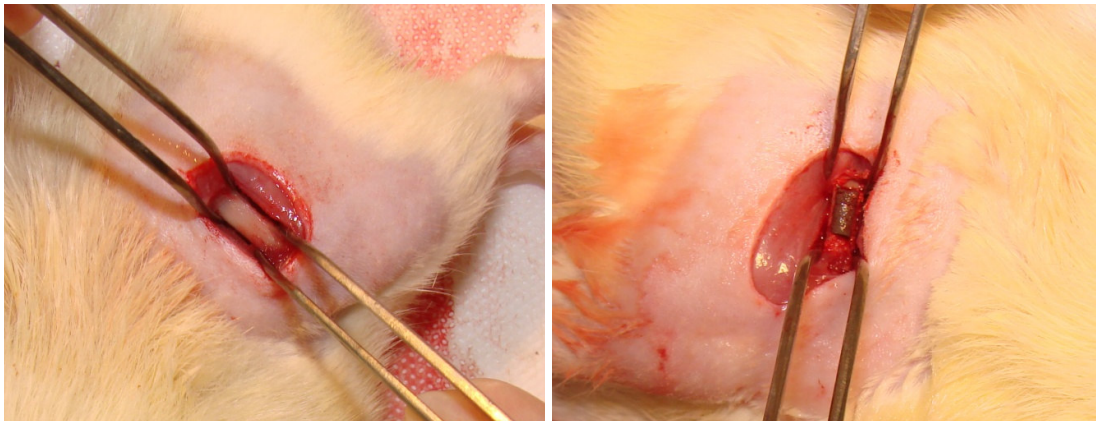


Figura 13. Ilustração da anatomia muscular do fêmur de ratos da raça Wistar [73].

O leito de inserção dos implantes foi preparado com o auxilio de brocas acopladas a um contra-ângulo com redução de 16:1, movido por um motor elétrico com velocidade de 1.000 rpm e 30 N/cm^2 de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%). Com auxílio de uma pinça o implante foi colocado no fêmur direito do rato (Figura 14).

Após a inserção dos materiais, foi realizada a sutura muscular com um ponto simples separado e a sutura da pele com ponto simples, utilizando fios de sutura mononylon agulhado (3/8 CR - 3,0cm). A assepsia, após o procedimento de sutura, foi feita com gluconato de clorhexidina a 0,12% e iodopovidona.



(A) (B)

Figura 14. (A) – Leito cirúrgico; (B) – Implante posicionado.

4.7.4 Aplicação dos marcadores ósseos

No decorrer dos 28 dias aguardados para a osteointegração dos implantes foram administrados, subcutaneamente, marcadores ósseos, para avaliação do processo de formação óssea. Para uma interpretação morfológica qualitativa, foi utilizada uma seqüência de três marcadores com cores diferentes, em intervalos de tempo apropriado (Tabela 5).

Os marcadores utilizados foram respectivamente: a calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), a alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA) e a tetraciclina (Cloridrato de oxitetraciclina 500mg, Terramicina®, Pfizer), utilizando o procedimento experimental de seqüência de marcadores detalhado na Tabela 5. Foi necessária a preparação de uma solução para a aplicação dos marcadores celulares, pois os mesmos se apresentavam em forma de pó. Cada marcador foi devidamente pesado em balança de precisão (Metler – Toledo AG245) e diluído em soro fisiológico (1ml) e solução tampão de Na_2HPO_4 (2mg), para dissolução total e homogeneização da solução.

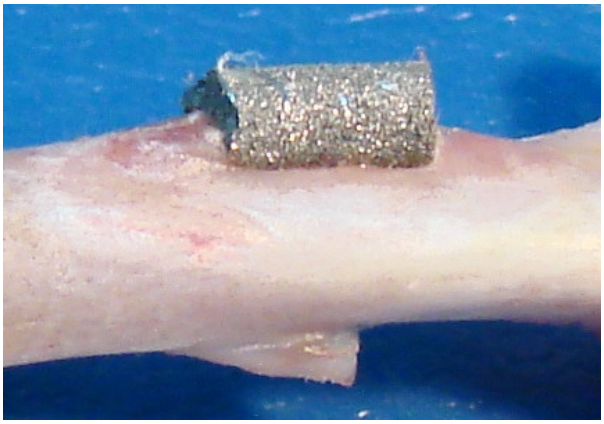
Tabela 5. Tempo de aplicação dos marcadores ósseos e dosagem.

Tempo	Marcador	Dose por kg do animal
7 dias	calceína	8 mg
14 dias	alizarina	20 mg
21 dias	tetraciclina	10 mg
28 dias	sacrifício	-

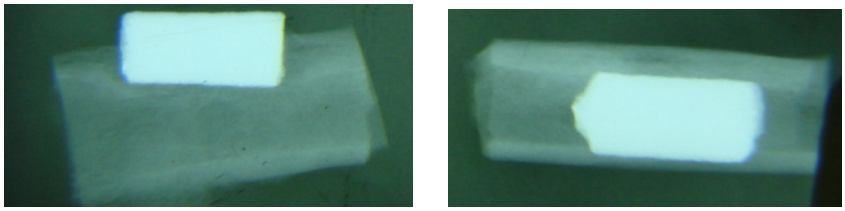
4.7.5 Preparação das amostras

O rato, por ser um animal de pequeno porte, apresenta um processo metabólico seis vezes superior ao de seres humanos. Este fato pode ser evidenciado também, no mecanismo de reparação tecidual ósseo. Portanto no presente trabalho, foi adotado o tempo de 4 semanas para avaliação da osteointegração. O sacrifíco dos animais foi realizado em câmara de CO_2. Anteriormente a inserção dos animais dentro da câmara, o gás CO_2 foi aberto para preencher a câmara e retirar o ar atmosférico, após o posicionamento dos animais dentro da câmara o fluxo de gás CO_2 foi mantido contínuo por 30 segundos. Os animais permaneceram dentro da câmara por 5 minutos, até não apresentarem sinais de vitalidade.

Os tecidos moles adjacentes à área estudada foram dissecados e, uma amostra de ~ 10 mm, no longo eixo do fêmur (envolvendo centralmente a área inicial de injúria de 5 mm de diâmetro), foi removida com o auxílio de serra.



(A)



(B) (C)

Figura 15. (A) – Amostra de fêmur e implante osteointegrado; (B) e (C) - Radiografia da amostra após remoção para fixação do tecido.

- Microscopia eletrônica de varredura

Uma amostra de cada grupo experimental foi separada para a análise da morfologia e integração óssea na interface osso-implante.

Após o procedimento de remoção da amostra osso-implante, estes foram submersos por 24 horas em solução de Karnovsky, que consiste em: paraformoldeído (2%), glutaraldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio (0,1M, - pH 7,3). Em seguida, três lavagens sucessivas com solução tampão fosfato (0,1M) foram necessárias para prodecer com a impregnação em solução tetróxido de ósmio (2%), por 2 horas. Mais uma lavagem de tampão fosfato encerra esta fase. A desidratação das amostras começa com diluições crescentes de álcool etílico (70, 80, 90, 96, 100%) e finaliza com método do ponto crítico. A armazenagem em ambiente livre de umidade é um fator importante para evitar cargas eletrostáticas na amostra durante a observação em microscópio eletrônico de varredura.

Para a análise, a preparação das amostras consiste na fixação das mesmas com cola de prata em bases de alumínio, e um fino recobrimento de ouro otimizando a captação das imagens.

- Análise histológica

Logo após a remoção das amostras, estas foram imersas em solução neutra de formalina a 10%, permanecendo por 30 dias. O procedimento de inclusão das amostras seguiu o protocolo da Resina Technovit® 9100 NEU até a etapa de obtenção das lâminas (Anexo II).

Para a etapa de obtenção das lâminas histológicas, o conjunto osso-implante embutido em resina, foi fixado em uma máquina de corte (Isomet 2000) de modo que o disco diamantado ficasse posicionado transversalmente ao longo eixo do osso. Nos cortes obtidos foi possível observar toda a área circunferencial do implante e do osso, tendo uma visão geral da superfície e da parte mais central, detalhe importante na avaliação dos materiais porosos (Figura 16).

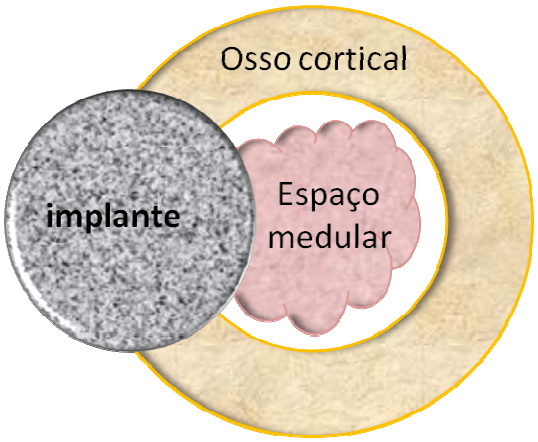


Figura 16. Representação esquemática do corte histológico.

Cada corte teve aproximadamente 500 µm de espessura e foram colocados individualmente em lâminas de acrílico utilizando uma gota de cianoacrilato (SuperBonder®, Loctite, Brasil), com pressão constante. Foi necessário o desgaste dos cortes até a espessura de 30 µm para a avaliação histológica. Lixas de carbeto de silício (granulometria 800, 1000, 1200, 2400, 4000 mesh) foram utilizadas neste processo para o desbaste e polimento.

A histomorfologia foi realizada a partir das análises das colorações das lâminas de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) (Anexo III). O microscópio óptico utilizado pertence ao Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

A técnica da fluorescência foi realizada a partir das lâminas histológicas sem coloração e analisadas em microscopia de fluorescência. As imagens foram retiradas de três áreas com interação osso-implante. Duas imagens das porções

de contato osso cortical e implante, superior (S) e inferior (I); e a terceira da área central (C), que corresponde ao contato osso medular e implante (Figura 17).

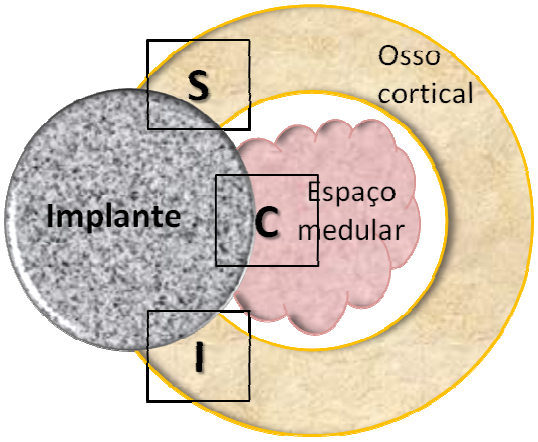


Figura 17. Representação esquemática das regiões analisadas por fluorescência, superior (S), inferior (I) e central (C).

Cada imagem foi fotografada em coloração monocromática com três diferentes filtros: UV – 2E/C (DAPI), B-2 E/C (FITC) e sem filtro de excitação. As imagens foram captadas no microscópio Nikon Eclipse – E1000 e câmera Nikon DXM 1200F, do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

A análise qualitativa procedeu-se com a sobreposição destas imagens no programa ImagePro Plus 5.1 com o ajuste manual dos tons de verde representando a calceína, vermelho representando a alizarina e o magenta ou azul para a tetraciclina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

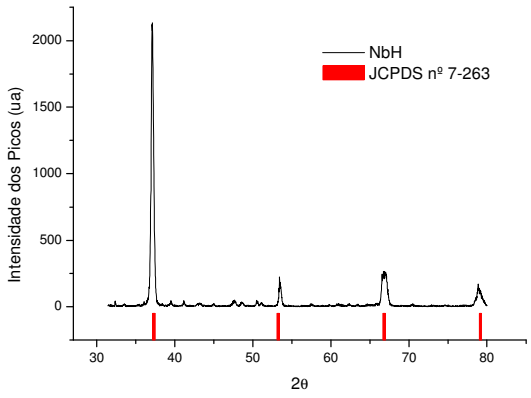
A apresentação dos resultados deste estudo segue a argumentação da discussão, iniciando pela caracterização física e química dos materiais particulados, processamento e caracterização dos sinterizados, testes de citotoxicidade dos materiais pelo teste *in vitro*, e finalizando com realização e caracterização da osteintegração dos materiais desenvolvidos, em teste *in vivo*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

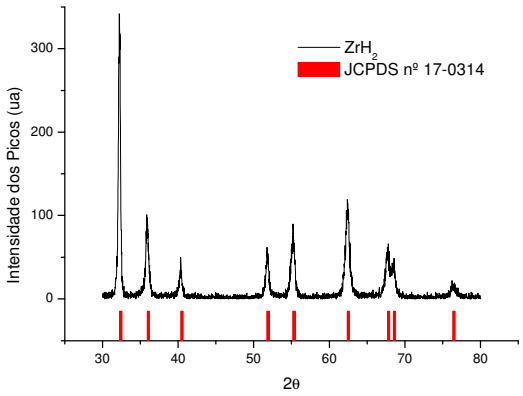
5.1 Caracterização dos materiais particulados

A aplicação da técnica da metalurgia do pó (MP) necessita materiais na forma de particulado para obter artefatos com formato final próximo ao desejado. O processo de hidrogenação-deidrogenação (HDH) permite obter pós metálicos pela ação do hidrogênio nos interstícios da rede cristalina dos metais, fragilizando-os. Este processo se aplica tanto para o titânio, nióbio e zircônio, resultando nos hidretos: TiH_2, NbH e ZrH_2.

Segundo a literatura, para o processo de obtenção dos hidretos é necessário um ciclo de três horas a uma temperatura de aproximadamente 500°C para o nióbio, enquanto o zircônio necessita de temperatura mais elevada, aproximadamente 800°C [74, 75]. Neste trabalho foram feitas adequações nas temperaturas de hidrogenação, pois, o nióbio estava na forma de cavaco e o zircônio na forma de esponja. Estes formatos permitiram que a temperatura utilizada para o nióbio fosse de 600°C e o zircônio de 500°C. O zircônio em esponja facilitou a adsorção do hidrogênio no interstício devido à alta área superficial, porém para o nióbio em cavaco houve a necessidade de elevar a temperatura de hidrogenação. Pela análise de DRX, foi verificado que todo o material ficou na forma de hidretos, Figura 18 A e B, por comparação com as fichas JPCDS do NbH e ZrH_2.



A



B

Figura 18. DRX: das matérias primas após tratamento térmico de hidrogenação. A - Nióbio (NbH) e B - Zircônio (ZrH2).

As características do material particulado como tamanho médio de partículas, morfologia e composição química, são fatores que influenciam a microestrutura final da liga. Com a finalidade de diminuir o tamanho médio de partículas, foi realizado processo de moagem, permitindo que as forças de impacto, atrito, cisalhamento e compressão atuassem sobre as partículas metálicas maiores. Como conseqüência essas partículas sofreram microforjamento, fratura, desaglomeração e aglomeração, diminuindo o tamanho [76]. A análise da distribuição granulométrica mensurou o diâmetro médio das partículas em ~20 µm (Figura 19).

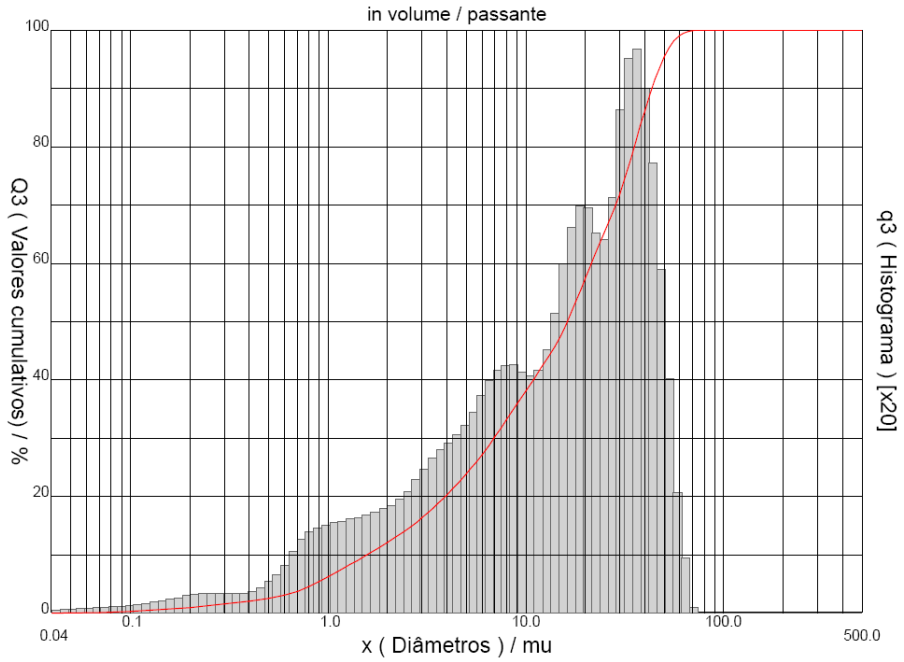


Figura 19. Distribuição Granulométrica do pó da liga - Cilas.

O moinho de bolas utilizado neste processo produz macroscopicamente um material particulado fino e homogeneizado entre os elementos da liga Ti-13Nb-13Zr. Microscopicamente as partículas apresentaram-se de forma irregular, não esféricas e de tamanhos variados (Figura 20). Essa característica provavelmente decorre da qualidade morfológica dos hidretos.

