

**CLAUDIA CRISTIANE CAMILO**

**Implantes de alumina em gradiente funcional de porosidade recobertos com  
hidroxiapatita e biovidro: avaliação da osseointegração**

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Projeto.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

**São Carlos  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

C183i Camilo, Claudia Cristiane  
Implantes de alumina em gradiente funcional de  
porosidade recobertos com hidroxiapatita e biovidro :  
avaliação da osseointegração / Claudia Cristiane Camilo;  
orientador Carlos Alberto Fortulan. -- São Carlos, 2010.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Mecânica e Área de Concentração em Projeto) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São  
Paulo, 2010.

1. Alumina. 2. Cerâmica com gradiente funcional.  
3. Cisalhamento interfacial. 4. Implante ósseo.  
5. Implante bucomaxilofacial. 6. Histologia. I. Título.

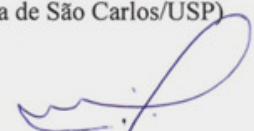
**FOLHA DE JULGAMENTO**

Candidato: Fisioterapeuta CLAUDIA CRISTIANE CAMILO.

Tese defendida e julgada em 26.10.2010 perante a Comissão Julgadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO FORTULAN** – (Orientador)  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

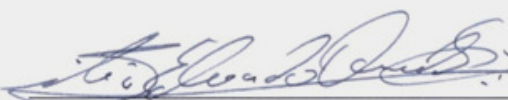
Aprovada

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **BENEDITO DE MORAES PURQUERIO**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

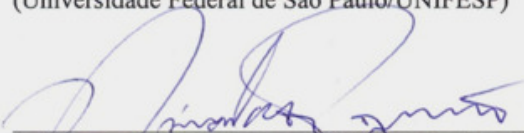
Aprovada

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Titular **CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA**  
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

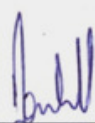
Aprovada


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **SILVIO EDUARDO DUAILIBI**  
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

Aprovada

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **NIVALDO ANTÔNIO PARIZOTTO**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Associado **JONAS DE CARVALHO**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Mecânica

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**  
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC



À minha família,

...minha filha Maria Clara,

...minha mãe, Dulcenea

...meu pai Antônio,

...minhas irmãs Jacqueline e Elizangela...

Sinônimo de simplicidade, diálogos,  
respeito á individualidade, afeto, união,  
amor recíproco!...



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida e por ser justo e bom e por não nos abandonar em tempo algum...

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Fortulan pela orientação desta pesquisa pelos ensinamentos e dedicação em todas as etapas deste trabalho. Por direcionar-me em diversos momentos com seu conhecimento. A atenção, o conhecimento e o empenho dispensados pelo Professor Fortulan, para seus orientandos, são verdadeira inspiração para quem está em processo de formação acadêmica.

Ao Professor Titular Benedito de Moraes Purquerio pela co-orientação, participação, colaboração durante este trabalho, pelos ensinamentos e também pela amizade.

Ao Professor Titular Nivaldo Antônio Parizotto do Dep. de Fisioterapia da UFSCar pela co-orientação e auxílio durante esta pesquisa, por disponibilizar seu tempo e seu conhecimento para o planejamento e análises do estudo *in vivo*, por esclarecer minhas dúvidas todas as vezes que foram necessárias.

Aos colegas Renata Neves Granito, Paulo Bossini, Renan Fangel do Lab de Eletrotermofoterapia do Dep. de Fisioterapia da UFSCar e Adriana Takeuchi da EESC – USP pela colaboração durante os estudos *in vivo*.

Ao Prof. Dr. João Manoel Domingos de Almeida Rollo por dispensar seu tempo com esclarecimentos sobre diversas partes deste trabalho, também pela colaboração e por disponibilizar a utilização do Laboratório de Transformação de Fases localizado no Dep. de Materiais da EESC-USP e do biotério da bioengenharia para estudo piloto com coelhos.

Ao Biólogo Nelson Ferreira da Silva Jr. pela colaboração no estudo piloto com animais.

À Professora Titular Dra. Cecília A. Zavaglia, pois de forma elementar, engrandece com seu conhecimento diversos estudos em biomateriais.

Aos Professores Dr. Silvio Eduardo Duailibi e a Dra. Mônica Talarico Duailibi pela gentileza em receber-me no Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do CTCMol (Centro de Terapia Celular e Molecular) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e também por colaborarem com a radiologia.

Ao Professor Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. da Universidade Federal do ABC – Centro de Ciências Naturais e Humanas, pela parceria e colaboração formada com nossa equipe. Pelo suporte e auxílio no estudo *in vivo* e histológico desta pesquisa.

À Professora Dra. Vanda Jorgetti do Lab. de Osteodistrofia Renal - FMUSP por oferecer seu tempo e seu conhecimento nos procedimentos histológicos deste trabalho. Agradeço, também a funcionária Meire pelo auxílio indispensável.

À Professora Dra. Suzana B. Veríssimo de Mello do Lab. de Fisiopatologia da Inflamação (FMUSP), e sua equipe a Bióloga Maria Aurora Gomes da Silva, Maria de Fátima Almeida, Celey Ap. Eugenio Silveira, ao Biólogo Antonio dos Santos Filho pela colaboração e auxílio, de todos, durante os procedimentos *in vivo* na Fase 2 desta pesquisa.

Agradeço a dedicação da amiga Celey Ap. Eugenio Silveira da FMUSP durante as cirurgias.

À Professora Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira e à Bióloga Valéria de Falco Caparbo do Laboratório de metabolismo ósseo - FMUSP - pela colaboração e auxílio durante os procedimentos *in vivo*.



À Professora Dra. Ana Claudia Muniz Rennó por permitir a minha colaboração durante estágio docente em suas disciplinas. Agradeço também o suporte nos procedimentos histológicos desta pesquisa. Agradeço ao pesquisador Leonardo Parreira (UNIFESP – Baixada Santista) pela colaboração nos procedimentos histológicos.

Ao Professor Elcio Marcantonio Jr. e Rafael Faeda da UNESP – Araraquara - pelo auxílio durante a microtomia desta pesquisa.

Aos Funcionários do Departamento de Materiais da EESC – USP, Eliezer Dias Francisco (Tico), José Silvano C Lima, Ricardo Gomes Pereira, ao João Jerônimo Bernardi e ao Pedro Luiz Di Lorenzo, pelo suporte técnico, treinamentos para utilização dos equipamentos para ensaios e preparo de amostras para MEV.

À José Carlos Risardi do Laboratório de Processos de Fabricação – EESC – USP, pelo empenho na manufatura dos moldes utilizados, pela colaboração em diversos procedimentos desta pesquisa e pela amizade.

Ao funcionário Luiz Penazzi do Laboratório de Tribologia e Compósitos, pelo auxílio técnico sempre que necessário.

À Márcio de Paula do IQSC, pelo auxílio com a Microscopia Eletrônica de Varredura e *Line scan*

À César A. M. Pereira do Laboratório de Biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) – HC – FMUSP, pelo auxílio e colaboração nos primeiros ensaios biomecânicos.

À Lourdes Cristina de Albuquerque Haach e à Camila Roberta Meira pela amizade e colaboração em diversos momentos deste trabalho.

À Alexandre Margarido pelo suporte indispensável durante a usinagem dos pinos.

Aos Colegas do Laboratório de Tribologia e Compósitos Cassius Riul, Thaís Helena S. Souza, Renan Botega, Lucas E. Soeira, Karen, Alexandre Margarido e Edeldo S. Antunes. E às Professoras Dra. Luciana Montanari e Professora Dra.Zilda de Castro Silveira– EESC – USP.

Aos amigos José Claudio P. Azevedo e Edson M. Gruppioni do Departamento de Aeronáutica - EESC-USP - pela colaboração e amizade.

Aos funcionários da secretaria de graduação e da secretaria de pós-graduação Ana Paula B. Bardelotte, Patrícia L. Morita e Iara do Dep. de Eng. Mecânica da EESC – USP, pelo auxílio durante o período da Pós-graduação.

Às amigas Carolina R. Rodrigues e Lie Yamanaka, pelo apoio e amizade.

À minha família...

...minha filha Maria Clara, por ser um presente de Deus e por distribuir alegria, amor, carinho...;

...à minha mãe Dulcenea Souza Camilo e meu pai Antônio José Camilo Jr, minhas irmãs Elizangela Camilo e Jacqueline Souza Camilo, pelo apoio, carinho e amor. Por fornecerem proteção, amor e por doarem-se em todos os momentos.

Ao apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação - BIOFABRIS - (Processo 573661/2008-1) edital nº.15/2008. E também ao apoio da Rede Ibero Americana de Biofabricação.

À CAPES pela concessão do projeto Pró Engenharias nº PE 0652008 481500/2007-3 pelo financiamento de Insumos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.



...se um pensamento está ligado às boas intenções, por traz dele haverá sempre uma sugestão Divina!

(Narcisa)

## RESUMO

CAMILO, C.C. (2010). **Implantes de alumina em gradiente funcional de porosidade recobertos com hidroxiapatita e biovidro**: avaliação da osseointegração. 197 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Esta pesquisa tem como finalidade desenvolver implantes de alumina com núcleo denso e superfície gradualmente porosa (FGM) recobertos com materiais bioativos - hidroxiapatita e biovidro. Materiais porosos são estudados como solução para a osseointegração, porém apresenta déficit nas suas propriedades mecânicas. Estruturas bifásicas foram desenvolvidas por pesquisadores com o propósito de promover crescimento tecidual, sem afetar significativamente sua propriedade mecânica, no entanto ocorre delaminação. Neste trabalho é proposta uma estrutura em gradiente funcional que visa aprimorar as propriedades mecânicas conjugadas com a sinalização celular e com integração óssea. O tamanho, a morfologia de poros e também a porosidade são parâmetros fundamentais para boa resposta tecidual e integração do implante, pois afetam a viabilidade e a afinidade celular. Para essa finalidade a busca por uma espessura efetiva de porosidade se faz fundamental para alto desempenho do implante. Peças de alumina porosas infiltradas com materiais bioativos foram fabricadas e estudadas *in vivo*, em tíbias de ratos da raça *Wistar* durante 14, 18, 21 e 28 dias, para investigar a qualidade do crescimento de tecido ósseo. O estudo com implantes porosos recobertos foi realizado para avaliar e padronizar a superfície porosa do gradiente funcional. Os animais foram analisados com densidade mineral óssea (DMO), as tíbias foram caracterizadas na interface osso-implante e nos poros com histologia, com *EDS-line-scan*, com radiografias e com ensaios de cisalhamento. Implantes de alumina com 70% de porosidade foram comparados com recobrimento bioativo e sem recobrimento *in vivo* e *ex-vivo*. Nos resultados, os implantes recobertos aceleram o processo de osseointegração. Essa característica foi mais evidente no período de 28 dias de implantação com aumento de 24% na tensão de cisalhamento. Após validar uma superfície porosa e osseointegrável para a superfície do gradiente funcional, foram aplicadas técnicas diferenciadas para manufaturar peças com núcleo denso e superfície com gradiente de porosidade. As peças com FGM foram manufaturadas com a utilização de duas técnicas, *dipping* e co-prensagem e foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura. Com o método de manufatura de co-prensagem foram obtidas peças com superfície gradualmente porosa, com transição de densificação contínua, sem delaminação. Os implantes de alumina em gradiente funcional com 70 % de porosidade na superfície mais externa, recobertos por bioativos apresentam potencial para aplicações em implantes ósseos ou dentários.

**Palavras-chave:** Alumina. Material com gradiente funcional. Cisalhamento interfacial. Implante ósseo. Implante Buco-maxilo-facial. Histologia.

## ABSTRACT

CAMILO, C.C. (2010). **Alumina implants with functional gradient of porosity coated with hydroxyapatite and bioactive glass**: evaluation of osseointegration. 2010. 197 p - Thesis (Doctorate) - School of Engineering of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Sao Carlos, 2010.

The present thesis reports on the development of alumina implants with dense core and gradually porous surface (FGM) covered with bioactive materials, hydroxyapatite (HA) and bioactive glass. Porous materials have been studied to provide tissue ingrowth, however they strongly affect the mechanical properties of the implant. Biphasic structures have been developed by some researchers to promote tissue growth without affecting the mechanical properties, although delamination may occur. This study proposes a functional gradient structure to improve both the mechanical properties of the material and cell signaling. The size and morphology of the pores as well as their porosity are key parameters for good tissue response and implant integration, since they affect the viability and cell affinity, and an effective porosity thickness becomes essential for a high performance of the implant. Porous alumina implants coated with bioactive materials were fabricated and studied *in vivo* in rat tibia for 14, 18, 21, and 28 days to investigate the quality of bone tissue growth. The study of porous coated implants was performed to evaluate and standardize the porous surface of the functional gradient. The animals were examined with bone mineral density (BMD), the tibias were characterized in the bone-implant interface and the pores were analyzed with histology, EDS line-scan, X-ray and shear tests. Alumina with 70% porosity was compared with and without bioactive coating *in vivo* and *ex vivo*. The results showed that the covered implants accelerated the osseointegration process. This characteristic is more evident within 28 days of deployment with a 24% increase in shear stress. After validating a porous and osteointegrated surface for the surface of the functional gradient, several techniques were applied to manufacture parts with dense core and surface with gradient of porosity. The pieces were manufactured with FGM using two techniques, dipping and co-pressing and were analyzed by scanning electron microscopy. The manufacturing method of co-pressing allowed obtaining pieces with gradually porous surface and continuous transition of densification without delamination. On the outermost surface, alumina implants with functional gradient and 70% porosity and coated with bioactive materials presented potential for application to bone or dental implants.

**Keywords:** Alumina. Functional gradient materials. Push-out tests. Bone implants. Bucco-maxillo-facial implants. Histology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** - Manufatura e caracterizações dos implantes porosos e em gradiente funcional. Foram preparadas duas barbotinas, uma para manufaturar as matrizes dos implantes em alumina e outra em materiais bioativos para recobri-las. Foi utilizada a sacarose como material formador de poros. A compactação do pó foi realizada em prensa isostática ..... 49
- Figura 3.2** – Barbotina de Alumina após a moagem ..... 53
- Figura 3.3** – Molde metálico utilizado para conformar os implantes em alumina porosa em formato cilíndrico ..... 53
- Figura 3.4** – Desenho dos implantes porosos cilíndricos, com as extremidades hemisféricas, exigência da ASTM F 981-04. Dimensões em mm..... 54
- Figura 3.5** – Desenho da inserção do implante ao osso. O defeito foi realizado em uma cortical óssea ..... 63
- Figura 3.6** – Imagem de uma tíbia preparada para o ensaio biomecânico, a cortical contralateral a inserção do implante foi removida para expor a face do implante a ser empurrada. A seta branca indica a cortical do osso, a seta cinza indica o implante..... 66
- Figura 3.7** – (A) Desenho do dispositivo para teste de cisalhamento. (B) Setas brancas indicam a tíbia posicionada no dispositivo durante teste ..... 66
- Figura 3.8** – Tíbia após o período experimental com o implante. Amostras embutidas em PMMA para formar o bloco para microtomia. Setas brancas indicam o PMMA. Setas pretas indicam a tíbia. Setas cinzas indicam o implante..... 68
- Figura 3.9** – Interface gráfica do *software Image Tool for Windows 3.0 (UTHSCA)*, utilizado para a análise de escala de tons de cinza das radiografias..... 72
- Figura 3.10** – *Line-scan* da interface osso-implante. Os elementos químicos sob a linha traçada foram identificados..... 74
- Figura 3.11** – Fluxograma da Técnica (A). Nessa técnica os pinos foram imersos em barbotina de alumina com formador de poros (sacarose) ..... 76
- Figura 3.12** – Fluxograma da Técnica (B), ou co-prensagem. Nessa técnica o pó de alumina “denso” e o pó de alumina com formador de poros foram co-prensados na isostática. Após a secagem da barbotina no molde adiciona-se o pó “denso” e faz-se a co-prensagem seguida de sinterização. Houve modificações nos moldes e na secagem da barbotina até a obtenção das peças em gradiente funcional.....77
- Figura 3.13** – Molde para prensagem isostática do corpo-de-prova em (A): Ilustração do molde; em (B): Ilustração do Molde para fabricação da camisa de silicone, ao centro a camisa moldada, a seta branca indica o pino. Com região útil..... 78
- Figura 3.14** – Desenho do pino dentário realizado em CAD..... 80
- Figura 3.15** – Implante dentário e projeto das etapas de usinagem ..... 81
- Figura 4.1** – Imagem de MEV – EDX, da região central de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra ..... 84
- Figura 4.2** – Imagem de MEV – EDX, da borda mais externa do implante de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra..... 85
- Figura 4.3** – Imagem de MEV – EDX da região intermediária entre o centro e a borda do implante de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra ..... 86
- Figura 4.4** – Perfilometria do implante controle. Em A, B e C imagens tridimensionais do perfil da superfície da peça. Em D perfil da seção transversal da superfície C ..... 87

- Figura 4.5** – Tíbia após ressecção e dissecação. A seta branca indica o calo ósseo, a seta preta indica o implante e a cinza indica a diáfise da tíbia ..... 102
- Figura 4.6** – Tíbia após ressecção e dissecação. A seta preta indica o implante sem recobrimento com tecido ósseo ..... 102
- Figura 4.7** – Tíbia após ressecção e dissecação. A seta preta indica o osso recobrindo o implante e a seta branca indica o implante..... 103
- Figura 4.8** – Ensaio de cisalhamento. O implante não cisalhou com o osso. A interface osso-implante foi mantida ..... 104
- Figura 4.9** – Gráfico da tensão de cisalhamento (*push-out*) dos implantes após período experimental 14 e 28 dias, dados expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa foi encontrada entre os períodos experimentais dos implantes infiltrados de 14 para 28 dias para o implante infiltrado. E aumento de 24% para implante infiltrado no período de 28 dias em comparação ao grupo controle.\*Nível de significância  $p < 0.005$ . Teste de *Tukey* ..... 105
- Figura 4.10** – Tíbias após ensaio de retenção ou cisalhamento – Em (A) Seta branca indica o implante com o centro empurrado e a interface osso-implante íntegra. Em B seta cinza indica o implante fraturado em três partes após o ensaio..... 106
- Figura 4.11** – Imagem obtida em microscópio óptico de implante infiltrado com materiais bioativos, implantados durante 18 dias. As setas brancas indicam, um tecido ósseo com uma matriz organizada, indicativo de uma trabécula óssea. Nas setas cinza observa-se o biomaterial..... 108
- Figura 4.12** – Imagem obtida em microscópio óptico de implante infiltrado com materiais bioativos, implantados durante 21 dias. Nas setas pretas observa-se neovascularização no interior do poro, nas cinzas pode-se observar o biomaterial ..... 108
- Figura 4.13** - Imagens obtidas em microscópio óptico de implante infiltrado ( $Al_2O_3i$ ) (A,e C) e Implante Controle  $Al_2O_3$  (B e D). Em A e B, observa-se implante infiltrado e implante controle, respectivamente, em período experimental de 18 dias. Em C e D observa-se implante infiltrado e implante controle, respectivamente, em período experimental de 21 dias. Nas imagens pode-se observar tecido recém formado (TC) em tons de azul mais escuro, a região dos implantes em preto. Em A, B e D vê-se região histoplasmocitária (\*) entre o implante e o tecido recém-formado. Em C a região histoplasmocitária entre o implante e o TC não é observada. Barra de escala = 100  $\mu m$  ..... 109
- Figura 4.14** - Imagens de Microscopia de luz comum de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $Al_2O_3i$ ) em A e C, alumina porosa (Implante controle –  $Al_2O_3$ ) em B e D após período experimental de 14 dias em tíbia de ratos. O implante está em preto e o tecido ósseo (Tc) está corado em tons de rosa. Em (A), (B) barra de escala 500 $\mu m$ , em, (C) e (D) barra de escala 100 $\mu m$ . Em A e B região medular (Md). Em 14 dias observa-se tecido ósseo cortical na superfície de ambos, porém para o implante infiltrado (A) e (C) o tecido apresenta-se com maior organização. Há tecido recém formado nos poros de ambas as amostras. Coloração com hematoxilina-eosina (HE) 111
- Figura 4.15** – Imagens de Microscopia de luz comum de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $Al_2O_3i$ ) em A e C, alumina porosa (implante controle –  $Al_2O_3$ ) em B e D após período experimental de 28 dias em tíbia de ratos. O implante está em preto e o tecido ósseo (Tc) está corado em tons de rosa. Em (A), (B) barra de escala 500 $\mu m$ , em (C) e (D) barra de escala 100 $\mu m$ . Em 28 dias observa-se tecido ósseo na superfície e nos poros de ambos, porém para o implante infiltrado (A) e (C) pode ser notado o contato direto entre o osso e o implante, enquanto que para o controle em alguns poros não é observado contato direto. Há tecido recém formado nos poros de ambas as amostras. Coloração com hematoxilina-eosina (HE) ..... 112
- Figura 4.16** - Imagens de Microscopia de luz comum. Em (A) de implante infiltrado (alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita) ( $Al_2O_3i$ ) em (B) alumina porosa sem recobrimento ( $Al_2O_3$ ). Período experimental de 28 dias. Observa-se a presença de tecido ósseo cortical na superfície do implante e tecido ósseo recém formado nos poros do material. Coloração HE ..... 113
- Figura 4.17** – Gráfico do percentual do contato ósseo na superfície dos implantes infiltrado (Alumina porosa recoberta com biovidro e HAp) e controle (Alumina porosa) após serem implantados em tíbias de ratos, períodos experimentais 14 e 28 dias. Diferenças significativas entre os grupos no período de 28 dias.  $p < 0,05$  considerado significativo ..... 115
- Figura 4.18** – Percentual de contato ósseo. Houve diferença significativa com valor significativamente maior para o implante infiltrado nos dois períodos experimentais. Nível de significância  $p < 0,05$ ..... 116



- Figura 4.19** – Diâmetro dos poros sem tecido organizado ou com tecido de granulação (poros “vazios”). Em (A) pode-se observar o gráfico de diâmetro dos poros sem tecido organizado e em (B) gráfico da média do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado. 70 % dos poros analisados com diâmetro médio menor que 100 µm não apresentaram tecido ósseo recém formado ..... 117
- Figura 4.20** – Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 14 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes infiltrados. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida..... 120
- Figura 4.21** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 28 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes infiltrados. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida..... 121
- Figura 4.22** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 14 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes controle. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida..... 122
- Figura 4.23** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 28 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes controle. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida..... 123
- Figura 4.24** – Valores de radiopacidade (*Pixels*), comparação entre os grupos controle (alumina porosa) e infiltrado (alumina infiltrada), nos períodos de 14 e 28 dias ..... 124
- Figura 4.25** – Em (A) e (B) MEV e espectro dos elementos químicos, Cálcio (Ca) e Alumínio (Al), observados com *Line Scan* da interface osso-implante. Em (A) implante recoberto com bioativos e em (B) implante controle. As setas indicam a interface. Tamanho da linha amarela: 1.0 mm..... 126
- Figura 4.26** – Microscopia eletrônica de varredura da interface do implante controle. A linha branca é tracejada a partir do implante. As setas brancas indicam a interface. As setas pretas indicam os poros no biomaterial ..... 127
- Figura 4.27** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface osso-implante controle. O ouro (Au) é o recobrimento para a análise e não faz parte dos elementos do implante ..... 128
- Figura 4.28** – *Line scan* da interface do implante controle. Espectro dos elementos químicos encontrados: Carbono (C), Oxigênio (O), Alumínio (Al), Fósforo (P), Cloro (Cl), Potássio (K), Cálcio (Ca), respectivamente. Tamanho da linha aproximadamente: 1,00 mm. As setas brancas indicam a interface osso-implante ..... 129
- Figura 4.29** – Microscopia eletrônica de varredura da interface do implante recoberto com materiais bioativos. A linha branca é tracejada a partir do implante. As setas brancas indicam a interface. As setas pretas indicam os poros no biomaterial..... 130
- Figura 4.30** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface do implante infiltrado. O ouro (Au) é o recobrimento para a análise e não faz parte dos elementos do implante ..... 130
- Figura 4.31** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface osso-implante infiltrado. Espectro obtido com a técnica EDS *Line-scan*. Tamanho da linha aproximadamente: 1,00 mm..... 131
- Figura 4.32** - Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 14 dias. A linha amarela foi tracejada desde a interface osso-implante e atravessa o implante ..... 134
- Figura 4.33** – Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 1 traçada na região de implante. Traçada na região do implante, tamanho da Linha 2.0 mm..... 135
- Figura 4.34** – Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 2 traçada na região de implante. Linha (2) traçada na região do implante, tamanho da Linha 1,7 mm..... 136
- Figura 4.35** – Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 3 traçada na região de implante. Tamanho da Linha 1,1 mm ..... 137
- Figura 4.36** - Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha traçada desde em diagonal. Tamanho da Linha 1,5mm ..... 138

<b>Figura 4.37</b> - Microscopia eletrônica de varredura e EDS- <i>Line-scan</i> do implante Infiltrado após período experimental de 14 dias. Linha 1 traçada na região porosa do implante .....	139
<b>Figura 4.38</b> – Microscopia eletrônica de varredura e EDS- <i>Line-scan</i> do implante Infiltrado após período experimental de 28 dias. Linha 2 traçada na região porosa do implante, próxima à região medular do osso. É observado o elemento cálcio nos poros e na superfície de contato osso-implante. Cálcio (Ca) e alumínio (Al) .....	140
<b>Figura 4.39</b> – Microscopia eletrônica de varredura e EDS- <i>Line-scan</i> do implante Infiltrado após período experimental de 28 dias. Linha 3 traçada na diagonal do implante. Há cálcio desde os poros mais próximos da região medular até os da superfície de implantação. Cálcio (Ca) e alumínio (Al) .....	141
<b>Figura 4.40</b> – Microscopia eletrônica de varredura de implante infiltrado após período experimental de 28 dias. Observa-se o que parece ser tecido ósseo em contato direto com a parede dos poros. A região de implante está indicada por $Al_2O_3$ (alumina), o tecido ósseo está indicada por (O) .....	142
<b>Figura 4.41</b> – Microscopia eletrônica de varredura de tíbias com implantes controle em A, B e C e infiltrado em D, E e F, após período experimental de 14 dias. Em A e D imagens da secção da tibia em menor aumento para ilustrar o posicionamento dos implantes. Em B e E imagem mais aproximada, observa-se que os implantes ainda não foram recobertos por tecido ósseo. Em C e F em maior aumento sobre a região de implante. Sendo região de medula óssea (Md), Região tecidual (Tc), região de implante controle ( $Al_2O_3$ ) e de implante infiltrado ( $Al_2O_3$ ).....	143
<b>Figura 4.42</b> – Microscopia eletrônica de varredura de tíbias com implantes controle em A, B e C e infiltrado em D, E e F, após período experimental de 28 dias. Em A e D imagens da secção da tibia em menor aumento para ilustrar o posicionamento dos implantes. Em B e E imagem mais aproximada, observa-se que os implantes foram recobertos por tecido ósseo ainda em processo de organização tecidual. Em C e F em maior aumento sobre a região de implante. Observa-se que a formação óssea nos poros do implante infiltrado (em F) ocorre de forma mais concêntrica, quando comparada com o implante controle (em C). Sendo região de medula óssea (Md), Região tecidual (Tc), região de implante controle ( $Al_2O_3$ ) e de implante infiltrado ( $Al_2O_3$ ) .....	144
<b>Figura 4.43</b> – Microscopia eletrônica de varredura (A e E) seguida de EDS (B, C, D, F, G, e H) dos implantes controle (A, B, C, D) e infiltrado (E, F, G e H) após 28 dias de implantação. A distribuição dos elementos químicos cálcio (Ca), fósforo (P) e alumínio (Al) na amostra foi detectada com EDS. Observa-se que a formação óssea nos poros do implante infiltrado ocorre de forma mais concêntrica, quando comparada com o implante controle .....	145
<b>Figura 4.44</b> – Imagem de pino denso em alumina com recobrimento em alumina porosa, manufaturado pela técnica <i>Dipping</i> (Imersão do pino na barbotina com formador de poros). A camada porosa destacou .....	147
<b>Figura 4.45</b> – Imagem de peça em MGF manufaturada com co-prensagem. A peça fraturou após a prensagem isostática .....	150
<b>Figura 4.46</b> - Etapas da manufatura das peças em gradiente funcional por co-prensagem com a utilização de molde de borracha mais espesso. Em (A) molde durante o recobrimento da superfície interna com a barbotina. Em (B) molde com a tampa metálica preenchido com o pó para a região densa e com a barbotina para região porosa na parede interna. Em (C) peça inteira e em (D) peça fraturada em duas partes após a prensagem isostática .....	151
<b>Figura 4.47</b> – Peças em Gradiente Funcional manufaturadas pelo método de co-prensagem em molde de silicone.....	151
<b>Figura 4.48</b> – Peça em Gradiente Funcional em formato cônico manufaturada com co-prensagem. A peça fraturou em 5 partes após a prensagem isostática .....	153
<b>Figura 4.49</b> – Imagem da peça em gradiente funcional manufaturada por co-prensagem, pronta para usinagem e sinterização.....	154
<b>Figura 4.50</b> – Imagem de MEV de peça manufaturada com a utilização de soprador para secar a barbotina.....	155
<b>Figura 4.51</b> – MGF em alumina com núcleo denso e superfície porosa manufaturado com método de co-prensagem seguido de sinterização. Utilizou-se molde de silicone.....	156

- Figura 4.52** – Imagem de MEV de peça manufacturada com centrifugação seguida de co-prensagem. Observa-se continuidade entre a região porosa e densa.....157
- Figura 4.53** – Imagem de MEV de regiões porosas de peça manufacturada pelo método de co-prensagem e centrifugação. Observa-se continuidade nas diferentes regiões porosas.....157
- Figura 4.54** – Peça em alumina com núcleo denso e porosidade gradual ..... 158
- Figura 4.55** – Imagem de MEV de Material em Gradiente Funcional de porosidade manufacturado pelo método de co-prensagem. Essa peça apresenta espessura de região porosa entre 192 e 379  $\mu\text{m}$  159
- Figura 4.56** – MEV de Gradiente Funcional com núcleo denso e superfície gradualmente porosa, com delaminação na interface. Método de manufactura co-prensagem. Região mais externa com espessura de 220  $\mu\text{m}$  (seta preta) apresenta poros maiores e a região mais interna (asterisco branco) apresenta espessura de 1046  $\mu\text{m}$  (~1 mm) com poros menores. Delaminação da camada porosa (seta branca), nessa peça o diâmetro da região densa é 6473  $\mu\text{m}$  (~6,5 mm) (asterisco preto) ..... 160
- Figura 4.57** – Usinagem do *blank* no formato de pino de dente. (A) *Blank* fixado no suporte. (B) *Blank* durante usinagem. (C) e (D) Usinagem em fase final de acabamento. (E) e (F) Pino usinado ..... 161
- Figura 4.58** – Pino dentário em gradiente funcional, manufacturado pela técnica de co-prensagem e com acabamento realizado através de usinagem à verde, após pré-sinterização..... 162
- Figura 4.59** – Pino dentário em gradiente funcional, manufacturado pela técnica de co-prensagem e com acabamento realizado através de usinagem à verde, após pré-sinterização. Na imagem após processo final com sinterização ..... 162