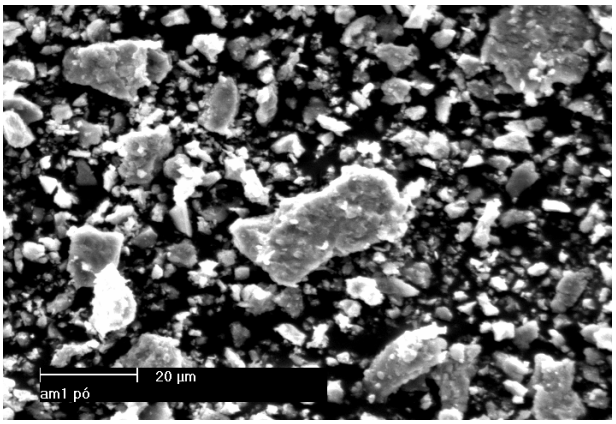


Figura 20. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do pó da liga.

Por espectroscopia de fluorescência de Raios X (Tabela 6) foram analisados os componentes da mistura do pó, antes da sinterização, e observou-se a presença significativa de silício (Si), provavelmente oriundo do processo de moagem, assim como pequenas concentrações de ferro (Fe) e tungstênio (W). A presença de Ráfnio (Hf) na amostra pode ser explicada por ele ser encontrado sempre junto ao zircônio na natureza devido à semelhança química, sendo muito difícil de separá-los.

Tabela 6. Composição do pó da liga, antes da sinterização, por EDXRF.

Elemento	*% em massa*
TiH_2	75,617
ZrH_2	12,005
NbH	10,579
Si	1,217
Hf	0,311
Fe	0,154
W	0,116

5.2 Obtenção e caracterização de amostras sinterizadas

Para obtenção dos implantes de pequenas dimensões, os pós foram compactados em moldes de silicone flexíveis. Na prensagem isostática, a pressão é distribuída homogeneamente por toda a superfície do molde, sobre a qual atua um fluído pressurizador [76].

A sinterização é um processo no qual as partículas se unem formando agregados de alta resistência [76]. Para que ocorra a difusão atômica entre as partículas, é necessária que a temperatura de sinterização esteja aproximadamente entre ½ a 2/3 da temperatura de fusão [76]. Neste estudo, a temperatura de sinterização escolhida (1150°C) fica próxima aos 2/3 da temperatura de fusão do titânio (elemento de maior concentração na liga).

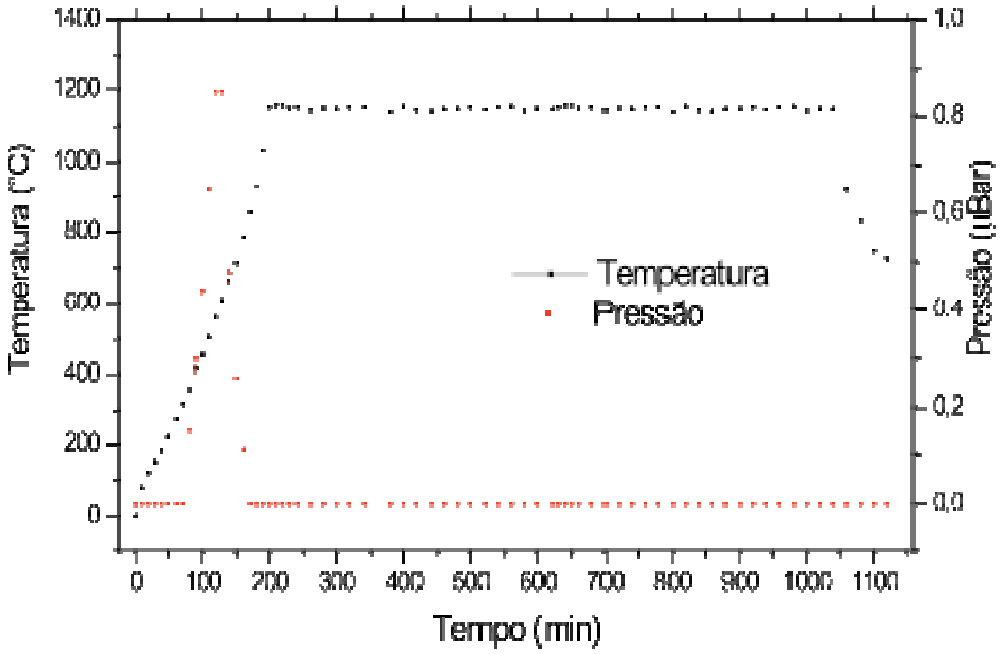


Figura 21. Gráfico representando a pressão (µBar) do forno de sinterização em função do tempo (min), e o ciclo térmico utilizado.

Devido à alta reatividade do titânio, pela formação da camada de óxido superficial, é comum a utilização de alto vácuo durante a sinterização. Além disso, o alto-vácuo favoreceu a dehidrogenação dos metais durante a elevação da

temperatura. Durante o processo, os metais hidrogenados começam a perder o hidrogênio intersticial, a 300℃, terminando o processo de dehidrogenação a ~850℃. No gráfico da Figura 21, observa-se um aumento brusco na pressão do sistema chegando ao pico equivalente à 0,8 μBar, na temperatura de 550℃, comprovando que a esta temperatura a remoção do hidrogênio para estes metais é bastante eficiente. A taxa constante de aquecimento de 5℃/min possibilita que a dehidrogenação ocorra em aproximadamente 175 minutos.

A amostra sinterizada a 1150ºC apresenta uma homogeneidade relativamente alta com pequenas regiões de material não reagido. Foram analisadas diversas regiões por EDS (Figura 22); alguns espectros obtidos são apresentados na Figura 23 A, B e C. Pela análise semi-quantitativa é possível observar que a matriz apresenta valores próximos à estequiometria da liga, isto é, 74% Ti, 13% Nb e 13% Zr. As regiões escuras possuem altas concentrações de titânio comparadas à matriz, e regiões mais claras apresentam concentrações mais elevadas de nióbio, em relação à estequiometria média da liga.

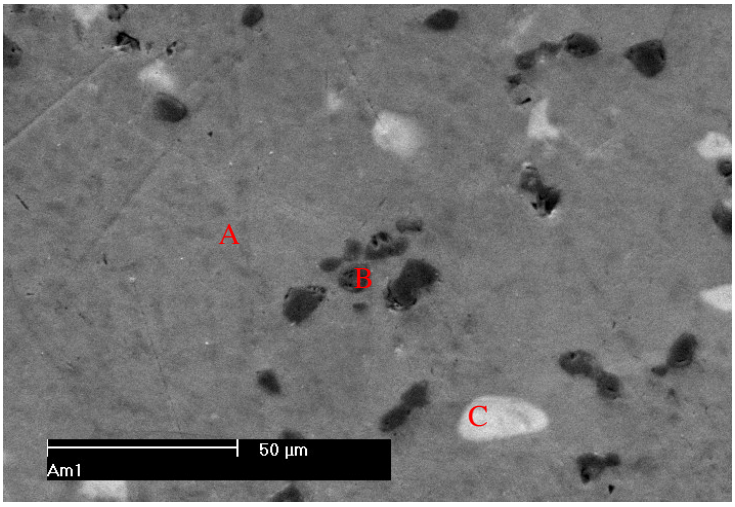


Figura 22. MEV da amostra sinterizada contendo matriz (A), região escura (B) e (C) região clara.

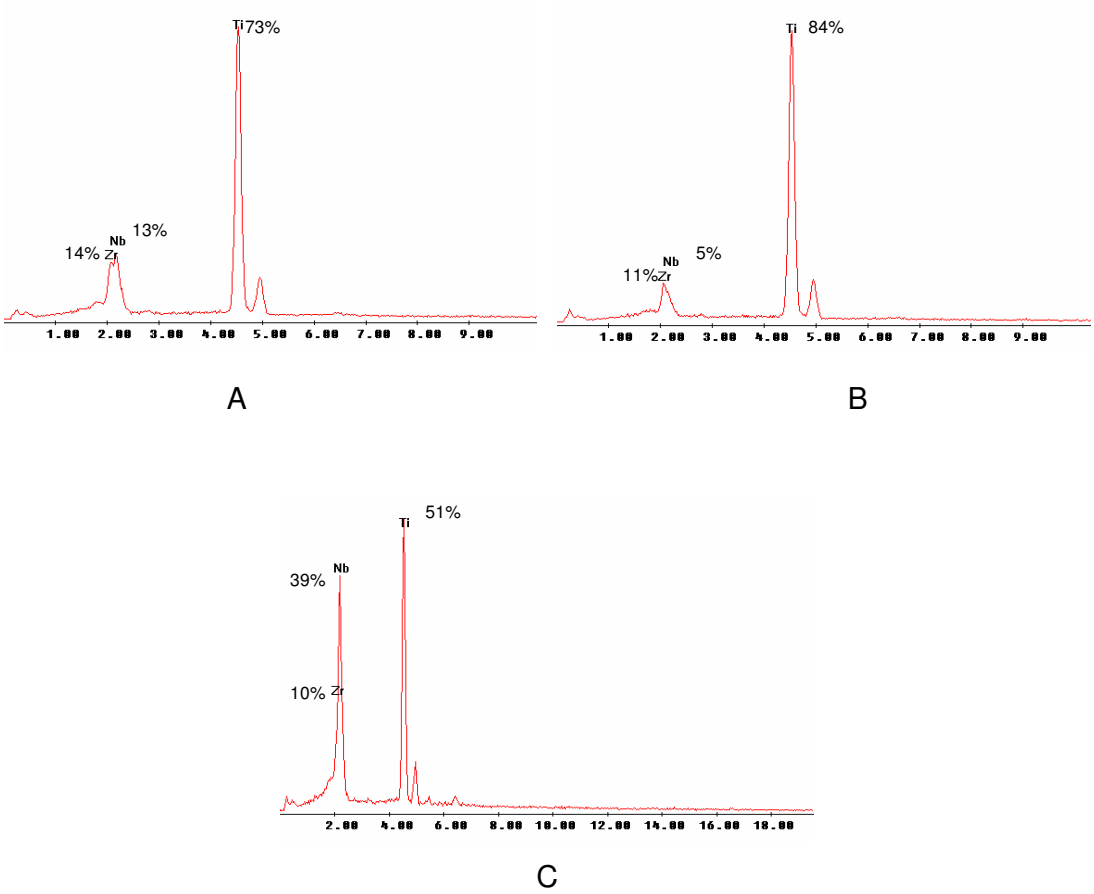


Figura 23. A) EDS da matriz da região (A); B) EDS da região escura da amostra (B) e C) EDS da região clara da amostra (C).

A liga Ti-13Nb-13Zr é considerada uma liga tipo *near* β, e é possível observar por MEV (Figura 24) a estrutura Widmanstätten que cresce com a dissolução das partículas β estabilizadoras (Nb), que agem como agente nucleador da fase β da liga, pela elevada temperatura de sinterização. O zircônio se dissolve-se mais rapidamente do que o nióbio, participando na estabilização das fases α e β. Essa característica estrutural confere à liga um bom equilíbrio de resistência mecânica, ductilidade e tenacidade à fratura [77].

Por EDS (Tabela 7), foi possível observar as porcentagens em peso das regiões avaliadas. A fase α caracterizada pela coloração cinza escuro e em forma de agulhas possui uma concentração maior de titânio em relação à composição média da liga. Já na fase β metaestável, o elemento em destaque é o nióbio, em concentração maior em relação à liga original (Ti-13Nb-13Zr).

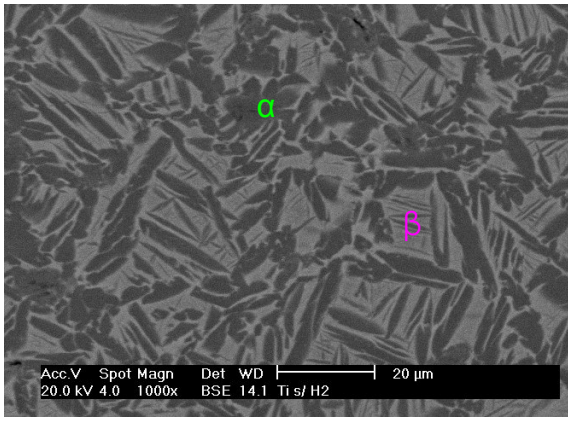


Figura 24. Fase α e β observada por MEV e analisada por EDS.

Tabela 7. Fases α e β observadas por MEV e analisadas por EDS.

Regiões avaliadas	α	β
% Ti (peso)	83	68
% Nb (peso)	7	18
% Zr (peso)	10	14

Por DRX da amostra (Figura 28), foram observados picos nas fases α e β do titânio, fases estas esperadas após o processamento por metalurgia do pó e sinterização. Para a liga Ti-13Nb-13Zr não foram encontrados dados nos arquivos JCPDS, a avaliação foi feita com base nos dados da fase α e β do titânio puro. Não foram observados picos relativos à hidretos, óxidos ou intermetálicos (Figura 28).

5.3 Ligas porosas

No processo para obtenção das amostras porosas, a gelatina adicionada ao pó metálico, homogeneizada, dissolvida em água e depois desidratada; foi removida em tratamento térmico a 300°C, por 90 minutos, em forno a vácuo (10^{-2} mBar). Nesta temperatura é promovida a degradação da gelatina em carbono, e o vácuo permite que o carbono formado seja removido de toda a peça do implante. A movimentação de saída do carbono promove a formação de porosidade aberta com canais-interconectados no material, fator importante para a etapa de osteointegração na utilização como implante (Figura 25).

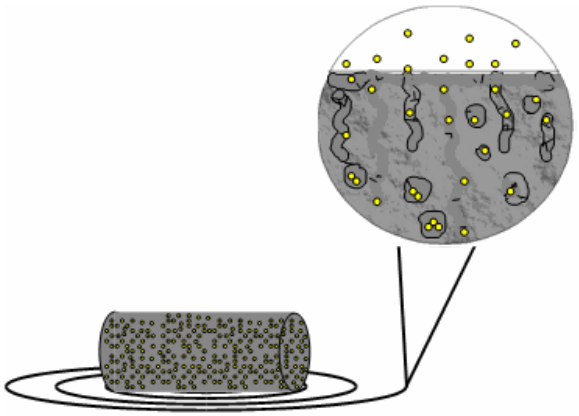


Figura 25. Representação esquemática da remoção da gelatina e conseqüentemente a formação de poros.

Foram avaliadas características de homogeneidade microestrutural por MEV e composição química por EDS nas amostras sinterizadas. As amostras Ticp e Ticp+ 15% apresentam apenas titânio em sua composição nominal, na análise por EDS nenhum outro elemento foi encontrado nessas amostras, mostrando que não há contaminantes (Figura 26 e Figura 27). Assim todo o material utilizado para o processamento foi completamente removido durante o tratamento térmico. Por MEV, observa-se o aumento na porosidade estrutural nas amostras com adição de gelatina, áreas bem escuras (Figura 26 e Figura 27). Nas amostras Liga + 5%, Liga + 10% e Liga + 15% observa-se, por MEV, uma heterogeneidade mais acentuada do que na Liga, isto pode ter sido propiciado pela presença dos poros e canais o que teria prejudicado a difusão dos elementos da liga. Contudo, pela análise semi-quantitativa de EDS, as amostras Liga + 5%, Liga + 10% e Liga + 15% apresentam todos os elementos da liga sem perda significativa durante o processo (Figura 28, Figura 29, Figura 30 e Figura 31).

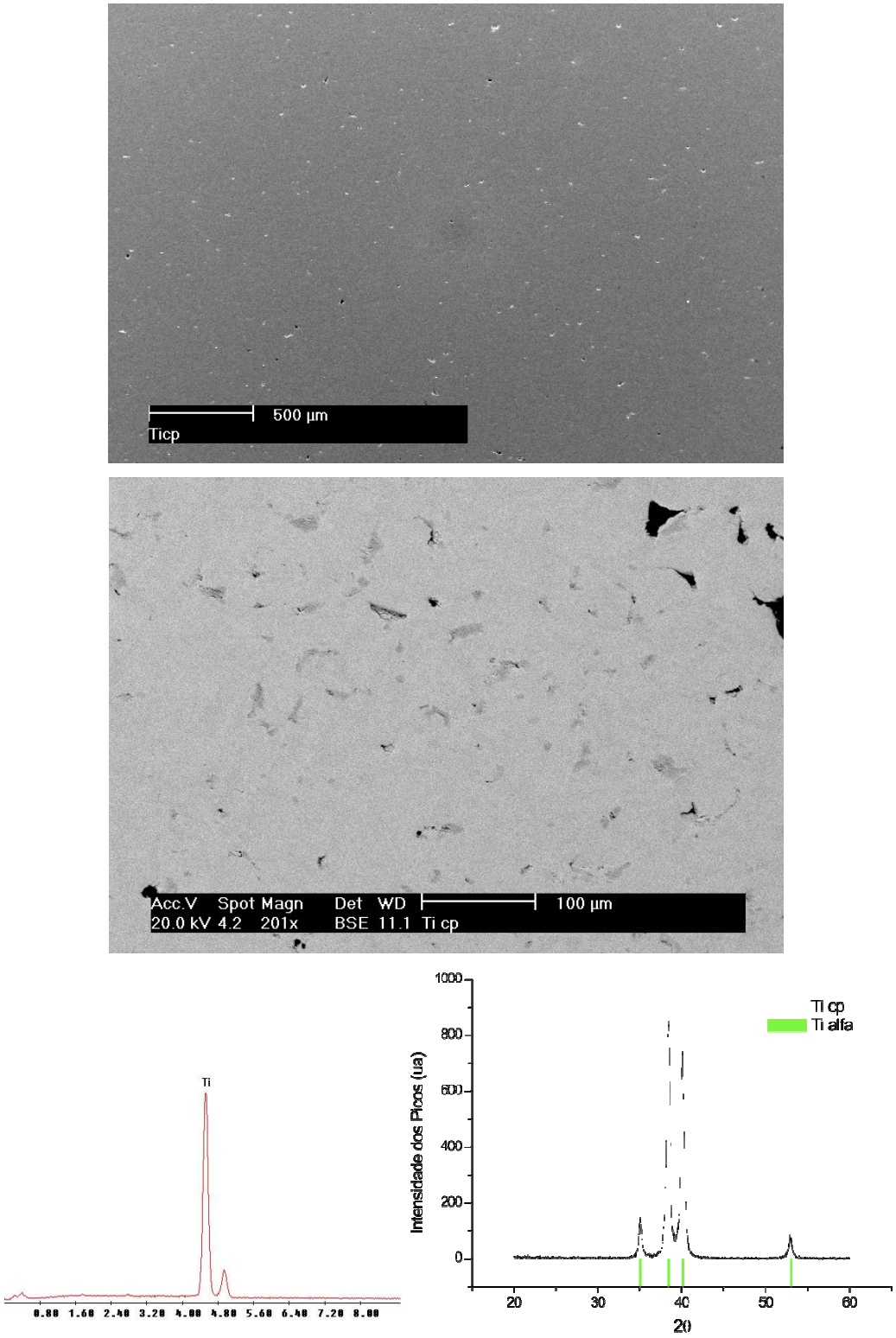


Figura 26. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX do Ticp.

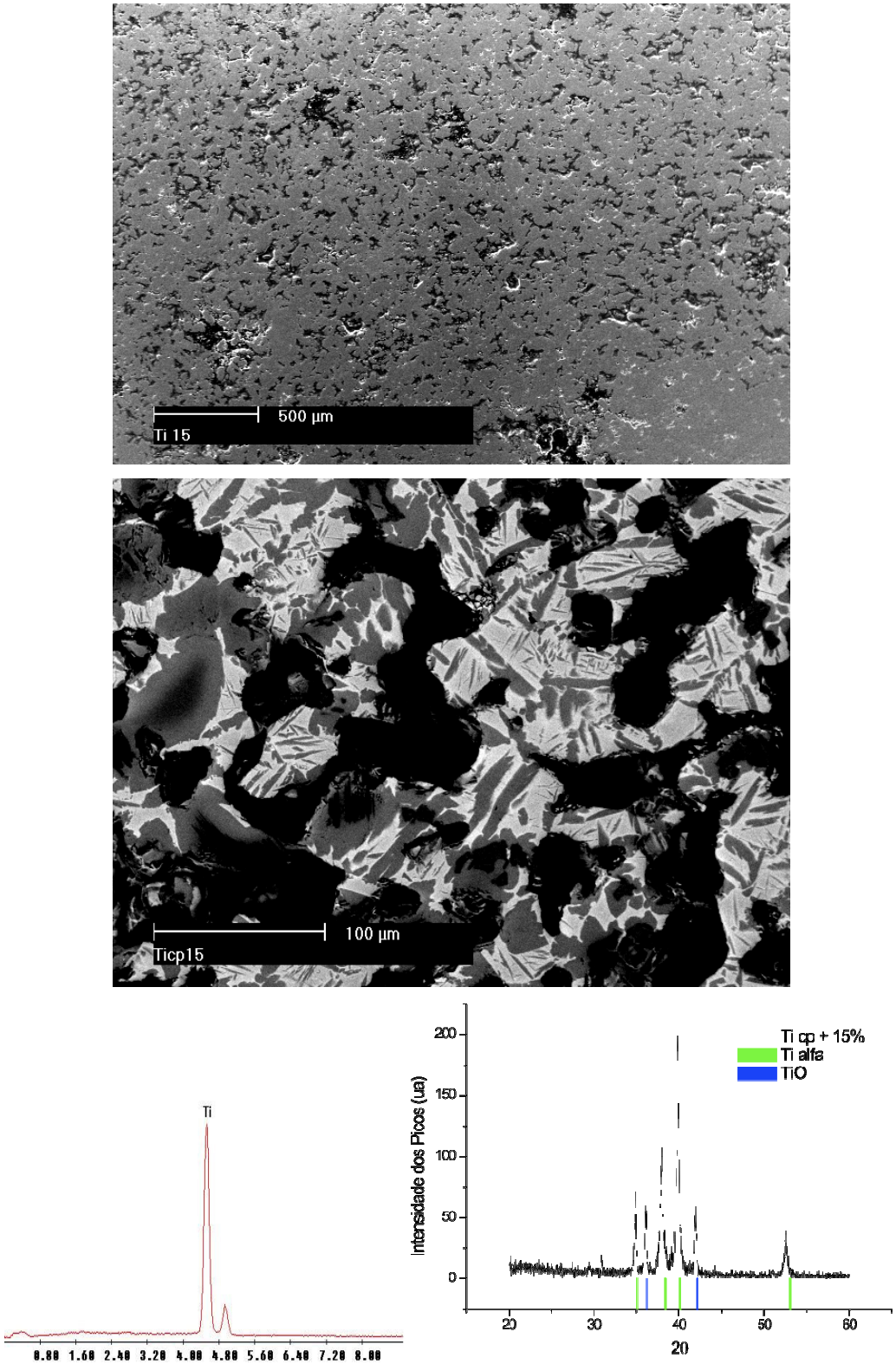


Figura 27. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX do Ticp + 15%.

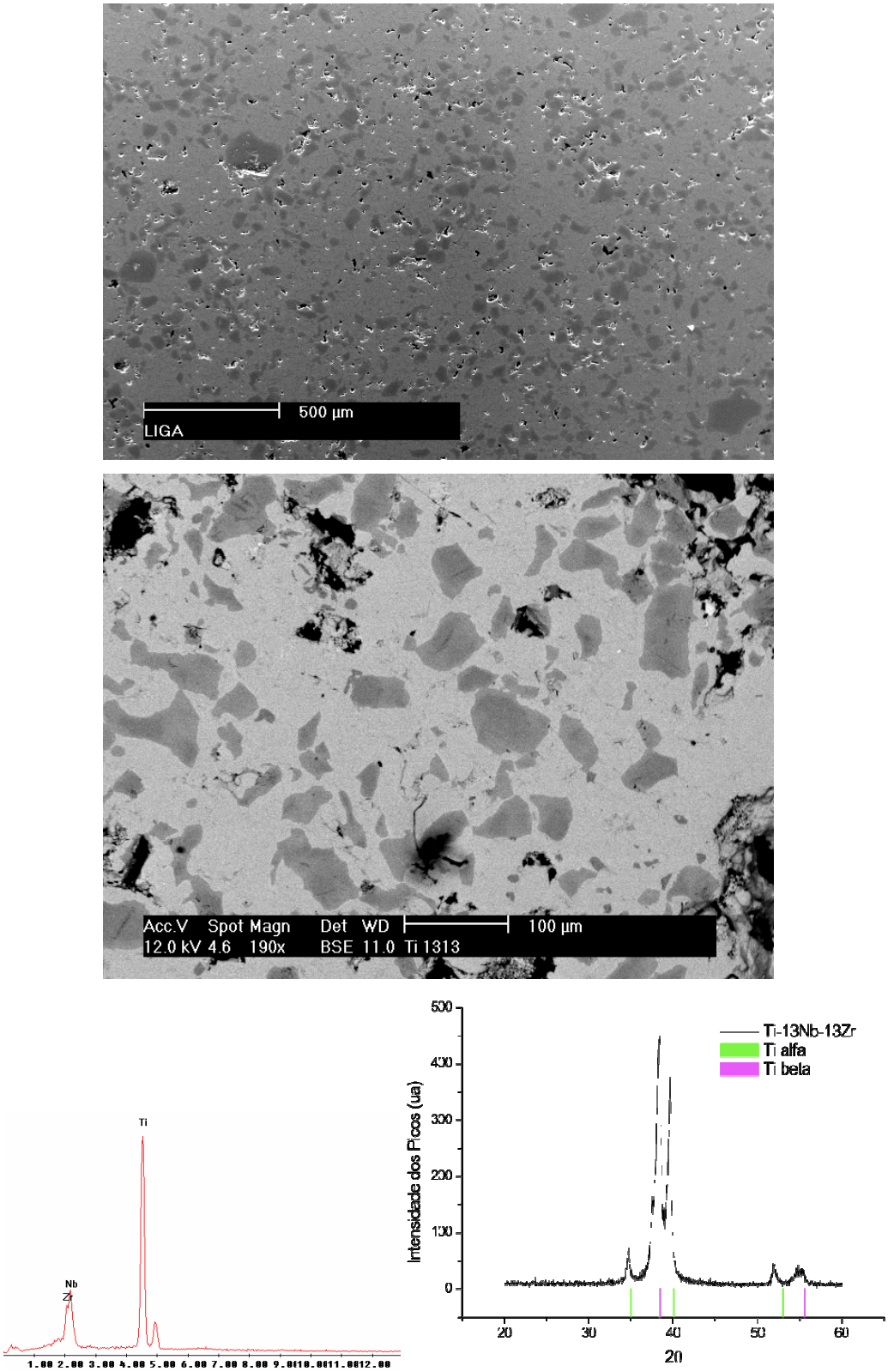


Figura 28. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga.