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Formação dos grupos experimentais durante os estudos <i>in vivo</i> na Fase 2. Com o período de implantação e número de animais (n) por grupo. ....	60
<b>Tabela 4.1</b> – Proporção dos elementos químicos distribuídos na matriz de alumina porosa recoberta com biovidro e HAp .....	83
<b>Tabela 4.2</b> – Valores da rugosidade superficial.....	88
<b>Tabela 4.3</b> – Valores da DMO, CMO e Área das respectivas regiões de interesse. Valores comparativos entre os grupos infiltrado, controle e controle-controle .....	91
<b>Tabela 4.4</b> – Relação dos grupos e das regiões de interesse com diferença significativa na DMO entre os grupos, nível de significância de 95%.....	93
<b>Tabela 4.5</b> – Tensão de cisalhamento ou de escorregamento – dados expressos em média e desvio padrão. Comparação entre os grupos e os períodos experimentais*.....	106
<b>Tabela 4.6</b> - Média e desvio padrão da percentagem de contato ósseo na superfície e nos poros dos implantes infiltrado e controle após os respectivos períodos experimentais.....	115
<b>Tabela 4.7</b> – Média e desvio padrão do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado ou poros “vazios” .....	118
<b>Tabela 4.8</b> – Valores de radiopacidade em <i>pixels</i> , média, mínimo, máximo das imagens radiográficas das tíbias após período experimental. Comparação entre os grupos controle (alumina porosa) e o grupo infiltrado (alumina recoberta) .....	123
<b>Tabela 4.9</b> – Elementos químicos presentes na interface osso-implante controle e infiltrado na Fase 1, períodos experimentais 14 e 21 dias .....	128
<b>Tabela 4.10</b> – Percentual em massa dos elementos químicos encontrados nos implantes controle e infiltrado após os períodos experimentais.....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14d	-14 dias de implantação do biomaterial
28d	- 28 dias de implantação do biomaterial
ASTM	- American Society for Testing and Materials
45S5 ®	- Biovidro comercial
ANOVA	- Análise de variância
BBvH	- Barbotina de Biovidro e Hidroxiapatita
CMO	- Conteúdo mineral ósseo
CV	- Coeficiente de variação
DMO	- Densidade mineral óssea
DXA	- Dual-energy X-ray absorptiometry
EDS	- <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> - Espectroscopia de Energia Dispersiva
EESC	- Escola de Engenharia de São Carlos
FGM	- Functional Gradient Materials
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	- Grama
g/cm <sup>2</sup>	- Grama por centímetro quadrado
HAp	- Hidroxiapatita
ISO	- International Organization for Standardization
ISS	- <i>Interfacial shear stress</i> - resistência ao cisalhamento interfacial
L1-L4	- Vertebrae lombares, primeira vertebra (L1), quarta vertebra (L4).
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MGF	- Material em gradiente funcional
MPa	- Mega Pascal
n	- Número de amostras
Pa	- Pascal

PVB	- Polivinil-Butiral
QBSD	- Detector de elétrons retro espalhados
Rm	- Rugosidade média
Rt	- Rugosidade total
TRAP	- Fosfatase Ácida Resistente ao Tártaro
UFSCar	- Universidade Federal de São Carlos
USP	- Universidade de São Paulo

## LISTA DE SIMBOLOS

$\text{Al}_2\text{O}_3$	Fórmula molecular da alumina
$\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$	Fórmula molecular do biovidro
45S5®	Biovidro comercial
$(\text{OH})^-$	Hidroxila
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Fórmula molecular da hidroxiapatita
nm	Nanômetro
±	Desvio padrão
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
σ	Desvio padrão
τ	Tensão de cisalhamento
Ca	Cálcio
Al	Alumínio
P	Fósforo
$\text{Al}_2\text{O}_{3i}$	Implante de alumina infiltrado com biovidro e HAP (Implante Infiltrado)
$\text{Al}_2\text{O}_3$	Implante de alumina poroso sem recobrimento (Implante controle (Na figuras)

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1 Aspectos Fundamentais da Resposta Tecidual aos Biomateriais e importância de poros.....	30
2.2 Biocerâmicas .....	36
2.2.1 Alumina.....	37
2.2.2 Biovidro.....	37
2.2.3 Hidroxiapatita.....	38
2.2.4 Recobrimento de superfícies com materiais bioativos.....	39
2.3 Materiais em Gradiente Funcional .....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.1 Materiais utilizados como componentes dos implantes.....	50
3.2 Matrizes de Alumina Porosa ou Implantes Porosos .....	51
3.2.1 Manufatura dos Implantes Porosos.....	51
3.2.1.1 Preparo das barbotinas.....	52
3.2.1.2 Conformação dos implantes porosos .....	52
3.2.1.3 Infiltração dos materiais bioativos na matriz de alumina porosa.....	54
3.2.1.4 Justificativas Sobre a Validação da Superfície Porosa Recoberta com Materiais Bioativos e Denominação dos Implantes Porosos .....	55
3.2.2 Análise química do implante - Espectroscopia de Dispersão de raios-X (EDX).....	56
3.2.3 Rugosidade Superficial .....	56
3.2.4 Estudo <i>In Vivo</i> dos Implantes porosos .....	57
3.2.4.1 Formação dos Grupos Experimentais .....	58
3.2.4.2 Esterilização dos Implantes.....	60
3.2.4.3 Procedimento anestésico.....	60
3.2.4.4 Mensuração da densidade mineral óssea corpórea - Exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA) .....	61
3.2.4.5 Cirurgias de Implantação do Biomaterial.....	61
Defeito ósseo nas tíbias e implantação do biomaterial.....	62
Manutenção dos animais .....	63
3.2.4.6 Eutanásia.....	64
3.2.4.7 Ressecção das tíbias .....	64
3.2.4.8 Ensaio mecânico.....	64
3.2.4.9 Preparo das Tíbias para Histologia de Tecido Mineralizado.....	67
A Microtomia.....	68
B Coloração.....	69
C Histologia e Morfometria.....	70
3.2.4.10 Estudo radiográfico .....	71



3.2.4.11 Espectroscopia de Energia Dispersiva – <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> – (EDS) e Line Scan.....	73
3.3 Manufatura das Peças com Núcleo Denso e Superfície Gradualmente Porosa.....	74
3.3.1 Técnica (A) – <i>Dipping</i> .....	75
3.3.2 Técnica (B) – Co-prensagem.....	77
3.3.3 Preparo das Peças em Gradiente Funcional para Microscopia de Varredura Eletrônica.....	79
3.3.4 Projeto de Usinagem à Verde do Gradiente Funcional em Formato Cônico para a Obtenção do Pino de Dente.....	79
4 RESULTADOS.....	82
4.1 Implantes porosos.....	82
4.1.2 Análise química – Espectroscopia de Dispersão de Raios-X (EDX).....	83
4.1.3 Rugosidade Superficial.....	87
4.1.4 Estudo <i>In Vivo</i> dos Implantes porosos.....	88
4.1.5 Mensuração da densidade mineral óssea corpórea - Exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA).....	89
4.1.6 Estudo <i>Ex Vivo</i> das Tíbias Após os Períodos Experimentais – Aspectos Gerais das Amostras.....	102
4.1.7 Ensaio Biomecânico.....	103
FASE 1.....	103
FASE 2.....	105
4.1.8 Histologia.....	107
FASE 1.....	107
FASE 2.....	110
Morfometria.....	114
4.1.9 Radiografia de Alta-Definição.....	119
4.1.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva – <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> – (EDS) e <i>Line Scan</i> .....	125
EDS <i>Line –scan</i> – Fase 1.....	125
EDS <i>Line-scan</i> Fase 2.....	132
4.2 Manufatura das Peças com Núcleo Denso e Superfície Gradualmente Porosa.....	146
4.2.1 Técnica (A).....	147
4.2.2 Técnica (B).....	149
4.2.3 Projeto de molde integral para Aperfeiçoamento da Técnica (B).....	152
4.2.4 Microscopia de Varredura Eletrônica das Peças em MGF.....	154
4.3 Usinagem do Pino de Dente.....	161
5 DISCUSSÃO.....	164
6 CONCLUSÃO.....	172
7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	174
REFERÊNCIAS.....	176
APÊNDICES.....	182

APÊNDICE A – Sequencia de procedimentos para o preparo e inclusão em resina das tíbias para microtomia, EDS – <i>Line-scan</i> e histologia.....	183
APÊNDICE B – Equipamentos utilizados para microtomia na Fase 2.....	184
APÊNDICE C – Valores e as diferenças estatísticas da densidade mineral óssea (DMO).....	185
APÊNDICE D – Dados estatísticos do programa <i>Instat</i> da análise de radiopacidade em pixels .....	192
APÊNDICE E – Percentual de contato ósseo na superfície dos implantes .....	193
ANEXOS.....	194
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em experimentação animal do estudo na Fase 1 .....	195
ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em experimentação animal do Estudo na Fase 2 .....	196



## 1 INTRODUÇÃO

Pesquisas que visam manufatura de implantes ósseos têm desenvolvido técnicas de manufatura para aprimorar respostas mecânicas e biológicas ao implante. Inicialmente estruturas densas foram desenvolvidas, seguindo com as estruturas porosas, em conjunto com técnicas para recobrimentos de superfícies e ultimamente métodos para desenvolver materiais em gradiente funcional.

O desenvolvimento de peças heterogêneas confere aos materiais existentes características novas, as quais podem classificá-los como novos materiais. Estruturas heterogêneas são funcionalmente mais interessantes que as homogêneas, pois podem fornecer em uma mesma peça as propriedades que mimetizam um material natural, a exemplo do osso, que apresenta em sua estrutura densidades diferente de poros, por exemplo.

A Engenharia Tecidual requer suportes sintéticos em gradientes e envolve três grandes áreas, as quais são: a biomimética, as modificações interfaciais e a engenharia de tecidos funcionais. Essas combinam entrega de sinais físicos (topografia do biomaterial) e químicos (com fatores de crescimento e de diferenciação e com moléculas para adesão celular) para alcançar transição contínua na estrutura e na função.

O tamanho de poros e a porosidade são parâmetros fundamentais para resposta tecidual compatível com o tecido a ser substituído ou reparado por *scaffolds* (estruturas porosas) ou estruturas heterogêneas com poros em sua superfície. O tamanho de poros com o mínimo de 100  $\mu\text{m}$  e poros maiores que 200  $\mu\text{m}$  são essenciais para a osteocondução em implantes porosos, porém pesquisas têm sugerido que o grau de interconectividade é mais crítico do que o tamanho de poros.

Cerâmicas porosas apresentam propriedades mecânicas limitadas devido a concentração de tensão, pois na região de porosidade existem trincas resultantes do processo de manufatura. . No osso, uma fratura do tamanho de 10  $\mu\text{m}$  ocasionada por um

impacto ou esforço excessivo será consolidada em dias. Desfavoravelmente em um implante cerâmico uma trinca com a mesma dimensão pode diminuir a resistência mecânica a centésimos da resistência original e não haverá consolidação prevista.

É conceituado que um implante com núcleo denso e superfície gradualmente porosa, que apresenta estrutura contínua de denso para poroso sem interface definida e sem destacamento ou delaminação justifica-se no sentido das possíveis aplicações, ou seja, para implante ósseo, os quais devem suportar diversos carregamentos mecânicos e ser integráveis ao tecido hospedeiro.

É tratado com originalidade o desenvolvimento do implante, sua manufatura e a determinação das variáveis do projeto como a espessura idealizada para osseointegração.

O objetivo geral desta pesquisa está no projeto e na manufatura de estruturas com núcleo denso e superfície em gradiente funcional de porosidade, onde é obtido em um único implante as respostas funcionais qualificadas, sejam as propriedades mecânicas pelo núcleo denso e a sinalização celular compatíveis com o tecido ósseo pela região porosa. As possíveis aplicações que se sugere serão especialmente para implantes ósseos e odontológicos a exemplo de enxertos, em reparação de fraturas, e também como os pinos dentários.

Os objetivos específicos são a obtenção de corpos-de-prova integralmente porosos recobertos com biovidro e hidroxiapatita.

Analisar *in vivo* em tíbias de ratos para definição da interação tecidual, e verificação da uma profundidade de crescimento tecidual nos poros e da resistência mecânica ao cisalhamento.

Investigar a região porosa quanto à qualidade do tecido em contato com o biomaterial, tanto na superfície, quanto nos poros do implante.

**Obter peças em alumina com gradiente funcional, com núcleo denso e superfície gradualmente porosa.** Técnicas diferenciadas para manufaturar peças em

gradiente funcional (peças com núcleo denso e superfície em gradiente funcional de porosidade) foram aplicadas para obter peças sem trinca e delaminação, com continuidade entre as diferentes porosidades e tamanho de poros, sem interfaces definidas.

Definir uma técnica capaz de oferecer continuidade entre as regiões com diferentes densidades.

Projetar e manufaturar pinos de dente em gradiente funcional para uma possível aplicação como um estudo de caso do material em estudo.

Correlacionar os resultados do estudo *in vivo* com as peças integralmente porosas recobertas com bioativos para planejar a superfície externa do gradiente funcional



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Serão abordados aspectos relacionados à interação entre os biomateriais e o tecido ósseo com ênfase na presença de poros; nos conceitos relacionados à biocerâmicas, com foco nas utilizadas neste trabalho, a saber, a alumina, biovidro e hidroxiapatita; e nas tecnologias envolvidas com esses materiais como recobrimento de superfícies e gradientes funcionais.

Propriedades físicas e químicas do material influenciam nas respostas do tecido ao implante. De importância para esta pesquisa existe um conceito relacionado à fixação do biomaterial denominado osseointegração.

Segundo Berglundh et al. (2007) a osteointegração em implantes é necessária para a fixação do material ao tecido. É um conceito importante para implantes ósseos, pois, está relacionada com a resposta tecidual na superfície da peça e envolve o contato que ocorre entre o osso e o biomaterial. Conforme consideram Albrektsson et al. (1981) contato tecidual com a interposição de osso neoformado em congruência com o implante, sem a presença de tecido conjuntivo ou fibroso na interface osso-implante e resposta adequada aos carregamentos mecânicos da região em que estiver implantado, pode-se classificar o implante como osseointegrável,

### **2.1 Aspectos Fundamentais da Resposta Tecidual aos Biomateriais e importância de poros**

Em biomateriais a obtenção de implantes ou dispositivos implantáveis com capacidade de apresentar certas propriedades mecânicas pode ser possível com a adequação das propriedades do material ao projeto mecânico. No entanto, obter peças que integrem ao tecido hospedeiro sem formação de cápsula fibrosa na interface osso-implante é um dos maiores desafios em projetos de implantes (HENCH, 1998).



Durante o desenvolvimento de um dispositivo pode-se conseguir respostas adequadas nos ensaios mecânicos, compatíveis com a região planejada. Contudo depois de implantado caso a consolidação for com a presença de tecido fibroso em vez de tecido mineralizado, o implante, talvez, não apresentará a fixação projetada.

Muitas características pertencentes aos implantes podem influenciar na interação dos materiais com o tecido ósseo. Pode-se citar a presença de poros ou rugosidade na superfície de implantes, se o material sofre ou não corrosão quando em contato com os fluidos fisiológicos, se é capaz de induzir diferenciação celular e deposição de tecido mineralizado ou de tecido fibroso. Entre esses fatores a interação tecidual com materiais que apresentam poros, denominados *scaffolds* ou matrizes porosas, são extensivamente pesquisados.

O processo de implantação de biomateriais, próteses ou dispositivos médicos e odontológicos resulta em alterações nos tecidos ou órgãos (ANDERSON 1988, 1993; GRISS et al., 2005).

A resposta do organismo a agressões teciduais é representada por inflamação aguda fenômeno em que os neutrófilos fagocitam e removem os agentes causais. Quando a inflamação aguda não é eficiente como mecanismo de defesa, o agente agressor persiste e o processo evolui para inflamação crônica.

As alterações na região de implantação são inicialmente resposta inflamatória aguda, causada pela lesão tecidual provocada pela presença do corpo estranho, o implante. Essa fase segue-se com a chegada de macrófagos que se agrupam em volta do dispositivo.

A vascularização de implantes ósseos, segundo Frank et al. (2008) é uma pré-condição para a cicatrização de defeitos ósseos, já a angiogênese é fundamental para a formação óssea e para a integração do biomaterial ao tecido ósseo.

A resposta às lesões depende de múltiplos fatores os quais incluem a extensão da ferida, interação do sangue com o material, formação da matriz provisória, extensão ou o grau da necrose celular, e do grau da resposta inflamatória. Estes eventos, por sua vez,

podem afetar a medida ou grau de formação do tecido de granulação, reação ao corpo estranho, e desenvolvimento de cápsula fibrosa.

Conforme o que Bacchi et al. (2010) em acordo com a literatura sobre patologia e processo inflamatório relatam que a fase de formação de tecido de granulação com neovascularização tem continuidade com a fusão do tecido de granulação, fase conhecida como cicatrização por primeira intenção segue-se com a compressão dos novos vasos sanguíneos pelo colágeno é a devascularização e regressão do processo inflamatório.

Com a fusão do tecido de granulação a matriz extracelular densifica-se e adquire cada vez mais fibras colágenas da seguinte forma: as células do tecido conjuntivo estão distribuídas no seio de uma matriz que elas próprias secretam, formada por fibras (elásticas e colágenas) e um material amorfo, um gel hidratado e poroso (proteoglicanos) que envolve fibras e células. As células da matriz, principalmente os fibroblastos, sintetizam o colágeno sob a forma solúvel. As fibras são dispostas com orientação em várias direções, com um “padrão frouxo” que será substituído por um “padrão denso” em que as fibras colágenas são compactadas em feixes paralelos.

A remodelação ou reabsorção da matriz se processa ao mesmo tempo em que há a formação da mesma. Quando a síntese é predominante forma-se excesso de matriz extracelular, denominado fibrose. Quando predomina a degradação, ocorre o desaparecimento parcial ou total da fibrose.

Alguns biomateriais podem favorecer a degradação da matriz e conseqüente desaparecimento da fibrose. Segundo Hench (1998) materiais porosos e inertes em meio fisiológico formam uma cápsula fibrosa, a qual é temporária e o implante integra-se ao tecido ósseo com congruência. No entanto conforme considera Anderson (2001) sem a presença de poros, ou seja, implantes densos formam a cápsula fibrosa na interface osso-implante; e materiais porosos integram-se ao tecido.

Em estudo comparativo Griss et al. (2005) pesquisaram a resposta tecidual em implantes densos, base de alumina e outro em metal a base de aço inoxidável. Implantou-se em fêmur de ratos. Ao comparar histologia desses implantes densos, a alumina densa não apresentou cápsula fibrosa nem corrosão, e ainda os implantes em cerâmica apresentavam-se integrados ao tecido enquanto o implante em metal apresentou-se isolado por uma cápsula fibrosa e com características de processo de corrosão.

As considerações sobre a interação entre tecido e implantes porosos e densos pesquisadas por Anderson (2001) e por Griss et al. (2005) são interessantes, ambos apresentam considerações diferentes sobre a resposta tecidual aos biomateriais no sentido de que Anderson (2001) coloca que implante não poroso tem geralmente como resposta final fibrose ou encapsulamento fibroso e considerou que existem exceções, os materiais porosos. No entanto, Griss et al. (2005) em estudo sobre implantes densos, encontraram como resultado que os implantes densos em alumina apresentavam-se integrados ao tecido.

A literatura considera que a presença de poros é importante em implantes ósseos, pois o tamanho de poros e a porosidade são parâmetros que influenciam na resposta tecidual.

Estudos com materiais em porosidade gradual *in vitro* e *in vivo* têm encontrado células e tecido ósseo em diferentes proporções nos diferentes tamanhos de poros, em materiais para crescimento celular e regeneração tecidual.

Segundo Oh et al. (2007), o crescimento dos condrócitos e osteoblastos, por exemplo, são mais evidentes entre os poros de 380-405  $\mu\text{m}$ ; os fibroblastos são encontrados entre os poros de 186-200  $\mu\text{m}$ , e osso recém formado é encontrado entre 290-310  $\mu\text{m}$ .

Segundo Kuhne (1994) o tamanho de poros com o mínimo de 100  $\mu\text{m}$  e poros maiores que 200  $\mu\text{m}$  são essenciais para a osteocondução em implantes porosos, porém pesquisas sugerem que o grau de interconectividade é mais crítico do que o tamanho de poros. O tamanho de poros tem importância na viabilidade e a afinidade celular por influenciar no movimento, união e espalhamento celular, sinalização intracelular e transporte

de nutrientes e metabolitos (OH et al., 2007). A proliferação de osteoblastos, o crescimento vascular e a formação óssea, são favoráveis em implantes com poros interconectados e com o mínimo de 100  $\mu\text{m}$  (HENCH, 1998).

A geometria dos poros (esférica ou oblonga), o tamanho e a distribuição dos poros, interconectividade apresentam também relação com as propriedades mecânicas. O objetivo é obter porosidades em torno de 60 a 90% e manter uma resistência mecânica compatível com a região tecidual à ser implantada. A porosidade e o tamanho de poros afetam também a neovascularização *in vivo* (YANG, 2002). No entanto o controle da porosidade na peça deve ser realizado de forma que não comprometa a propriedade mecânica do implante, pois, quanto maior a porosidade, menor a resistência mecânica da estrutura porosa (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

O controle do tamanho dos poros e a interconectividade são fundamentais para o sucesso do implante, pois poros “vazios”, sem tecido organizado ou sem tecido ósseo recém formado são concentradores de tensão e, portanto indesejáveis.

No entanto, defeitos estruturais podem ser primeiramente induzidos no processo de conformação da peça, e esses irão governar a vida útil do material. É conhecido que a vida de um componente cerâmico sob alto estado de tensão mecânica ou térmica é determinada pela existência de defeitos que podem ser na forma de vazios, inclusões, um grão muito grande, uma região com concentrações de pequenos vazios ou região com predomínio de grãos mal densificados. Contudo, para aplicações em membranas ou para Engenharia Tecidual os poros ainda devem ser comunicantes (LANGE, 1979).

Como a superfície do implante é a primeira parte a entrar em contato com o tecido, a engenharia de superfície é investigada por ser fundamental desde as primeiras horas de implantação do biomaterial, pois pode modular positivamente a resposta do hospedeiro ao implante. Dentre os parâmetros mais modificados, a topografia e a química têm resultados promissores, pois superfícies irregulares favorecem a fixação biomecânica e a neoformação óssea (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004).

Nesse sentido, superfícies rugosas aceleram cicatrização óssea e aprimoram as respostas biomecânicas com fixação mais estável quando comparadas às superfícies lisas.

Butz et al. (2006) comprovaram através de técnica de nanoindentação que superfícies rugosas resultam em maiores propriedades mecânicas comparadas a superfícies lisas nos períodos iniciais de osseointegração. Butz et al. (2006) mostraram que a cinética de reparo ósseo é positivamente alterada nos implantes com superfície rugosa, e consideraram que esta característica deveria ser levada em consideração para o desenvolvimento de futuras superfícies.

Pesquisas com biomateriais e investigação *in vivo* envolvem as análises histológicas e histomorfométricas do sítio de implantação. Para essas análises, após a retirada do osso com o implante, o material é preparado para estudo do tecido biológico em lâminas as quais são analisadas ao microscópio óptico.

A histologia da região de interesse pode ser realizada para investigar a osteointegração. Aldini et al. (2002) analisaram *in vitro* e *in vivo* biomaterial cerâmico inerte, a zircônia, recoberto por uma camada de material bioativo, o biovidro (RKKP bioglaze®). Os cortes histológicos de 70 µm foram obtidos com micrótomo Leica, corados com *Fast Green* e observados ao microscópio. Histologicamente, o osso trabecular se organiza em torno de ambos os materiais de forma regular.

Ignatius et al. (2005) pesquisaram a alumina densa recoberta por uma camada de biovidro. Os implantes foram testados em tíbias de carneiro, dois locais da tíbia foram selecionados para analisar as respostas ao carregamento mecânico sobre o biomaterial, abaixo do platô tibial (implante triangular) e na diáfise (implante cilíndrico). As análises foram comparativas entre o implante recoberto por biovidro e não recoberto por biovidro (controle). As amostras foram removidas após 6 meses de implantação. Ao microscópio foram observadas a reação celular e a osseointegração. Duas lâminas de cada amostra foram avaliadas por microscópio com aumento de 50 vezes. Os resultados indicaram osso lamelar (cortical) em torno do implante, sem sinais de inflamação, a exemplo de macrófagos ou células gigantes. Observaram-se osteoblastos (células formadoras de osso) na superfície do

implante recoberto e nos implantes cilíndricos uma fina camada de osteócitos aprisionados pela matriz óssea recém formada (tecido osteóide).

Hamadouche et al. (2000), estudaram implantes de alumina com cobertura bioativa. Cilindros com dimensões de Ø4mmx6mm foram implantados em fêmur de coelhos. Os tempos experimentais foram 3, 12 e 24 semanas. Para as análises histológicas, as amostras foram desidratadas em etanol e emblocadas em Poli (metacrilato de metila). Secções perpendicularmente ao eixo longo dos implantes foram realizadas com disco diamantado e lixadas até 100µm, a superfície foi corada com *Stevenel Blue* e *Van Gieson*, para as análises histológicas e histomorfométricas. O tecido em contato com o implante foi mensurado.

Neste mesmo estudo, histologicamente nenhuma reação inflamatória foi encontrada. Tecido fibroso e osso foram observados em torno do implante de alumina sem recobrimento. Quatro tipos de tecidos foram encontrados em contato direto com os implantes com cobertura bioativa: osso, tecido fibroso, cartilagem e tecido osteóide após 12 semanas. Nos achados histomorfométricos, a porcentagem de osso em contato direto com o implante foi significativamente maior para a alumina com cobertura bioativa.

## **2.2 Biocerâmicas**

As cerâmicas utilizadas como biomateriais são denominadas biocerâmicas (WILLIAMS, 1987). As biocerâmicas de uso clínico podem ser classificadas em três categorias: reabsorvíveis, bioativas e praticamente inertes. Das biocerâmicas existentes são de importância para esta pesquisa, a alumina (praticamente inerte), o vidro (bioativo) também denominado biovidro ou biosilicato e a hidroxiapatita (bioativa).

É sabido que relativamente a outras classes de materiais as cerâmicas apresentam comportamento frágil e em geral alto módulo elástico que pode proporcionar efeito

denominado *stress shielding*. Estes aspectos reforçam a necessidade de projetos que não concentram tensões excessivamente.

Simscke, Ayers e Bateman (1997) apresentam algumas propriedades desejadas em cerâmicas bioinertes, a saber: que não seja bioabsorvível, o que significa que não sofram corrosão nem lixiviação, que não apresentem citotoxicidade; que não sejam mutagênicas e nem carcinogênicas, o que quer dizer que não reajam com DNA e RNA. Deseja-se ainda que mantenham sua forma, ou seja, que não sofram reações de superfície ou deformação; que não causem reação inflamatória, ou seja, que não reajam com fagócitos, basófilos, eosinófilos e outras células do sistema imune; espera-se que mantenham suas propriedades mecânicas; que não apresentem microfraturas e que não sofram fadigas cíclicas; deseja-se que sejam biocompatíveis, ou seja, que estejam de acordo com os requisitos das padronizações da *International Organization for Standardization* (ISO) e da *Food and Drug Administration* (FDA).

### **2.2.1 Alumina**

A alumina apresenta forma molecular  $Al_2O_3$  é um material praticamente bioinerte, porém de aceite comum citada como bioinerte, será também assim tratada neste trabalho. Segundo Williams (1987), um material bioinerte não desenvolve atividades fisiológicas ou químicas em meio biológico. Na prática não existe um material totalmente inerte. A alumina é também um material de baixo custo e não absorvível.

### **2.2.2 Biovidro**

O biovidro é um material bioativo, conforme definição de Williams (1987), um material bioativo é indutor de atividade biológica específica na interface, que resulta na formação de

uma ligação entre o tecido e o biomaterial. Segundo Hench e West (1996) a bioatividade do biovidro 45S5<sup>®</sup> o qual a estrutura é SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O, é devido à liberação de íons e reações de precipitação. Segundo Hench (1998a) Os níveis de bioatividade de um material específico podem ser mencionados como o tempo necessário para mais de 50 % da interface se ligar ao osso. Materiais que exibem Índice de bioatividade maior que oito são denominados como classe A. O Biovidro 45S5<sup>®</sup>, pertence a essa classe de biomaterial, une-se tanto com tecidos moles como com tecido ósseo.

Outra consideração sobre os biovidro é que quanto maior a solubilidade de um vidro bioativo mais pronunciado será o efeito sobre o crescimento ósseo (DUCHEYENE; QUI, 1999).

Também é classificado como um material osteoindutor e segundo Keating e McQueen (2001) estimula células indiferenciadas a converterem-se em células osteoprogenitoras, os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea.

### 2.2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é considerada como material bioativo e depende especialmente de sua estrutura e quantidade do grupo funcional como a hidroxila (OH)<sup>-</sup> (WEBSTER et al., 2001) contida na hidroxiapatita, a qual apresenta a seguinte fórmula molecular Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>.

A hidroxiapatita sintética (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>), de acordo com Jarcho (1981), é considerada, um material biocompatível, que proporciona uma resposta inflamatória quando em contato com o tecido biológico sendo classificada como um material que promove bioatividade e osteocondutividade. Osteocondução, segundo Williams (1987) é o processo no qual o osso é direcionado para dentro da estrutura do material com poros ou canais, e conforme Keating e McQueen (2001) osteocondução pode ser responsável por conduzir as novas células originadas à promover a neoformação tecidual.



Conforme Hench (1991) a hidroxiapatita sintética apresenta Índice de bioatividade na classe B, esta classificação significa que seu índice é menor que 8 e maior que zero, e o material une-se ao tecido ósseo.

Tanto a hidroxiapatita quanto o biovidro são materiais que promovem integração com o tecido ósseo, porém suas resistências mecânicas, comumente, não são compatíveis com os carregamentos mecânicos exigidos por regiões que necessitam de substituições ou reparações ósseas.