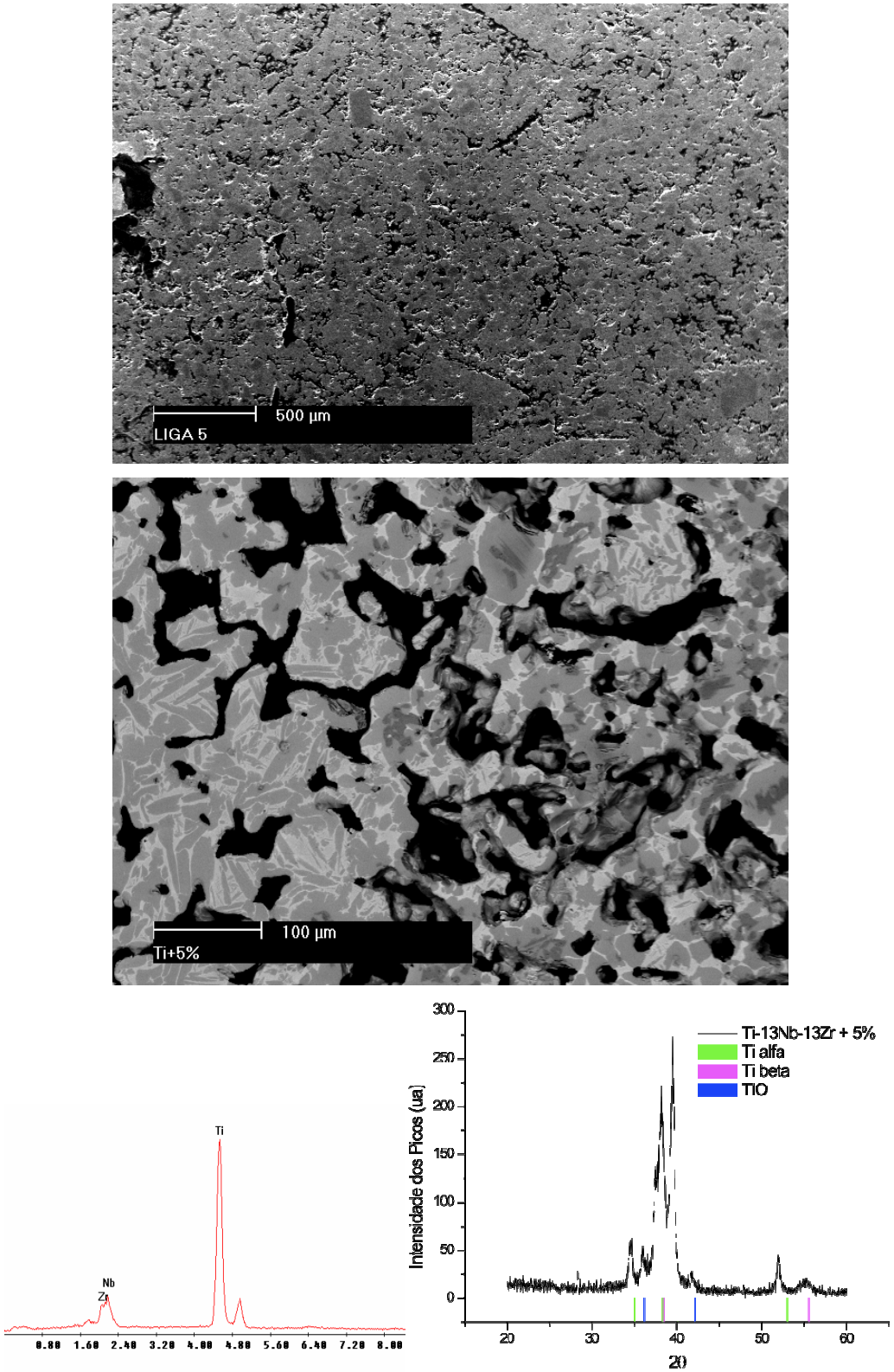


Figura 29. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 5%

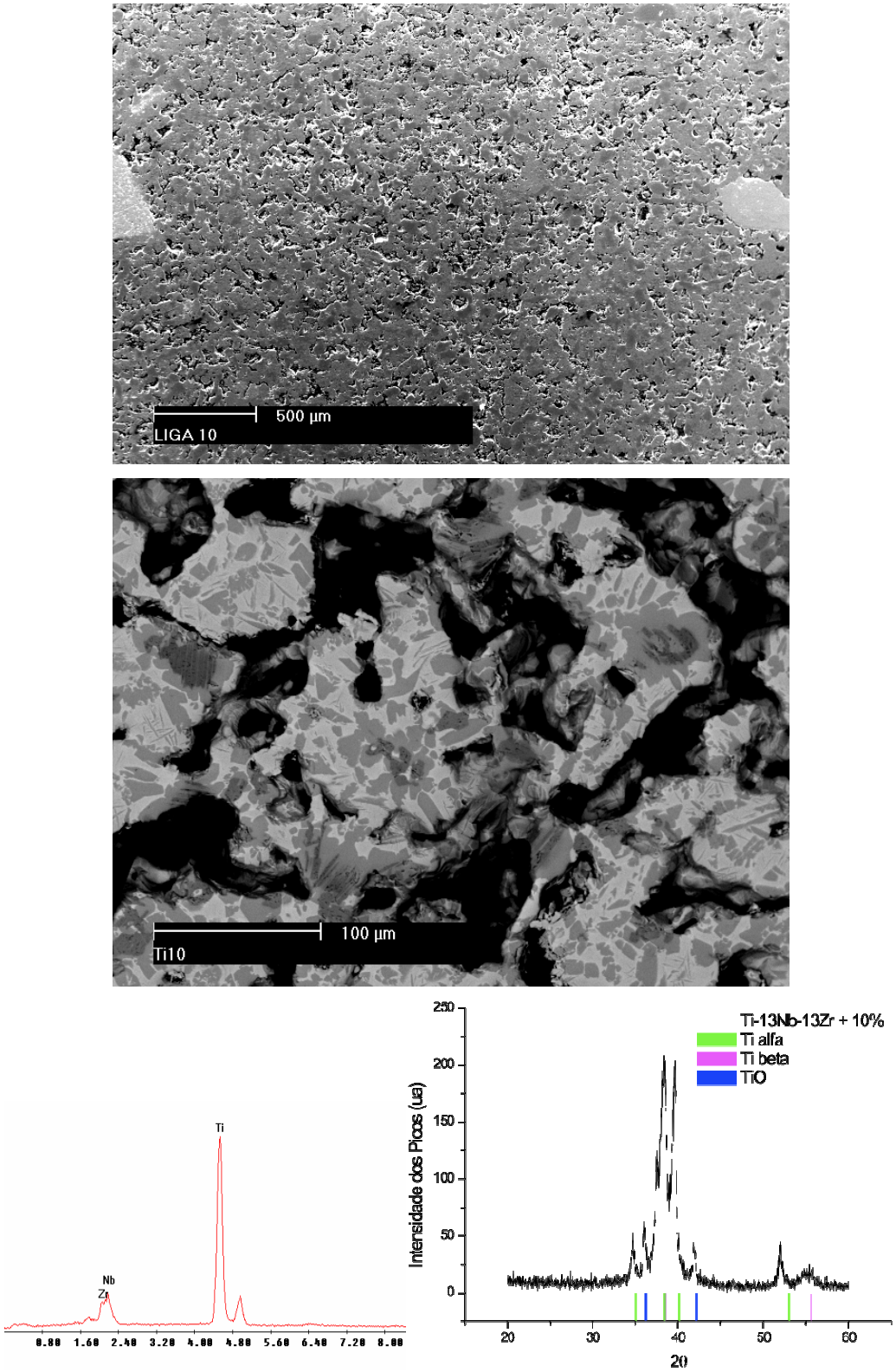


Figura 30. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 10%

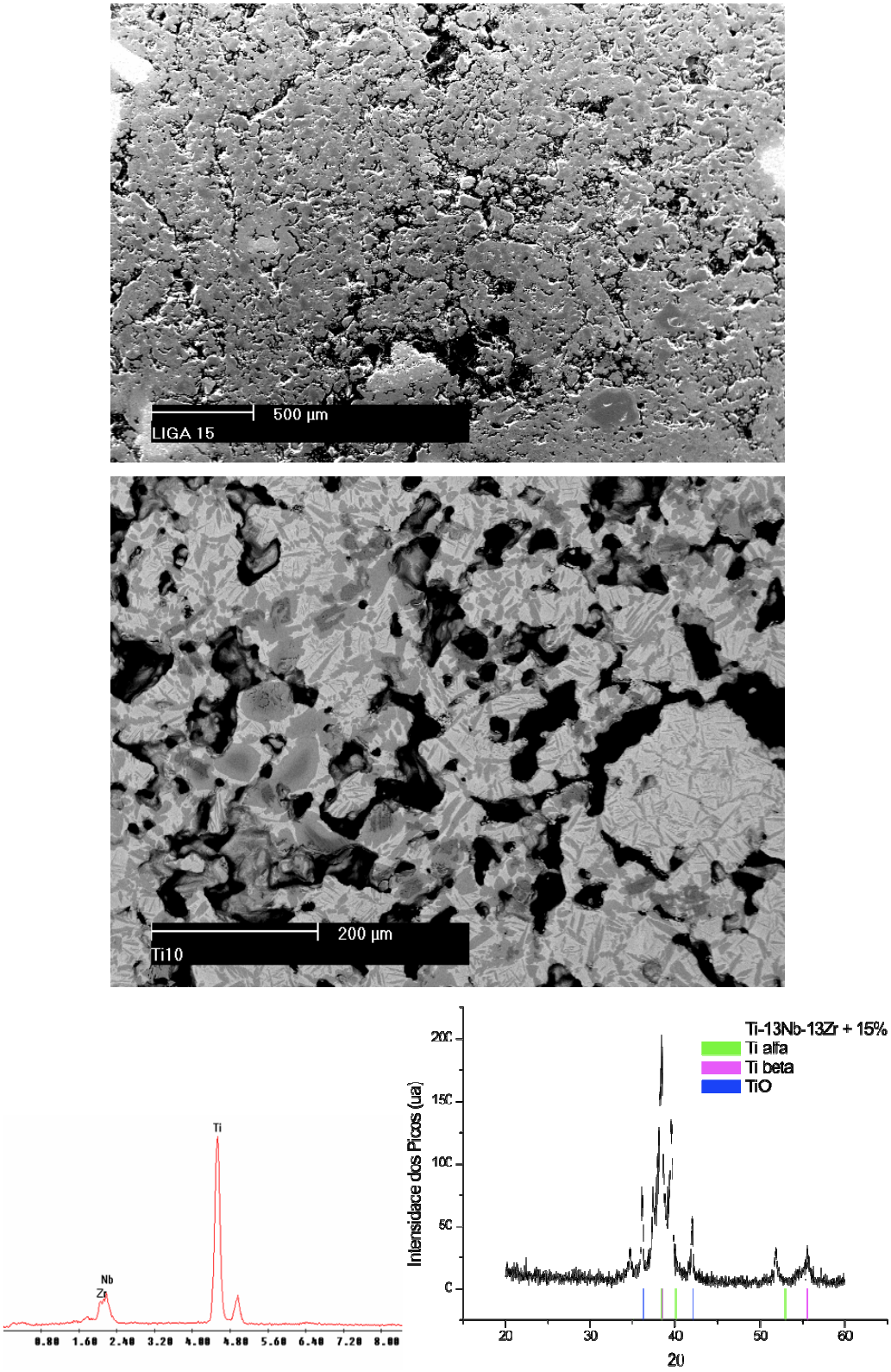


Figura 31. MEV da superfície polida, EDS da região analisada e DRX da Liga + 15%

Foram identificadas as fases formadas nas amostras sinterizadas por DRX. A amostra Ticp apresentou apenas a fase α, a liga Ti-13Nb-13-Zr, as fases α e β. As ligas porosas, modificadas microestruturalmente pela adição de gelatina apresentaram uma camada de óxido (TiO), os picos estão identificados nos gráficos pela cor azul. Apesar do óxido mais comumente encontrado na superfície do titânio e suas ligas ser o TiO_2 pela sua estabilidade química, a fase TiO foi formada nas amostras porosas, devido a pequena quantidade de oxigênio na atmosfera do forno. Pelo diagrama de fases de Titânio-Oxigênio, nas condições da temperatura de sinterização (1150℃) a razão O/Ti-superficial estaria em torno de 1.2, proporcionando a estabilização do TiO em temperatura ambiente (Figura 32).

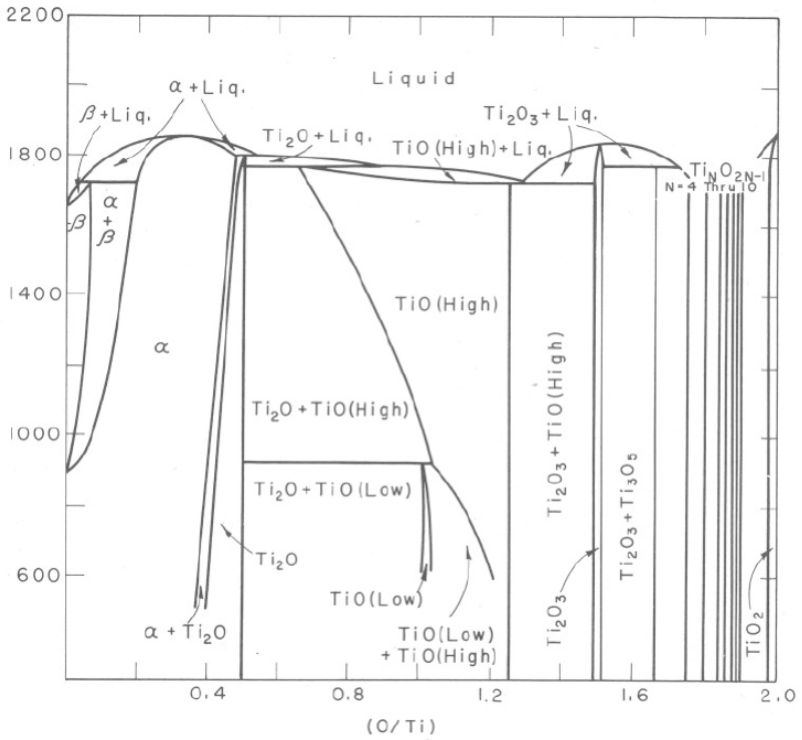


FIG. 2081.—System Ti–TiO_2.

P. G. Wahlbeck and P. W. Gilles, *J. Am. Ceram. Soc.*, **49** [4] 181 (1966).

Figura 32. Diagrama de fases do titânio.

Para determinação da porosidade aparente foi utilizado querosene (ρ=0,76g/cm^3, a 25ºC) como líquido penetrante, e não água. Esta substituição

está relacionada ao fato do querosene apresentar, a temperatura ambiente, menor tensão superficial (23 dina/cm) em relação à água (72 dina/cm), esta característica permite maior habilidade de penetração nos poros e descontinuidades, conferindo melhor molhabilidade e capilaridade, forças que estão associadas também a tensão superficial, induzindo uma penetração espontânea na região dos poros. Durante este ensaio as amostras foram imersas em querosene e mantidas num sistema de vácuo por 30 minutos, para eliminação completa de gases, antes de mensurar os valores de massa (imersa e úmida) necessários para determinação da porosidade [71].

Foi observado um aumento sensível da porosidade das peças com a utilização de 5, 10 e 15% peso de gelatina (Tabela 8). No material poroso a área de contato entre o osso e o implante aumenta, permitindo uma cicatrização mais rápida quando comparadas às superfícies sem nenhum tipo de tratamento. Outra vantagem seria o aumento na resistência à tensão por meio de crescimento interno do tecido ósseo, em características tridimensionais.

A porosidade relativa é representada pela diferença entre a densidade teórica e a hidrostática, em porcentagem. Os valores discrepantes entre a porosidade relativa e aparente em relação às amostras sem adição de gelatina, ocorre devido a fórmula da porosidade aparente ser específica para materiais porosos. Portanto para as amostras densas, o valor a ser considerado é da porosidade relativa.

Tabela 8. Resultados de densidade e porosidades em valores porcentuais

Amostra	Densidade Hidrostática (%)	Porosidade Relativa (%)	Porosidade Aparente (%)
Ticp	93	7	1
Ticp + 15%	63	37	36
Liga	92	8	4,6
Liga + 5%	70	30	29
Liga + 10%	71	29	29
Liga + 15%	68	32	32

A partir das micrografias das superfícies polidas das amostras, foi possível mensurar (em porcentagem) a porosidade da amostra em relação à área total selecionada. Utilizando o programa ImagePro Plus 4.1, foram mensuradas micrografias com aumento de 50x (500µm) e 250x (100µm). Os resultados obtidos são bastantes similares quando comparados entre si, com exceção da Liga + 15%, que apresentou grande discrepância (Tabela 9).

Tabela 9. Mensuração da porcentagem de porosidade pela imagem do MEV.

Amostras	Porosidade em 50x	Porosidade em 250x
Ticp	1%	0,5%
Ticp + 15%	27%	27%
Liga	2%	3%
Liga + 5%	25%	28%
Liga + 10%	31%	28%
Liga + 15%	40%	22%

Para analisar a porosidade das amostras, foi testada a técnica de porosimetria por intrusão de mercúrio. Os resultados não foram conclusivos, pois a amostra possui superfície irregular e poros interconectados, sendo a intrusão muito rápida, o que não permite a detecção dos poros maiores. Para caracterizar a distribuição do tamanho médio de poros das amostras, foram analisadas as mesmas micrografias em aumento de 250x (100µm), pelo programa ImagePro Plus. Os valores máximos e mínimos tiveram uma grande variação chegando o desvio padrão em 17 como no caso do Ticp + 15%. Essa desigualdade no tamanho dos poros é menos expressiva nas amostras densas que apresentam o desvio padrão bem baixo (Tabela 10), conforme esperado, já que não existem poros grandes.

Tabela 10. Distribuição de tamanho de poros em µm.

Amostra	tamanho médio de poro	valor máximo	valor mínimo	desvio padrão
Ticp	3,23	21,13	1,2	± 4,1

Ticp+15%	10,11	105,61	1,2	± 16,9
Liga	5,1	8,66	1,81	± 2,0
Liga+5%	8,55	86,8	1,41	± 14,0
Liga+10%	8,55	73,41	1,43	± 13,7
Liga+15%	6,19	61,98	1,16	± 8,4

A caracterização por picnometria de hélio foi utilizada para determinar a densidade real do corpo de prova pela adsorção de gás hélio (Tabela 11). Para as amostras de Ticp, onde a densidade teórica é 4,51 g/cm^3, a amostra com adição de gelatina apresentou a densidade mais próxima ao valor da densidade teórica. Por estes resultados conclui-se que existem poros fechados na estrutura em maior quantidade na amostra Ticp em relação à amostra Ticp + 15%, que apresenta porosidade aberta.

Os resultados das análises da liga e suas variantes porosas apresentaram um desvio padrão elevado por isso os valores de densidade foram maiores que a densidade teórica da liga Ti-13Nb-13Zr, que é 5,01 g/cm^3. Apesar dessa variação, as amostras porosas possuem valores maiores que a amostra sem adição de gelatina, por serem mais heterogêneas. Existe a influência das densidades do nióbio (8,4 g/cm^3) e do zircônio (6,5 g/cm^3) não reagidos que elevam os valores de densidade quando comparados à densidade teórica da liga. Portanto, a mesma conclusão é válida.

Tabela 11. Picnometria de Hélio.

Amostras	Densidade (g/cm3)	Desvio Padrão
Ticp	4,40	± 0,003
Ticp + 15%	4,45	± 0,003
Liga	5,04	± 0,007
Liga + 5%	5,16	± 0,021
Liga + 10%	5,45	± 0,029
Liga + 15%	5,11	± 0,013

5.4 Caracterização por ensaio *in vitro*

Os elementos titânio, nióbio e zircônio, separadamente, não apresentam características de toxicidade, sendo considerados materiais inertes para o sistema biológico [78]. Porém, modificações durante o processo de obtenção do implante podem influenciar as características finais do material. Em se tratando de um biomaterial, o teste de citotoxicidade determina a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro* usando parâmetros biológicos apropriados. No teste de citotoxicidade (Figura 33), a interceptação das curvas analisadas com o índice de citotoxicidade ($IC_{(50\%)}$) determina a citotoxicidade da amostra. No gráfico, a curva obtida para cada amostra correlaciona o porcentual médio de células vivas em função da concentração dos extratos. Dois parâmetros foram utilizados para avaliar a citotoxicidade dos materiais: o controle negativo, um material de características conhecidas que não produz resposta de citotoxicidade, neste caso o Ticp; e o controle positivo, que reproduz uma resposta de citotoxicidade, como a solução fenol 0,3%.

Como resultado, os hidretos de titânio e de nióbio mostraram-se satisfatoriamente não citotóxicos. O hidreto de zircônio, por ter uma baixa resistência à corrosão, apresenta uma curva bem próxima do limiar de toxicidade, porém ainda assim, aceitável [79]. A presença do ráfnio não deve interferir nos resultados de biocompatibilidade da liga formada [80]. O pó da liga mostrou-se altamente citotóxico, com $IC_{(50\%)}$= 40 (índice de citotoxicidade); valor mais elevado inclusive do que o controle positivo, onde $IC_{(50\%)}$= 75. Uma das prováveis causas da citotoxicidade da mistura do pó de liga é a utilização de ciclohexano durante o processo de moagem. Apesar da tentativa de remoção deste composto por tratamento em vácuo, é provável que permaneça algum resíduo, provocando essa reação deletéria às células [81]. O ciclohexano, por ser um hidrocarboneto, é provavelmente decomposto apenas na fase de sinterização, onde o material fica em vácuo e altas temperaturas, eliminando qualquer resquício de carbono [82]. O resultado do teste de citotoxicidade comprova que a liga Ti-13Nb-13Zr após a sinterização não é citotóxica, reforçando a característica de biocompatibilidade.

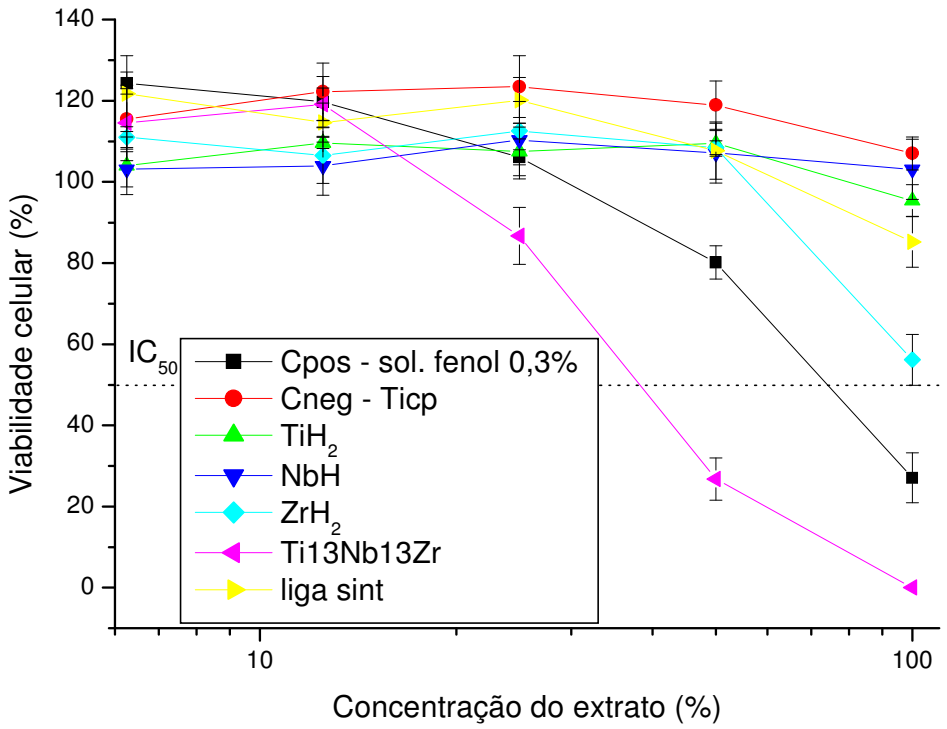


Figura 33. Gráfico de citotoxicidade dos materiais particulados: Controle Positivo (Cpos) - solução fenol com concentração de 0,3%; Controle Negativo (Cneg) - Ticp; Titânio hidrogenado (TiH_2), Nióbio hidrogenado (NbH), Zircônio hidrogenado (ZrH_2), liga em pó (Ti-13Nb-13Zr) e liga sinterizada (liga sint).

No teste de citotoxicidade das amostras sinterizadas (Figura 34), o controle negativo foi o mesmo utilizado no teste anterior e o positivo foi a solução fenol 0,5%, apresentando citotoxicidade onde o $IC_{(50\%)}$= 30. Apesar da manipulação e modificação dos metais durante o processo para obtenção de implantes com estruturas variadas, nenhum apresentou característica de citotoxicidade, viabilizando a utilização dos mesmos nos ensaios *in vivo*.

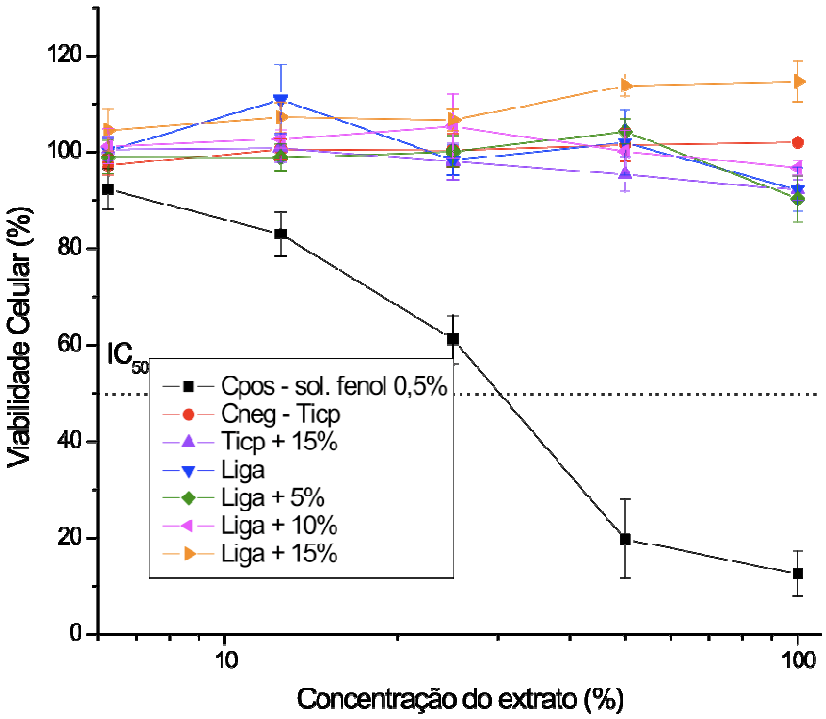


Figura 34. Gráfico de citotoxicidade dos materiais sinterizados com diferentes porosidades: Controle Positivo (Cpos) - solução fenol com concentração de 0,5%; Controle Negativo (Cneg) - Ticp; Ticp + 15%, Liga, Liga +5%, Liga +10%, Liga +15%.