#### **2.2.4 Recobrimento de superfícies com materiais bioativos**

Existem dificuldades na interpretação das modificações das superfícies dos implantes encontradas na literatura, devido a diferentes formas dos implantes, modelos animais, sítios cirúrgicos, e tempo *in vivo*, pesquisas indicam que superfícies rugosas e adição de biocerâmicas a base de Ca e P beneficiam a resposta óssea inicial ao implante.

Considera-se que material de matrizes porosas, se inerte, não permite o ciclo bioquímico e/ou biológico de crescimento e reparo tecidual, contudo a presença de material bioativo em contato direto com o meio biológico melhora a capacidade osteogênica e osteocondutiva (ALDINI et al., 2002).

Biomateriais, como a alumina, são utilizados em implante ósseo em função da biocompatibilidade e alta confiabilidade mecânica. Desfavoravelmente, um material bioinerte, pode não favorecer o crescimento ósseo para o interior do implante poroso, o que dificultaria sua fixação.

Pesquisas baseadas em adequar as propriedades mecânicas dos materiais inertes com as propriedades bioativas de materiais osseoindutores e osseocondutores planejam a bioativação ou recobrimento da superfície inerte com materiais bioativos para aplicação em reparação óssea (ALDINI et al., 2002; FISHER et al., 2005; HE; ZANG; MANSELL 2008; IGNATIUS et al., 2005; JUN et al., 2003; SU et al., 2007).

As técnicas para recobrimento de materiais bioativos sobre substratos inertes são: síntese sol-gel, plasma spray, deposição física por vapor, e a aplicação de barbotina cerâmica (ALDINI et al., 2002; HAMADOUCHE et al., 2000; KIM et al., 2004). Vários tipos de coberturas e técnicas foram avaliados para fazer a superfície bioativa e melhorar a união química e biológica ao osso (MONTENERO et al. 2000; ROCCA et al., 1998).

Recobrimentos biocerâmicos a base de Cálcio (Ca) e Fósforo (P), são estudados como modificadores de superfície o que resulta em aumento da resposta do hospedeiro ao implante nos períodos iniciais de reparo ósseo.

Em comparação, Mendes et al. (2007), apresentaram resultados de união entre osso e hidroxiapatita em escala nanométrica contra superfícies tratadas apenas por ataque ácido. A superfície utilizada neste estudo é obtida pela deposição de uma camada biocerâmica a base de Ca e P com espessura entre 300-500nm sobre uma superfície de implante previamente jateada por alumina e lavada com ácido. A caracterização previa desta superfície também mostrou que a rugosidade inicial não é alterada significativamente pela deposição da camada biocerâmica (Alumina/ácido  $R_a = 0,66 \pm 0,10 \mu\text{m}$ , e Controle  $R_a = 0,48 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ). Logo, essa superfície melhora o reparo ósseo ao redor do implante devido às suas características de rugosidade e alterações químicas. Deve-se lembrar que a superfície controle utilizada neste estudo foi a mesma superfície rugosa (alumina/ácido) presente antes da deposição iônica da biocerâmica, e não uma superfície lisa.

### 2.3 Materiais em Gradiente Funcional

Um material com **estrutura totalmente densa**, ao ser implantado em tecido ósseo pode não se fixar adequadamente ao tecido, pois a fixação do implante depende principalmente da interface do material. Porosidade controlada proporciona um ambiente propício para a fixação do implante. No entanto um implante denso seria mecanicamente vantajoso, pois os vazios contidos em uma peça porosa aumentam a propensão a fraturas.

Uma tendência atual em pesquisar materiais com porosidades diferentes tem oferecido ênfase aos Materiais em Gradientes Funcionais (MGF) ou *Functional Gradient Materials (FGM)*.

O conceito de materiais em gradiente funcional foi proposto no Japão em 1984 Koizumi e Niino (1995). A partir desta data esses materiais têm inspirado muitos pesquisadores, por combinar propriedades e funcionalidades não encontradas em materiais com estrutura convencional. Inicialmente proposto para a Engenharia Aeroespacial e atualmente têm surgido aplicações para Engenharia Tecidual entre outras. No entanto, a seleção apropriada entre os componentes e técnica que produza as regiões de transição é de essencial importância em projetos que envolvam aplicações para tecido ósseo e reposições dentárias (pinos de dente) (KAWASAKI; WATANABE 2002; WATARI et al. 2004).

Porém um dos desafios em material com estrutura em porosidade gradual seria a delaminação das interfaces com densidades diferentes. Propostas de pesquisas com implantes em gradientes com região de transição, também conhecidos como Materiais em Gradiente Funcional (FGMs) com região de transição fornecem novas expectativas para reduzir ou eliminar problemas de fraturas, delaminação e soltura comuns em implantes homogêneos e/ou bifásicos (SHERWOOD et al., 2002). Outra incessante busca entre os pesquisadores é a aplicação de fatores que promovam crescimento e diferenciação celular para obter sucesso em aplicações para a área ortopédica e buco-maxilo-facial.

Materiais em Gradiente Funcional (FGM) são definidos de acordo com GASIK (2003) como materiais, os quais são baseados em projetos que originam peças que apresentam composição, estrutura e propriedades específicas com o objetivo de serem superiores aos materiais homogêneos, com mesmos ou similares elementos. Segundo Miyamoto et al. (1999) MGF são compostos que apresentam discreta ou contínua variação na composição.

Os projetos fundamentados em MGFs para aplicações em Engenharia Tecidual integram gradientes com sinais controlados espacialmente para conduzir as células, e potencializam com as terapias celulares, segundo Singh, Berkland e Detamore (2008). As

células são sensíveis a variações físicas e estímulos químicos, os quais causam migração (ou “taxis”), esses estímulos são explorados em Engenharia Tecedual (HAGA et al., 2005; LO et al., 2000).

Diversas pesquisas (CHEN et al., 2005; HSU; TURNER; MILES, 2007; LAUF et al., 2001; MIAO; SUN, 2010; OH et al., 2007; SINGH; BERKLAND; DETAMORE, 2008) têm investigado processamentos para obter peças heterogêneas com regiões de transição, como os MGFs. Nesses trabalhos, as diferentes fases, planejadas para gerar o gradiente, apresentam diferentes funções para adequar-se ao projeto.

Vários métodos são propostos para fabricar MGFs, os quais incluem colagem com adesivo, sinterização, *spray* térmico, infiltração reativa, fusão a frio (*freeze-casting*) (MACCHETTA; TURNER; BOWEN, 2009). Centrifugação de suspensão (OH et al. 2007; CHEN et al. 2005) com ou sem secagem a frio, *Tape Casting* múltiplos – este método proporciona peças com tamanho de poros e porosidade controláveis porém pouca interconectividade entre os poros (WERNER et al., 2002).

Um dos maiores desafios ao manufaturar estruturas heterogêneas como os MGFs, está em planejar as regiões de transição. Devem-se selecionar os componentes e conciliar com uma técnica de manufatura apropriada para obtenção de continuidade entre as regiões com diferentes densidades.

Durante a aplicação das técnicas deve-se considerar a temperatura e o tempo de sinterização, momento em que a peça é levada a altas temperaturas e geralmente as regiões com diferentes porosidades e tamanho de poros podem retrair de forma desigual e então ocorrer o destacamento ou soltura de uma região para outra, esse destacamento é denominado delaminação.

FGMs apresentam geralmente frações dos constituintes variadas gradualmente com dimensões geométricas em macro-escalas como espessura de cobertura. Os gradientes podem ser contínuos em níveis microscópicos ou compostos por camadas de metais, cerâmicas e polímeros. As diferentes fases, que surgem a partir da graduação dos constituintes, apresentam diferentes funções para adequar-se ao projeto.

Em estudo realizado por Sherwood et al. (2002), ao manufaturar MGF procurou-se os motivos da delaminação ocorrida conforme o processo de manufatura, em compósito com polímero e Fosfato Tricálcio (TCP) percebem que após lixiviar o cloreto de sódio, material utilizado como formador de poros, houve redução diferente entre a parte porosa e parte densa. Esses autores concluíram que o encolhimento aumenta com o tempo de lixiviação, que quanto menor a temperatura de lixiviação, maior o encolhimento. Para o material estudado por Sherwood et al. (2002) o encolhimento ocorre durante a lixiviação e não após ou durante a secagem.

Chen et al. (2005) utilizaram o método de centrifugação para produzir porosidade gradual em tubos de alumina, como formador de poros os autores utilizaram Poli (metacrilato de metila). Os tubos não evidenciaram delaminação ou trincas.

Em estudo realizado por Oh et al. (2007) a centrifugação foi utilizada para produzir a porosidade gradual e observaram, *in vitro* e *in vivo*, que as células e tecido ósseo mostraram diferentes proporções em diferentes tamanhos de poros, para crescimento celular e regeneração tecidual. O crescimento dos condrócitos e osteoblastos foram mais evidentes entre os poros de 380-405  $\mu\text{m}$ ; os fibroblastos foram encontrados entre os poros de 186-200  $\mu\text{m}$ , e osso recém formado foi encontrado entre 290-310  $\mu\text{m}$ .

Em revisão sobre as técnicas para gerar gradientes, realizada por Singh, Berklund e Detamore (2008) esses autores colocam que as técnicas combinam entrega de sinais físicos (topografia do biomaterial) e químicos (com fatores de crescimento e de diferenciação e com moléculas para adesão celular) para alcançar transição contínua na estrutura e na função.

Singh, Berklund e Detamore (2008) concluíram que moléculas sinalizadoras químicas com gradientes físicos podem fornecer um imenso potencial para a complexa regeneração de tecidos. Os quais em conjunto podem ser os fatores que faltam para cumprir todo o potencial do campo da medicina regenerativa. Outro parecer dessa revisão é que estudos comparativos *in vivo* são requeridos para fornecer evidências substanciais que comprovem o desempenho superior de implantes baseados em gradiente funcional quando comparados com engenharia de tecidos tradicionais.

Fuji Takeshi et al, (2009) pesquisam compósito de fosfato de octacálcio com alginato (Alg/OCP). Para manufaturar estrutura com Material em Gradiente Funcional, realizou-se o seguinte procedimento: fez-se suspensão em água deionizada para obter a barbotina de alginato com fosfato. A solução suspensa foi centrifugada nas velocidades de 3000, 5000, 10000 e 15000 rpm por 5 minutos. O que ficou suspenso sobre a superfície foi removido e liofilizado. Foi formado compósito com diferente tamanho de poros. Finalmente conformaram-se discos de 4 mm de diâmetros e 0,5 mm de espessura.

Esses autores analisaram o efeito da centrifugação em diferentes velocidades com relação ao tamanho de poros e da porosidade. Obtiveram peças com poros de 11; 9,5; 6 e 6  $\mu\text{m}$  e porosidade de 91; 92; 88; 86 %. As amostras foram analisadas *in vivo* em calvária de ratos. Para realização da histologia as amostras foram descalcificadas, desidratadas e incluídas em parafina, fatiadas com espessura de 5  $\mu\text{m}$  e coradas com Hematoxilina – Heosina e Fosfatase Ácida Resistente ao Tártaro (TRAP). Foram analisados os efeitos da porosidade na proliferação de osteoblastos e na interação tecidual. Os resultados deste estudo evidenciaram que quanto maior a porosidade maior a migração de osteoblastos para região.

Contudo, projetos com base em aprimorar a capacidade mecânica de estruturas para implantes ósseos com uma região densa e regiões porosas, possibilitam a investigação de implantes possíveis de serem aplicados em diferentes carregamentos mecânicos com uma maior possibilidade de osteointegração do que as estruturas totalmente densas.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

*Scaffolds* porosos, na forma de corpos-de-prova, foram implantados em tíbias de ratos para caracterizar a interface osso-implante, quanto a fixação da peça com ensaio biomecânico de cisalhamento, quanto a profundidade de formação óssea com análise química de EDS e histologia, quanto a formação de tecidos na interface e nos poros do implante. Para a obtenção de implante baseado em alumina porosa-densa foram elaboradas etapas para determinar a espessura da região porosa limite para garantir interação efetiva com o tecido ósseo e o papel do núcleo denso em fornecer resistência mecânica. Foram planejadas duas etapas.

Na **primeira etapa** manufaturaram-se implantes porosos. Foi planejado implante com poros interconectados o que faz de suas superfícies funcionais, para isto foi desenvolvida manufatura de geração de porosidade com controle do tamanho dos poros e com o recobrimento bioativo nas superfícies dos poros, os quais foram caracterizados quanto a rugosidade superficial, *in vivo* e *ex vivo*.

Esses implantes foram colocados em tíbias de ratos e foram realizadas análises de densitometria mineral óssea *in vivo*, histologia, ensaio de cisalhamento, EDS-*Line-scan* e radiografia de alta-definição *ex vivo*. Com os resultados obtidos no estudo das peças integralmente porosas projetou-se a espessura da superfície porosa para que ao implantar o gradiente funcional, em trabalhos futuros, os poros sejam preenchidos por tecido organizado, pois poros “vazios” são concentradores de tensão e fragilizariam a peça. Verificações com relação a citotoxicidade *in vitro* da alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita foram realizadas por Camilo (2006) e Camilo et al. (2009).

Na **segunda etapa** testaram-se técnicas para manufaturar peças em gradiente funcional proposto por este trabalho, os implantes com núcleo denso e superfície gradualmente porosa foram caracterizados macro e microscopicamente com microscopia eletrônica de varredura.



O material utilizado para a matriz dos implantes foi a Alumina ( $Al_2O_3$ ), material praticamente inerte em meio fisiológico. É conhecido que nenhum material depois de implantado apresenta inércia ao entrar em contato com os fluidos fisiológicos, por este motivo a alumina é conhecida como material praticamente inerte. Neste trabalho o termo **material inerte** será utilizado em vez de **praticamente inerte**.

A alumina é um material não absorvível, apresenta extrema dureza, alto módulo elástico (380 GPa), e baixo custo, sua adoção foi devida às propriedades bioinerte (praticamente bioinerte), boas propriedades mecânicas e ser uma cerâmica muito conhecida como uma cerâmica universal.

Para recobrir a superfície dos implantes foram utilizados Hidroxiapatita e Biovidro, como materiais bioativos, estes materiais são reportados na literatura como referências para osseointegração.

A hidroxiapatita é considerada reabsorvível, dependendo da dimensão de seu particulado (1  $\mu m$ ) apresenta osseointegração mais lenta e reconhecidamente estável, seu Índice de bioatividade é menor que 8 e maior que zero (DUCHEYENE; QUI, 1999).

O biovidro (45S5®) conhecido na literatura como padrão ouro, reporta Hench (1998a) que este material apresenta Índice de bioatividade acima de 8 que o faz capaz de osseointegrar rapidamente (2 horas) e também com tecidos moles, além disto, auxilia na fixação mecânica da hidroxiapatita quando ambos recobrem a superfície de alumina. É idealizado que o biovidro inicialize rapidamente o processo de osseointegração na concorrente formação de tecidos fibrosos.

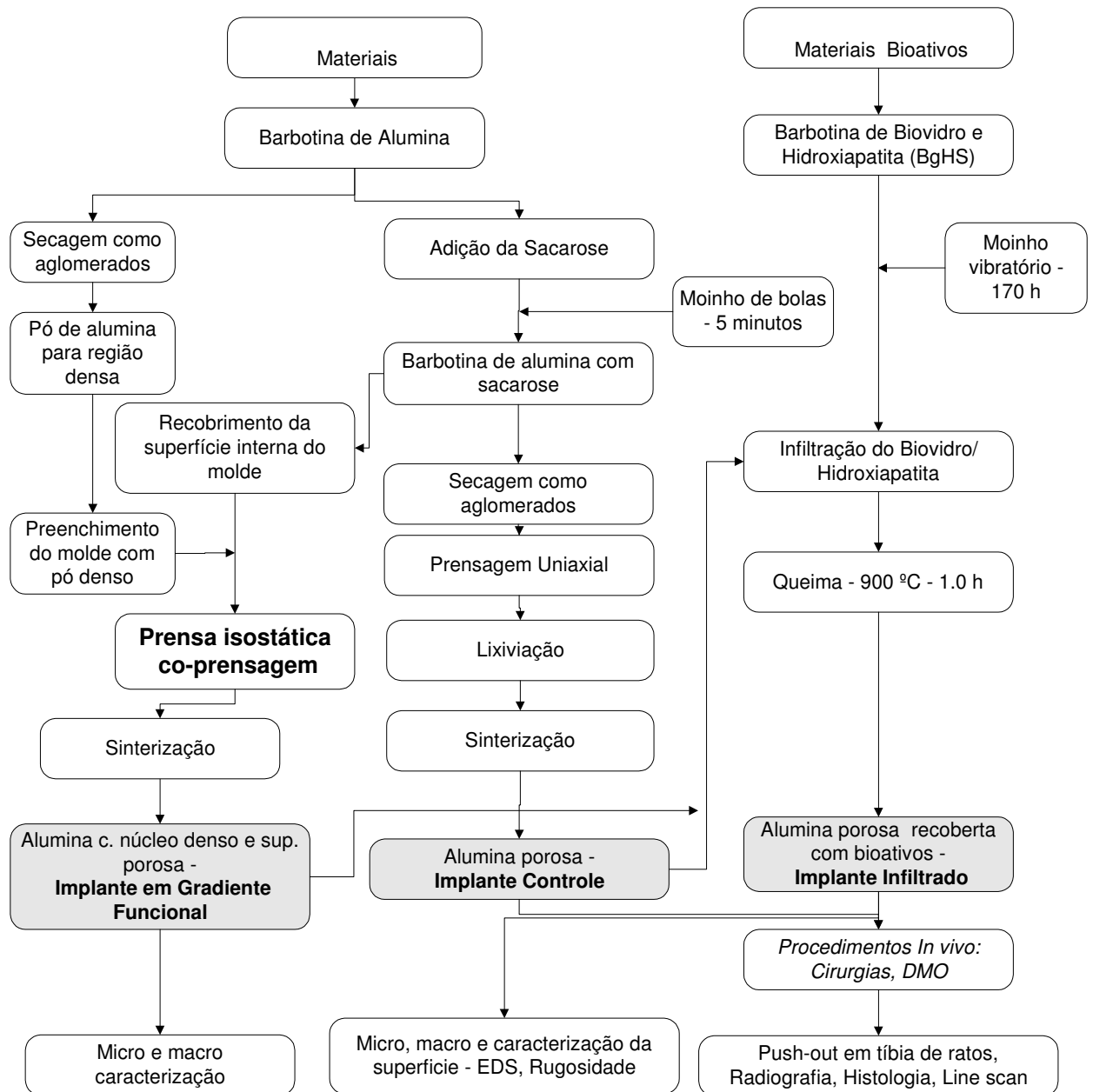
As diferentes técnicas para manufaturar o MGF, foram desenvolvidas para obtenção de peças com regiões contínuas, sem a presença de trincas e delaminação entre as regiões densa-porosa e as regiões menos porosa-mais porosa, ou seja, entre as regiões com diferentes densidades.

Realizaram-se ajustes de moldes de das técnicas e com a melhor técnica, ou seja, aquela que se obteve peças em gradiente funcional inteiras e sem interfaces definidas, planejou-se estudo de caso para conformar o implante em formato de pino de dente, com

projeto e manufatura de molde e usinagem da peça. Na Figura 3.1 é apresentado o fluxograma com os métodos gerais da manufatura e das caracterizações dos implantes porosos e em gradiente funcional.

No fluxograma da Figura 3.1 os procedimentos para manufaturar as peças em **alumina porosa recoberta com bioativos, porosa sem recobrimento e peças com gradiente funcional** e as respectivas caracterizações com rugosidade, EDS e *in vivo* das peças porosas; e micro e macro análises com MEV das peças em gradiente funcional.

Para o preparo das barbotinas utilizou-se alumina em pó e ligante cerâmico, em seguida secou-se para obtenção de aglomerados e formação do pó. A compactação do pó foi realizada com prensagem isostática. Todas as peças foram sinterizadas à 1550 °C durante 1h.



**Figura 3.1** - Manufatura e caracterizações dos implantes porosos e em gradiente funcional. Foram preparadas duas barbotinas, uma para manufaturar as matrizes dos implantes em alumina e outra em materiais bioativos para recobri-las. Foi utilizada a sacarose como material formador de poros. A compactação do pó foi realizada em prensa isostática

Para os estudos *in vivo*, comparou-se alumina porosa recoberta com materiais bioativos, a qual foi denominada **implante infiltrado** com alumina porosa sem recobrimento, a qual foi denominada **implante controle**.

Os implantes em alumina com núcleo denso e superfície gradualmente porosa foram denominados **implantes em gradiente funcional**.

### 3.1 Materiais utilizados como componentes dos implantes

Os materiais utilizados para a manufatura das peças foram:

Como **componente estrutural bioinerte** dos implantes foi utilizada a **Alumina** Calcificada A1000-SG, (Almatis, Inc.).

Como **agente formador de poros** foi utilizada a **Sacarose** (PA) da Synth (LABYNTH Prod. p/ laboratórios Ltda), a sacarose foi separada em peneiras em dois intervalos dos tamanhos de partículas ( $177 < \text{tamanho A} < 300 \mu\text{m}$  e  $300 < \text{tamanho B} < 600 \mu\text{m}$ ), foram misturados 50% em volume (vol%) do tamanho A e 50% vol% do tamanho B. A porosidade planejada de 70% vol%, requer uma entrada de 82% vol% de sacarose.

Como **ligante cerâmico** foi empregado o Polivinil-butiral (PVB) (Butvar B98). Como **solvente do ligante e meio líquido da barbotina** foi utilizado o Álcool Isopropílico (PA) - ACS da (Labsynth Ltda.).

Como **solvente para lixiviação do açúcar** foi usada água destilada nos corpos conformados. Para os implantes em gradiente funcional foi utilizado **polvilho azedo** durante a pré-queima como auxiliador para remoção da sacarose, pois a expansão da sacarose em altas temperaturas pode ser fator causador de trincas na peça.

Como **componente para infiltração – materiais bioativos (1)**, foi utilizada a Hidroxiapatita (Sigma-Aldrich – 289396). Este material apresenta pureza que atende a norma ASTM 1185-03.

O **componente para infiltração (2)** foi empregado o Biovidro (Biogran – 45S5 *Bioglass®*). Para a barbotina de biovidro e hidroxiapatita (BBvH) estabeleceu-se uma

suspensão a 12 vol% de sólidos, 0,3 vol% de PVB e álcool isopropílico. Nos procedimentos o PVB foi considerado como líquido uma vez que estaria dissolvido no álcool.

### **3.2 Matrizes de Alumina Porosa ou Implantes Porosos**

Foram idealizados corpos em alumina porosa, denominados *scaffolds*, que possuem tamanho médio de poros próximo a 192  $\mu\text{m}$ , interconectados e com presença de poros menores que 190  $\mu\text{m}$  e máximo de até 230  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2.1 Manufatura dos Implantes Porosos**

Alumina porosa sem recobrimento e alumina porosa com recobrimento bioativo foram analisadas comparativamente para planejamento de manufatura de estruturas com núcleo denso e superfície gradualmente porosa.

Os poros ou vazios desejados são obtidos com adição de agente formador de poros, sacarose, o qual é inicialmente removido durante a lixiviação com água destilada e o restante é degradado durante pré-sinterização. O tamanho de poros é controlado com a classificação das partículas de sacarose em peneiras. A porosidade foi controlada com a proporção de sacarose na formulação geral da barbotina cerâmica. A forma das peças foi obtida em moldes cilíndricos com prensagem uniaxial, à 10 MPa seguida de compactação dos cilindros em prensa isostática, a 100 MPa. Os corpos-de-prova foram sinterizados e conseqüente aumento do tamanho dos grãos e diminuição da porosidade até obtenção do desejado, nesta etapa planeja-se obter peças porosas e resistentes mecanicamente.

### 3.2.1.1 Preparo das barbotinas

Para os implantes integralmente porosos foram estabelecidas duas composições de barbotina: **a) Barbotina de Alumina** para a matriz do implante com suspensão de 30 % vol., perfazendo 5,4% vol. de alumina e 24,6% vol. de sacarose, 5 vol % de PVB (5% vol.) e 65 vol% de álcool isopropílico considerando como sólida a alumina e a sacarose **b) Barbotina de Hidroxiapatita e Biovidro** para recobrir a matriz dos implantes, fez-se uma suspensão de Hidroxiapatita (6.6 % vol.), Biovidro (3.4 % vol.), PVB (0.3 % vol.), e Álcool Isopropílico (89.7 % vol.).

A mistura, desaglomeração e moagem da composição para a barbotina de alumina foi feita em moinho de bolas durante 6 horas em jarro de polietileno com 400g de elementos de moagem. Para a barbotina de biovidro e HAp foi empregado um jarro de polietileno com volume total de 60 ml carregado com 75g de elementos de moagem esféricos de zircônia com 6mm de diâmetros durante 170h em moinho vibratório.

Acrescentou-se sacarose na barbotina de alumina, e o jarro foi colocado em moinho giratório durante 5 minutos.

### 3.2.1.2 Conformação dos implantes porosos

A barbotina de alumina com sacarose (Fig. 3.2) passou por processo de secagem com soprador de ar quente (até 70 °C) e granulação para obtenção dos aglomerados de prensagem.



**Figura 3.2** – Barbotina de Alumina após a moagem

Os implantes foram conformados em prensa uniaxial à 10 MPa durante um minuto, ilustra-se na Figura 3.3 o molde, com seus componentes fabricados em metal duro, utilizado para conformar as peças, foi planejado de forma a apresentar as extremidades dos dois pinos, inferior e superior, hemisféricas para proporcionar aos implantes formato cilíndrico e extremidades hemisféricas, exigência que atende a Norma ASTM F 981 (2004).



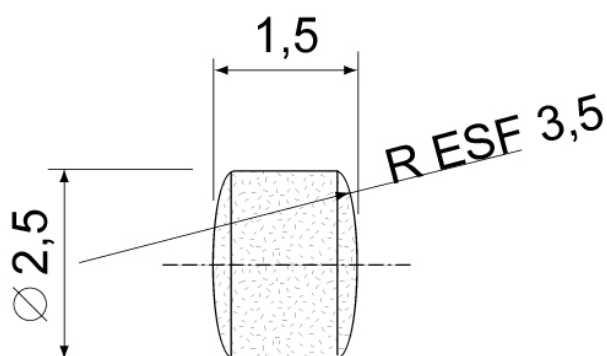
**Figura 3.3** – Molde metálico utilizado para conformar os implantes em alumina porosa em formato cilíndrico

A compactação final das peças cilíndricas foi realizada em prensa isostática à pressão de 100 MPa durante um minuto. Para este procedimento, os implantes foram envolvidos com filme de elastômero, o ar existente entre o filme e a peça foi removido com

bomba de vácuo. Após esta fase as peças foram submetidas a lixiviação em água destilada durante 2 horas sem agitação, para remoção da sacarose.

Na fase de queima antes da sinterização a sacarose remanescente foi removida por decomposição térmica e volatilização, a temperatura de sinterização foi 1550 °C com patamar de uma hora. Após esta fase os implantes apresentam diâmetro 2.5 mm ( $2,52 \pm 0,05$ ) e altura 1.5 mm ( $1,48 \pm 0,22$ ). O desenho dos implantes cilíndricos com as extremidades hemisféricas é mostrado na Figura 3.4.

Como a retração durante a sinterização não é a mesma para todas as peças, foram manufacturados 300 implantes e desses 110 apresentaram dimensões adequadas para implantar e 104 foram implantados.



**Figura 3.4** – Desenho dos implantes porosos cilíndricos, com as extremidades hemisféricas, exigência da ASTM F 981 (2004). Dimensões em mm

As matrizes de alumina porosa foram recobertas com materiais bioativos na superfície dos poros.

### 3.2.1.3 Infiltração dos materiais bioativos na matriz de alumina porosa

A barbotina de hidroxiapatita e biovidro foi utilizada para infiltrar nos implantes porosos. O método consiste em imergir as peças na barbotina e acionar o vácuo durante um minuto. Em seguida as peças foram levadas para a queima à 900 °C durante 1h.



### 3.2.1.4 Justificativas Sobre a Validação da Superfície Porosa Recoberta com Materiais Bioativos e Denominação dos Implantes Porosos

Para avaliar o potencial de adesão biomecânica interfacial, de osteointegração e formação tecidual *in vivo* em matrizes porosas em alumina recobertas com biovidro e hidroxiapatita – denominadas **Scaffolds** ou **Implantes Infiltrados** – analisou-se comparativamente com matrizes sem recobrimento – denominadas **Scaffolds controle ou Implantes controle** ou **não infiltrados**.

As análises dos implantes porosos foram programadas para caracterizar respostas biológicas na interface osso-implante e nos poros para programar o projeto e a manufatura das peças com núcleo denso e superfície gradualmente porosa. A investigação consistiu em observar se há uma profundidade de formação tecidual nos poros para planejar a espessura da região porosa nas peças em gradiente funcional de porosidade. Ou seja, para manufaturar peças com espessura de região porosa que permita a formação de tecido mineralizado em contato com a parede dos poros, pois poros sem tecido organizado podem ser concentradores de tensão e fragilizam a peça.

Os implantes infiltrados apresentam 70% de porosidade, resposta mecânica a compressão com valor de 43.27 MPa (CAMILO., 2006; CAMILO et al., 2009). A alumina é material praticamente inerte em meio fisiológico e não absorvível

As análises dos implantes porosos foram as seguintes: estudo do impante infiltrado com **MEV-EDS** para investigar a distribuição de material bioativo nas peças recobertas, **rugosidade superficial** para verificar quanto o recobrimento interfere na rugosidade das peças, pois a rugosidade interfere nas respostas de osteointegração dos implantes; quanto mais rugosa a peça melhor será a fixação ao osso. Após seguiu-se com o estudo *in vivo*, implantou-se em tíbias de ratos, realizou-se **exame de DXA** nos animais durante o período experimental, para mensurar a densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo

(CMO), e nas tíbias após ressecção realizou-se **histologia, ensaios biomecânicos, EDS *Line-scan* e radiografia** de alta definição.

### **3.2.2 Análise química do implante - Espectroscopia de Dispersão de raios-X (EDX)**

O objetivo dessa análise foi verificar a distribuição do recobrimento com materiais bioativos nos implantes em alumina porosos recobertos com biovidro e hidroxiapatita.

A superfície de fratura da alumina infiltrada foi analisada com análise química da seguinte forma: as amostras foram recobertas com carbono, utilizou-se um equipamento EDX *Link Analytical*, modelo QX 2000, acoplado a um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo LEO 440. Realizou-se a análise com um feixe de elétrons de 20keV. O microscópio utilizado foi LEO modelo 440 disponibilizado pelo CAQI – IQSC – USP.