5.5 Caracterização por ensaio in vivo

O processo de reparo imediatamente após a instalação cirúrgica de um implante poroso, responde com um processo inflamatório aumentando a vascularização e a atividade celular da região. O coágulo formado e a rede de fibrina que preenche os espaços no interior dos poros (Figura 35), é substituído por células mesenquimais osteoprogenitoras que proporcionaram a formação de um osso trabecular desorganizado nesse primeiro estágio. O segundo estágio do processo de “bone ingrowth” refere-se ao modelamento e remodelamento induzido por estresse de espículas ósseas em trabeculado maduro.

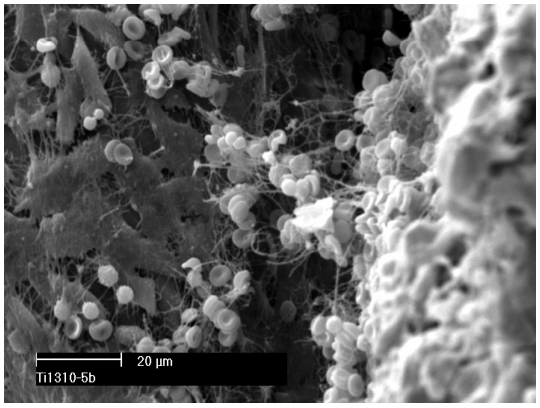
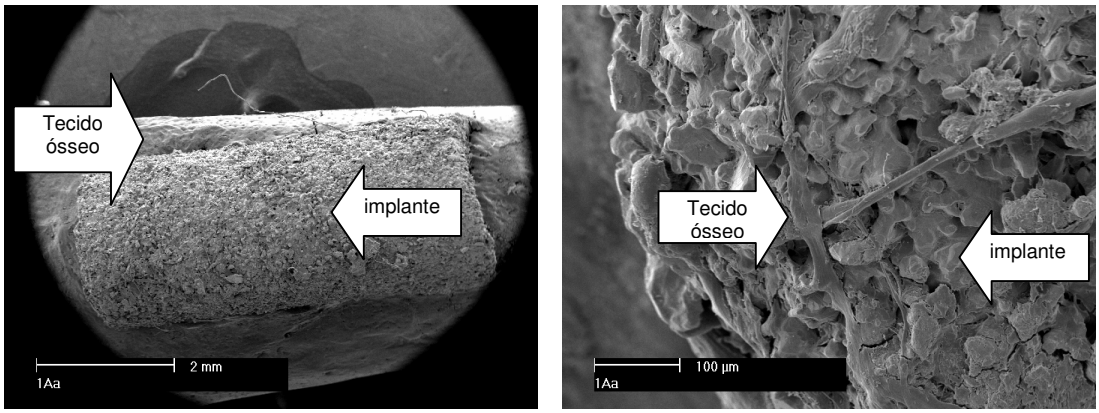


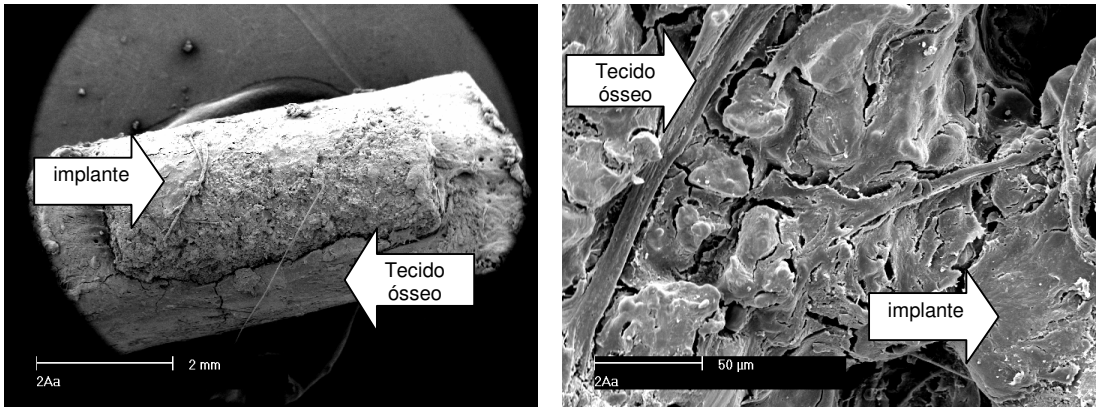
Figura 35. Formação de rede de fibrina e coágulo após a cirurgia. Situação representativa da amostra Liga + 10% (MEV).

Na análise dos resultados do ensaio in vivo, as amostras Ticp e Liga atuam como grupo controle por serem as de maior densidade. A interface osso-implante e o crescimento de tecido ósseo envolvendo a área de contado da superfície do implante podem ser observados: Figura 36 e Figura 38 - A, B. As amostras macroporosas Ti+ 15%, Liga + 5%, Liga + 10% e Liga + 15%, quanto as amostras mais densas propiciaram um crescimento ósseo tecidual preenchendo irregularidades das superfícies dos implantes, assim como os poros (Figura 37, Figura 39, Figura 40, Figura 41 - B). É importante salientar que a formação óssea está intimamente relacionada com uma ampla rede vascular e com a estabilidade mecânica dos implantes.



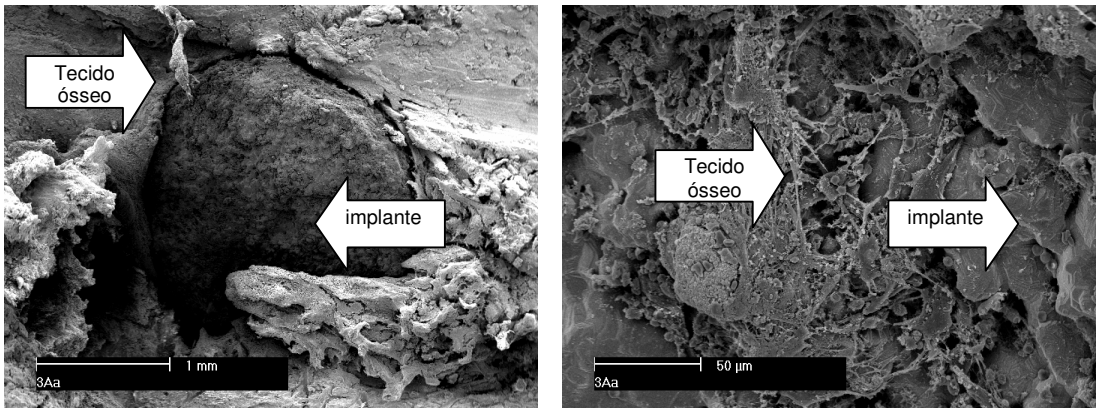
A B

Figura 36. Amostra Ticp: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.



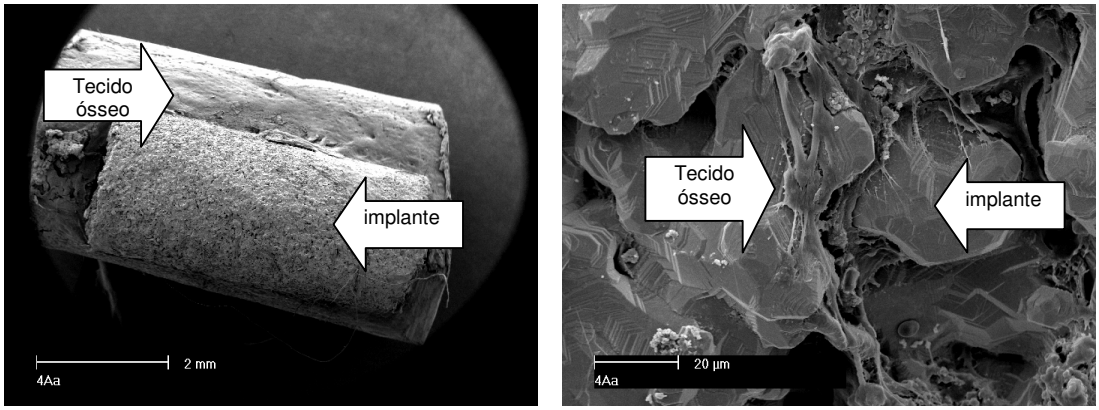
A B

Figura 37. Amostra Ticp + 15%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.



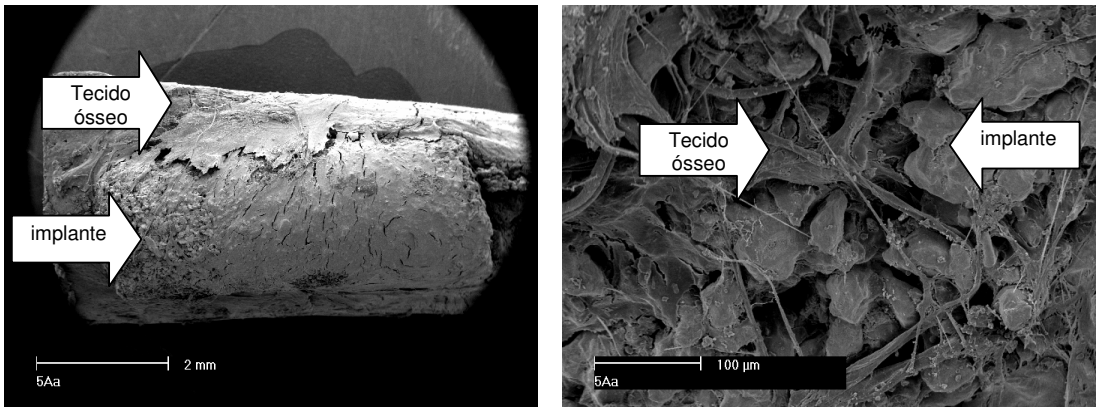
A B

Figura 38. Amostra Liga: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.



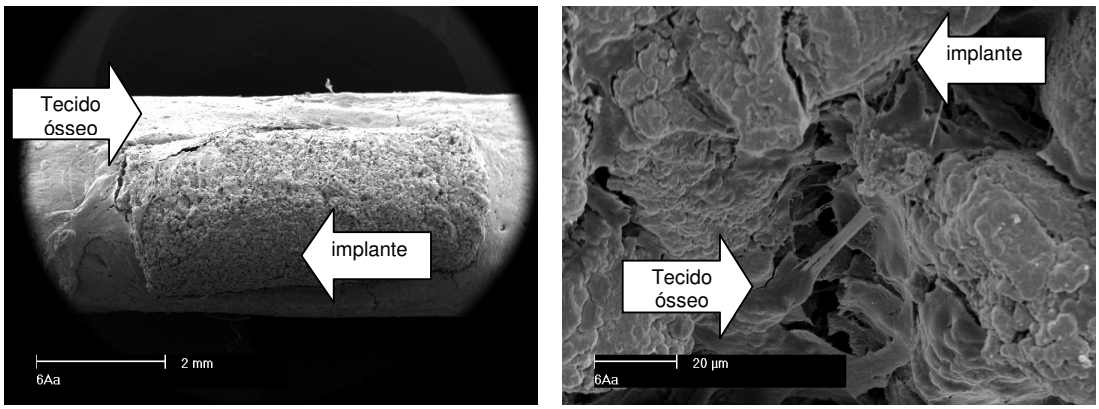
A B

Figura 39. Amostra Liga + 5%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.



A B

Figura 40. Amostra Liga + 10%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.



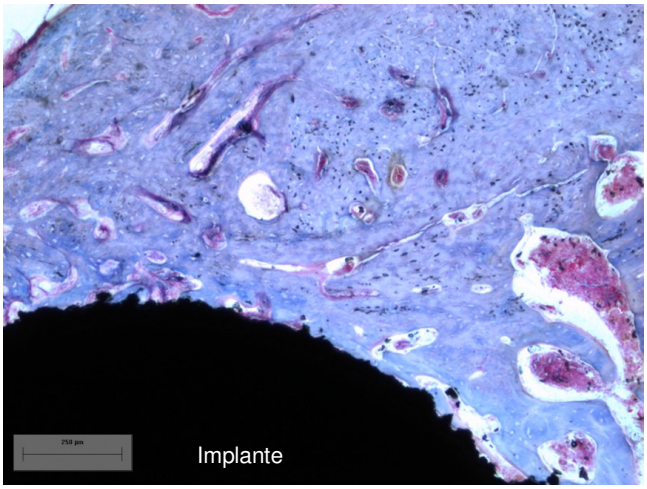
A B

Figura 41. Amostra Liga + 15%: A - MEV amostra implantada; B - MEV superfície do implante e tecido ósseo.

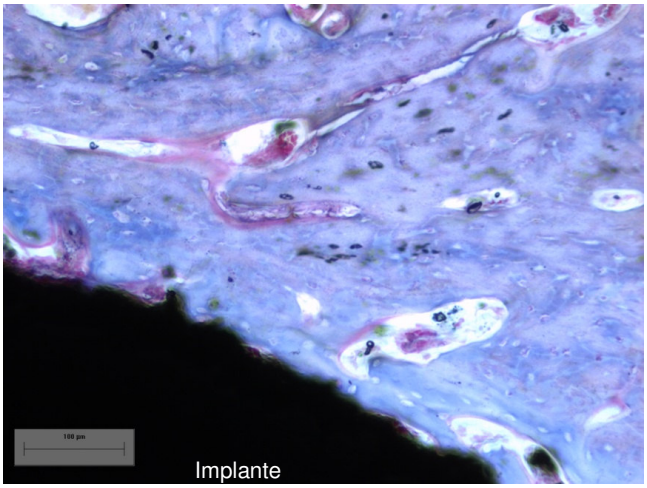
A estabilidade do implante facilita a vascularização local, proporcionando a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos; além disso, é bem estabelecido que os osteoblastos só sintetizam a matriz óssea na presença de alta tensão de oxigênio. Quando não ocorre esta estabilização mecânica, a vascularização local é dificultada e as células osteoprogenitoras diferenciam-se preferencialmente em condroblastos. Conseqüentemente, a interface osso-implante é preenchida por um tecido conjuntivo fibroso (tecido avascular), causando o insucesso do implante [46].

Para análise morfológica estrutural foi realizada a avaliação microscópica, que procedeu a partir da técnica de identificação Tricromico de Masson (TM). Além de mostrar muito bem o núcleo e o citoplasma, esta técnica ajuda a diferenciar tecido ósseo antigo (observado em cor azul escuro), tecido ósseo neo-formado (observado em cor azul claro) e tecido ósseo não mineralizado (observado em cor vermelha) [83]. Foi possível identificar nas micrografias os diferentes estágios de maturação óssea.

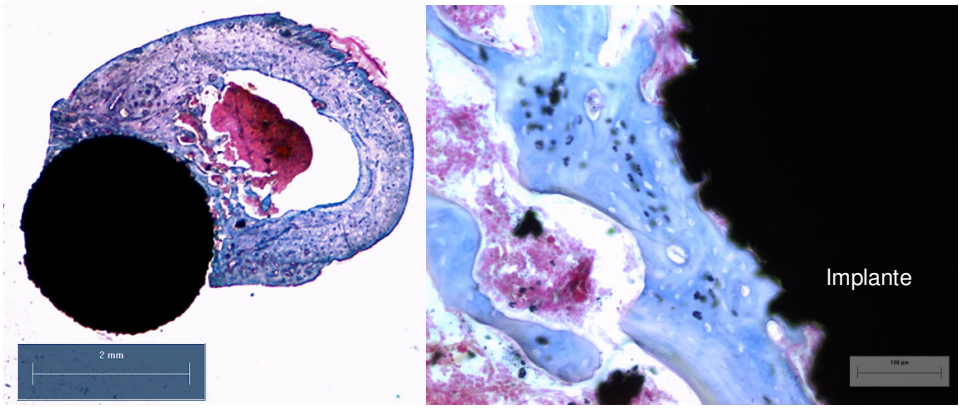
Após 4 semanas para o período de recuperação pós operatória dos animais, os implantes densos, ou seja as amostras Ticp e Liga, apresentaram tecido ósseo neo-formado predominantemente pela cor azul claro, ao redor da superfície do implante (Figura 42, Figura 43). As amostras porosas apresentaram, em contrapartida, um tecido ósseo não mineralizado circundando a superfície representada pela cor avermelhada (Figura 44, Figura 45). Essa diferença pode estar relacionada com a formação de tecido ósseo no interior dos canais e poros do implante. Devido à maior dificuldade de penetração de nutrientes e células, a maturação do tecido próximo ao implante pode ser mais demorada.