### **3.2.3 Rugosidade Superficial**

Este ensaio foi realizado no Departamento de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Características da superfície do implante, como a rugosidade e a presença ou ausência de materiais bioativos, podem interferir na integração óssea de implantes e alterar a resposta do implante durante os testes de cisalhamento.

Imagens tridimensionais da superfície dos implantes porosos com recobrimento bioativo e sem recobrimento, foram realizadas com perfilometria para comparar a superfície de rugosidade dos implantes.

A rugosidade superficial das peças foi analisada com a utilização de perfilometro de superfície. A análise foi realizada em perfilometro *Veeco - Wyko NT 1100*. Obtiveram-se os

parâmetros médios de rugosidade (Rm) e rugosidade total (Rt). Utilizou-se teste *t* pareado, sendo  $p < 0.05$  considerado estatisticamente significativo.

### 3.2.4 Estudo *In Vivo* dos Implantes porosos

Foram comparados implantes infiltrados com implantes não infiltrados em estudo *in vivo*. Seguiu-se a Norma ASTM F981 (2004), a qual padroniza o número mínimo de animais por grupo em 5.

O sítio para realização do defeito ósseo e implantação do biomaterial foi a tíbia, pois a técnica cirúrgica já estava em andamento nos trabalhos realizados no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, local onde foram realizadas as primeiras cirurgias, e também por ser um osso de fácil acesso, e que apresenta semelhanças com a mandíbula no reparo e remodelamento ósseos, conforme estudo realizado por Najjar e Kahn (1977).

Com isso a tíbia é um sítio que permite a realização de defeitos ósseos para estudos de biomateriais com possíveis aplicações nas áreas ortopédica, odontológica e buco-maxilo-facial.

O estudo *in vivo* foi realizado em dois locais, no Departamento de Fisioterapia da UFSCar e no Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

A fase realizada no Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foi denominada **Fase 1**.

**Na Fase 1** padronizou-se o tamanho do defeito ósseo, definiu-se a dimensão dos implantes e realizaram-se os primeiros implantes em ratos. Fizeram-se os primeiros ensaios biomecânicos e preparo histológico. Sendo importante para ajustar os dispositivos de ensaio e aprimorar o preparo da amostra para o teste. Com relação à histologia, os primeiros cortes histológicos foram com disco diamantado, não se obteve espessura igual para histologia em

todas as lâminas, e a padronização da espessura também foi de difícil tarefa. A partir deste preparo histológico, buscaram-se outras parcerias para obtenção de lâminas histológicas com potencial para a análise desejada.

A **Fase 2** do estudo *in vivo* foi realizada no Departamento de Reumatologia – Laboratório de Inflamação – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (FMUSP). A realização da segunda fase na FMUSP foi devido a parceria com outros trabalhos relacionados ao mesmo biomaterial aplicado como enxerto em outro sítio de implantação (mandíbula), também pela disponibilidade de equipe técnica para auxiliar na manutenção dos animais e durante os procedimentos cirúrgicos bem como pela possibilidade de realizar a Densitometria Mineral Óssea nos animais antes da implantação e antes da eutanásia, este exame é de grande importância por fornecer respostas do metabolismo ósseo com os animais vivos, porém de investigação não local como os realizados *ex vivo*, ou seja ensaio biomecânico, histologia, EDS – *Line scan* e Radiografia.

Os projetos relacionados aos estudos *in vivo* foram avaliados por Comitês de Ética para Experimentação Animal, os certificados estão nos ANEXOS A e B. Os pareceres com numeração de protocolos são 021/2008 na primeira fase (UFSCar) e 0218/09 na segunda fase (FMUSP).

#### **3.2.4.1 Formação dos Grupos Experimentais**

No total foram implantadas 104 peças (27 na Fase 1 e 77 na Fase 2) em ratos (machos) adultos da raça *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus)*; massa corpórea 260-300g ( $285.39 \pm 17.42$ ); idade entre 8 a 9 semanas; condição geral e motricidade normais.

O número total de animais estudados foram 78, sendo 14 na primeira fase e 64 na segunda fase. O estudo foi realizado com machos, pois ratas (fêmeas) apresentam ciclo estral mensal, este fator faz com que as fêmeas sofram alterações hormonais freqüentes, essas alterações poderiam aumentar as variáveis do estudo.

Para o tratamento dos dados foram utilizados 5 animais de cada grupo em cada período experimental, com exceção do grupo controle-controle (sem implante), o qual se utilizou menos animais, pois se fez o defeito em ambas as tíbias sem implantar, sendo que ambas foram para a mesma análise *ex vivo*, a histologia.

Na primeira fase os animais vieram do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), na segunda fase vieram do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A água e alimentação foram mantidas *ad libitum*. Os tempos experimentais foram de 2; 2,5; 3 e 4 semanas – sendo períodos padronizados pela ISO 10993 – 6 (2007), para estudos de curtos períodos.

Para cada fase houve 2 períodos experimentais, ou seja, eutanásias em períodos diferentes. Sendo que na **Fase 1** os animais permaneceram com os implantes durante 18 e 21 dias.

Na **Fase 2** definiu-se 14 e 28 dias. Os grupos foram denominados de acordo com os implantes que receberam, sendo que se fez controle do implante teste, ou seja, do implante infiltrado, fez-se controle do defeito ósseo (Grupo Controle-controle, os animais receberam o defeito ósseo sem colocação do implante), fez-se controle para o exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA) (Grupos Infiltrado-1Tibia e Controle-1Tibia; nesses grupos os animais receberam o implante em apenas uma tibia).

### **Fase 1**

**Grupo Infiltrado 1 (n=7):** recebe implante infiltrado em ambas as tíbias (Alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita). Três animais deste grupo receberam eutanásia com 18 dias e quatro animais receberam eutanásia com 21 dias.

**Grupo Controle 1 (n=7):** recebe implante controle em ambas as tíbias (Alumina porosa). Três animais deste grupo receberam eutanásia com 18 dias e quatro animais receberam eutanásia com 21 dias.

### **Fase 2**

Na Tabela 3.1 mostra-se a formação dos grupos experimentais na fase 2, com os períodos de implantação e o número de animais por grupo.

**Tabela 3.1** – Formação dos grupos experimentais durante os estudos *in vivo* na Fase 2. Com o período de implantação e número de animais (n) por grupo.

<b>Fase 2</b>		
<b>Período de implantação (Dias)</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>Grupos/nº de animais</b>		
<b>Infiltrado*</b>	7	7
<b>Controle**</b>	7	7
<b>Controle-Controle***</b>	5	2
<b>Infiltrado-1 Tibia****</b>	-	5
<b>Controle-1 Tibia*****</b>	-	5

\*Grupo com Implante infiltrado em ambas as tíbias (Alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita). \*\* Grupo com implante controle (Alumina porosa). \*\*\* Grupo com defeito ósseo em ambas as tíbias sem implantação do biomaterial. \*\*\*\* Grupo com implante infiltrado na tíbia direita e defeito ósseo na tíbia esquerda. \*\*\*\*\* Grupo com Implante controle na tíbia direita e defeito ósseo na tíbia esquerda.

### 3.2.4.2 Esterilização dos Implantes

Os implantes foram esterilizados em autoclave com calor úmido à temperatura de 121°C durante 20 min (GUEHENNEC et al., 2005).

### 3.2.4.3 Procedimento anestésico

Na **Fase 1** os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (40mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente) em via intramuscular. Na **Fase 2** os animais foram anestesiados com os mesmos anestésicos com dose 1:1 (20ml/100g) em via intraperitoneal. Estas doses mantiveram os animais anestesiados durante 30-40 min, período necessário para a realização dos procedimentos.

#### **3.2.4.4 Mensuração da densidade mineral óssea corpórea - Exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA)**

Este exame foi realizado com os animais anestesiados, após realizar os procedimentos para o primeiro grupo, depois do exame de DXA e da cirurgia, no mesmo dia, o que resultou em 3 óbitos no dia seguinte. Definiu-se a realização do exame uma semana anterior à cirurgia de implantação, pois duas doses de anestésico no mesmo dia podem ser a causa dos óbitos.

O exame foi realizado com o Densitômetro Hologic QDR 2000 (Hologic Inc. Bedford, MA), com software especialmente desenvolvido para análise de dados em pequenos animais. O local dos exames foi no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais **foram avaliados em dois momentos, uma semana antes da cirurgia e no dia da eutanásia**. As regiões de interesse (ROI) foram corpo total, coluna lombar (L1-L4), tíbia e fêmur. Com este exame pode-se obter valores quantitativos, da densidade mineral óssea, do conteúdo mineral ósseo, da massa corporal total, da massa magra total, da porcentagem de gordura total e da área de cada região de interesse.

Para obter o coeficiente de variação realizou-se o exame de EDX da densidade mineral óssea (DMO) com 5 medidas de cada região de interesse, com reposicionamento, em 2 ratos.

#### **3.2.4.5 Cirurgias de Implantação do Biomaterial**

A Norma ASTM F981 (2004), a qual padroniza a compatibilidade de biomateriais utilizados como implante cirúrgico e a *International Standard Organization* – ISO 10993 – 6 (2007), a qual padroniza a avaliação biológica de produtos médicos, foram utilizadas parcialmente.

As cirurgias foram realizadas em ambas as tíbias, os defeitos unicorticais (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM - F981, 2004).

Segundo a ISO – 10993 – 6 (2007) os implantes controle e teste poderão ser implantados em um mesmo animal em membros contralaterais, porém esta pesquisa visa o estudo histológico e biomecânico, havendo a necessidade de implantar em um mesmo animal o mesmo tipo de implante bilateralmente.

### **Defeito ósseo nas tíbias e implantação do biomaterial**

Foi realizado um defeito na tíbia esquerda e um defeito na tíbia direita de cada animal, da seguinte forma: para a implantação do biomaterial realizou-se tricotomia da região medial entre o fêmur e a tíbia; incisão na pele, longitudinalmente ao membro na região medial e proximal da tíbia, seguida de uma divulsão total da pele, até a visualização da tíbia.

**Para realizar o defeito 1: na tíbia esquerda**, fixou-se o paquímetro a 10 mm da linha articular do joelho, marcou-se esse ponto com porta agulha fixado na pele adjacente e realizou-se a perfuração.

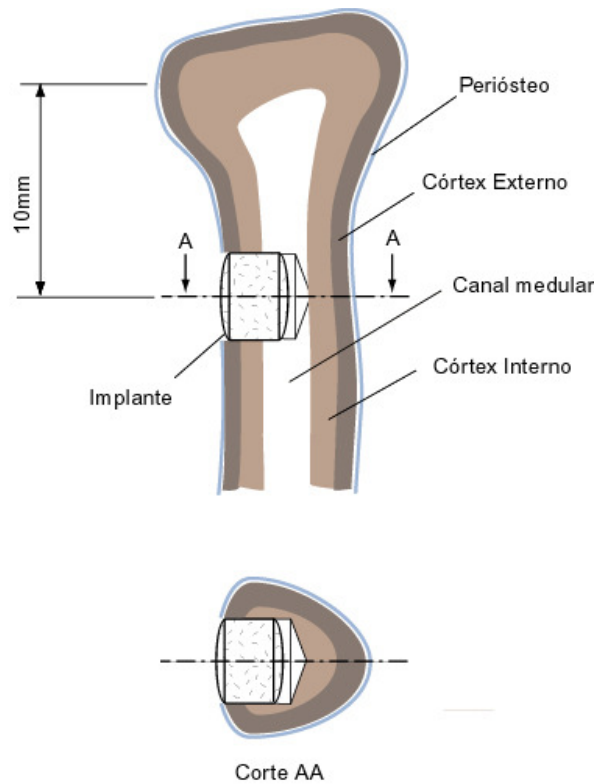
Para realizar o **defeito 2: na tíbia esquerda**, fixou-se o paquímetro a 10 mm da linha articular do joelho, marcou-se esse ponto com porta agulha fixado na pele adjacente e realizou-se a perfuração.

Para realizar o defeito unicortical na diáfise da tíbia utilizou-se uma broca, com 2,4 mm de diâmetros, acionada por um micromotor. Fixou-se a broca de forma perpendicular ao osso, utilizou-se solução salina estéril no momento da perfuração sobre a região do defeito, o diâmetro do defeito foi aproximadamente de 2,5 mm, realizou-se a perfuração de uma cortical óssea (ASTM – F981, 2004).

A introdução do implante no defeito foi realizada com uma pressão digital, deve-se encaixar o implante de forma que fique justo ao defeito, Figura 3.5. Suturam-se os planos



internos (Músculos) com fio de sutura absorvível e o plano externo (Pele) com fio *catgut* cromado 5-0.



**Figura 3.5** – Desenho da inserção do implante ao osso. O defeito foi realizado em uma cortical óssea

### Manutenção dos animais

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem, mantidos em grupos de 5, nas mesmas condições ambientais (manejo, *ad libitum* e limpeza da gaiola) até o final do experimento, quando foram submetidos à eutanásia.

#### **3.2.4.6 Eutanásia**

Os animais da Fase 1 foram submetidos à eutanásia após 18 e 21 dias da cirurgia de implantação, injetando-se cloreto de potássio (KCl) 10% intracardíaco. Nos animais da Fase 2 a eutanásia foi realizada em câmara de dióxido de carbono.

#### **3.2.4.7 Ressecção das tíbias**

Para a retirada das tíbias, realiza-se a desarticulação do joelho e do tornozelo e em seguida disseca-se a tíbia.

Após a retirada de ambas as tíbias, foram armazenadas em frascos, devidamente identificados. A tíbia direita foi armazenada em frasco com soro fisiológico, mantida em congelador, foi encaminhada para ensaio biomecânico de *push-out* para mensurar a resistência ao cisalhamento. As tíbias esquerdas foram armazenadas em frascos com álcool 70%, mantidas em refrigerador, foram encaminhadas para histologia, radiografia de alta-definição, análise química com EDS-*Line Scan*.

Após a retirada das tíbias suturou-se os planos cirúrgicos incisados, os ratos foram embrulhados em papel e plástico apropriados e firmemente vedados, depois depositados em sacos plásticos próprios para materiais biológicos e levados ao depósito específico.

#### **3.2.4.8 Ensaio mecânico**

Após 14 e 28 dias de implantação, fez-se a eutanásia nos animais, removeram-se as tíbias, as quais foram armazenadas em soro fisiológico e mantidas em congelador durante 30 dias. Doze horas antes do ensaio mecânico as amostras foram colocadas no refrigerador para serem descongeladas. Seria ideal manter as tíbias em dimetilsulfóxido (DMSO) em vez de soro fisiológico e armazenar em criopreservação em vez de congelador. Porém, não

havia esses recursos à disposição. Como os estudos da presente pesquisa foram comparativos entre os implantes teste e controle, as alterações que ocorreram na estrutura óssea das tíbias quando mantidas em congelador, foram consideradas iguais para as amostras, pois essas foram mantidas durante o mesmo período em congelador.

Os implantes de alumina porosa infiltrada com biovidro e hidroxiapatita foram denominados **implantes infiltrados**, esses foram comparados com implantes de alumina porosa sem infiltrado, denominados **implantes controle**.

Os ensaios de retenção ou cisalhamento foram realizados no laboratório de ensaios mecânicos do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos na Universidade de São Paulo.

O ensaio consistiu em apoiar a face medial da tíbia em uma base contendo um orifício de três milímetros de diâmetro de tal maneira que ocorra o alinhamento do implante inserido na tíbia com o orifício da base.

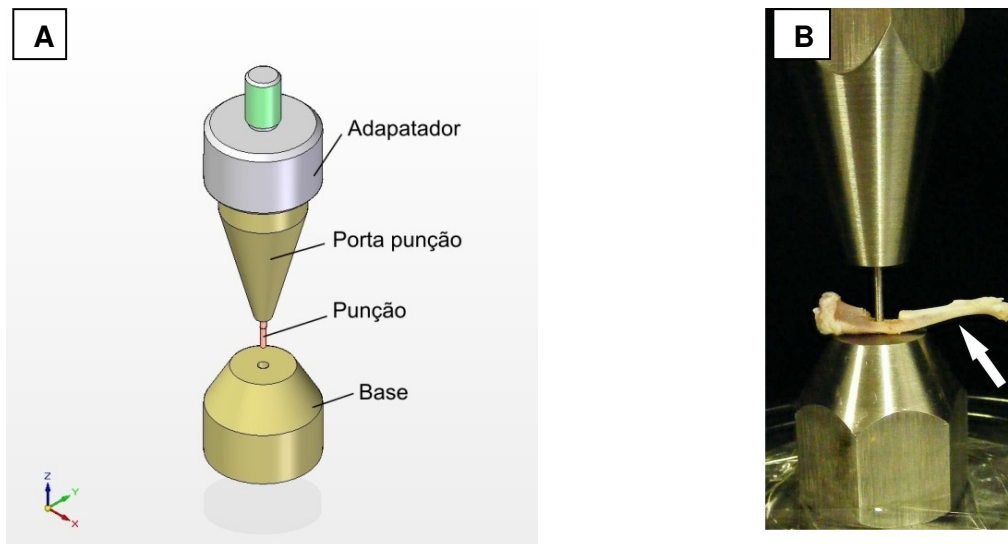
O atuador foi conectado à célula de carga e à parte móvel da máquina de ensaios. O movimento de descida do atuador promoveu a compressão do implante e o seu deslocamento.

O preparado das tíbias para este teste foi realizado com a remoção cuidadosa da cortical não perfurada durante a cirurgia, a cortical contralateral à inserção do implante foi removida para expor a face do implante a ser empurrada durante o ensaio biomecânico. Foi utilizado disco diamantado acionado por dispositivo perfurador. Pode-se observar na Figura 3.6 uma tíbia com a cortical removida. Todas as amostras encaminhadas para os ensaios biomecânicos tiveram a cortical contralateral removida, por esta razão não se considerou as possíveis alterações estruturais provocadas no osso pela vibração do dispositivo, sendo que a análise foi comparativa entre as amostras.



**Figura 3.6** – Imagem de uma tíbia preparada para o ensaio biomecânico, a cortical contralateral à inserção do implante foi removida para expor a face do implante a ser empurrada. A seta branca indica a cortical do osso, a seta cinza indica o implante

O dispositivo para realização do ensaio foi manufaturado na oficina do Laboratório de Processos de Fabricação do Departamento de Engenharia Mecânica da EESC – USP, Figura 3.7 (A). O posicionamento da tíbia no dispositivo está ilustrado na Figura 3.7 (B).



**Figura 3.7** – (A) Desenho do dispositivo para teste de cisalhamento. (B) Seta branca indica tíbia posicionada no dispositivo durante teste

Utilizou-se Máquina de Ensaio Mecânico – EMIC, Célula de carga de 500 kgf (5 KN), Temperatura 23 °C, Fundo de escala 450 kgf, Velocidade de ensaio 0,5 mm/min (HING et al., 2004). Os ensaios foram interrompidos após atingir a força máxima determinada pela queda subsequente da curva.

A Tensão de Cisalhamento ( $\tau$ ) foi calculada com a aplicação da Equação 1 e os seguintes dados foram utilizados: diâmetro do implante (2.5 mm), diâmetro da punção do dispositivo (2.0 mm), espessura da cortical do osso (média = 0,97 mm  $\pm$  0,1) e Força máxima.

$$\tau = \frac{F}{S} \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo que Tensão de cisalhamento é a  $F$  - Força Máxima;  $S$  - Área da superfície cisalhante, ou seja, a área lateral do cilindro:  $\pi dh$ ,  $d$  - diâmetro do atuador,  $h$  - altura do implante.

#### 3.2.4.9 Preparo das Tibias para Histologia de Tecido Mineralizado

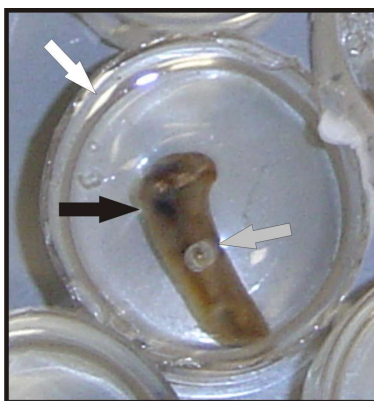
O preparo histológico para avaliar a interação osso-implante de material com extrema dureza, não são processados por técnicas convencionais como a inclusão em parafina, por exemplo. Como os implantes em alumina estudados nesta pesquisa são de extrema dureza deve-se preparar para realização de desgaste dos cortes, a inclusão das amostras deve ser realizada em resina mais resistente do que a parafina.

O preparo das amostras até obtenção do bloco foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi o mesmo entre a **Fase 1** e a **Fase 2**, porém a microtomia foi diferente entre as duas fases.

Foram analisados a interface osso-implante e os poros dos implantes quanto a presença de tecido ósseo recém formado, presença de tecido de granulação e organização tecidual. Comparativamente entre os implantes e os períodos experimentais.

O procedimento foi realizado de forma a manter os ossos mineralizados, para a realização da histologia e da análise química por EDS – *Line scan*, esta última consiste em analisar os elementos químicos existente na amostra.

A sequência para preparo das amostras e obtenção do bloco utilizado para a microtomia foi da seguinte forma: fixação em etanol; desidratação; inclusão em resina- Poli (metacrilato de metila) (Figura 3.8); preparação e identificação do osso embutido em resina, o procedimento completo é descrito na tabela do APÊNDICE A.



**Figura 3.8** – Tibia após o período experimental com o implante. Amostras embutidas em PMMA para formar o bloco para microtomia. Seta branca indica o PMMA. Seta preta indica a tibia. Seta cinza indica o implante

## A Microtomia

Para cortar materiais de extrema dureza como a alumina, deve-se utilizar disco diamantado ou fita diamantada. A espessura de corte obtida foi em torno de 500  $\mu\text{m}$  com disco diamantado na Fase 1 e 400-450  $\mu\text{m}$  com fita de corte diamantada na Fase 2.

Há a necessidade de desgaste e polimento do corte, porém na **Fase 1** este processo foi manual, e obteve-se espessura em torno de 100 a 150  $\mu\text{m}$ , na **Fase 2** o desgaste e polimento foram realizados com sistema automático, obtendo-se espessura de corte entre 39 e 4  $\mu\text{m}$ .

Em ambas as fases foi retirado um corte para cada tíbia.

Na **Fase 1** a microtomia foi realizada em micrótomo com disco diamantado (Modelo Isomet “BUEHLER” – *Low Speed Saw*) obteve-se cortes com espessura de 500 µm. Os cortes foram lixados até 150 µm de espessura. Em seguida foram colocados em lâminas gelatinadas (solução a 2%) com álcool 50% e 100% (APÊNDICE A). Após a microtomia, as lâminas permaneceram em estufa a 37°C durante 12 horas e foram encaminhadas para coloração.

Na **Fase 2** a microtomia foi realizada no Laboratório para preparo histológico com sistema EXAKT na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. As tíbias emblocadas foram cortadas com fita diamantada, em seguida realizou-se micro-desgaste em equipamento tipo politriz com dispositivo digital e sensor controlador da espessura de desgaste, as espessuras das lâminas obtidas foram entre 39-4 µm, os equipamentos utilizados estão descritos no APÊNDICE B.

## **B Coloração**

### **FASE 1**

A coloração na Fase 1 foi no Laboratório de Fisiopatologia Renal da FMUSP.

A coloração consistiu em aplicar Azul de toluidina 0,1% em Solução 1-17,0g de fosfato de Sódio Dibásico 12 H<sub>2</sub>O (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O).

O corante azul de toluidina é um corante básico e liga-se a estruturas basófilas das células e tecidos, os componentes dos tecidos que reagem com corantes básicos o fazem por conter ácidos em sua composição.

Após a coloração com azul de toluidina as lâminas foram observadas em microscópio Leica-Leitz-DM-RX. As imagens foram adquiridas sob luz transmitida e

avaliadas com Software *Motic Image – advanced* 3.2, no Laboratório de Transformação de Fase da Escola de Engenharia de São Carlos.

## **FASE 2**

A coloração da Fase 2 foi no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Coraram-se as lâminas com Hematoxilina – Eosina (HE), conforme o protocolo que se segue:

**Solução de Hematoxilina:** 2.5 g de hematoxilina, 25 ml de álcool 100%, 50 g de alúmen de amônio ou potássio, 500 ml de água destilada, 1.25g de óxido vermelho de mercúrio, 20 ml de óxido acético. Dissolver a hematoxilina, no álcool, dissolver o alúmen na água destilada (previamente aquecida). Posteriormente, as duas soluções devem ser misturadas e aquecidas até a fervura. O óxido de mercúrio é adicionado à solução que deve ser resfriada, mergulhando-se o frasco em água fria. O ácido acético é então colocado na solução fria para finalmente ser filtrada.

**Solução de Eosina:** 1 grama de eosina dissolvida em 100 ml de água destilada,

**Montagem e coloração das lâminas:** banho das lâminas em hematoxilina durante 2 minutos, deixar em água corrente durante 7 minutos, banho em eosina durante 20 min.

Foram analisados a interface osso-implante e os poros do implante, fez-se quantificação: da área do implante e área de tecido nos poros

## **C Histologia e Morfometria**

As imagens para histologia e morfometria foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo (UNIFESP) com o *software Motic* 2.0.

A análise morfométrica foi realizada com o *software Image Tool for Windows* 3.0 (UTHSCA). O campo de observação foi do centro do implante para a superfície de contato entre o osso e o implante.



Foram obtidos os valores dos perímetros da superfície do implante e do contato ósseo, valores dos perímetros dos poros e do contato com o tecido ósseo recém formado, para obtenção da porcentagem de contato ósseo na superfície do implante (Equação 2).

$$\% \text{ Contato ósseo no poro} = \frac{\text{Perímetro do contato ósseo } (\mu\text{m})}{\text{Perímetro do Implante } (\mu\text{m})} \cdot 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Obtenção da porcentagem de contato ósseo nos poros dos implantes (Equação 3).

$$\% \text{ Contato ósseo no poro} = \frac{\text{Perímetro do contato ósseo } (\mu\text{m})}{\text{Perímetro do Poro } (\mu\text{m})} \cdot 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Foram também obtidos os valores de diâmetro dos poros, perímetro de tecido recém formado nos poros. Esses valores foram comparados entre os implantes controle e infiltrados, nos períodos de 14 e de 28 dias.

#### 3.2.4.10 Estudo radiográfico

As amostras embutidas em PMMA foram encaminhadas para o exame de radiografia de alta-definição antes de irem para microtomia.

Esta análise foi realizada com o apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Biobabrição - BIOFABRIS - (Processo 573661/2008-1) edital nº.15/2008 e também da Rede Biofab. (Rede Ibero Americana de Biofabricação).

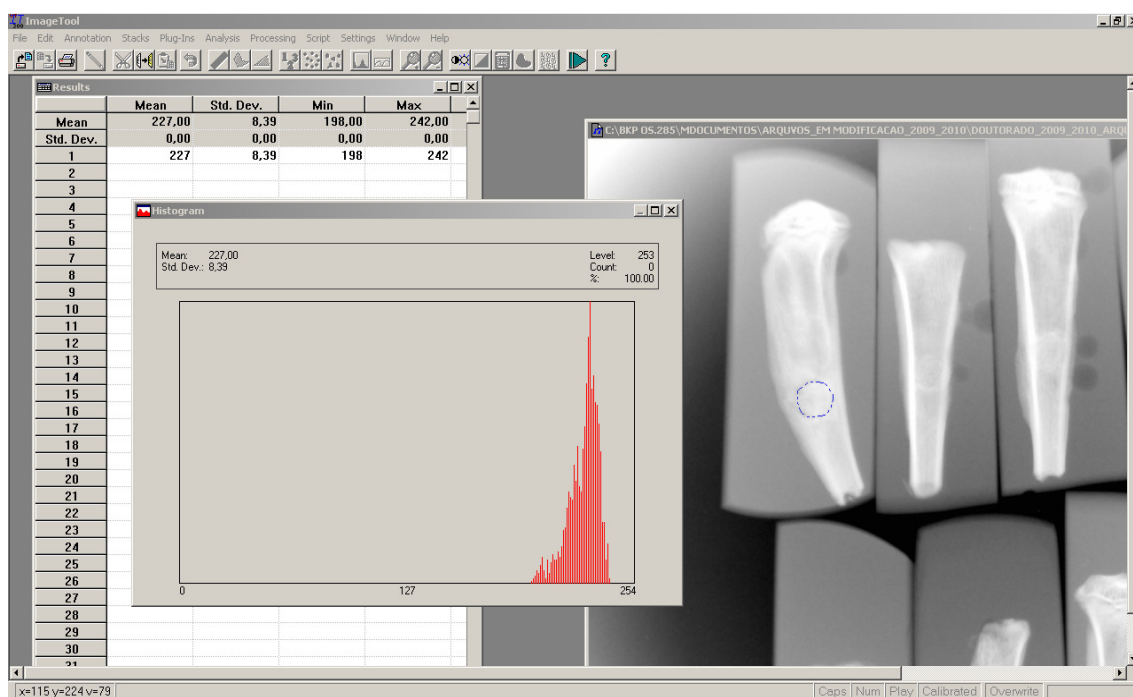
O sistema utilizado está localizado no Laboratório de Engenharia Tecidual e Biofabricação do CTCMol (Centro de Terapia Celular e Molecular) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-SP).

Foi utilizado equipamento para exame radiográfico em animais de pequeno porte, parâmetros iguais foram utilizados para todas as amostras: colimação: 7, Tempo: 2 min., Foco: 60. Foi observada nas imagens do exame radiográfico a região de interface osso-implante. Para esta análise a região de interface osso-implante radiopaca é indicação de

região mineralizada, região de interface osso-implante radio translúcida é indicação de pouca mineralização na interface.

As imagens radiográficas foram analisadas quanto à escala de tons de cinza na interface osso-implante com a utilização do *software Image Tool for Windows 3.0* (UTHSCA). Todas as imagens obtidas foram salvas em formato *TIF*, formato não compactado, em resolução de 400 *dpi*, e no formato de 8 *bits*, em tons de cinza. As imagens em 8 bits possuem tons de cinza, os quais possuem valores entre 0 a 256, sendo que o extremo 0 é a cor preta e 256 é a cor branca, entre esses dois valores são os tons intermediários. É considerado que quanto maior o valor encontrado, maior a radiopacidade da região analisada, o que representa região mais mineralizada na interface osso-implante.

Na Figura 3.9 pode-se observar a interface gráfica do programa.



**Figura 3.9** – Interface gráfica do *software Image Tool for Windows 3.0* (UTHSCA), utilizado para a análise de escala de tons de cinza das radiografias

### 3.2.4.11 Espectroscopia de Energia Dispersiva – *Energy Dispersive Spectroscopy* – (EDS) e Line Scan

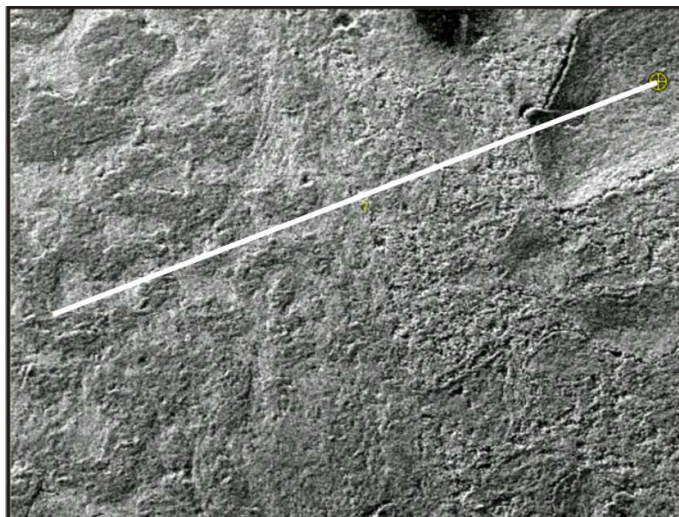
Para estas análises foram utilizadas as amostras emblocadas, após a microtomia as túbias com implantes embutidas foram polidas e encaminhadas para o EDS e *Line-scan* em microscópio de varredura eletrônica.

As análises foram realizadas com a utilização de um equipamento EDX *Link Analytical*, modelo QX 2000, acoplado a um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo LEO 440.

Esta técnica nos fornece a porcentagem dos elementos químicos na interface osso-implante e nos poros do implante e um espectro dos respectivos elementos.

Na **Fase 1** as amostras emblocadas foram preparadas para esta análise com recobrimento de 20nm de ouro em metalizador Balsers modelo SDC 050 (Liechtenstein, Alemanha), foi utilizado detector de elétrons secundário (SE).

A técnica *Line-scan* consiste em primeiramente recobrir as amostras com uma camada de ouro seguida de análise de EDS, e imagens de MEV na sequencia foi traçada uma linha sobre a região da amostra em que se deseja analisar. Nas análises realizadas o tamanho da linha traçada foi entre 600 a 1000  $\mu\text{m}$ . A Figura 3.10 ilustra a linha traçada na interface osso-implante. Este ensaio foi elaborado na idealização de que a medição de elementos químicos no interior dos poros pode sinalizar a espessura de preenchimento ósseo da superfície para o interior do poro.



**Figura 3.10** – *Line-scan* da interface osso-implante. Os elementos químicos sob a linha traçada foram identificados

Na **Fase 2** realizou-se esta análise com recobrimento de carbono, e utilizou-se detector de elétrons retro-espalhados (QBSD), Foram traçadas uma linha na interface osso-implante, e três linhas na região de implante.

### **3.3 Manufatura das Peças com Núcleo Denso e Superfície Gradualmente Porosa**

Foram testadas técnicas para manufaturar peças com núcleo denso e superfície gradualmente porosa com objetivo de obter implantes para aplicações que exijam relativa resistência mecânica e que confirmam osteointegração.

Nas técnicas empregadas foi obtido o pó para a região densa e barbotina para a região porosa da seguinte forma:

**Pó de alumina para a região densa:** foram adicionados em jarro contendo elementos de moagem, pó de alumina, (Poli) Vinil Butiral e álcool isopropílico, o jarro permaneceu durante 6 horas em moinho de bolas, após a obtenção da barbotina, secou-se o álcool com soprador de ar e granulou-se manualmente na obtenção dos aglomerados relativo a região densa.

**Barbotinas para a região porosa:** foram manufaturadas duas barbotinas com diferentes proporções de sacarose 50% e 82%. Os componentes das barbotinas foram alumina, álcool isopropílico, PVB e sacarose. **Barbotina com 50% de sacarose:** a barbotina sem adição de sacarose permaneceu durante 6 horas em moinho de bolas, em seguida adicionou-se sacarose em proporção de 50 % desta solução, a qual permaneceu durante 5 minutos em moinho de bolas. **Barbotina com 82% de sacarose:** realizou-se o mesmo procedimento que o utilizado para a barbotina anterior, porém com adição de 82% de sacarose na solução.

Todas as peças foram sinterizadas com patamar de 1550 °C, durante 1 hora.

As técnicas empregadas foram a Técnica (A), a qual se realizou imersão ou *Dipping* da peça, a Técnica (B) que envolve co-prensagem isostática da região densa e porosa da peça.

Durante o desenvolvimento do trabalho houve ajustes de molde, adaptação da formulação das barbotinas e da secagem, para obter peças em gradiente funcional.

### 3.3.1 Técnica (A) – *Dipping*

Esta técnica consistiu na imersão (*Dipping*) de pino em alumina densa em barbotina de alumina com formador de poros.

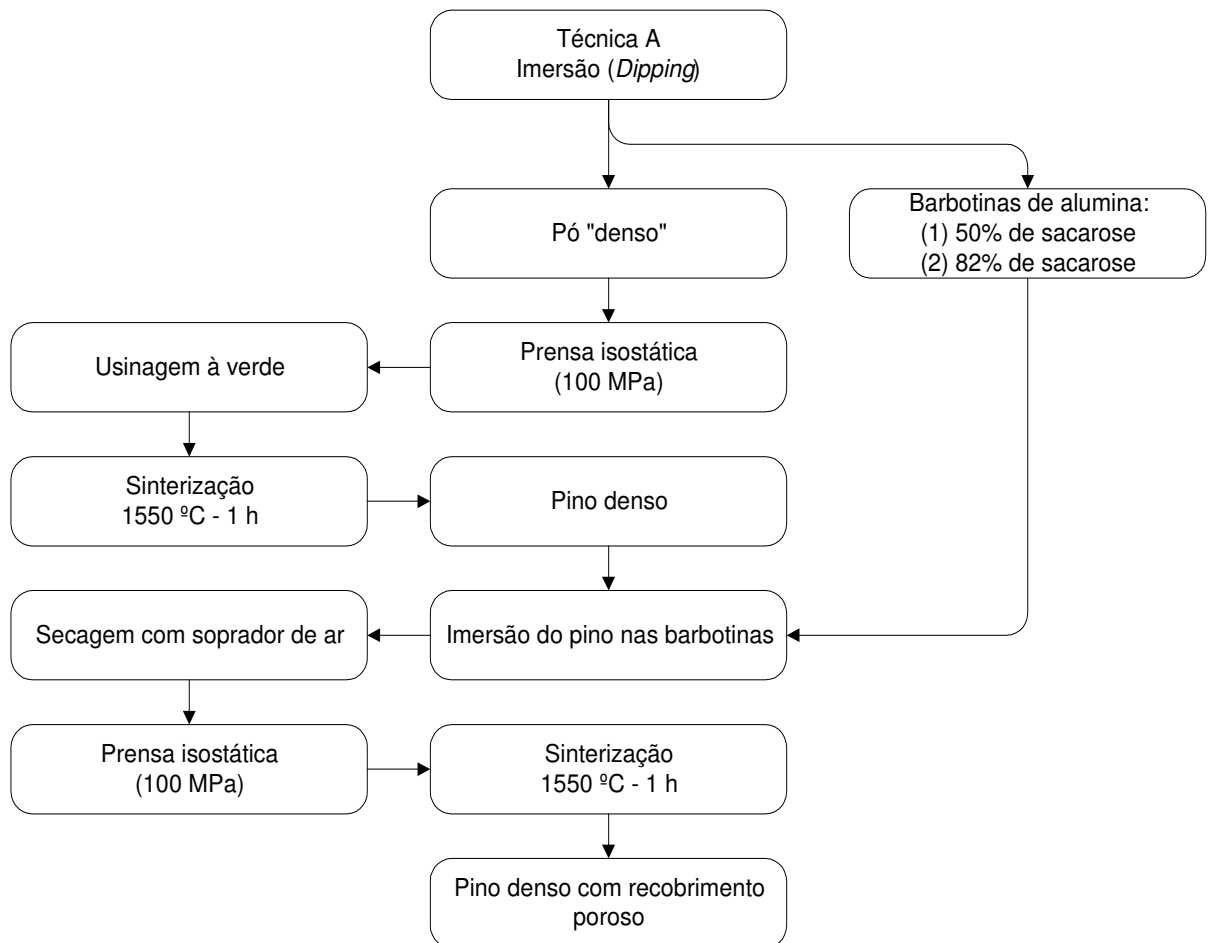
Nesta técnica primeiramente manufaturou-se o núcleo denso da seguinte forma: conformação de cilindros com prensagem uniaxial do pó de alumina a 10 MPa; usinagem à verde do pino.

Após a obtenção do pino usinado fez-se a imersão em barbotina de alumina com formador de poros como se segue: a **barbotina com 50% de sacarose** foi utilizada para formar a porosidade mais interna e mais próxima da região densa, a peça densa foi imersa três vezes, sendo que entre cada imersão secou-se a peça para a realização da próxima. A **barbotina com 82% de sacarose** foi utilizada para formar a porosidade mais externa da

peça, imergiu-se a peça densa recoberta com a barbotina 50% três vezes na barbotina 82%, sendo que entre cada imersão secou-se a peça para a realização da próxima.

Na sequência as peças foram compactadas na prensa isostática à 100 MPa e sinterizadas à 1550 °C. No fluxograma da Figura 3.11 é observada a sequencia da Técnica

(A)

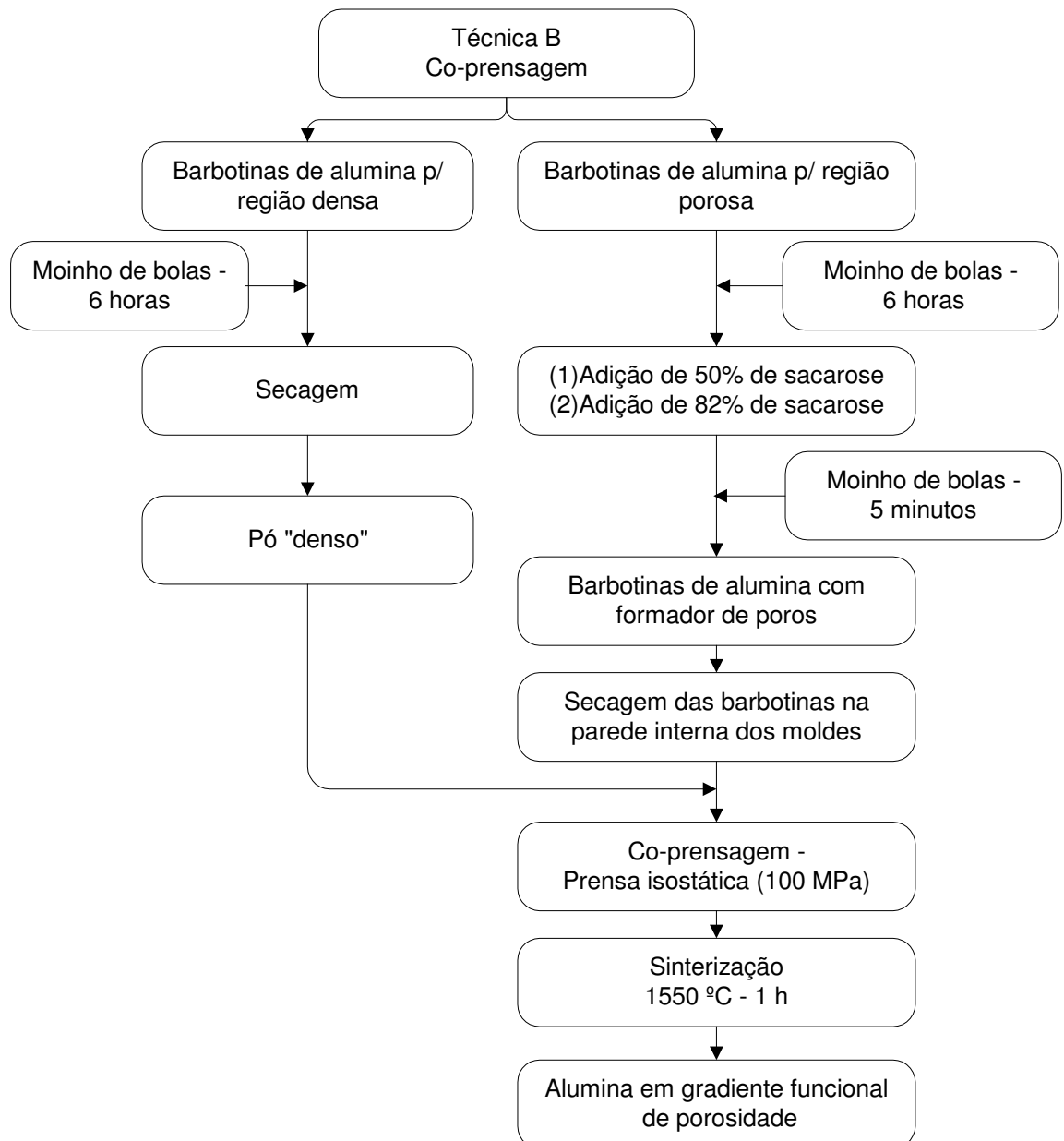


**Figura 3.11** – Fluxograma da Técnica (A). Nessa técnica os pinos foram imersos em barbotina de alumina com formador de poros (sacarose)

As peças foram recobertas com polvilho para ir ao forno sendo que durante a pré-sinterização os componentes orgânicos (polvilho e sacarose) são degradados, a sinterização ocorreu com patamar de 1550 °C, durante 1 hora.

### 3.3.2 Técnica (B) – Co-prensagem

A técnica de co-prensagem consiste em prensar isostaticamente o pó “denso” juntamente com o pó “poroso” (com formador de poros) adicionados de forma estratificada no molde. No fluxograma da Figura 3.12 é observada a sequencia geral dessa técnica.



**Figura 3.12** – Fluxograma da Técnica (B), ou co-prensagem. Nessa técnica o pó de alumina “denso” e o pó de alumina com formador de poros foram co-prensados na isostática. Após a secagem da barbotina no molde adiciona-se o pó “denso” e faz-se a co-prensagem seguida de sinterização. Houve modificações nos moldes e na secagem da barbotina até a obtenção das peças em gradiente funcional

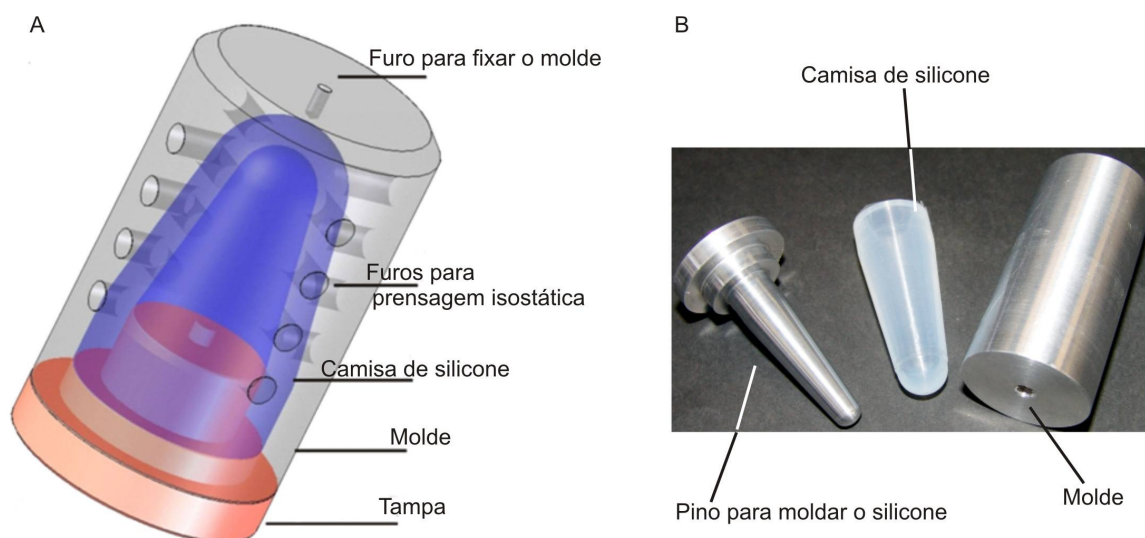
Durante o desenvolvimento da técnica, foram utilizados moldes com as seguintes características: molde de borracha, molde metálico e molde de silicone, todos em formato cilíndrico. Foi possível obter peças íntegras sem fratura, mas também ocorreu fratura em sentido radial de algumas peças. Foram realizadas modificações no molde com projeto e adaptações da técnica para resolver o problema relacionado às fraturas nas peças.

Para realizar a co-prensagem, foi utilizada a barbotina com 82% de sacarose para a porosidade mais externa e a solução com 50 % de sacarose para a porosidade interna.

Foram realizadas variações na barbotina: manufacturou-se uma contendo tamanho A de partícula de sacarose e outra contendo tamanho B de partícula de sacarose, sendo os tamanhos conforme o que se segue ( $177 < \text{tamanho A} < 300 \mu\text{m}$  e  $300 < \text{tamanho B} < 600 \mu\text{m}$ ).

Diversas camadas de barbotina porosa foram depositadas na parede do molde. Uma, duas, três, quatro, seis e oito camadas foram depositadas.

O conjunto formador do molde para dar forma de pino de dente nas peças foi projetado e o molde foi manufacturado. Na Figura 3.13 vê-se em (A) o desenho do molde projetado e manufacturado para conformar peças em forma cônica. Em (B) uma fotografia do molde com a camisa de silicone.



**Figura 3.13** – Molde para prensagem isostática do corpo-de-prova em (A): Ilustração do molde; em (B): Ilustração do Molde para fabricação da camisa de silicone, ao centro a camisa moldada, a seta branca indica o pino. Com região útil



Durante o desenvolvimento do trabalho a secagem da barbotina na parede do molde foi realizada de três formas com soprador de ar, com centrifugação e com acréscimo temporário de acetona.

### **3.3.3 Preparo das Peças em Gradiente Funcional para Microscopia de Varredura Eletrônica**

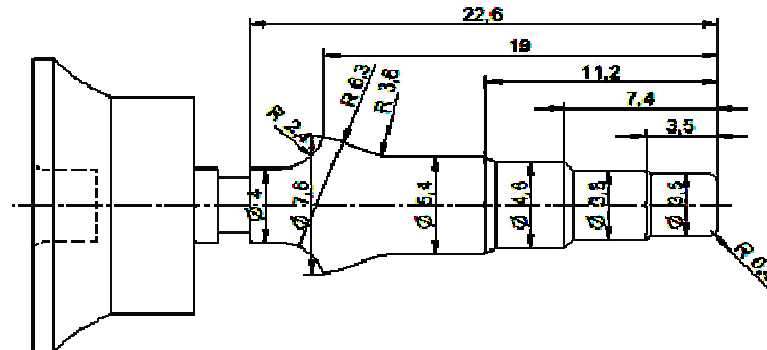
Após embutir as peças em resina epóxi, as mesmas foram lixadas e polidas como se segue: ordem granulométrica das lixas 150, 220, 320, 400, 600, 800, 1500. Seguiu-se com polimento em pasta diamantada (1  $\mu\text{m}$ , Marca: AROTEC), lavou-se com álcool etílico hidratado (92,8%) e colocou-se no ultra-som, durante 10 minutos, para remover toda a pasta da peça. Após as peças estarem polidas retirou-se a resina epóxi em altas temperaturas para degradação da resina e obtenção das peças em Gradiente Funcional polidas.

A Microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o equipamento LEO com um detector Oxford (Cambridge, Inglaterra), com feixe de elétrons de 20keV para operar, foi utilizado para obter fotomicrografias de MEV. As amostras foram recobertas com 20nm de ouro em metalizador Balsers modelo SDC 050 (Liechtenstein, Alemanha).

### **3.3.4 Projeto de Usinagem à Verde do Gradiente Funcional em Formato Cônico para a Obtenção do Pino de Dente**

**Considerações sobre usinagem do pino de dente:** para a usinagem à verde da peça porosa externamente e com núcleo denso, foi necessário aumentar a espessura da região porosa na parte inferior do cone, pois se deve considerar a perda de material na parte inferior devido à usinagem. Deve-se também considerar que a região porosa na parte inferior na peça final, é necessária para fixação do tecido ósseo, porém na parte superior não há a necessidade de poros, pois essa região não terá contato com o osso e servirá para fixar a coroa dentária.

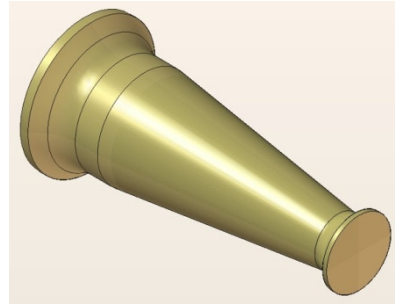
O pino dentário foi desenhado em CAD (*Solid Edge ST2*) de acordo com o desenho ilustrado na Figura 3.14.



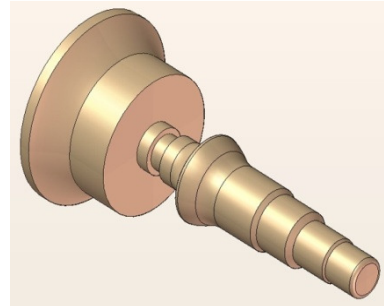
**Figura 3.14** – Desenho do pino dentário realizado em CAD

A peça em gradiente funcional foi usinada por processo abrasivo para conferir o formato desejado, e em seguida sinterizado para obtenção do produto final. Foram utilizados os seguintes parâmetros de usinagem: disco de alumina eletrofundida marrom #80 *mesh*, liga vítrea, diâmetro de 40 mm e espessura de 1,5mm, com velocidade periférica de 56 m/s, velocidade de avanço em 0,55 mm/s e profundidade de corte de 0,03mm.

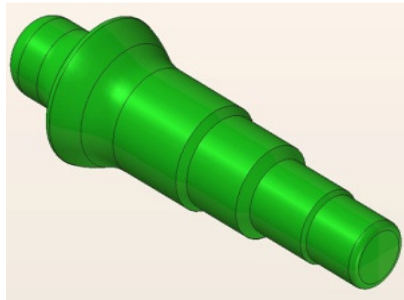
O projeto das etapas de manufatura do implante dentário é ilustrado na Figura 3.15.



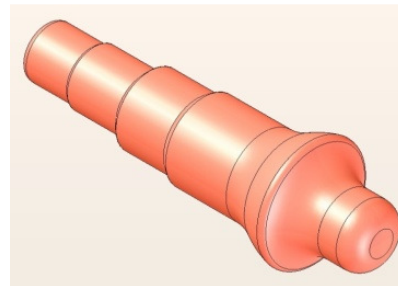
Blank após prensagem isostática



Blank após usinagem à verde



Pino à verde



Pino sinterizado

**Figura 3.15** – Implante dentário e projeto das etapas de usinagem

*Blank* significa bloco de pó comprimido, em forma bruta, com necessidade de usinagem ou de outro beneficiamento, para atingir sua forma final.

## 4 RESULTADOS

Implantes porosos recobertos com materiais bioativos foram caracterizados quanto a **estrutura** (porosidade, penetração do infiltrado bioativo nos poros e rugosidade superficial); **in vivo** com densidade e conteúdo mineral ósseo; **ex vivo** com análises biomecânicas, histológicas, com análise química EDS-*Line scan* e com radiografia, para validação e verificação de viabilidade biomecânica, tecidual e fisiológica de projeto de manufatura de implante com estrutura central densa e superfície gradualmente porosa recoberta com materiais bioativos, compostos pelas mesmas matérias-primas.

Esses implantes visam possíveis aplicações em tecido ósseo nas áreas de ortopedia, buco-maxilo-facial e odontológica.

### 4.1 Implantes porosos

Os implantes porosos em alumina com porosidade em torno de 70%, recobertos com biovidro e hidroxiapatita são denominados nesta pesquisa de **Scaffolds ou implantes infiltrados**, foram caracterizados comparativamente com alumina porosa sem recobrimento, denominados de **Scaffolds ou implantes não recobertos ou controles**.

#### 4.1.2 Análise química – Espectroscopia de Dispersão de Raios-X (EDX)

A análise da distribuição dos materiais bioativos na matriz em alumina recoberta com biovidro e hidroxiapatita foi realizada com Espectroscopia de Dispersão de Raios-X. Foram observadas duas regiões, no centro da mostra e próximo a borda.

Esta análise foi realizada para verificar a presença e a distribuição dos materiais bioativos na amostra, após o recobrimento de Biovidro e HAp na matriz de alumina porosa.

Os elementos químicos presentes na matriz de alumina são alumínio (Al) e oxigênio (O) componentes da alumina com fórmula molecular  $Al_2O_3$ . Os elementos químicos presentes no recobrimento realizado sobre a matriz de alumina são o Cálcio (Ca), o Fósforo (P), Oxigênio (O), o Hidrogênio (H), Silício (Si) e Sódio (Na), os quais são elementos da hidroxiapatita com estrutura molecular  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , e do biovidro 45S5<sup>®</sup> com estrutura molecular  $SiO_2-CaO-P_2O_5-Na_2O$ .

Vê-se na Tabela 4.1 as proporções em massa dos elementos químicos na matriz de alumina recoberta por biovidro e HAp (Implante Infiltrado)

**Tabela 4.1** – Proporção dos elementos químicos distribuídos na matriz de alumina porosa recoberta com biovidro e HAp

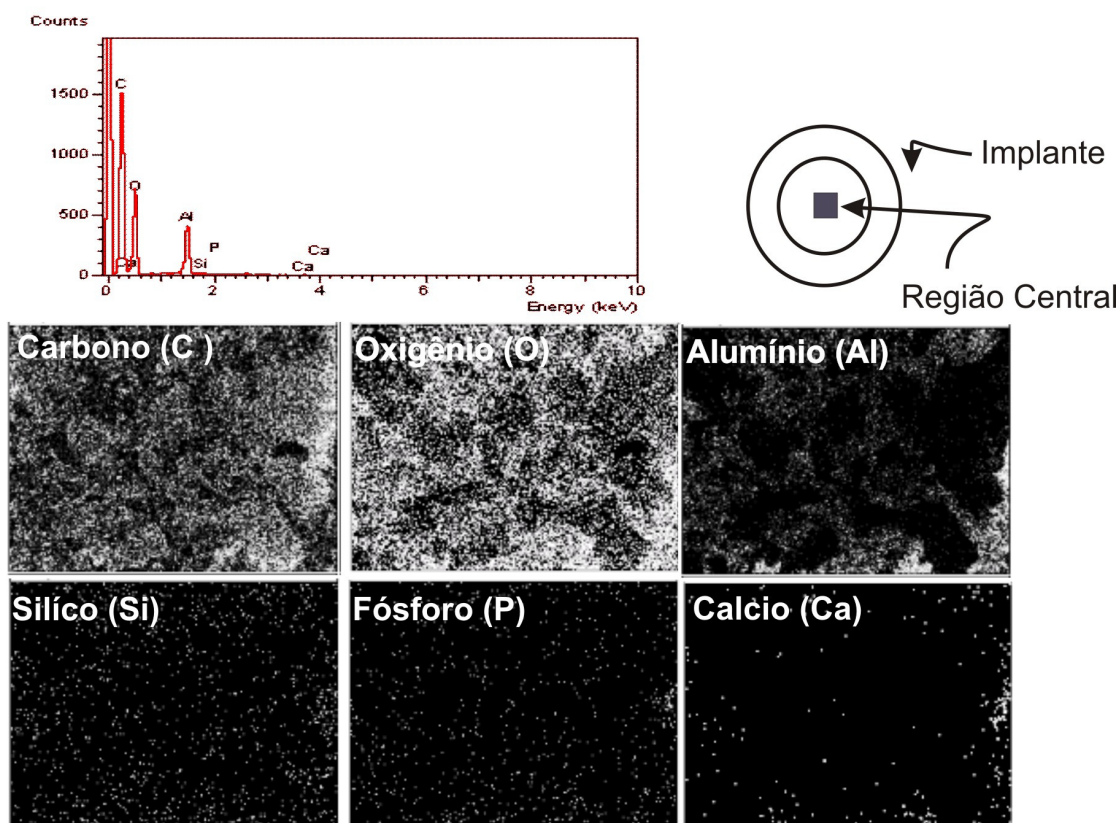
Elemento químico	Região Central (%)	Região intermediária	Borda (%)	Região mais externa (%)
<b>C</b>	51.94	47.42	43.33	42.32
<b>O</b>	42.73	44.30	44.12	42.68
<b>Al</b>	5.07	7.88	12.14	14.54
<b>Si</b>	0.19	0.31	0.17*	0.19*
<b>P</b>	0.04*	0.03*	0.09*	0.12*
<b>Ca</b>	0.04*	0.07*	0.15	0.16
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

(\*) < 2 Sigma: não significativo

C (Carbono), O (Oxigênio), Al (Alumínio), Si (Silício), P (Fósforo), Ca (Cálcio).

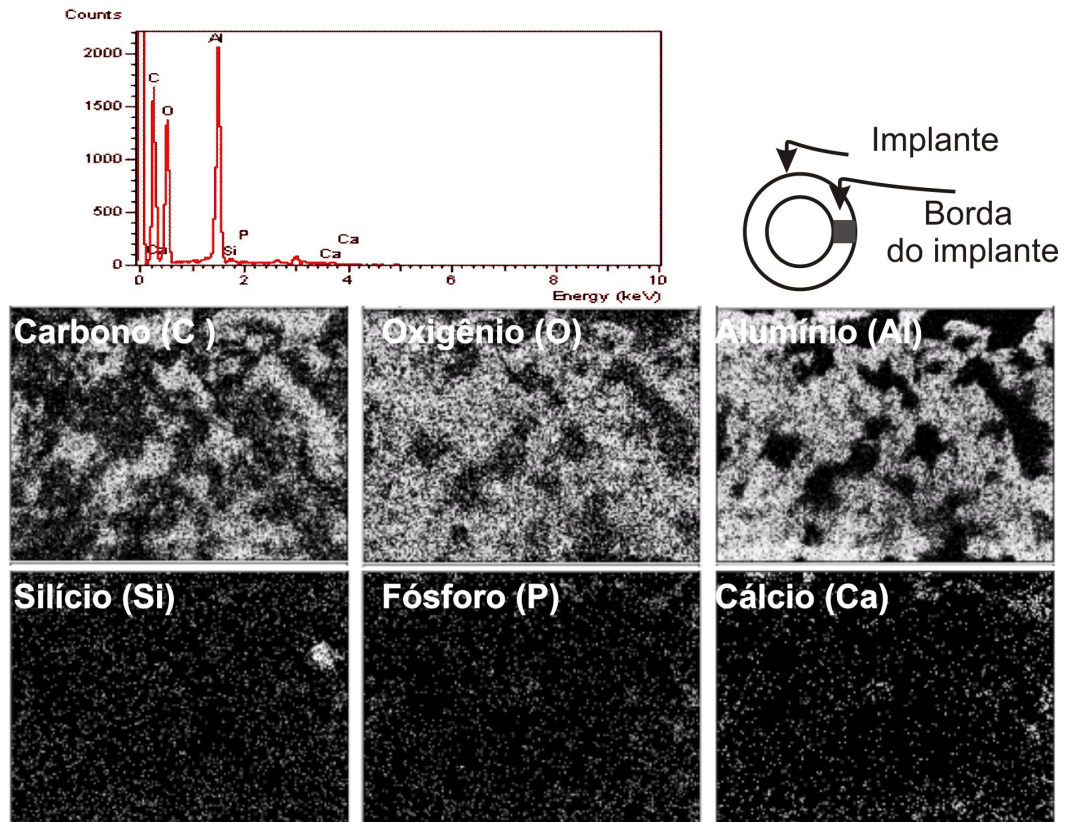
Observa-se que a proporção em massa de cálcio é maior na borda e na região mais externa da amostra.