A

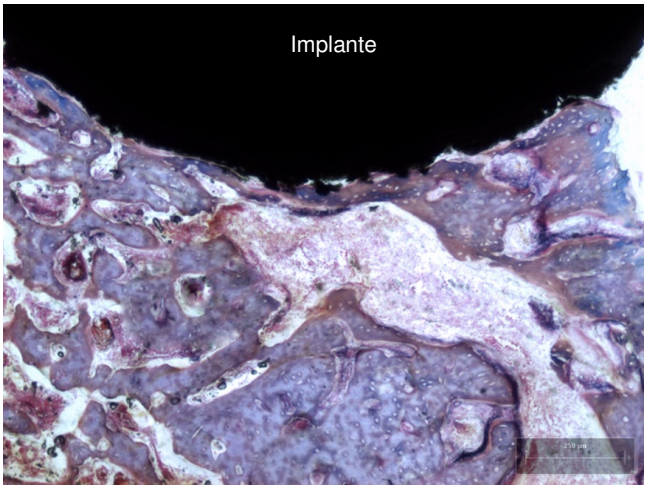


B

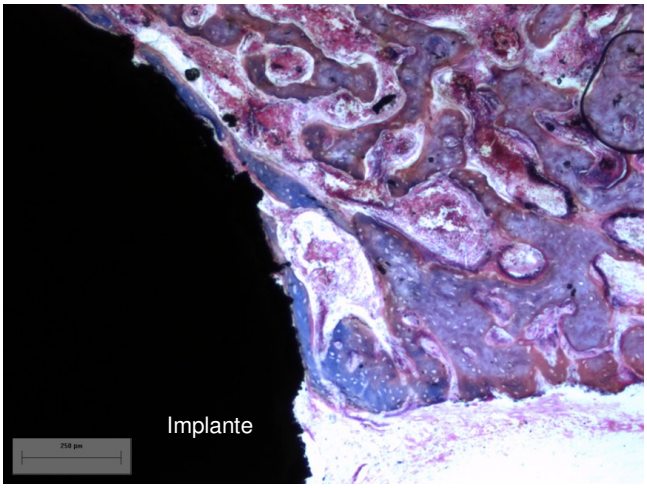


C D

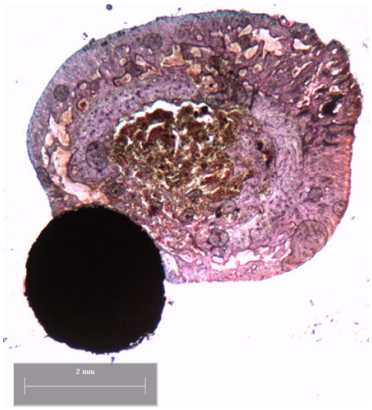
Figura 42. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Ticp: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante.

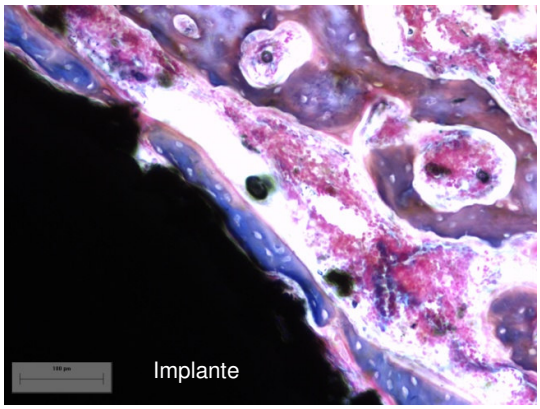


A



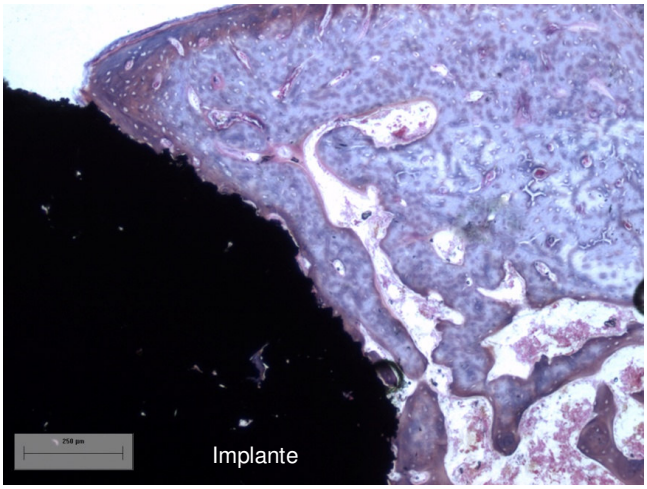
B



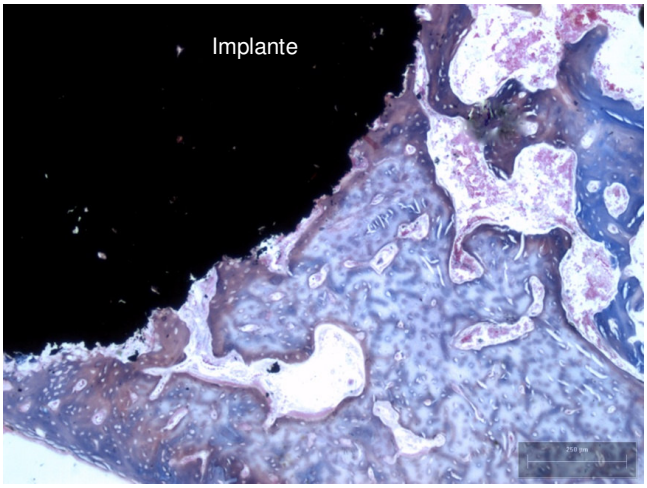


C D

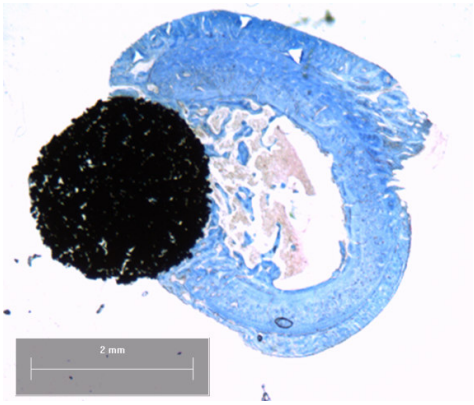
Figura 43. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante.

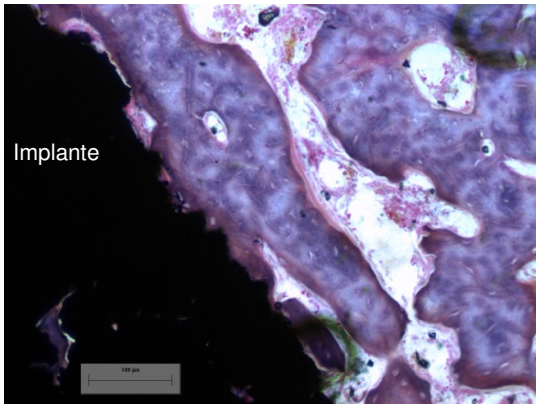


A



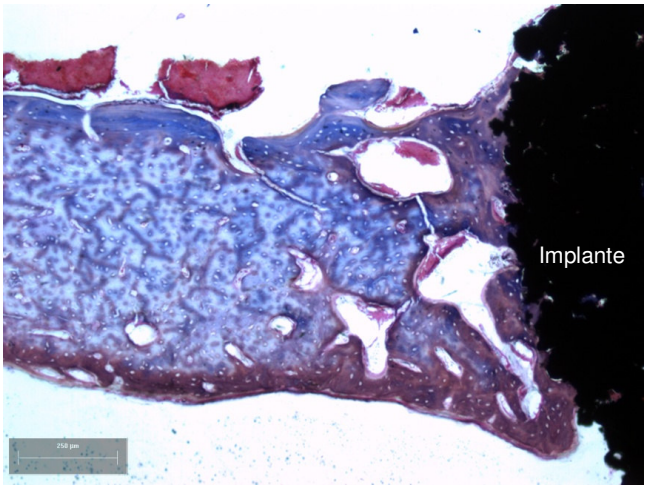
B



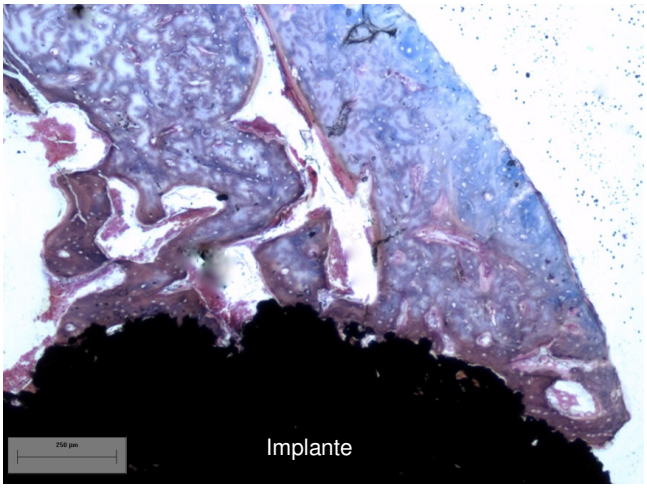


C D

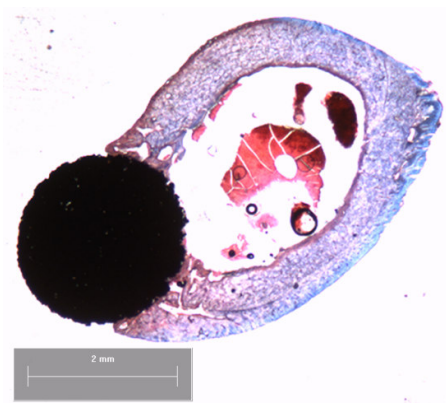
Figura 44. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga + 5 %: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante.

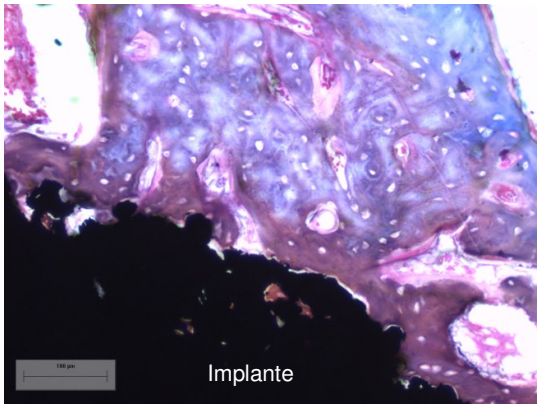


A



B

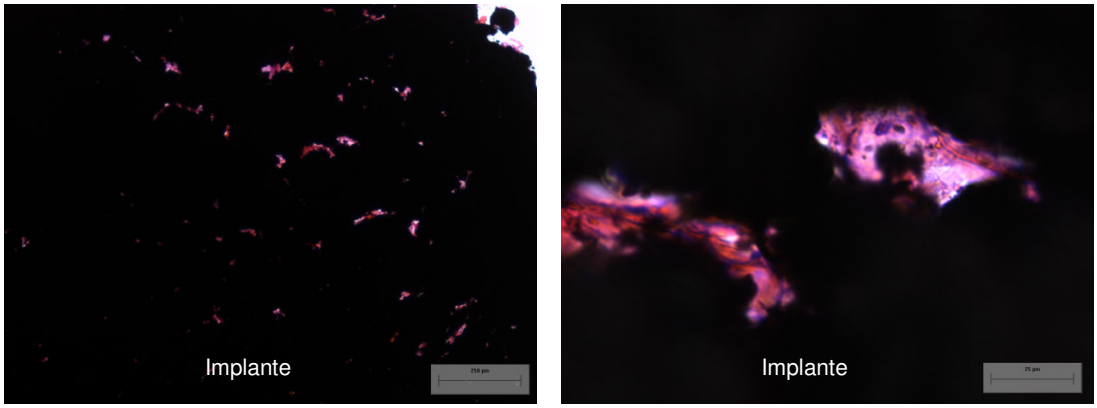




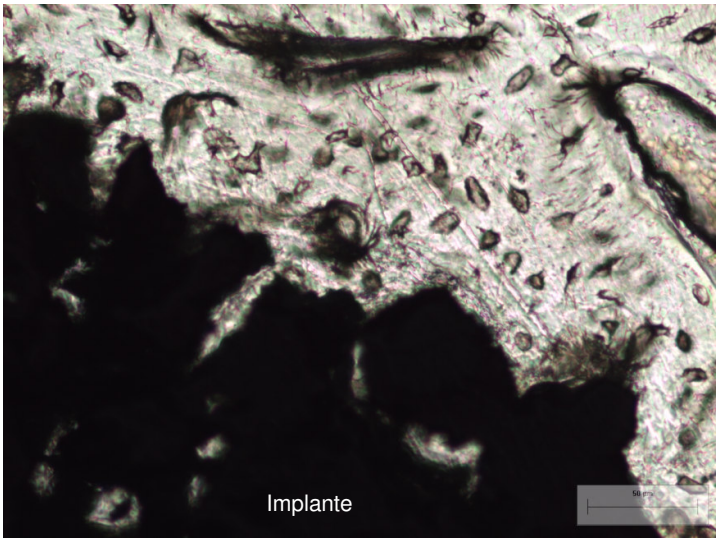
C D

Figura 45. Micrografia da lâmina histológica TM da amostra Liga + 15 %: A e B – diferentes regiões analisadas; C – imagem macro representativa; D – interface osso-implante.

Pelas micrografias de lâminas identificadas por Hematoxilina e Eosina (HE), foi possível analisar nas amostras porosas a região do implante, e observar a formação de tecido ósseo internamente ao material (Figura 46 – A e B). Para as amostras mais porosas foi possível observar a penetração do tecido para o interior do implante em mais de 500 µm em relação à superfície. A caracterização mais detalhada de um osteócito dentro de uma porosidade é possível ser observada na Figura 46-C. Todas essas características comprovam o sucesso da osteointegração.



A B



C

Figura 46. A e B - Micrografia da lâmina histológica HE da amostra Liga + 15 %; C – Micrografia da lâmina histológica sem coloração com a presença de osteócitos dentro dos canais do implante.

Pela análise das imagens obtidas pela técnica de microscopia por fluorescência, foi possível visualizar o crescimento ósseo nas diferentes fases, que acompanharam a administração dos marcadores fluorescentes. Após excitação com comprimento de luz ultravioleta adequado com uso de filtros específicos, são observadas as diferentes colorações para cada marcador em diferentes porções ósseas que cresceram com o tempo de reparação.

As colorações observadas de acordo com cada marcador foram respectivamente: verde para calceína, vermelho para alizarina e magenta ou azul para tetraciclina; a coloração amarela observada é proveniente das áreas de sobreposição onde se encontra calceína e alizarina.

Cada marcador teve sua imagem capturada com um filtro específico em escala monocromática para reduzir o ruído de sinal e aumentar a sensibilidade de se visualizar esse marcador. Posteriormente as imagens foram coloridas digitalmente pelo programa ImagePro Plus conforme a cor apresentada pelo marcador ao ser observado diretamente no microscópio. Com a adição da cor o próprio programa fusiona as imagens que foram capturadas em um mesmo campo com filtros diferentes e forma uma imagem final RGB (*Red-Green-Blue*) como apresentada a seguir.

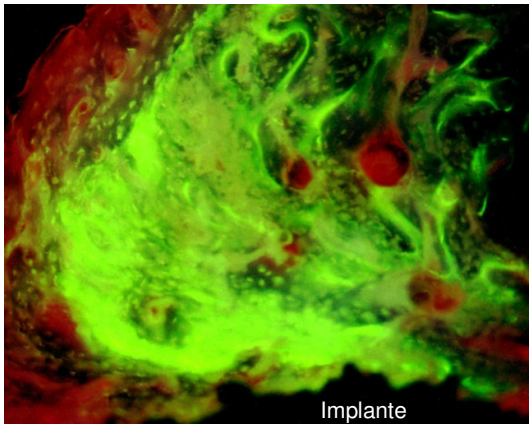
A partir das imagens completas com a apresentação dos três marcadores é possível inferir o período de crescimento com base no marcador ósseo que está presente naquela área específica. O primeiro marcador aplicado foi a calceína e pode ser observado que nas imagens a marcação verde está sempre mais interna e mais próxima do implante, o que denota que esse crescimento foi o primeiro passo para a reparação do tecido ósseo frente ao procedimento cirúrgico e colocação do implante. A coloração vermelha que representa a alizarina é observada ao redor das áreas verdes (calceína) e dentro dessas áreas em algumas imagens, isto por que sendo o segundo marcador a ser aplicado ele abrange uma segunda fase de crescimento dando suporte para a primeira fase que está bem representada pelas áreas verdes.

Com o resultado das junções entre as áreas verdes e vermelhas, devido a adição das cores, foi possível observar a coloração amarela que neste caso indica áreas onde são encontrados os dois marcadores, podendo ser denominadas áreas de transição onde ambos marcadores puderam ser agregados ao tecido em

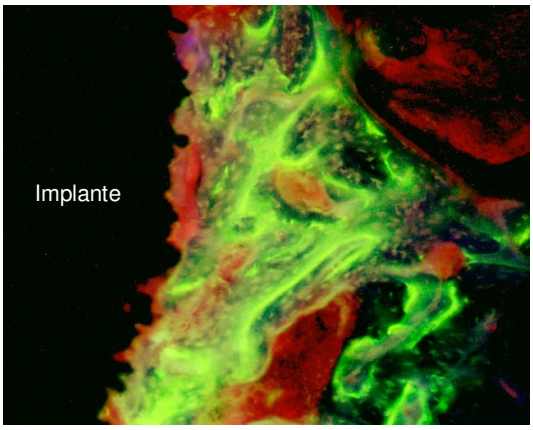
crescimento. Isto também é válido para as áreas amarelas de grande extensão, pois nestas áreas foram agregados os dois marcadores, calceína e alizarina, devido um crescimento mais lento do tecido ósseo.

A marcação com a tetraciclina, em magenta ou azul, quando presente foi muito tênue e é encontrada preferencialmente em áreas marginais ao crescimento ósseo. Isto é explicado não por um defeito de agregação nem por erro na técnica de visualização, mas devido ao alto metabolismo dos ratos. Pela análise das imagens não houve crescimento exuberante nesta fase que foi aplicado o marcador. O remodelamento ósseo, constante, apresentou-se menos intenso em relação as duas fases iniciais representadas pelos marcadores calceína e alizarina. Com o osso mais consolidado houve o impedimento da agregação da tetraciclina que tem grande afinidade pela matriz osteóide (não-mineralizada) [84]. Outro fato que também explica a baixa agregação decorre da maior presença de tecido não mineralizado ser nas primeiras fases da reparação óssea.