A distribuição desses elementos foi observada também com as imagens das Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, vêem-se as imagens da representação dos elementos químicos no **centro da amostra**, na **borda mais externa** do implante e na **região intermediária entre o centro e a borda**, os pontos em branco são os elementos.



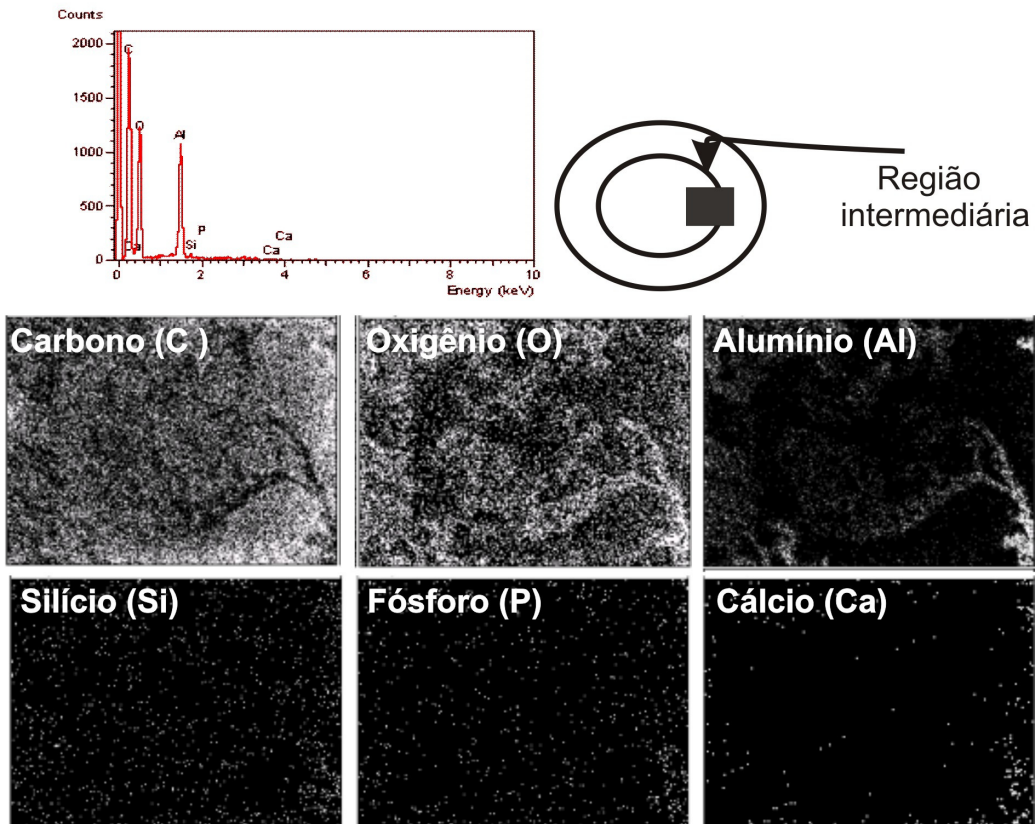
**Figura 4.1** – Imagem de MEV – EDX, da região central de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra

Analisou-se a borda mais externa do implante de alumina recoberta com biovidro e hidroxiapatita, a Figura 4.2 ilustra as imagens.



**Figura 4.2** – Imagem de MEV – EDX, da borda mais externa do implante de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra

Na Figura 4.3 ilustra-se a distribuição dos elementos químicos na posição intermediária entre o centro e a borda do implante.



**Figura 4.3** – Imagem de MEV – EDX da região intermediária entre o centro e a borda do implante de matriz em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita. Observa-se a distribuição dos elementos químicos na amostra

Nesta análise pode-se observar a presença dos elementos químicos representados pelos pontos em branco pertencentes aos materiais bioativos distribuídos em toda a matriz de alumina.

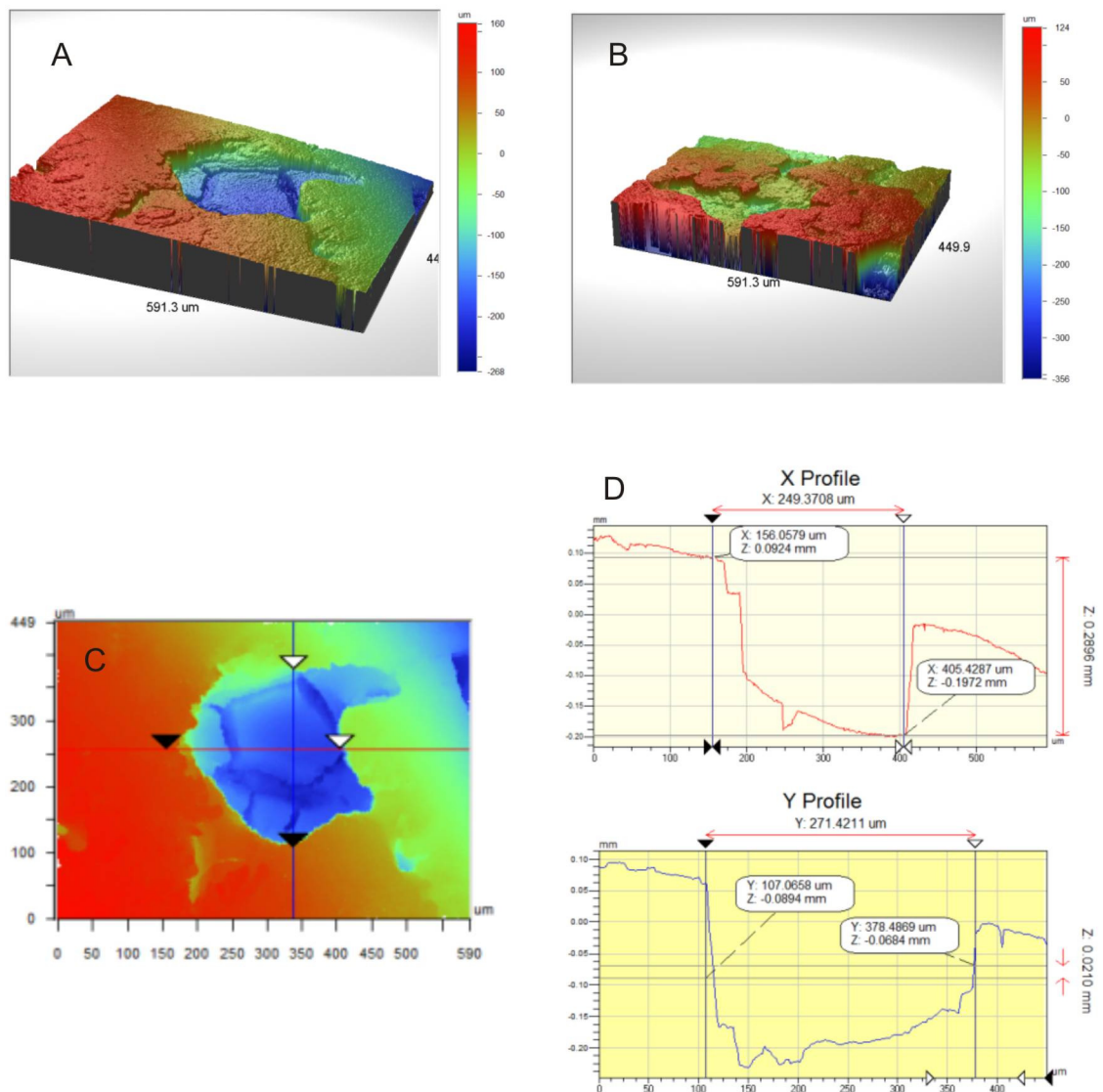
A comparação dos elementos na Tabela 4.1 e das imagens nas Figuras 4.1 e 4.2 e 4.3, fornece a informação de que a presença dos elementos químicos dos materiais bioativos é mais pronunciada entre a região intermediária e na borda mais externamente, ou seja, a concentração maior está na superfície do implante.



### 4.1.3 Rugosidade Superficial

Imagens tridimensionais da superfície dos implantes porosos com recobrimento bioativo e sem recobrimento, foram realizadas com perfilometria para comparar a superfície de rugosidade dos implantes. Obtiveram-se os parâmetros para a análise: Ra (rugosidade média) e Rt (rugosidade total). Na Figura 4.4 vê-se a perfilometria do implante controle.

#### Implante Controle



**Figura 4.4** – Perfilometria do implante controle. Em A, B e C imagens tridimensionais do perfil da superfície da peça. Em D perfil da seção transversal da superfície C

A média dos valores absolutos da rugosidade (Ra) e a rugosidade total (Rt) foram obtidos e os dados foram analisados com os dados médios e desvio padrão conforme a Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – Valores da rugosidade superficial

Rugosidade* ( $\mu\text{m}$ )	Implante recoberto	Implante controle	Diferença estatística**
Ra	74,18 $\pm$ 5,15	60,43 $\pm$ 5,00	P=0,0049 (Muito significativa)
Rt	429,05 $\pm$ 27,13	491,25 $\pm$ 2,02	P=0,2395 (Não significativa)

\* Média e Desvio Padrão – Ra – Média da rugosidade superficial, Rt – Rugosidade total.

\*\* Teste t pareado -  $p < 0,05$  para diferenças significativas.

Os **implantes recobertos** com materiais bioativos apresentaram maior rugosidade média quando comparados com os **implantes controle** (sem cobertura com bioativos).

Com esses resultados observa-se que os implantes revestidos com bioativos têm duas características que, teoricamente, proporcionam uma maior integração com o tecido ósseo, que são a presença de materiais bioativos e aumento da rugosidade superficial.

#### 4.1.4 Estudo *In Vivo* dos Implantes porosos

Aspecto geral dos animais durante os procedimentos: dos 78 animais dois apresentaram infecção na região de implante. Houve três (3) óbitos, provavelmente devido ao excesso de anestésico, pois nos primeiros animais da segunda fase realizou-se o exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA), para obtenção da Densitometria Mineral Óssea (DMO) e Conteúdo Mineral Ósseo (CMO), e a cirurgia de implantação no mesmo dia. Procedimentos esses que exigiram a necessidade de aplicar duas doses de anestésico no mesmo dia. Três dos 5 animais foram a óbito, a partir deste ocorrido os próximos animais fizeram este exame uma semana antes da cirurgia de implantação, não ocorreram mais óbitos.

Todos os animais apresentaram movimentação com apoio dos membros após o efeito anestésico, com motricidade próxima do normal um dia após a cirurgia.

Os grupos foram diferenciados de acordo com o tipo de implante que receberam e denominados da seguinte forma: grupo **Infiltrado**, grupo **Controle**, grupo **Controle-control**, esses três grupos receberam cirurgia em ambas as tíbias. Os grupos **Infiltrado-1-Tib** e **Controle-1-Tib** receberam cirurgia em uma tíbia. Os resultados deste exame foram analisados quanto às diferenças entre os grupos com teste *Tukey*, para  $p < 0,05$  considerou-se diferença significativa.

#### 4.1.5 Mensuração da densidade mineral óssea corpórea - Exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios X (DXA)

Todos os animais do estudo *in vivo* na Fase 2 fizeram exame de DXA, as regiões de interesse foram Coluna Lombar, Fêmures direito e esquerdo, Tíbias direita e esquerda e Corpo total ou Corpo inteiro. Os dados foram avaliados em termos de média e desvio padrão.

Realizaram-se cinco medidas em cada região de interesse com reposicionamento para obtenção dos valores de Coeficiente de Variação para este estudo.

Para obter o valor do coeficiente de variação em cada região de interesse aplicou-se a Equação 1.

$$CV = \sqrt{\frac{\sum \sigma^2}{n}} \cdot 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

sendo,  $CV$  é o Coeficiente de variação,  $\sigma$  é o Desvio Padrão e  $n$  é o número de animais.

O Coeficiente de Variação para a Densidade Mineral Óssea representa o grau de dispersão entre as regiões de interesse segue em ordem do menor para o maior valor de dispersão: corpo total (CT) (0,2 %), coluna lombar (0,4 %), tíbia direita (0,5 %), tíbia esquerda

(0,7 %), fêmur direito (0,8 %), fêmur esquerdo (0,8%). Foi utilizada Análise de Variância One-way (ANOVA), para as diferenças nos tempos entre 0 a 14 dias e 0 a 28 dias, o teste de comparações múltiplas *Tukey-Kramer* foi aplicado para discriminar as diferenças, intervalo de confiança 95%,  $p < 0,05$ .

Para a região de interesse **corpo total (CT)**, com relação ao **grupo infiltrado**, a diferença entre o período sem implante para o período com implante foi considerada extremamente significativa,  $p < 0,001$ . Para esse mesmo grupo, antes de implantar nos dois tempos zero, a diferença foi significativa nos valores de DMO de CT.

Com relação ao valor de  $p$  para o conteúdo mineral ósseo (**CMO da tíbia direita em 14 dias**), o grupo infiltrado apresentou valores de  $p < 0,05$ , estatisticamente significativo quando comparado com os grupos controle e controle-controle, porém entre os grupos controle e controle-controle as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Com relação ao valor de  $p$  para **Área da tíbia direita no período de 14 dias**. As diferenças foram significativas entre **infiltrado-14 x controle-14** e entre **infiltrado x controle-controle 14**, porém para **controle** e **controle-controle 14**, estatisticamente não significativo.

Na Tabela 4.3 vêem-se os valores da densidade mineral óssea (DMO), e do conteúdo mineral (CMO) e **área** das regiões de interesse. Valores comparativos entre os grupos **infiltrado** (alumina porosa recoberta com materiais bioativos), **controle** (alumina porosa) e **controle-controle** (defeito ósseo na tíbia sem implante).

**Tabela 4.3** - Valores da DMO, CMO e Área das respectivas regiões de interesse. Valores comparativos entre os grupos infiltrado, controle e controle-controle

Período experimental: 14 dias. Local: Tíbia Direita	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2256 ± 0,0046	0,2244±0,00541	0,2202 ± 0,0125	0,5717(ns)	0,5
CMO	0,388 ± 0,0249	0,344 ± 0,0151	0,342 ± 0,02775	0,0137 (s)	
Área	1,718 ± 0,1114	1,538 ± 0,043243	1,546 ± 0,0750	0,0068 (s)	
Período experimental: 14 dias. Local: Tíbia Esquerda	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,22±0,013058	0,2264±0,0099	0,2202±0,0118	0,9082(ns)	0,7
CMO	0,374±0,0336	0,394±0,0305	0,362±0,0438	0,4011(ns)	
Área	1,688±0,0729	1,736±0,1163	1,644±0,1322	0,4420(ns)	
Período experimental: 28 dias. Local: Tíbia Direita	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2444±0,0206	0,2354±0,0032	0,227±0,0070	0,3453(ns)	0,5
CMO	0,414±0,0416	0,395±0,02429	0,38±0	0,2565(ns)	
Área	1,698±0,0920	1,6416±0,0416	1,685±0,0494	0,3931(ns)	
Período experimental: 28 dias, Local: Tíbia Esquerda	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2352±0,0128	0,2428±0,0238	0,2195±0,0148	0,7873(ns)	0,7
CMO	0,43±0,0435	0,412±0,0408	0,38±0,0282	0,3800(ns)	
Área	1,828±0,0788	1,768±0,0687	1,735±0,0070	0,2533(ns)	
Período experimental: 14 dias. Local: Fêmur Direito	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,225±0,0117	0,239±0,0066	0,2302±0,01495	0,1984(ns)	0,8
CMO	0,328±0,066	0,314±0,0167	0,314±0,0320	0,8436(ns)	
Área	1,444±0,2715	1,314±0,0658	1,366±0,0602	0,04776(s)	
Período experimental: 14 dias. Local: Fêmur Esquerdo	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2248±0,01814	0,241±0,0102	0,2352±0,0177	0,2969(ns)	0,8
CMO	0,302±0,0311	0,34±0,0254	0,316±0,0336	0,1752(ns)	
Área	1,348±0,2040	1,408±0,0605	1,346±0,1028	0,7229(ns)	
Período experimental: 28 dias. Local: Fêmur Direito	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2636±0,0132	0,2478±0,0169	0,265±0,0042	0,2129(ns)	0,8
CMO	0,434±0,1244	0,344±0,0460	0,38±0,0141	0,3185(ns)	
Área	1,642±0,4463	1,38±0,1055	1,425±0,0777	0,4131(ns)	
Período experimental: 28 dias. Local: Fêmur Esquerdo	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,2702±0,0152	0,2522±0,0162	0,2875±0,0049	0,0466 (s)	0,8
CMO	0,414±0,0439	0,358±0,0396	0,4±0,0282	0,1183(ns)	
Área	1,524±0,1031	1,398±0,0697	1,565±0,1485	0,0950(ns)	
Período experimental: 14 dias. Local: Coluna (L1-L4)	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
DMO	0,201±0,0063	0,2076±0,0085	0,2±0,0136	0,4503(ns)	0,4
CMO	0,474±0,0207	0,498±0,03701	0,442±0,0593	0,1504(ns)	<b>Cont</b>
Área	2,348±0,075	2,414±0,1031	2,21±0,1443	0,0375 (s)	

Continuação Tab.4.3

Período experimental: 28 dias. Local: Coluna (L1-L4)	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
<b>DMO</b>	0,2228±0,0069	0,2126±0,0108	0,2215±0,0021	0,2031(ns)	0,4
<b>CMO</b>	0,546±0,03646	0,516±0,0550	0,555±0,0070	0,4677(ns)	
<b>Área</b>	2,452±0,1044	2,428±0,1617	2,515±0,0777	0,0031 (s)	

Período experimental: 14 dias. Local: Corpo Total (CT)	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
<b>DMO</b>	0,1384±0,0043	0,1406±0,0041	0,138±0,0058	0,5681(ns)	0,2
<b>CMO</b>	9,066±0,5882	9,334±0,5126	8,552±0,5925	0,1265(ns)	
<b>Área</b>	65,532±3,5068	66,4±2,8810	62,014±2,377	0,0182 (s)	
<b>Massa corporal (Balança)</b>	388,2±14,7546	394,6±20,8877	367,4±17,40	0,0001 (s)	
<b>Massa gorda</b>	24,14±6,6395	27,62±7,2634	23,84±6,2159	0,6251(ns)	
<b>Massa magra+CMO</b>	365,84±12,7107	371,36±22,8682	349,96±14,8196	0,1717(ns)	
<b>Massa total</b>	389,96±17,5420	398,98±24,5397	373,78±17,4987	0,1765(ns)	
<b>% gordura</b>	6,16±1,4604	6,9±1,7306	6,36±1,4673	0,7449(ns)	
Período experimental: 28 dias. Local: Corpo Total (CT)	Infiltrado	Controle	Controle- controle	p	CV %
<b>DMO</b>	0,1504±0,0042	0,1452±0,0046	0,1495±0,0021	0,1300(ns)	0,2
<b>CMO</b>	10,696±1,0492	10±0,6272	10,58±0,6363	0,4340(ns)	
<b>Área</b>	70,326±4,8110	68,836±3,1792	70,895±5,3952	0,7961(ns)	
<b>Massa corporal (Balança)</b>	425,32±45,1565	416,4±15,0764	447±25,4558	0,5596(ns)	
<b>Massa gorda</b>	33,14±7,9754	331,46±6,2986	31,5±8,4852	0,9280(ns)	
<b>Massa magra+CMO</b>	401,68±37,9845	389,18±12,8956	412,9±24,6073	0,5823(ns)	
<b>Massa total</b>	434,82±45,8279	420,62±18,7891	444,4±33,0925	0,4075(ns)	
<b>% gordura</b>	7,52±1,0568	7,46±1,1674	7,05±1,3435	0,8820(ns)	

Os dados são expressos em Média e ( $\pm$ ) Desvio padrão. (s) estaticamente significativo e (ns) estatisticamente não significativo. Coeficiente de Variação (CV)  $p < 0.05$ , considerado significativo.

Na Tabela 4.4 consta a relação dos grupos e as respectivas regiões de interesse que apresentaram resultados estatisticamente significativos nos valores da DMO.

**Tabela 4.4** – Relação dos grupos e das regiões de interesse com diferença significativa na DMO entre os grupos, nível de significância de 95%

<b>Região de Interesse</b>	<b>Grupos (<math>p &lt; 0.05</math>)</b>
Região Lombar	Inf-14 x inf28; Cnt-cntr-0x14; Cnt-cntr-14x28
Região Lombar	Inf-0x14; Inf-0x28; Inf-14x28; Cont-0x14; Cont-0x28
Corpo Inteiro	Inf-0x14; Inf-0x28; Inf-14x28; Cont-0 x 14; Cont-0 x 28
Corpo Inteiro	Cont-cont-0x14; Cont-cont-14x28
Tíbia D	Controle-0 x 14; Controle-0 x 28; Inf-0 x 14; Inf-0 x 28;
Tíbia E	Infil-0x14; Infil-0x28; Contr-0x14; Contr-0x28
Fêmur Esquerdo	Infiltrado 0-14 x Infiltrado 0-28 (mantida)
Fêmur Esquerdo	Infiltrado 0-28 x Controle 0-28 (não mantida)
Fêmur Esquerdo	Infil x Control_x Contr-Contr* - 28 dias
Fêmur Esquerdo	Cont_1_Tib 0 x 28; Infi_1_Tib-0 x 28
Fêmur Esquerdo	Infiltrado_1_Tib * x Controle_1_Tib - 28
Fêmur Direito	Infil-0 x 14; Infil-0 x 28
Fêmur Direito	Controle-0 x 14; Controle-0 x 28
Fêmur Direito	Inf-14 x infiltr-28; Inf14 x inf28 x Inf_1Tib_28

Cont=Grupo controle, Inf=Grupo Infiltrado, Contr=grupo controle-controle

Para todos os grupos quanto maior o período experimental maior o valor de DMO nas regiões de interesse. Para realizar as comparações nas tabelas anteriores deve ser considerado que os implantes foram colocados nas tíbias e que o sistema interpreta a presença do implante como aumento de DMO quando as tíbias foram comparadas antes do período de implantação.

Contudo, as regiões fora do sítio de implantação, ou seja, sem ser a tíbia, que aumentaram significativamente o valor da DMO, e os respectivos grupos, antes e depois de implantar foram; no **fêmur esquerdo** nos grupos **infiltrado**, **controle**, **controle\_1tib** e **infiltrado\_1tib**; no **fêmur direito** nos grupos **infiltrado** e **controle**, nas **tíbias direita e esquerda também se pode observar o crescimento significativo nos grupos infiltrado**

e **controle**, na **região lombar** e **corpo inteiro** nos grupos **infiltrado**, **controle** e **controle-controle**. Houve aumento da DMO significativo no Corpo Inteiro, Região lombar, Fêmur Direito e Esquerdo.

No período de 28 dias para o Fêmur esquerdo do grupo Controle-controle apresentou maior valor de DMO, porém esse mesmo grupo apresentou maior área de fêmur mensurada com relação a esses dois grupos.

Os valores da DMO para o **Fêmur esquerdo** aumentaram significativamente após os períodos de implantação, ou seja, entre 0 e 14 dias e entre 0 e 28 dias, tanto para os Grupos **Infiltrado** quanto **Controle**, no entanto no grupo **Controle-controle** as diferenças entre esses períodos não são significativas.

Pode-se considerar com esses resultados que a presença de implante em alumina na tíbia, aumenta significativamente a DMO no Fêmur Esquerdo.

As diferenças antes de implantar entre todos os grupos, **Infiltrado**, **Controle**, **Controle-controle**, **Infiltrado\_1Tib** e **Controle\_1Tib**, foram significativas entre os seguintes grupos: Infiltrado 0-14 vs Infiltrado 0-28, sendo que esta diferença manteve-se após os períodos experimentais correspondentes.

Entre os grupos, Infiltrado (14), infiltrado (28), Controle-controle 14 e 28, comparou-se o valor da DMO das Tíbias Direita e Esquerda, Fêmur Direito e Esquerdo. A DMO da tíbia direita entre os grupos foi considerada não significativa ( $p=0,0772$ ), a diferença de valores entre os grupos da DMO da tíbia direita foi considerada significativa (0,0369)

Compararam-se as **DMOs** do **Corpo Total (CT)** de todos os grupos **antes de implantar**. O teste de Tukey,  $p$  foi considerado significativo quando menor que 0,05. Diferença não significativa –  $p=0,014$  – foi encontrada entre os grupos implante **Infiltrado**, implante **controle-controle** antes da cirurgia e permanecer com o implante por 14 dias. Os que foram para 28 dias as diferenças entre os valores foram consideradas extremamente significativas,  $p=0,0001$ .

As **DMOs** do **CT** dos grupos **após implantar**. Para os grupos Implante infiltrado, Implante controle e controle-controle (Grupo sem implante) que permaneceram com o



implante por 14 dias, o valor de  $p=0,568$ , diferença considerada não significativa. Para os grupos Implante infiltrado, Implante controle e controle-controle, Infiltrado\_1\_tib e Controle\_1\_tib no tempo 2 (até 28 dias), o valor de  $p=0,364$ , diferença considerada não significativa. Na DMO do Corpo Inteiro do Grupo **Infiltrado** entre os períodos 0 e 14 dias e 0 e 28 dias e entre 14 e 28 dias as diferenças foram consideradas significativas nos três períodos, com o mesmo valor de  $p=0,0001$  para os dois primeiros e  $p=0,0012$  entre os períodos 14 e 28 dias. Na DMO do Corpo Inteiro do Grupo **Controle** entre os períodos 0 e 14 dias e 0 e 28 dias e entre 14 e 28 dias as diferenças foram consideradas significativas nos dois primeiros períodos, os valores são  $p=0,0002$  e  $p=0,0001$ , respectivamente; para última comparação (14 e 28) o aumento foi considerado não significativo e o valor de  $p=0,1202$ . Na DMO do Corpo Inteiro do Grupo **Controle-controle** entre os períodos 0 e 14 dias e 0 e 28 dias e entre 14 e 28 dias as diferenças foram consideradas significativas no primeiro período, os valores de  $p$  são  $p=0,1202$  e  $p=0,1455$ , respectivamente; para última comparação (14 e 28) o aumento foi considerado significativo e o valor de  $p=0,0142$ .

Comparou-se a **DMO da região lombar (L1-L4)** entre os grupos, no **tempo zero** dos grupos **Infiltrado, controle e controle-controle** antes de implantar e permanecer por 14 dias,  $p=0,0745$ , não significativo. **Tempo zero** dos grupos **Infiltrado, controle e controle-controle** antes de implantar e permanecer por 28 dias, o valor de  $p=0,0029$ , diferença considerada muito significante. Comparou-se a DMO da Coluna Lombar do grupo **Infiltrado** entre os períodos 0 e 14 dias e 0 e 28 dias, houve aumento significativo nos dois períodos, valor de  $p=0,0001$  e  $p=0,0002$ , respectivamente. A comparação do grupo **infiltrado** entre os períodos de 14 e 28 dias foi considerada significativa, valor de  $p=0,0013$ . Entre os grupos **Infiltrado-14 dias, Infiltrado-28 dias e Infiltrado\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,0022$ , considerado muito significante. Comparou-se a DMO da Coluna Lombar do grupo **Controle** entre os períodos 0 e 14 dias e 0 e 28 dias, houve aumento significativo nos dois períodos, valor de  $p=0,0001$  e  $p=0,0002$ , respectivamente. A comparação do grupo **Controle** entre os períodos de 14 e 28 dias, houve aumento da DMO considerado não significativo, valor de  $p=0,4464$ . Comparou-se a DMO da Coluna Lombar do grupo **Controle-Controle** entre os períodos 0 e

14 dias e 0 e 28 dias, houve aumento significativo no primeiro período, valor de  $p=0,0496$  e  $p=0,1813$ , respectivamente. A comparação da DMO na Coluna Lombar no grupo **Controle-controle** entre os períodos 14 e 28 dias foi considerada com aumento significativo, valor de  $p=0,0266$ . Entre os grupos **Controle-14 dias e Controle-28 dias**,  $p=0,4422$ , considerado não significativa. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-28 dias e Controle\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,5771$ , considerado não significativo. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-controle-14 dias**,  $p=0,3221$ , considerado não significativo. **Controle-28 e Controle-controle-28 dias**,  $p=0,3261$ , considerado não significante. Entre os grupos **infiltrado e controle** até 14 dias,  $p=0,2048$ , não significativo. Entre os **grupos infiltrado e controle** até 28 dias,  $p=0,1146$ , não significante. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-controle** até 28 dias,  $p=0,1146$ , não significante. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-controle** até 14 dias,  $p=0,4503$ , não significante.

Comparou-se a **DMO da tibia esquerda** entre os grupos, no **tempo zero** dos grupos **Infiltrado, controle e controle-controle** antes de implantar e permanecer por 14 dias,  $p=0,7166$ , as diferenças foram consideradas não significativas. **Tempo zero** dos grupos **Infiltrado, controle e controle-controle** antes de implantar e permanecer por 28 dias, o valor de  $p=0,0854$ , considerado não significativo. Comparou-se a DMO da Tíbia esquerda do grupo **infiltrado** entre os períodos 0 e 14 e também 0 e 28 dias, houve aumento significativo quanto maior o período experimental, valor de  $p=0,0472$ , para o primeiro período e  $p=0,0360$ , para o segundo período. Comparou-se a DMO da Tíbia esquerda do grupo **Controle** entre os períodos 0 e 14 e também 0 e 28 dias, houve aumento significativo quanto maior o período experimental, valor de  $p=0,0097$ , para o primeiro período e  $p=0,0522$ , para o segundo período, porém nesse o aumento não foi considerado muito significativo. Comparou-se a DMO da Tíbia esquerda do grupo **Controle-controle** entre os períodos 0 e 14 e também 0 e 28, valor de  $p=0,0807$  para o primeiro período e  $p=0,1949$ , para o segundo período, em ambos os períodos houve aumento não significativo. Comparou-se a DMO do Grupo **Infiltrado\_1\_Tib** entre os períodos 0 e 28 dias, houve aumento significativo, valor de  $p=0,023$ . Na DMO da Tibia esquerda do Grupo

**Controle\_1\_Tib** entre os períodos de 0 e 28 dias houve aumento não muito significativo, valor de  $p= 0,0558$ . Comparou-se a DMO do Grupo **Infiltrado\_1\_Tib** e o grupo **Controle\_1\_Tib** no período de 28 dias e houve discreta diferença não significativa, valor de  $p=0,8260$  Entre os grupos **Infiltrado-14 dias e Infiltrado-28 dias**,  $p=0,4246$ , não significativo. Entre os grupos **Infiltrado-28 dias e Infiltrado\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,6253$ , não significativo. Entre os grupos **Controle-14 dias e Controle-28 dias**,  $p=0,5457$ , considerado não significativo. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-28 dias e Controle\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,8050$ , considerado não significativo. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-control-14 dias**,  $p=0,6856$ , não significativa. **Controle-28 e Controle-control-28 dias**,  $p=0,4411$ , não significativa. Entre os grupos **infiltrado e controle** até 14 dias,  $p=0,7156$ , não significativa. Entre os **grupos infiltrado e controle** até 28 dias,  $p=0,7963$ , não significativa. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-control** até 28 dias,  $p=0,7873$ , considerado não significativa. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-control** até 14 dias,  $p= 0,9082$ , não significativa.

Comparou-se a DMO da **tíbia direita** entre os grupos, no tempo zero para todos os grupos diferença considerada não significativa, valor de  $p=0,5568$ . Ao comparar o **Grupo Infiltrado** de 0 para 14 dias, houve diferença considerada significativa com  $p=0,0362$ . Para o **Grupo Infiltrado** de 0 para 28 dias, houve diferença muito significativa, valor de  $p= 0,0026$ . Para o **Grupo Controle** de 0 para 14 dias, houve diferença muito significativa, valor de  $p=0001$ . Para o **Grupo Controle** de 0 para 28 dias, houve diferença considerada muito significativa, valor de  $p= 0,0005$ . Com relação às diferenças entre os **Grupos Infiltrado e Controle-control** no período de 14 dias, consideradas não significativas, valor de  $p= 0,4051$ . Entre os grupos **Controle e controle-control** no período de 14 dias, valor de  $p= 0,5206$ , diferença considerada não significativa. Com relação às diferenças entre os **Grupos Infiltrado e Controle-control** no período de 28 dias, consideradas não significativas, valor de  $p=0,1730$ . Entre os grupos **Controle e controle-control** no período de 28 dias, diferença considerada não significativa, valor de  $p=0,3535$ . Entre os **Grupos infiltrado e Controle** no período de 14 dias, diferença considerada não significativa, valor de  $p= 0,7159$ .

Entre os **Grupos Infiltrado e Controle** no período de 28 dias, diferença considerada não significativa, valor de  $p=0,3905$ .

Comparou-se **DMO do Fêmur Direito** entre os grupos, no **tempo zero** dos animais antes de implantar e permanecer por 14 dias, o valor de  $p=0,0508$ , não significativo. Tempo zero dos animais antes de implantar e permanecer por 28 dias, o valor de  $p=0,0013$ , considerado muito significativo. Entre os grupos **Infiltrado-14 dias e Infiltrado-28 dias** diferença muito significativa foi encontrada, valor de  $p=0,0018$ . Entre os grupos **Infiltrado-14 dias, Infiltrado-28 dias e Infiltrado\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,0003$ , considerado extremamente significante. Entre os grupos **Controle-14 dias e Controle-28 dias**,  $p=0,3297$ , considerado não significativa. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-28 dias e Controle\_1Tib\_28 dias**,  $p=0,3297$ , considerado não significante. Entre os grupos **Controle-14 dias, Controle-28 dias e Controle\_1Tib\_28, Controle-controle-14 e Controle-controle-28 dias**,  $p=0,0411$ , considerada significativa. Entre os **grupos Infiltrado e Controle** até 14 dias,  $p=0,0589$ , considerado não significativo. Ente os **grupos infiltrado e controle** até 28 dias,  $p=0,1448$ , considerado não significativo. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-controle** até 28 dias,  $p=0,2129$ , diferença não significativa. Entre os grupos **infiltrado, controle e controle-controle** até 14 dias,  $p=0,0060$ , muito significativo.

Comparou-se **DMO do Fêmur Esquerdo** no **Grupo Infiltrado** ao comparar os períodos 0 e 14 dias, o valor da DMO foi maior para o período de 14 dias, com diferença considerada significativa, valor de  $p= 0,0067$ . No mesmo grupo o **Infiltrado**, ao comparar os períodos de 0 para 28 dias, o valor da DMO foi maior no período de 28 dias, com diferença significativa, valor de  $p=0,0017$ , e também foi significativo o aumento entre 14 e 28 dias para o grupo **Infiltrado**, valor de  $p=0,0036$ . No grupo **Controle** ao comparar os períodos de 0 para 14 dias, houve diferença considerada significativa, valor de  $p=0,0001$ . No grupo **Controle** ao comparar os períodos de 0 para 28 dias, houve diferença considerada significativa, valor de  $p= 0,0002$ . No entanto, ao comparar os períodos de 14 e 28 dias para o grupo **Controle**, houve aumento não significativo, valor de  $p=0,2414$ . Ao comparar os grupos **Infiltrado e controle** no período de 28 dias, houve diferença não significativa, valor de  $p= 0,1138$ . Ao

comparar o grupo **Controle-controle** entre os períodos 0 para 14 dias, houve diferença não significativa, valor de  $p=0,0968$ . Ao comparar o grupo **Controle-controle** entre os períodos 0 para 28 dias, houve diferença não significativa, valor de 0,1515. Para o grupo **Controle-controle** entre os períodos de 14 e 28 dias houve diferença significativa, valor de  $p=0,0038$ . As diferenças antes de implantar entre todos os grupos, **Infiltrado**, **Controle**, **Controle-controle**, **Infiltrado\_1Tib** e **Controle\_1Tib**, as diferenças foram significativas entre os seguintes grupos: Infiltrado 0-14 vs Infiltrado 0-28, sendo que esta diferença manteve-se após os períodos experimentais correspondentes, Infiltrado 0-28 vs Controle 0-28, sendo que esta diferença não foi significativa após os respectivos períodos experimentais ( $p=0,1138$ , para os grupos Infiltrado e Controle após 28 dias), Comparou-se o Grupo **Controle\_1\_Tib** entre os períodos 0 e 28 dias, houve aumento da DMO no Fêmur Esquerdo considerado significativo, valor de  $p=0,0002$ . Comparou-se o Grupo **Infiltrado\_1\_Tib** entre os períodos 0 e 28 dias, houve aumento da DMO no Fêmur Esquerdo considerado significativo, valor de  $p=0,0001$ . Com relação às diferenças entre os grupos **Infiltrado\_1\_Tib** e **Controle\_1\_Tib** no período de 28 dias, houve aumento significativo da DMO no Fêmur Esquerdo para o grupo Infiltrado\_1\_Tib, valor de  $p=0,0162$ .

Os valores da DMO para o Fêmur esquerdo aumentaram significativamente após os períodos de implantação, ou seja, entre 0 e 14 dias e entre 0 e 28 dias, tanto para os Grupos **Infiltrado** quanto **Controle**, no entanto no grupo **Controle-controle** as diferenças entre esses períodos não são significativas. Pode-se considerar com esses resultados que a presença de implante em alumina na tíbia, aumenta significativamente a DMO no Fêmur Esquerdo.

Os valores do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) dos grupos **Infiltrado\_1Tib** e **Controle\_1Tib**, foram comparados, deve-se considerar para este resultado que as tíbias direita desses grupos receberam os respectivos implantes e as tíbias esquerda receberam apenas o defeito ósseo. Os valores do CMO das **tíbias direita** no **período de 28** foram maiores para o grupo Infiltrado\_1Tib, com **diferença não significativa**,  $p=0,2016$ . Sendo que para esses grupos no **tempo zero não houve diferença** nos valores do CMO. Em

comparação às tíbias direita dos grupos **Infiltrado\_1Tib** e **Controle\_1Tib** os valores do CMO das **Tíbias Esquerda** no tempo zero não apresentaram diferenças significativas e no período de 28 dias o grupo **Infiltrado\_1Tib** apresentou valores maiores, porém diferença não significativa,  $p=0,2938$ . Esses resultados indicaram que com a presença do implante **Infiltrado** nas tíbias houve aumento do Conteúdo Mineral Ósseo nesse osso em ambos os lados, mesmo na tíbia esquerda, porém esse aumento não foi significativo.

Os valores da CMO da Tíbia Direita, para o grupo **Infiltrado** (no tempo zero, antes de implantar) foi maior para o grupo **Controle-controle** seguido do grupo **Infiltrado**, com diferença considerada não significativa,  $p=0,1115$ .

Os valores da CMO da Tíbia Direita, para o grupo **Infiltrado** (14 e 28 dias) foi maior nos dois períodos em comparação com os grupos **Controle** e **Controle-controle**, diferença considerada muito significativa,  $p=0,0016$ . No tempo zero o grupo **Controle-controle** apresentou maior valor de CMO na Tibia Direita.

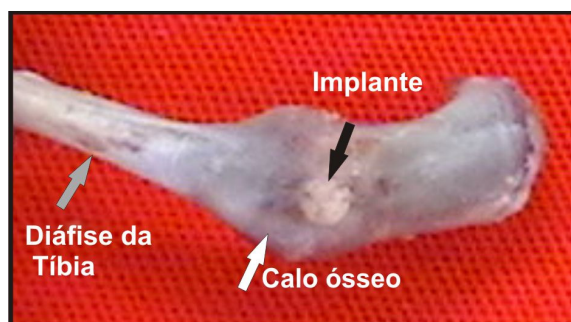
Os valores da Densidade Mineral Óssea (DMO) dos grupos **Infiltrado\_1Tib** e **Controle\_1Tib**, foram comparados, deve-se considerar para este resultado que as tíbias direita desses grupos receberam os respectivos implantes e as tíbias esquerda receberam apenas o defeito ósseo. No **tempo zero** para o **Fêmur Esquerdo** nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com  $p=0,5923$ . No período experimental de 28 dias o valor da DMO do **Fêmur Esquerdo** para o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p= 0,0162$ , considerado significante. No **tempo zero** para o **Fêmur Direito** nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com  $p= 0,6577$ . No período experimental de 28 dias o valor da DMO do **Fêmur Direito** para o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p=0,2719$ , considerado não significativo. No **tempo zero** para a **Tíbia Esquerda** nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com  $p=0,2427$ , No período experimental de 28 dias o valor da DMO da **Tíbia Esquerda** para

o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p=0,8260$ , considerado não significativo. No **tempo zero** para a **Tíbia Direita** (Tíbia que recebeu o implante) nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com  $p=0,2252$ . No período experimental de 28 dias o valor da DMO da **Tíbia Direita** para o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p=0,1189$ , considerado não significativo. No **tempo zero** o valor de DMO para a região de interesse **Corpo Inteiro ou total** nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com valor de  $p= 0,9999$ . No período experimental de 28 dias o valor da DMO do **Corpo Inteiro** para o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p=0,3345$ , diferença considerada não significativa. No **tempo zero** o valor de DMO para a região de interesse **Coluna lombar (L1-L4)** nesses dois grupos as diferenças foram consideradas não significativas com valor de  $p=0,4417$ . No período experimental de 28 dias o valor da DMO da **Coluna lombar (L1-L4)** para o grupo **Infiltrado\_1Tib** foi maior do que o valor da DMO do grupo **Controle\_1Tib**, com valor de  $p= 0,0756$ . diferença considerada não significativa.

As regiões fora do sítio de implantação, ou seja, sem ser a tíbia, que aumentaram significativamente o valor da DMO, e os respectivos grupos, antes e depois de implantar foram na **Região Lombar** e **Corpo Inteiro** nos grupos **Infiltrado**, **Controle** e **Controle-controle**. No Fêmur Esquerdo nos grupos **Infiltrado**, **Controle**, **Controle\_1Tib** e **Infiltrado\_1Tib**. Fêmur Direito **Infiltrado** e **Controle**. Nas tíbias direita e esquerda **também se pode observar o crescimento significativo nos grupos Infiltrado e Controle**, quando comparados os períodos antes e depois de implantar. Para essas comparações deve-se considerar que os implantes foram colocados nas tíbias e houve aumento da DMO significativo no Corpo Inteiro, Região lombar, Fêmur Direito e Esquerdo.

#### 4.1.6 Estudo *Ex Vivo* das Tibias Após os Períodos Experimentais – Aspectos Gerais das Amostras

Após a ressecção e dissecação das tíbias, antes de irem para o preparo histológico, o **aspecto geral da região de implante** foi observado. Havia a presença de calo ósseo em três amostras do grupo controle e em uma amostra do grupo infiltrado. Na Figura 4.5 imagem de uma amostra após ressecção e dissecação evidencia o calo ósseo.



**Figura 4.5** – Tibia após ressecção e dissecação. A seta branca indica o calo ósseo, a seta preta indica o implante e a cinza indica a diáfise da tibia

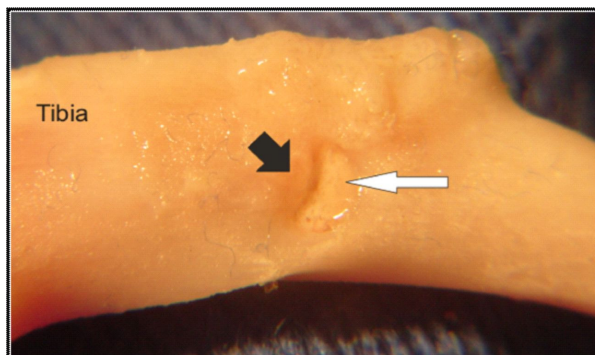
Com relação ao recobrimento do implante com osso, 15 tíbias do grupo **controle** e 15 tíbias do grupo **infiltrado** não apresentaram recobrimento do implante. Ao dissecar as amostras empurraram-se os implantes com uma pinça para verificar possível soltura do implante, todos se apresentaram fixos ao osso. Na Figura 4.6 vê-se uma tibia após o período experimental, sem o recobrimento do implante. Também foi observado osso sobre o biomaterial, como ilustrado na Figura 4.7.



**Figura 4.6** – Tibia após ressecção e dissecação. A seta preta indica o implante sem recobrimento com tecido ósseo



Houve crescimento ósseo parcialmente em cinco amostras, sendo uma do grupo infiltrado na Fase 1, e em duas amostras no grupo infiltrado na Fase 2, e também em duas do grupo controle da Fase 2, vê-se o osso sobre o biomaterial na Figura 4.7



**Figura 4.7** – Tíbia após ressecção e dissecação. A seta preta indica o osso recobrindo o implante e a seta branca indica o implante

#### 4.1.7 Ensaio Biomecânico

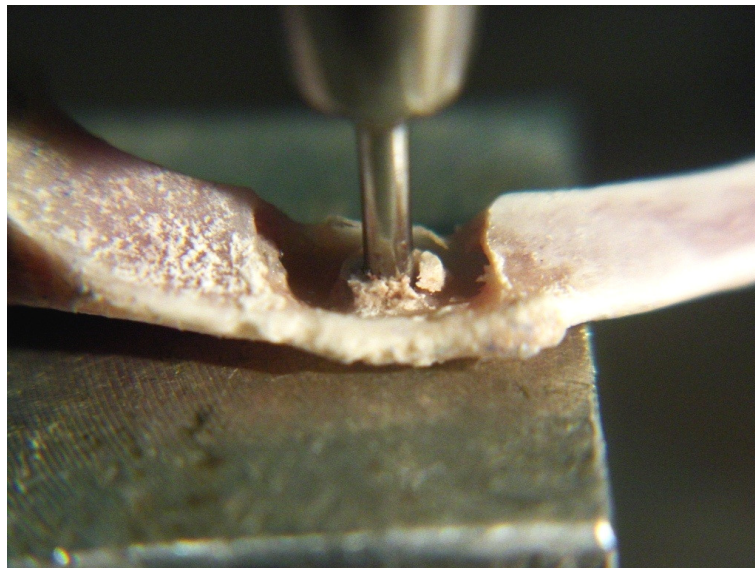
Célula de carga de 500 kgf (5 KN), temperatura 23 °C, fundo de escala 450 kgf, velocidade de ensaio 0,5 mm/min.

Como a tíbia de rato é um osso pequeno realizou-se a remoção cuidadosa do córtex contralateral à região de inserção do implante sem que o disco de corte danificasse o implante. Utilizaram-se algumas amostras para a realização dos pré-testes necessários para ajustar o tamanho do dispositivo de ensaio.

#### FASE 1

Durante a Fase 1 foram realizados os primeiros testes de cisalhamento e para ajustar as medidas do dispositivo de ensaio foram utilizadas algumas amostras do grupo controle. Após este procedimento os ensaios na Fase 1 foram realizados com uma amostra do Grupo controle (21 dias) e 7 do Grupo infiltrado (sendo 4 de 18 dias e 3 de 21 dias). Os resultados

obtidos com o teste de *push-out* para os implantes recobertos com materiais bioativos (infiltrados) os valores médios de carga máxima de 30,5N ( $\pm 5,9$ ) e 38,45 N ( $\pm 17,82$ ) nos períodos de 18 dias e 21 dias, respectivamente, A tensão de cisalhamento interfacial para os implantes infiltrados foi de 6,42 MPa ( $\pm 1,65$ ) e 8,89 MPa ( $\pm 4,14$ ) nos períodos de 14 e 21 dias, respectivamente,  $p=0,32$ , considerado não significativo. A respeito da Tensão de cisalhamento para o implante controle foi de 6,4 MPa A Figura 4.8 ilustra o ensaio biomecânico, observa-se que nesse ensaio, não houve o cisalhamento da interface osso-implante, o atuador penetrou no implante, fraturando-o, sem empurrá-lo para baixo. A interface apresentou resistência mecânica superior ao núcleo do corpo-de-prova.



**Figura 4.8** – Ensaio de cisalhamento. O implante não cisalhou com o osso. A interface osso-implante foi mantida

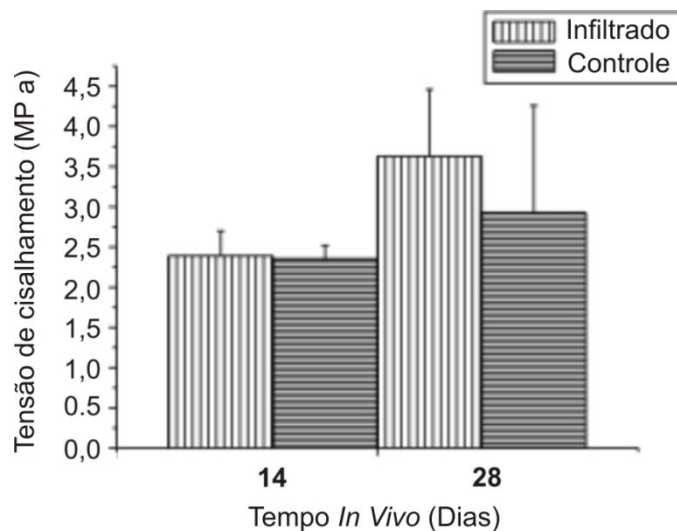
Como as tíbias com os implantes controle foram utilizadas para ajustar os parâmetros da máquina de ensaio mecânico não houve a possibilidade de comparar a tensão de cisalhamento entre os dois grupos, contudo nesta fase pode-se observar para os implantes infiltrados que houve aumento da tensão de cisalhamento entre os dois períodos experimentais, porém sem significância estatística.

## FASE 2

Os valores de tensão de cisalhamento foram analisados quanto às diferenças entre os grupos com teste *Tukey*, para  $p < 0,05$  considerou-se diferença significativa.

Com as **tíbias direitas** realizou-se ensaio de cisalhamento. Durante o ensaio o atuador empurrou o centro do implante. Para calcular a tensão de cisalhamento utilizou-se a área do implante, e o raio  $r$  utilizado foi do atuador, para calcular a superfície cisalhante.

Utilizou-se a altura do implante ao invés de utilizar a espessura da cortical do osso, pois, o implante não se soltou inteiro, a região do implante em contato com o osso não se soltou, o implante foi empurrado e a interface não acompanhou, conforme ilustrado nas Figuras 4.8 e 4.10. Os resultados indicaram que quanto maior tempo de implantação maior a tensão ao cisalhamento. Na Figura 4.9 e na Tabela 4.5 observam-se os resultados expressos em média e desvio padrão. O número de amostras analisadas por grupo (n) foi cinco. Utilizou-se o programa para análise estatística *Instat*.



**Figura 4.9 - Gráfico** da tensão de cisalhamento (*push-out*) dos implantes após período experimental 14 e 28 dias, dados expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa foi encontrada entre os períodos experimentais dos implantes infiltrados de 14 para 28 dias para o implante infiltrado. E aumento de 24% para implante infiltrado no período de 28 dias em comparação ao grupo controle. \*Nível de significância  $p < 0,005$ . Teste de *Tukey*

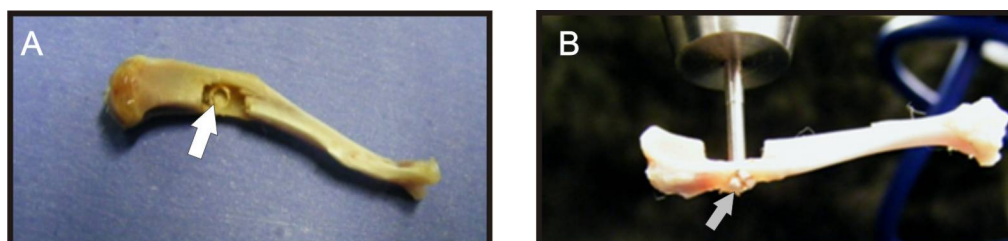
Entre os grupos infiltrado e controle no período de 14 dias não foi significativa a diferença com valor de  $p=0,8298$ , entre os grupos infiltrado e controle 28 dias, valor maior para o grupo infiltrado com diferença não significativa,  $p=0,3244$ , com ganho para o grupo infiltrado na tensão em 24%. Entre o grupo Infiltrado em tempos diferentes 14 e 28 dias a diferença foi significativa, o valor de  $p=0,0260$ . Entre o grupo controle em tempos diferentes 14 e 28 dias a diferença foi não significativa, o valor de  $p=0,391$ .

**Tabela 4.5** – Tensão de cisalhamento ou de escorregamento – dados expressos em média e desvio padrão. Comparação entre os grupos e os períodos experimentais\*

Tensão cisalhamento	Infiltrado_14dias	Infiltrado_28dias	Controle_14dias	Controle_28dias
<b>Média</b>	2,3936	3,6356	2,357	2,9344
<b>Desvio padrão</b>	0,3108	0,8320	0,1787	1,3339
<b>14 Dias</b>	<b>28 Dias</b>		<b>14 x 28 Dias</b>	
<b>Grupo infiltrado maior que o grupo controle, <math>p=0,8298</math>, não significativo</b>	<b>Grupo infiltrado muito maior que o grupo controle, <math>p=0,3244</math>, não significativo, com ganho na tensão para o infiltrado em 24%.</b>		<b>Infiltrado, valor maior no período de 28 dias, <math>p=0,0260</math>, diferença significativa.</b>	
			<b>Controle, valor maior no período de 28 dias, <math>p=0,3914</math>, diferença não significativa.</b>	

\*Nível de significância  $p<0,005$ . Teste *Tukey*

Na Figura 4.10 é observada a resposta dos implantes ao ensaio de *push-out*, em (A) vê-se que a interface não, cisalhou, e em (B) o implante fraturou em três partes.



**Figura 4.10** - Tíbias após ensaio de retenção ou cisalhamento – Em (A) Seta branca indica o implante com o centro empurrado e a interface osso-implante íntegra. Em B seta cinza indica o implante fraturado em três partes após o ensaio

Para a Tensão de cisalhamento de implantes porosos em **alumina infiltrada com Biovidro e HAp** pode-se considerar ganho de 24 % do período de 14 dias

para 28 dias, quanto maior o tempo experimental maior a resistência à expulsão do implante. Porém para a **alumina porosa sem bioativos** ou **controle** não há diferença significativa com relação ao tempo experimental, ou seja, a tensão inicial permanece com valor próximo à tensão final, sem diferença significativa.

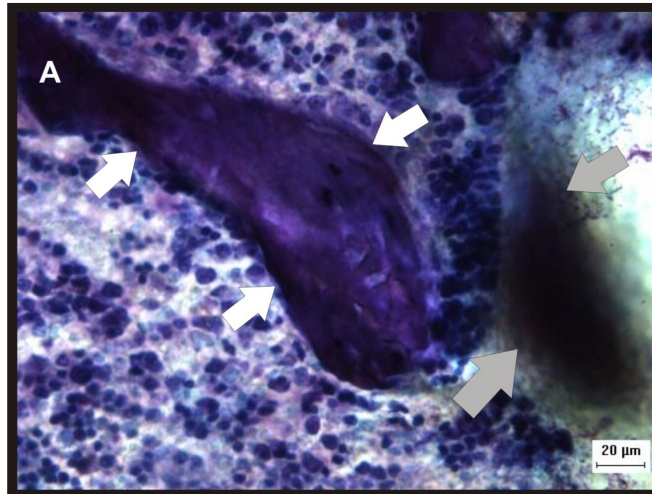
#### **4.1.8 Histologia**

##### **FASE 1**

Na fase 1 as tíbias foram fatiadas para histologia com disco diamantado e seguiu-se com desgaste com lixamento das amostras até que espessura ficasse em torno de 120-150  $\mu\text{m}$  e as lâminas foram coradas com azul de toluidina. Como a espessura das lâminas ficou muito maior do que o desejado (3-10  $\mu\text{m}$ ) para histologia, os parâmetros qualitativos das imagens foram analisados de forma descritiva e comparativamente entre os tempos experimentais, ou seja, 18 e 21 dias, períodos em que os animais permaneceram com o implante até a eutanásia, e entre o tipo de implante.

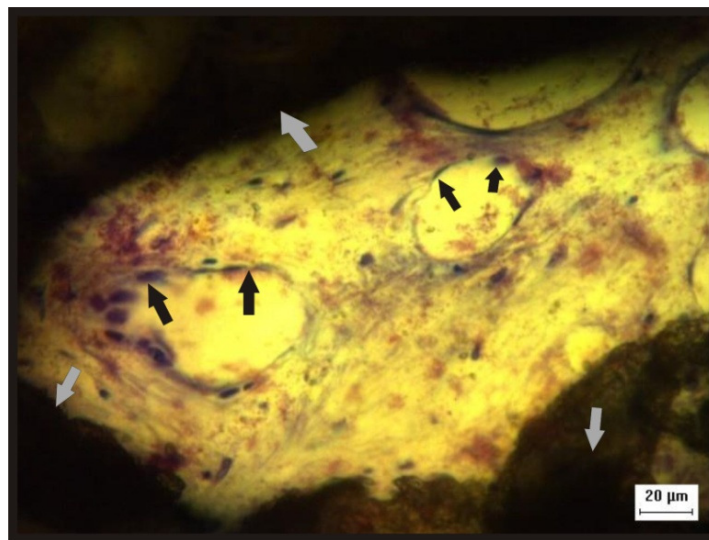
Nas Figuras 4.11 e 4.12 podem-se observar imagens obtidas por microscópio ótico dos implantes recobertos com material bioativo, que permaneceram por 18 e 21 dias implantados, são ilustrados.

A imagem da Figura 4.11 sugere matriz aparentemente organizada na interface osso implante.



**Figura 4.11** – Imagem obtida em microscópio óptico de implante infiltrado com materiais bioativos, implantados durante 18 dias. As setas brancas indicam, um tecido ósseo com uma matriz organizada, indicativo de uma trabécula óssea. Nas setas cinza observa-se o biomaterial

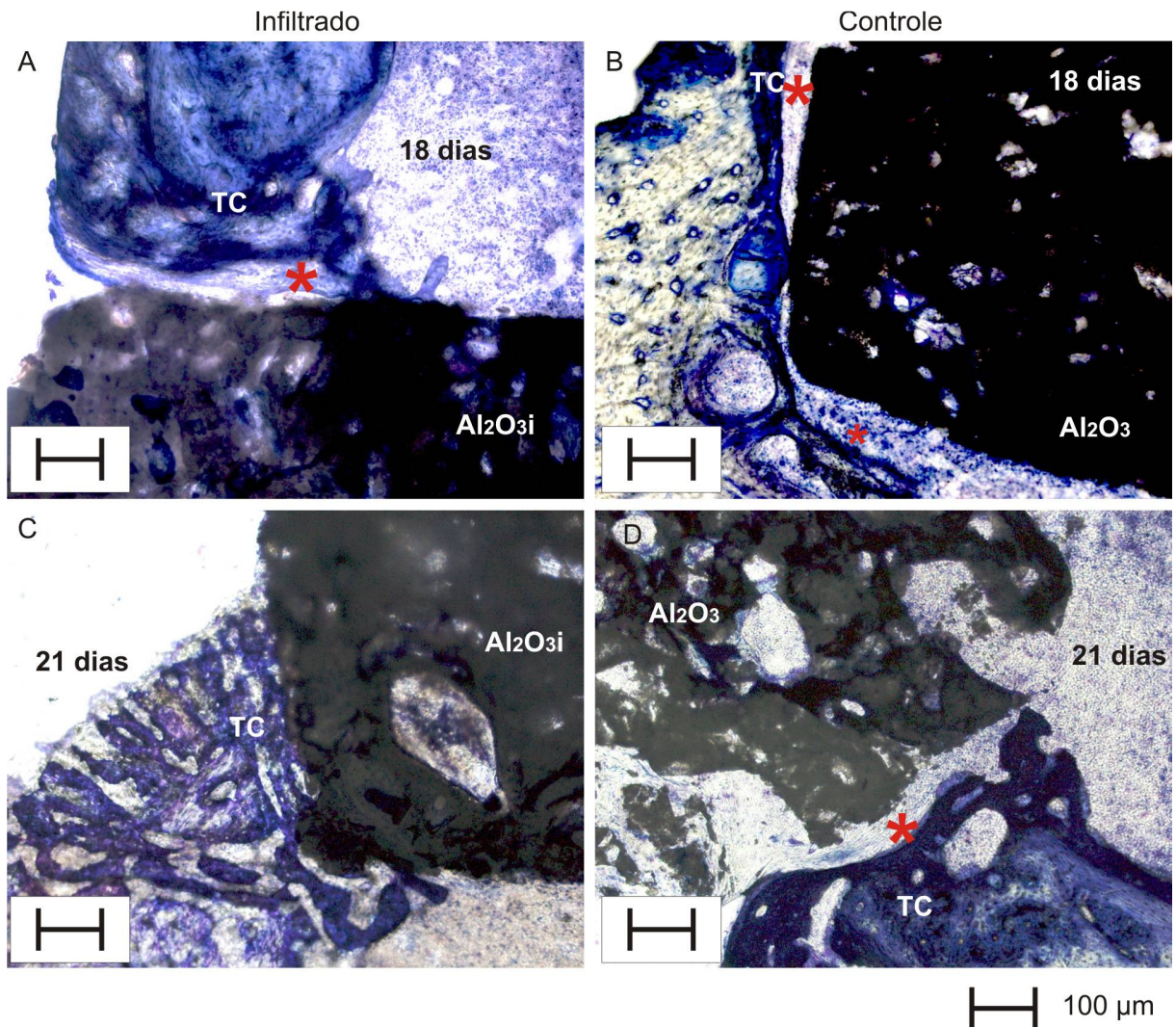
Para o tempo experimental de 21 dias os implantes recobertos sugeriram a formação de novos vasos no interior de poros, na imagem observam-se os pericitos como ilustrado na Figura 4.12.