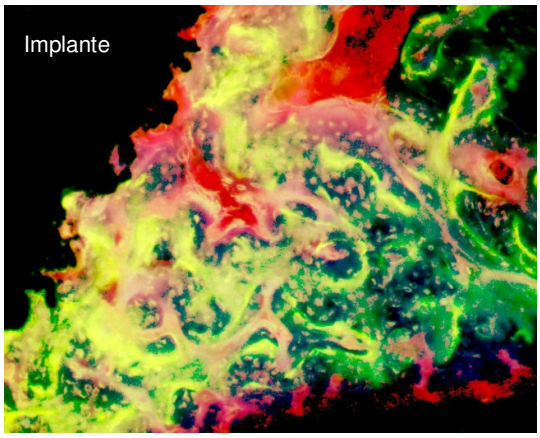
Em relação às amostras porosas, foi possível observar o crescimento de tecido ósseo no interior dos poros e canais interconectados, pela coloração do tecido durante o processo de reparação. Nos implantes porosos, pode ser observado que há a presença da calceína no interior, nas regiões próximas à superfície, período que consistiu na estabilização do implante e do tecido ósseo. Em regiões mais internas dos mesmos implantes, foi observada com maior intensidade a coloração vermelha, representada pela alizarina (Figura 50). Esta fase consiste na condução e penetração do tecido ósseo pelos canais interconectados. Desta forma, é possível concluir o caráter de osteocondução da liga porosa. O tamanho dos poros obtidos pela técnica da MP/gelatina permitiu a nutrição e manutenção necessária para a sobrevivência das células, comprovando que os poros e canais formaram uma rede de alta interconectividade.



A

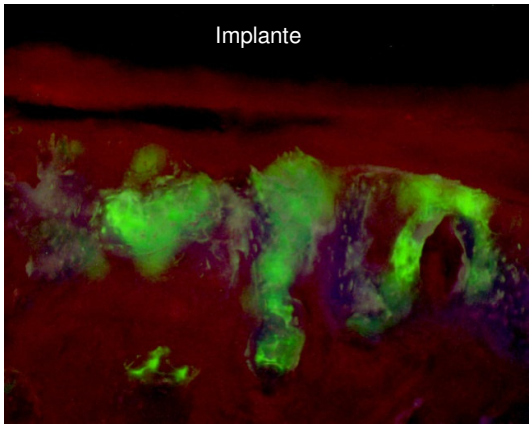


B

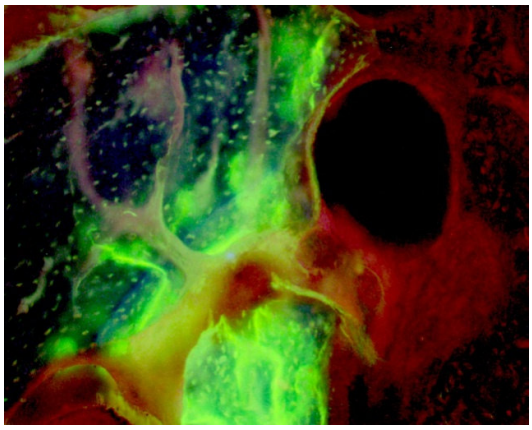


C

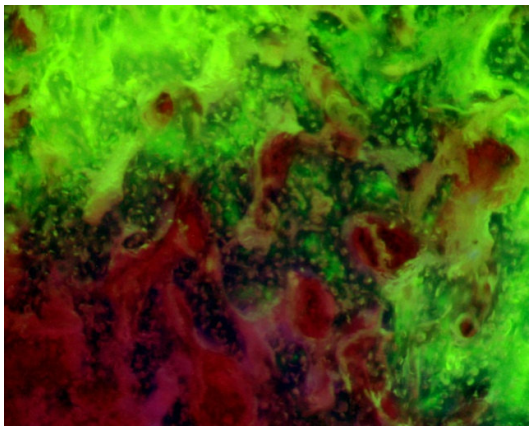
Figura 47. Imagens de Fluorescência do Ticp. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.



A

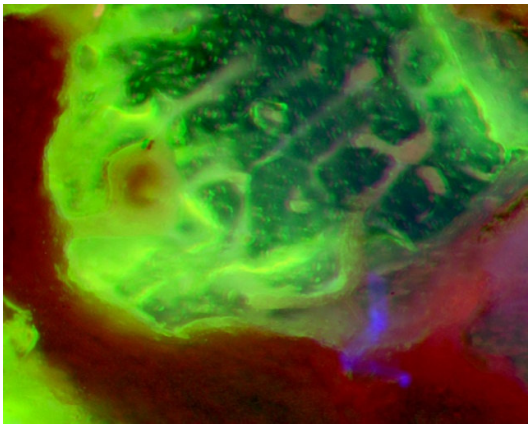


B

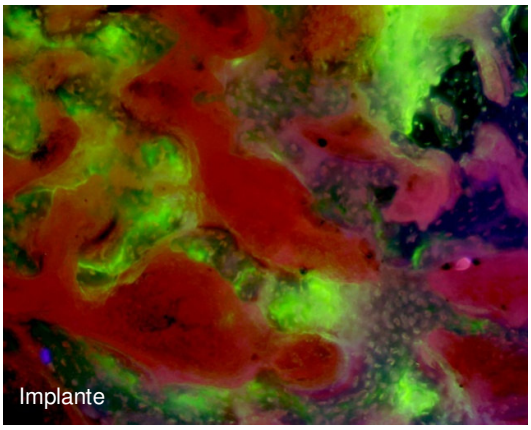


C

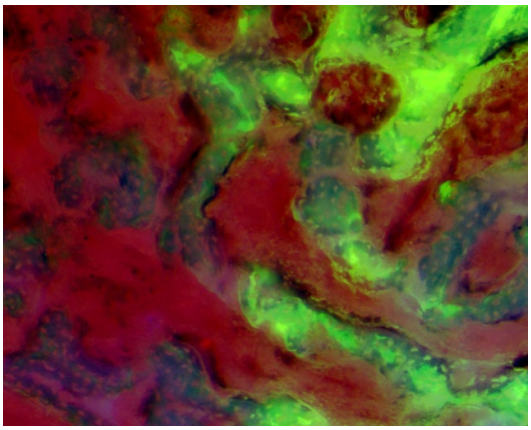
Figura 48. Imagens de Fluorescência do Ticp + 15%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.



A

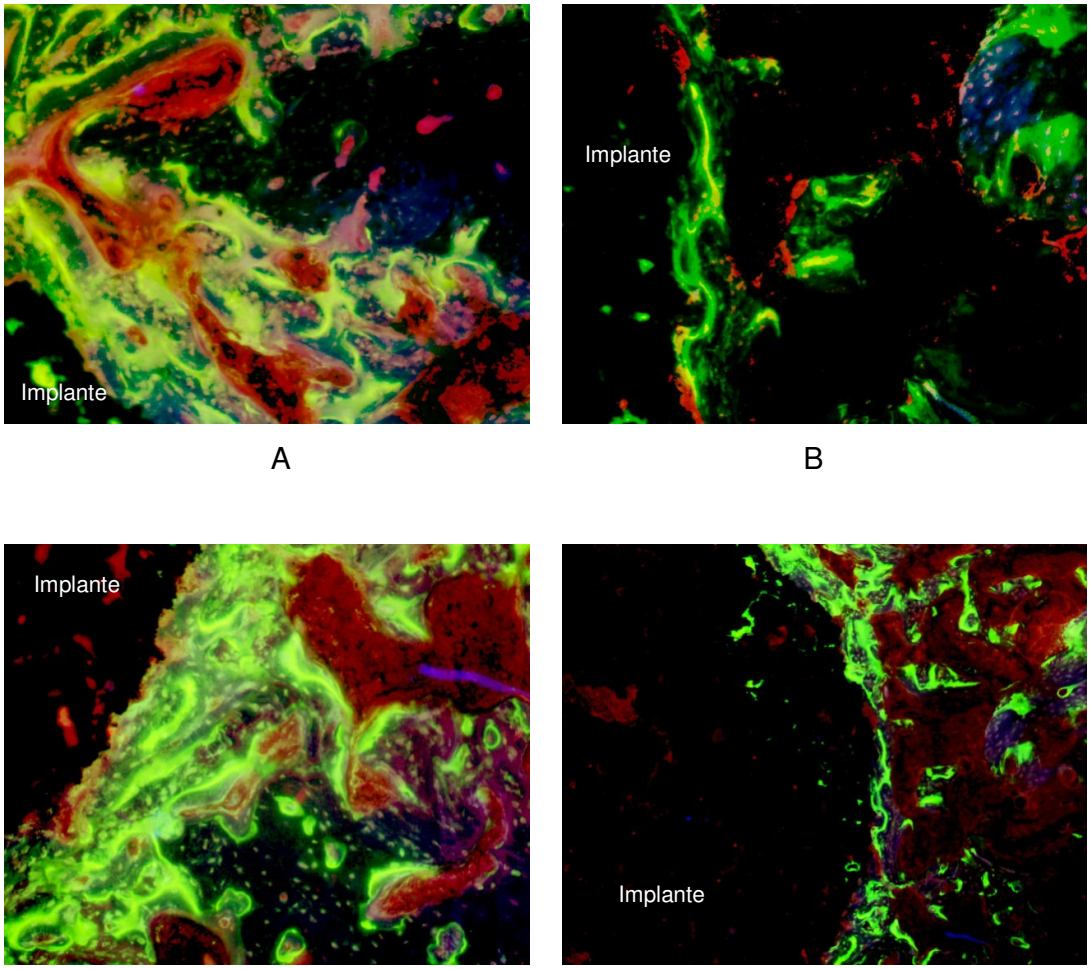


B



C

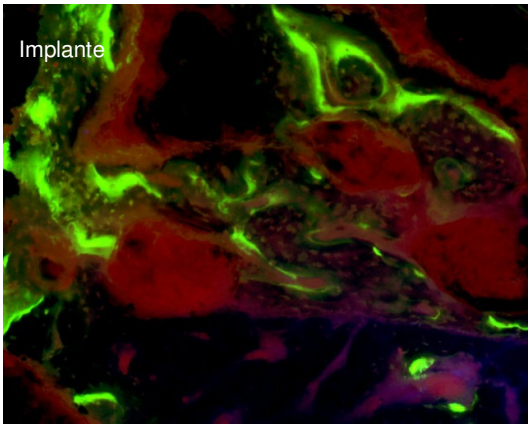
Figura 49. Imagens de Fluorescência da Liga. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.



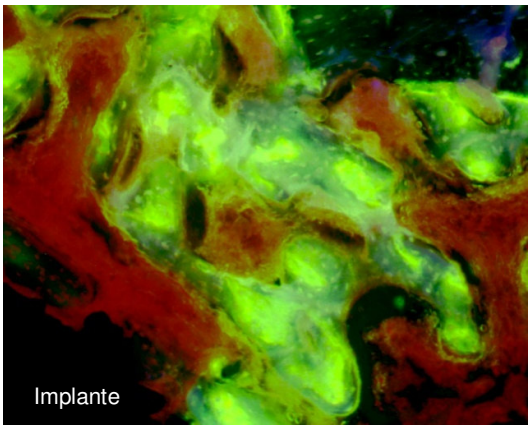
A B

C D

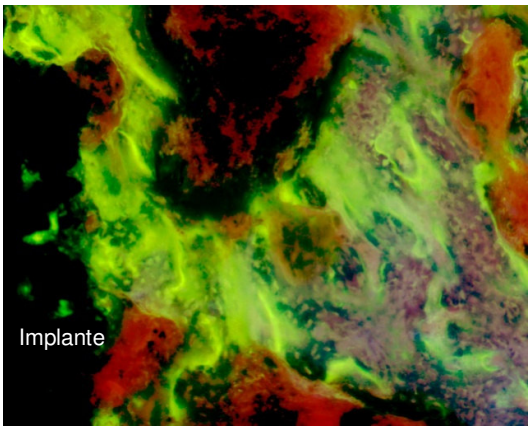
Figura 50. Imagens de Fluorescência da Liga + 5%. A – parte superior, B – parte central, C – parte inferior do implante e D – observação do tecido marcado no interior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.



A

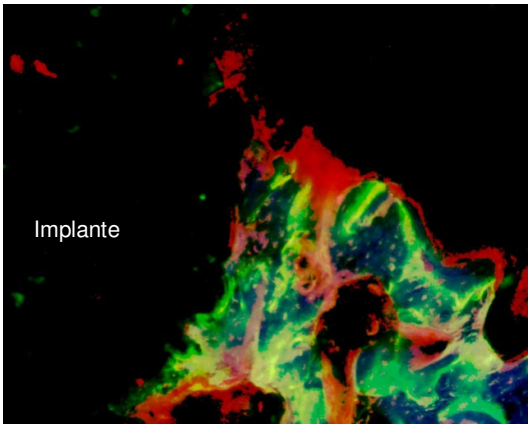


B

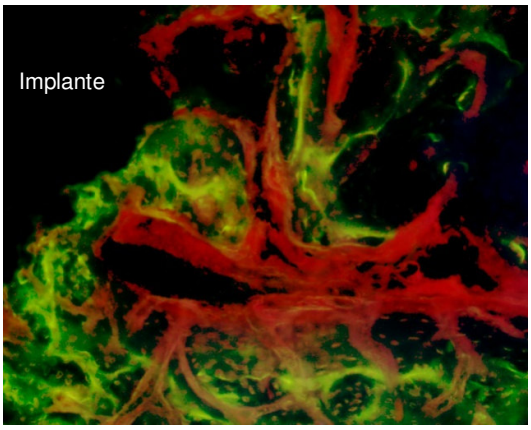


C

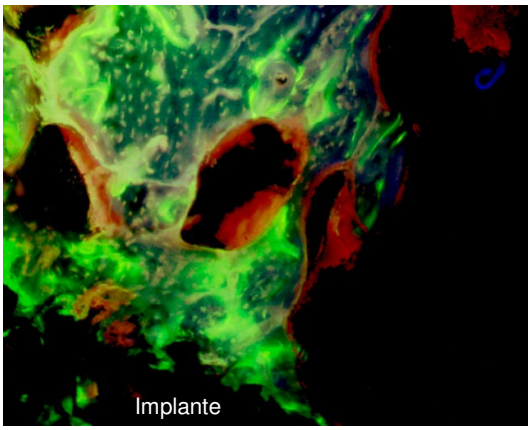
Figura 51. Imagens de Fluorescência da Liga + 10%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.



A



B



C

Figura 52. Imagens de Fluorescência da Liga + 15%. A – parte superior, B – parte central e C – parte inferior do implante. Cor verde – calceína; cor vermelha – alizarina; cor magenta ou azul – tetraciclina; cor amarela – calceína e alizarina.

CONCLUSÕES

Finalizando este estudo, as principais conclusões estão apresentadas neste capítulo

6. CONCLUSÕES

Foi possível obter porosidades variando as concentrações de gelatina no processamento de ligas metálicas porosas.

Durante o processamento por metalurgia do pó para obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr, pelo uso do ciclohexano, foram inicialmente obtidos produtos citotóxicos, que após a sinterização perderam as características de citotoxicidade. A adição de gelatina não apresentou toxicidade ao material, ou seja, as ligas com diferentes graus de porosidade não apresentaram sinais de citotoxicidade. Estes resultados do estudo *in vitro*, viabilizaram iniciar os testes *in vivo* na ordem da caracterização de um biomaterial, segundo as normas ISO-10993 (1993).

Pode ser observado que todas as amostras de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr, apresentaram pela técnica de MP uma superfície irregular, bastante favorável para o conceito de osteointegração do implante.

O tamanho dos poros obtidos pela técnica da gelatina permitiu a nutrição e manutenção necessária para a sobrevivência das células, comprovando que os poros e canais formaram uma rede de alta interconectividade. Desta forma, foi possível concluir o caráter de osteocondução da liga porosa.

7. ANEXOS

Anexo I – Aprovação do comitê de ética em pesquisa para realização dos testes in vivo.

C.E.P. - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ipen

Parecer - Projeto Nº 8/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **AVALIAÇÃO DA OSTEOINTEGRAÇÃO DE LIGAS DE Ti – Nb – Zr POROSAS EM RATOS** de responsabilidade do pesquisador **ANA HELENA DE ALMEIDA BRESSIANI** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 19 de maio de 2006

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP

Anexo II - Protocolo de embutimento para Resina Technovit 9100 NEW (manual traduzido do fabricante)

1) Amostras fixadas em formol (10%) por 30 dias.

2) Desidratação:

a. Álcool 70% - 1 hora
b. Álcool 80% - 1 hora
c. Álcool 96% - 1 hora
d. Álcool 96% - 1 hora
e. Álcool 100% - 1 hora
f. Álcool 100% - 1 hora
g. Álcool 100% - 1 hora
h. Xilol - 1 hora
i. Xilol - 1 hora

3) Preparação da resina:

j. Resina (50%) + Xilol (50%) - 1 hora
k. Resina Normal (200 ml) + Hardener -1 (1g) - 1 hora
l. Resina Ativada (200 ml) + Hardener -1 (1g) - 1 hora em geladeira
m. Solução A - 1 hora em geladeira
    1) PMMA (80g)
    2) Resina Ativada (500 ml)
    3) Hardener – 1 (3~4g)
n. Embutimento + vácuo (10 min) - 48 horas em geladeira
    4) Solução A (9 partes)
    5) Solução B (1 parte)

    OBS: manter em vidro ambar

Anexo III – Protocolo modificado de coloração das lâminas histológicas da FMVZ –USP.

1) Hematoxilina e Eosina (HE)
   a. Álcool 100º durante 3 minutos
   b. Álcool 95º durante 3 minutos
   c. Álcool 70º durante 3 minutos
   d. Água corrente durante 10 minutos
   e. Hematoxilina durante 5 minutos
   f. Água corrente durante 3 minutos
   g. Álcool ácido uma lavagem
   h. Água corrente durante 20 minutos
   i. Eosina durante 2 minuto
   j. Álcool 95º durante 1 minutos
   k. Álcool 100º durante 2 minutos
   l. Álcool 100º durante 2 minutos
   m. Secagem das lâminas no ambiente
   n. Montagem da lamínula com resina

2) Tricrômico de Masson
   a. Álcool 100º durante 3 minutos
   b. Álcool 95º durante 3 minutos
   c. Álcool 70º durante 3 minutos
   d. Água corrente durante 10 minutos
   e. Hematoxilina durante 5 minutos
   f. Água corrente durante 3 minutos
   g. Álcool ácido uma lavagem
   h. Água corrente durante 20 minutos
   i. Fucsina ácida durante 2 minutos
   j. Água corrente durante 3 minutos

k. Colocar em várias trocas de água destilada
l. Solução Fosfotungsca 5% e Ácido Molíbdico 5% (1/1) durante 5 minutos
m. Azul de anilina-acética até corar
n. Água corrente durante 3 minutos
o. Álcool 95º durante 1 minuto
p. Álcool 100º durante 2 minutos
q. Álcool 100º durante 2 minutos
r. Secagem das lâminas no ambiente
s. Montagem da lamínula com resina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] JUNQUEIRA,, L.C.; CARNEIRO, J. ***Histologia básica***. Guanabara Koogan. 8.ed. Rio de Janeiro, Brasil, 1995.

[2] SPENCER, A.P. ***Anatomia humana básica***. Manole. 2.ed. São Paulo, Brasil, 1991.

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

[4] LEMONS, J.E.; BIDEZ, M.W. Edosteal Implant Biomaterials and Biomechanics. ***In: Endosteal Dental Implants.*** McKinney Jr, RV. Sant Luis (Missouri): Mosby, 1991:27-36.

[5] PUELO, D.A.; NANCI, A. Undestanding and controlling the bone-implant interface. ***Biomaterials***, vol. 20, n. 23-24, pp. 2311-2321, 1999.

[6] LEMONS, J.E. Biomaterials, Biomechanics, Tissue Healing, and Immediate-Function Dental Implants. ***J Oral Implantol***, vol. 30, n.5, pp. 318-324, 2004.

[7] COELHO, P.G.; BOTTINO, M.C.; SUZUKI, M. Biomateriales en implantodoncia – Aspectos Físicos, Químicos e Biológicos. In.: ***Implantodoncia Conteporanea***. Todescan, F.F.; Bechelli, A.; Romanelli, H. Artes Médicas, 2005. pp. 497-519.

[8] RAIMONDI, T. The in-vivo wear performance of prothetic femoral heads with titanium nitre coating. ***Biomaterials***, vol. 21, n.9, pp. 907-913, 2000.

[9] GROTH, T.; FALCK, P.; MIETHKE, R-R. Cytotoxicity of Biomaterials – Basic mechanisms and in vitro test methods: a review. ***Alternative to Laboratory animals***, vol. 23, n.6, pp. 790-799, 1995.

[10] ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. ***Biomateriais Fundamentos & Aplicações***. 1ª ed., Cultura Médica, Brasil, 2006.

[11] LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. ***Materials Science and Engineering: R: Reports***, vol. 47, n. 3-4, pp. 49-121, 2004.

[12] FAEDA, S.R.; TAVARES, H.S.; SARTORI, R.; GUASTALDI, E.M.Jr. Avaliação de implantes de titânio com modificações da superfície por ablação a laser. Estudo biomecânico em tíbia de coelhos. ***4º Congresso Latino americano de órgãos artificiais e biomateriais***, Caxambu, Minas Gerais - Brasil, 2006.

[13] GUÉHENNEC, L. L., SOUEIDAN, A., LAYROLLE, P., AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. ***Dental Materials.*** Vol. 23, pp. 844–854, 2007.

[14] SADEGH, A.M.; LUO, G.M.; COWIN, S.C. Bone ingrowth an application of the boundary element method to bone remodeling at the implant interface. ***Journal of Biomechanics.*** Vo. 26, nº 2, pp. 167-182, 1993.

[15] HULBERT, S.F.; YOUNG, F.A.; MATHEWS, R.S.; KLAWITTER, J.J.; TALBERT, C.D.; STELLING, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. ***J Biomed Mater Res***, vol. 4, n. 3, pp. 433-56, 1970.

[16] ITÄLA, A.I.; YLANEN, H.O.; EKHOLM, C.; KARLSSON, K.H.; ARO, H.T. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits. ***J Biomed Mater Res***, vol. 58, n. 6, pp. 679-683, 2001.

[17] KUJALA, S. ***Biocompatibility and biomechanical aspects of nitinol shape memory metal implants***. Academic dissertation. University of Oulu, oulu, 88 páginas, 2003.

[18] RYAN G, PANDIT A, APATSIDIS DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. ***Biomaterials***, Review. Vol. 27, n. 13, pp. 2651-70, 2006.

[19] TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; SUZUKI, J.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. ***Biomaterials,*** vol. 26, n. 30, pp. 6014-6023, 2005.

[20] CACHINHO, S.C.P. ***Titânio macroporoso para osteointegração – replicação inversa de esponjas poliméricas***, Tese de Mestrado, DECV/Universidade de Aveiro, Portugal, 2006.

[21] BOTTINO, M.C.M. ***Estudo da osteointegração da Liga Ti-13Nb-13Zr obtida por metalurgia do pó com diferentes graus de porosidades***. Tese de mestrado. IPEN, São Paulo, 127 páginas, 2005.

[22] LANDI, E.; VALENTINI, F.; TAMPIERI, A. Porous hydroxyapatite/gelatine scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications. ***Acta Biomaterialia.*** Vol. 4 , nº 6 , pp.1620 – 1626, 2008.

[23] PANZAVOLTA, S.; FINI, M.; NICOLETTI, A.; BRACCI, B.; RUBINI, K.; GIARDINO, R.; BIGI, A. Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed α-tricalcium phosphate. ***Acta Biomaterialia.*** In Press, Available online 10 September 2008.

[24] COLLIER, J.P.; COLLIGAN, G.A.; BROWN, S.A. Bone ingrowth into dynamically loaded porous-coated intramedullary nails. ***J Biomed Mater Res***, n. 7, pp. 485-492, 1976.

[25] MOYEN, B.J.; LAHEY, P.J.JR.; WEINBERG, E.H.; HARRIS, W.H. Effects on intact femora of dogs of the application and removal of metal plates. ***J Bone Join Surg Am***, vol. 60, n. 7, pp. 940-947, 1978.

[26] DUJOVNE, A.R.; BOBYN, J.D.; KRYGIER, J.J.; MILLER, J.E.; BROOKS, C.E. Mechanical compatibility of noncemented hip protheses with the human femur. ***J Arthroplasty***, vol. 8, n.1, pp. 7-22, 1993.

[27] HENRIQUES, V.A.R.; GALVANI, E.T., TADDEI, E.B.; BRESSIANI, J.C.; CAIRO, C.A.A. Obtenção de amostras da liga Ti-13Nb-13Zr com porosidade controlada. ***4º***

Congresso Latino americano de órgãos artificiais e biomateriais, Caxambu, Minas Gerais - Brasil, 2006.

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

[29] SEMIATIN, S.L.; SEETHARAMAN, V. WEISS, I. The thermomechanical processing of alpha/beta titanium alloys. ***Journal of Metals***, vol. 49, pp. 33-39, 1997.

[30] GOODMAN, S.B.; DAVIDSON, J.A.; FORNASIER, L.V.; MISHRA, A.K. Histological response to cylinders of low modulus titanium alloy (Ti-13Nb-13Zr) and a wear-resistant zirconium alloy (Zr-2,5Nb) implanted in the rabbit tibia. ***Journal of Applied Biomaterials***, vol. 4, pp. 331-339, 1993.

[31] DAVISON, J.A.; MISHRA, A.K.; KOVACS, P.; POGGIE, R.A. New surface hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloy for total hip arthroplasty. ***Bio-medical Materials and Engineering***, vol.4, pp. 231-243, 1994.

[32] YU, S.Y. & SCULLY, J.R. Corrosion and passivity of Ti-13Nb-13Zr in comparison to other biomedical implant alloys. ***Corrosion***, vol. 53, n.12, pp. 965-976, 1997.

[33] SCHNEIDER, S.G. ***Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial***. Tese de doutoramento. Instituição de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo, 141 páginas, 2001.

[34] GEETHA, M.; MUDALI, U.K.; GOGIA, A.K.; ASOKAMANI, R.; RAJ, B. Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy. ***Corros Sci***, vol. 46, n. 4, pp. 877-892, 2004.

[35] SPENCER, A.P. ***Anatomia humana básica***. Manole. 2.ed. São Paulo, Brasil, 1991

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

[37] WATKINS, J. ***Estrutura e função do sistema musculoesquelético***. Porto Alegre, Art Med, 2001.

[38] SCHWARTSMANN, C.; TELÖKEN, O.L,M. ***Fraturas: princípios e práticas***. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.

[39] SCHNEIDER,V.;OGANOV, V.; LeCLANC, A.; KAKMONOV, A.; TAGGART,L.; BARULIN, A.; HUNTOON, C.; GRIGORIEV, A.; VARONIN, L. ***Bone and body mass changes during space flight***. Acta Astronautica,. Vol. 36, nº 8-12, pp. 463-466, 1995.

[40] SALTER, R.B. ***Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético***. 3ª Ed. Rio de Janeiro, RJ. Editora Médica e Científica, 2001.

[41] SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Biomaterials and bone mechanotransduction. ***Biomaterials***, vol. 22, pp. 2581-2593, 2001.

[42] COWIN, S.C. ***Bone mechanics handbook***. CRC Press, 2nd Edition, 2000.

[43] MISCH, C.E. ***Implantes Dentários Contemporâneos***. Editora Santos, 2ª edição – 2000.

[44] SOUZA, G.F.M. ; ANDRADE, E.S.S.; MIRANDA, J.L.; ALVES, R.D.; PINTO, L.P.; ALMEIDA, D. Abordagem imunológica da cárie dental. ***PGR-Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos***, v.4, n.2, maio/ago. 2001.

[45] RAVAGLIOLO, A.; KRAJEWSKI, A. ***Bioceramics: Materials. Properties. Applications***. Editora Springer, 1 ed., 1991.

[46] CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. ***Células: uma abordagem multidiciplinar***. Editora Manole, 2005.

[47] WISE, D.L.; TRANTOLO, D.J.; ALTOBELLI, D.E.; YASZEMSKI, M.J.; GRESSER, J.D. ***Human biomaterials applications***. Human press, Totowa, New Jersey, 1996.

[48] RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, L.E. ***Biomaterials Science an introduction to materials in medicine***. Academic Press, 1ed., 1996.

[49] BASTOS, C.A.S. ***Estudo da interface Ti-6Al-4V/TiO2 por microscopia electrónica de varrimento***. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2000.

[50] BLACK, J. ***Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility.*** Marcel Dekker, Inc., Second edition, 1992.

[51] WAN DER WAL, E. ***Bioactivity and surface reactivity of RF-spattered calcium phosphate thin films.*** Tese de doutorado. Universiteit Utrecht, 2003.

[52] KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. ***Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease***. Editora Saunders, 7 ª ed, 2004.

[53] NIINOMI, M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. ***Science and Technology of Advanced Materials***. vol. 4, pp. 445-454, 2003.

[54] VAQUILA, I.; VERGARA, L.I.; PASSEGGI, M.C.G.; VIDAL, R.A.; FERRÓN, J. Chemical reactions at surfaces: titanium oxidation. ***Surface & Coatings Technology***. vol.122, pp. 67-71, 1999.

[55] CALLISTER, W.D.Jr. ***Ciência e Engenharia de materiais: uma introdução***. Editora LTC, Rio de Janeiro – RJ. 5ª edição. 2002.

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

[57] MÜLLER, F.A., BOTTINO, M.C., MÜLLER, L., HENRIQUES, V.A.R., LONHBAUER, U., BRESSIANI, A.H.A, BRESSIANI, J.C. ***In vitro apatite formation on chemically treated (P/M) Ti-13Nb-13Zr***. Dental Mater. Vol. 24, n. 1, pp. 50-56, 2008.

[58] LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. ***Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications***. Materials Science and Engineering: R: Reports, vol. 47, n. 3-4, pp. 49-121, 2004.

[59] BORGIOLI, F.; GALVANETTO, E.; GALLIANO, F.P.; BACCI, T. Air treatment of pure titanium by furnace and glow-discharge processes. ***Surface & Coatings Technology***. vol. 141, pp. 103-107, 2001.

[60] CONFORTO, E.; ARONSSON, B.O.; SALITO, A.; CRESTOU, C.; CAILLARD, D. Rough surfaces of titanium and titanium alloys for implants and prostheses. ***Materials Science and Engineering***. Vol. C24, pp. 611-618, 2004.

[61] BRAMA, Y.L.; SUN, Y.; DANGETI, S.R.K.; MUJAHID, M. Response of sputtered titanium films on silicon to thermal oxidation. ***Surface & Coatings Technology***. Vol.195, pp. 189-197, 2005.

[62] KRISHNA, D.S.R.; SUN, Y. Thermally oxidised rutile-TiO_2 coating on stainless steel for tribological properties and corrosion resistance enhancement. ***Applied Surface Science***. Vol. 252, pp. 1107-1116, 2005.

[63] CACCIAFESTA, P.; HALLAM, K.R.; WATKINSON, A.C.; ALLEN, G.C.; MILES, M.J.; JANDT, K.D. Visualisation oh human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness. ***Surface Science***. Vol.491, pp. 405-420, 2001.

[64] FELLER, C. ***Atualização na clínica Odontológica***. Editora Artes Médicas, São Paulo – SP. 22 edição, 1998.

[65] LEGEROS, R.Z.; CRAIG, R.G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. ***J Bone Miner Res***. Dec;8 Suppl 2:S583-96, 1993.

[66] AVERY, J.K. ***Desenvolvimento e Histologia Bucal.*** Editora Santos, 3 ed., 2005.

[67] LI, J.P.; LI, S.H.; de GROOT, K.; LAYOROLLE, P. Preparation and characterization of porous titanium. ***Key Engineering Materials***, vol. 218-220, pp. 51-54, 2002.

[68] WEN, C.E.; YAMADA, Y.; SHIMOJIMA, K.; CHINO, Y.; ASAHINA, T.; MABUCHI, M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine***. Vol.13, pp. 397-401, 2002.

[69] ST-PIERRE, J.P.; GAUTHIER, M.; LEFEBVRE, L.P.; TABRIZIAN, M. Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. ***Biomaterials***. Vol. 26, pp. 7319-7328, 2005.

[70] LI, J.P.; LI, S.H.; BLITTERSWIJK, C.A.V.; GROOT, K. A novel porous Ti6Al4V: characterization and cell attachment. ***Journal of Biomedical Materials Research***. Vol. 73A, pp. 223-233, 2005.

[71] ASTM C20-00. Standard test methods for apparent porosity, water absorption, apparent specific gravity, and bulk density of burned refractory brick and shapes by boiling water.

[72] Informações retirada do site em 01/01/2008: http://www.cobea.org.br/index.php

[73] Imagem retirada do site em 21/01/2008:
http://www.baa.duke.edu/companat/BAA_289L_2004/Hip_and_leg/Rat/ratthigh.htm

[74] HENRIQUES, V.A.R; SILVA, C. R. M. DA; BRESSIANI, J. C. Utilização de técnicas de Metalurgia do Pó (M/P) na Obtenção da Liga Ti-13Nb-13Zr. ***Revista Metalurgia e Materiais***, vol. 59, nº 532, abril 2003.

[75] TADDEI, E.B.; HENRIQUES, V.A.R.; SILVA, C.R.M.; CAIRO, C.A.A. Production of a new Titanium Alloy for Orthopedic Implants. ***Materials Science and Engineering C***, vol. 24, n. 5, pp. 683-687, 2004.

[76] BRAGA, N.A.; FERREIRA, N.G. Obtenção de titânio metálico com porosidade controlada por metalurgia do pó. ***Quim. Nova***. Vol.30, n. 2, pp. 450 – 457, 2007.

[77] MELLO, G.M.R. ***Efeito de elementos betagênicos na estabilidade de fases e propriedades de ligas de titânio para implantes ortopédicos***. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, SP: [s.n.], 2004.

[78] EISENBARTH, E.; VELTEN, D.; MULLER, M.; THULL, R.; BREME, J. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. ***Biomaterials***, vol.25, n. 26, pp.5705-5713, 2004.

[79] HENRIQUES, V.A.R.; CAMPOS, P.P. de. Production of titanium alloy for advanced aerospace systems by powder metallurgy. ***Materials Research***, vol. 8, nº 4, 443-446, 2005.

[80] ELLINGSEN, J.E; LYNGSTADAAS, S.P. Bio-Implant Interface. ***CRC Press***, pp. 448, 2003.

[81] ATKINS, P.; JONES, L. ***Princípios de química***. São Paulo: Artmed Editora L,tda, pp.851, 2002.

[82] QUAGLIANO, V.J.; VALLARINO, M. L. ***Química***. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 801, 1973.

[83] SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, A.H.; BRESSIANI, J.C.; MESEGUER, L.O.; KONIG JR.B. In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. ***Journal of Biomedical Materials Research***, v.62, n.4, p.587-592, 2002.

[84] Informações retiradas do site em 15/09/2008:

http://pathology2.jhu.edu/bonelab/4cycline.htm