**Figura 4.12** – Imagem obtida em microscópio óptico de implante infiltrado com materiais bioativos, implantados durante 21 dias. Nas setas pretas observa-se neovascularização no interior do poro, nas cinzas pode-se observar o biomaterial

Na Figura 4.13, as amostras foram observadas em microscópio óptico com maior intensidade de luz em que se vêem comparativamente os implantes infiltrado e controle de acordo com o tempo experimental 18 e 21 dias na **Fase 1**. Pode-se observar o implante em

preto, a interface região histoplasmocitária-implante indicada pelo asterísco e tecido recém formado (TC).



**Figura 4.13** - Imagens obtidas em microscópio óptico de implante infiltrado (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>i) (A,e C) e Implante Controle Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (B e D). Em A e B, observa-se implante infiltrado e implante controle, respectivamente, em período experimental de 18 dias. Em C e D observa-se implante infiltrado e implante controle, respectivamente, em período experimental de 21 dias. Nas imagens pode-se observar tecido recém formado (TC) em tons de azul mais escuro, a região dos implantes em preto. Em A, B e D vê-se região histoplasmocitária (\*) entre o implante e o tecido recém-formado. Em C a região histoplasmocitária entre o implante e o TC não é observada. Barra de escala = 100 µm

Nas imagens da Figura 4.13 é observado o contato entre o tecido organizado e o implante em fase de maior integração no período de 21 dias para a imagem do implante

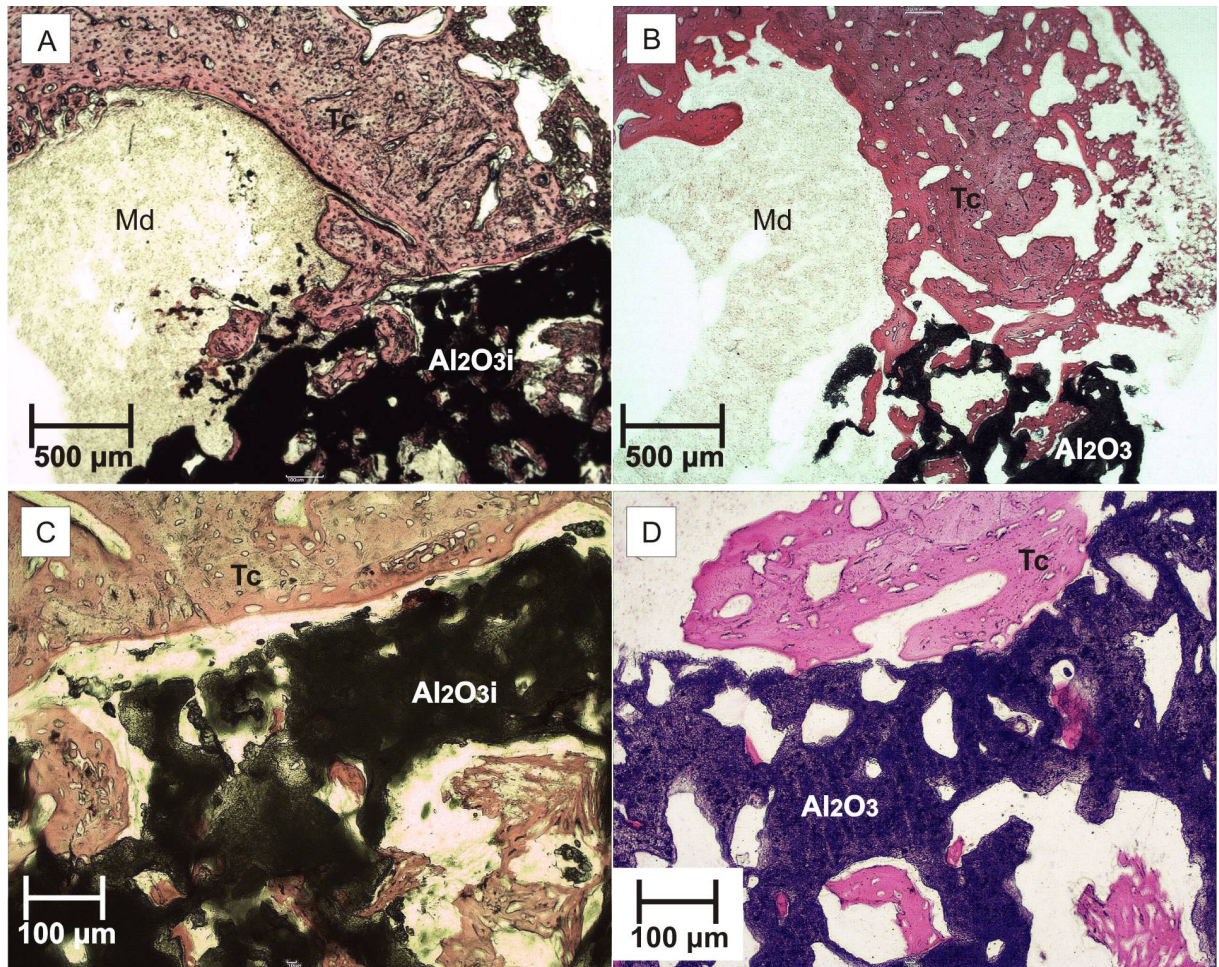
infiltrado (Figura 4.13-C). As regiões indicadas pelos asteriscos em A, B, e D evidenciam a presença de tecido de granulação ou histoplasmocitário na interface.

## FASE 2

Durante a **Fase 2** as amostras foram cortadas com a utilização de fita diamantada e lixadas nas espessuras de 4 a 38  $\mu\text{m}$ . A coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. As imagens 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17 foram obtidas em microscópio com luz comum para analisar contato osso-implante e a presença de tecido neoformado nos poros dos implantes.

Na Figura 4.14 vê-se lâmina histológica de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ ) em A e C, denominado implante infiltrado, e alumina porosa sem recobrimento ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em B e D, após período experimental de 14 dias em tibia de rato. As imagens (A), (B), (C) e (D) evidenciam a interface osso-implante e os poros. Nessas imagens vê-se a região de medula óssea (Md), vê-se também tecido ósseo (Tc) na interface osso-implante e nos poros do implante.





**Figura 4.14** - Imagens de Microscopia de luz comum de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ ) em A e C, alumina porosa (Implante controle –  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em B e D após período experimental de 14 dias em tíbia de ratos. O implante está em preto e o tecido ósseo (Tc) está corado em tons de rosa. Em (A), (B) barra de escala 500 $\mu\text{m}$ , em, (C) e (D) barra de escala 100 $\mu\text{m}$ . Em A e B região medular (Md). Em 14 dias observa-se tecido ósseo cortical na superfície de ambos, porém para o implante infiltrado (A) e (C) o tecido apresenta-se com maior organização. Há tecido recém formado nos poros de ambas as amostras. Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Na Figura 4.15 vê-se lâmina histológica de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ ) em A e C, denominado implante infiltrado, e alumina porosa ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em B e D, após período experimental de 28 dias em tíbia de rato. As imagens (A), (B), (C) e (D) evidenciam a interface osso-implante e os poros. Nessas imagens vê-se tecido ósseo (Tc) na interface osso-implante e nos poros do implante. Em A e C, nas imagens do implante infiltrado pode ser notado o contato direto entre o osso e o implante. Em B e C observa-se tecido ósseo na superfície e nos poros do implante, pode-se

observar em alguns poros que o tecido ósseo formado não apresenta contato direto com a parede do poro do implante.

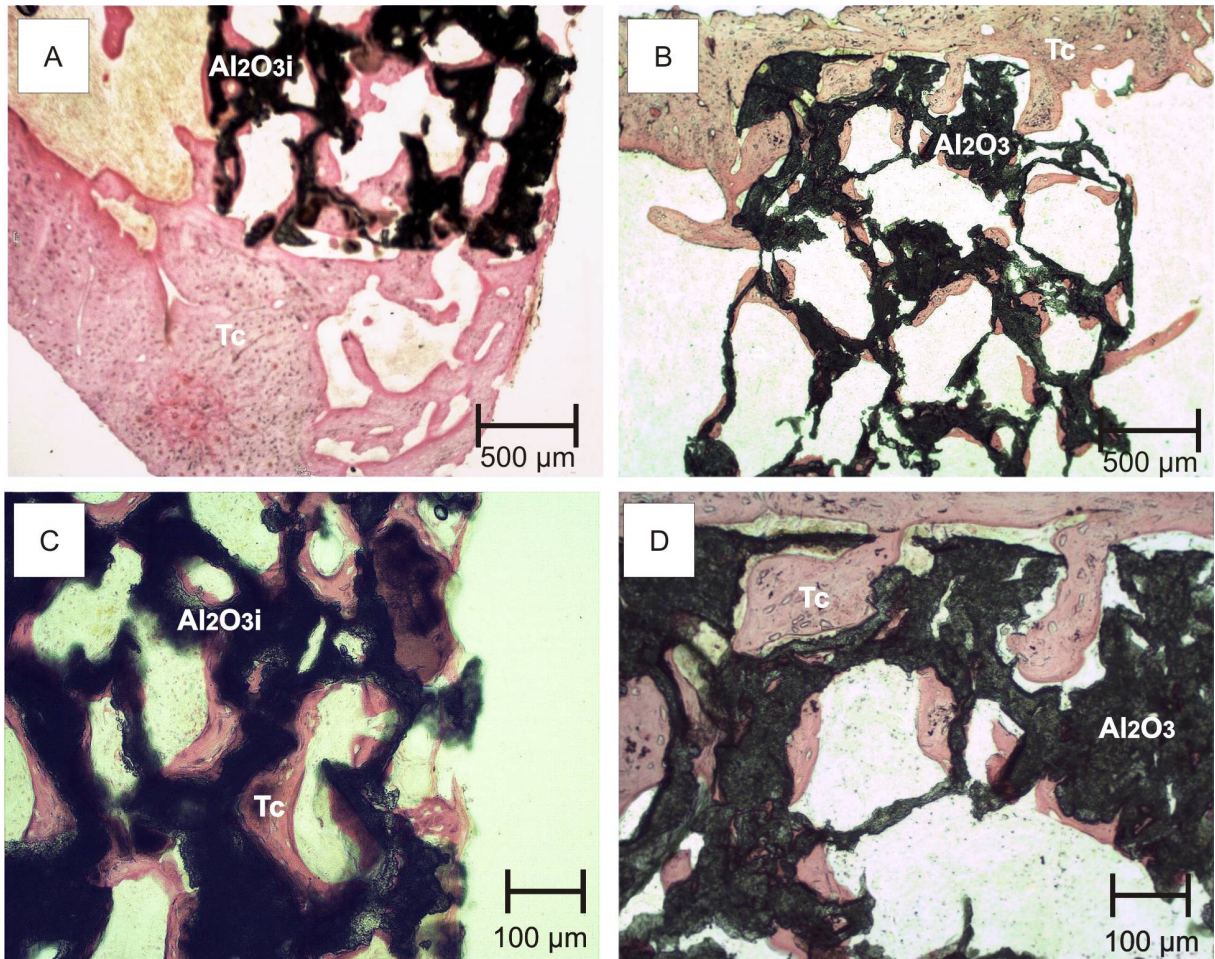
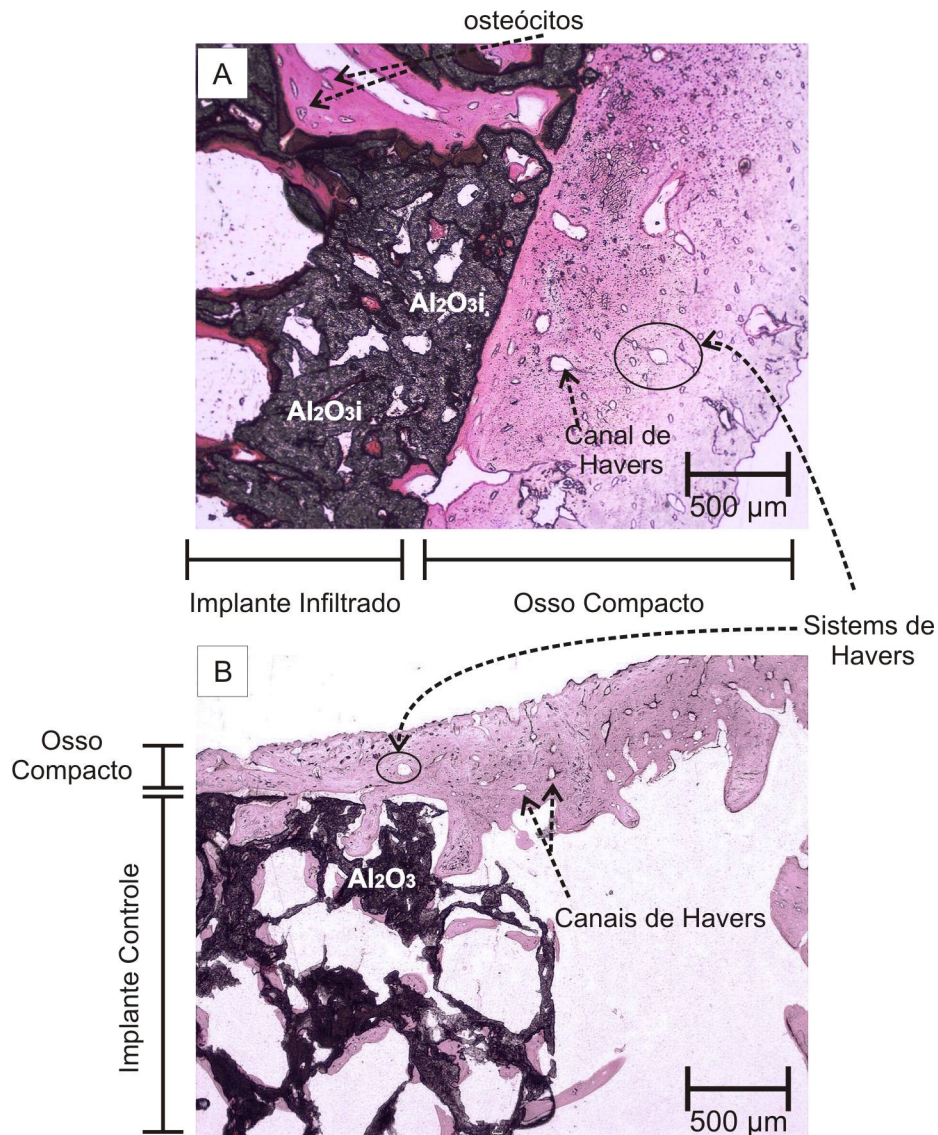


Figura 4.15 – Imagens de Microscopia de luz comum de implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ ) em A e C, alumina porosa (implante controle –  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em B e D após período experimental de 28 dias em tíbia de ratos. O implante está em preto e o tecido ósseo (Tc) está corado em tons de rosa. Em (A), (B) barra de escala 500 $\mu\text{m}$ , em (C) e (D) barra de escala 100 $\mu\text{m}$ . Em 28 dias observa-se tecido ósseo na superfície e nos poros de ambos, porém para o implante infiltrado (A) e (C) pode ser notado o contato direto entre o osso e o implante, enquanto que para o controle em alguns poros não é observado contato direto. Há tecido recém formado nos poros de ambas as amostras. Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Na Figura 4.16 em (A) e (B) observa-se Implante em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ ) (implante infiltrado) e alumina porosa (implante controle), após período experimental de 28 dias em tíbia de rato. Em (A) e (B) observa-se a interface osso implante indicada pela seta branca, o implante em preto, o tecido ósseo em tons rosa, nessa imagem pode-se observar tecido ósseo nos poros e na superfície osso-implante. Em

(A) percebe-se que a região de contato entre o tecido ósseo e o implante é contínua, em (B) é observado que na superfície e em alguns poros esse contato não é direto, com a presença de tecido de granulação na interface. É observado no interior dos poros osteócitos. Osso maduro em contato com o material na superfície do implante, com Sistemas de *Havers* e os respectivos canais.



**Figura 4.16** - Imagens de Microscopia de luz comum. Em (A) de implante infiltrado (alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita) (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>i) em (B) alumina porosa sem recobrimento (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Período experimental de 28 dias. Observa-se a presença de tecido ósseo cortical na superfície do implante e tecido ósseo recém formado nos poros do material. Coloração HE

Ao observar as imagens 4.14 a 4.16 comparativamente entre implante controle e implante infiltrado pode-se perceber maior contato osso-implante nas amostras com

implante infiltrado. Deve-se considerar que nesta segunda Fase as amostras infiltradas utilizadas para as imagens anteriores foram cortadas com espessura de 38 a 18  $\mu\text{m}$ , e as amostras controle foram cortadas e lixadas até a espessura menor que 9  $\mu\text{m}$ . A verificação sobre a interferência da espessura do corte para histologia será realizada com o estudo de EDS-*line-scan* do item 4.1.10 deste capítulo, pois para realizar o EDS-*line-scan* as amostras são analisadas incluídas sem realização de microtomia, o que possivelmente mantém a integridade da amostra.

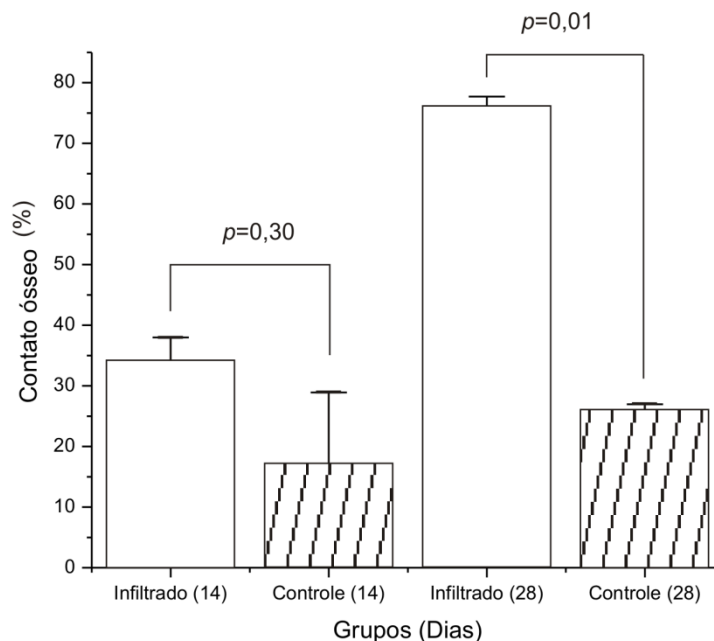
### **Morfometria**

As imagens para morfometria foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo (UNIFESP) com o *software Motic 2.0*. A análise morfométrica foi realizada com o *software* livre *Image Tool for Windows 3.0* (UTHSCA). O campo de observação foi do centro do implante para a superfície de contato entre o osso e o implante.

Foram obtidos os valores dos perímetros da superfície do implante e do contato ósseo, valores dos perímetros dos poros e do contato com o tecido ósseo recém formado, para obtenção da porcentagem de contato ósseo na superfície do implante e nos poros. Foram também obtidos os valores de diâmetro dos poros, perímetro de tecido recém formado nos poros. Esses valores foram comparados entre os implantes controle e infiltrado, nos períodos de 14 e de 28 dias.

A diferença encontrada entre os implantes controle e infiltrado, no período de 14 dias, foi considerada não significativa,  $p=0,30$ . No período de 28 dias foi considerada significativa,  $p=0,0173$ . O gráfico que representa os valores está na Figura 4.17.

As diferenças entre os dois períodos 14 e 28 dias para o grupo infiltrado foi considerada significativa,  $p=0,0462$ . Para o grupo controle a diferença foi considerada significativa, valor de  $p=0,4814$ .



**Figura 4.17** – Gráfico do percentual do contato ósseo na superfície dos implantes infiltrado (Alumina porosa recoberta com biovidro e HAp) e controle (Alumina porosa) após serem implantados em tíbias de ratos, períodos experimentais 14 e 28 dias. Diferenças significativas entre os grupos no período de 28 dias.  $p < 0,05$  considerado significativo

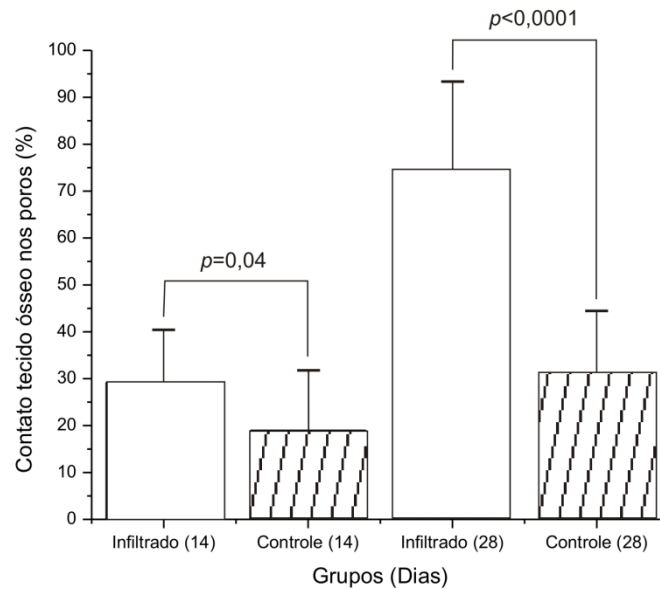
Na Tabela 4.6 contém os valores expressos em média e desvio padrão do percentual de contato ósseo na superfície e nos poros dos implantes infiltrado e controle após os respectivos períodos experimentais.

**Tabela 4.6** - Média e desvio padrão da percentagem de contato ósseo na superfície e nos poros dos implantes infiltrado e controle após os respectivos períodos experimentais

	% Contato ósseo na superfície dos implantes		% Contato ósseo nos poros dos implantes	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias
<b>Infiltrado</b>	33,94±4,03	76,13±1,57	29,24±11,18	74,54±18,83
<b>Controle</b>	16,51±12,39	25,84±1,12	19,03 ±12,71	31,10±13,38

Houve aumento do percentual de contato ósseo nos poros dos implantes com o aumento do período de implantação. Foram consideradas diferenças significativas entre os

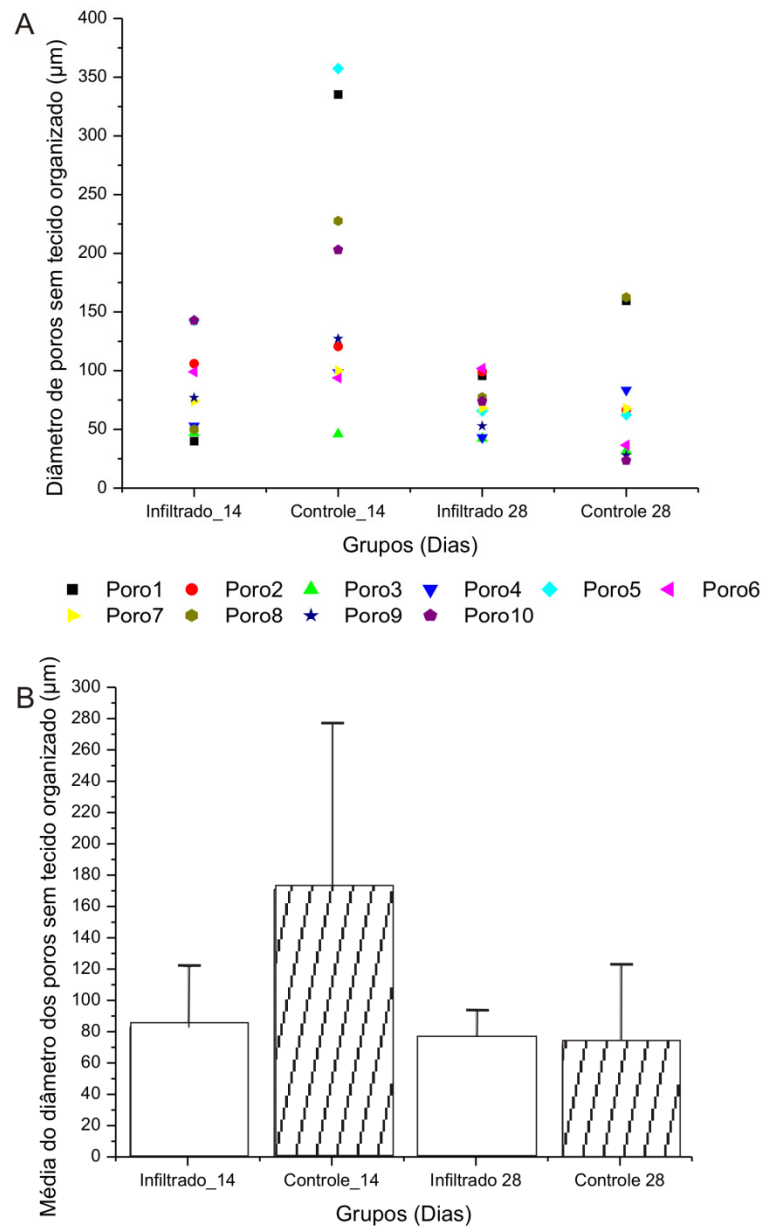
grupos infiltrados e controle no período de 14 dias e 28 dias, valor de  $p=0,0402$  e  $p< 0,0001$ , respectivamente. No gráfico da Figura 4.18 pode-se observar o contato de tecido ósseo recém formado nos poros dos implantes após os respectivos períodos experimentais.



**Figura 4.18** – Percentual de contato ósseo. Houve diferença significativa com valor significativamente maior para o implante infiltrado nos dois períodos experimentais. Nível de significância  $p<0,05$

Para os grupos com implante infiltrado entre os períodos de 14 e de 28 dias houve aumento com diferença considerada extremamente significativa, valor de  $p<0.0001$ . Para os grupos com implante controle entre os períodos de 14 e 28 dias houve aumento considerado significativo, valor de  $p=0.0272$ , o aumento para o grupo controle foi considerado com nível de significância menor do que para o grupo infiltrado.

Foram obtidos os valores médios do diâmetro dos poros sem tecido mineralizado. Nos implantes após os períodos experimentais 10 poros sem tecido organizado, ou “vazios”, ou com tecido de granulação, de cada amostra foram mensurados quanto ao diâmetro médio. Três medidas de cada poro foram obtidas para o diâmetro médio dos poros “vazios”. Nos gráficos da Figura 4.19 em (A) pode-se observar o diâmetro dos poros sem tecido organizado e em (B) média do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado.



**Figura 4.19** – Diâmetro dos poros sem tecido organizado ou com tecido de granulação (poros “vazios”). Em (A) pode-se observar o gráfico de diâmetro dos poros sem tecido organizado e em (B) gráfico da média do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado. 70 % dos poros analisados com diâmetro médio menor que 100  $\mu\text{m}$  não apresentaram tecido ósseo recém formado

Na tabela 4.7 são observados os valores do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado.

**Tabela 4.7** – Média e desvio padrão do diâmetro médio dos poros sem tecido organizado ou poros “vazios”

<b>Diâmetro médio dos poros sem tecido organizado</b>		
	<b>14 dias</b>	<b>28 dias</b>
<b>Infiltrado</b>	83,16±38,27	72,02±22
<b>Controle</b>	170,94±106,57	72,19±50,89

Foram observados 40 poros, 10 de cada amostra, para obtenção dos valores de diâmetro médio de poros “vazios” (poros sem tecido organizado, ou com tecido de granulação). 28 poros apresentaram diâmetros menores que 100  $\mu\text{m}$ , oito com diâmetro médio entre 100<diâmetro>200  $\mu\text{m}$ , 2 poros entre 200<diâmetro>300 e dois entre 300<diâmetro>400. Sendo que para o implante infiltrado todos os poros sem tecido organizado apresentavam diâmetro médio dos poros menores que 150  $\mu\text{m}$  em ambos os períodos. Para o implante controle poros menores que 357  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e com 28 dias, e também poros menores que 162  $\mu\text{m}$  de diâmetro puderam ser encontrados sem tecido organizado.

Com esses achados a infiltração de hidroxiapatita e biovidro nos poros de alumina com 70 % de porosidade (implante infiltrado) parece proporcionar o crescimento de tecido ósseo recém-formado nos poros desde 14 dias de implantação para poros maiores que 100  $\mu\text{m}$ . No entanto, sem a infiltração com materiais bioativos (implante controle) os poros com diâmetros menores que 162  $\mu\text{m}$  não foram encontrados com tecido ósseo até o período experimental de 28 dias em tíbias de ratos.

Esses resultados evidenciam que ao planejar a região porosa de material em gradiente funcional, há relevância no tamanho de poros. O projeto deve ser capaz de desenvolver poros com diâmetro médio entre 100 e 400  $\mu\text{m}$  e restringir a formação de poros menores que 100  $\mu\text{m}$ , para que não ocorra a presença de poros sem formação de tecido organizado ou “vazios”. Esse planejamento deve ser realizado para aplicações em tecido ósseo.



#### 4.1.9 Radiografia de Alta-Definição

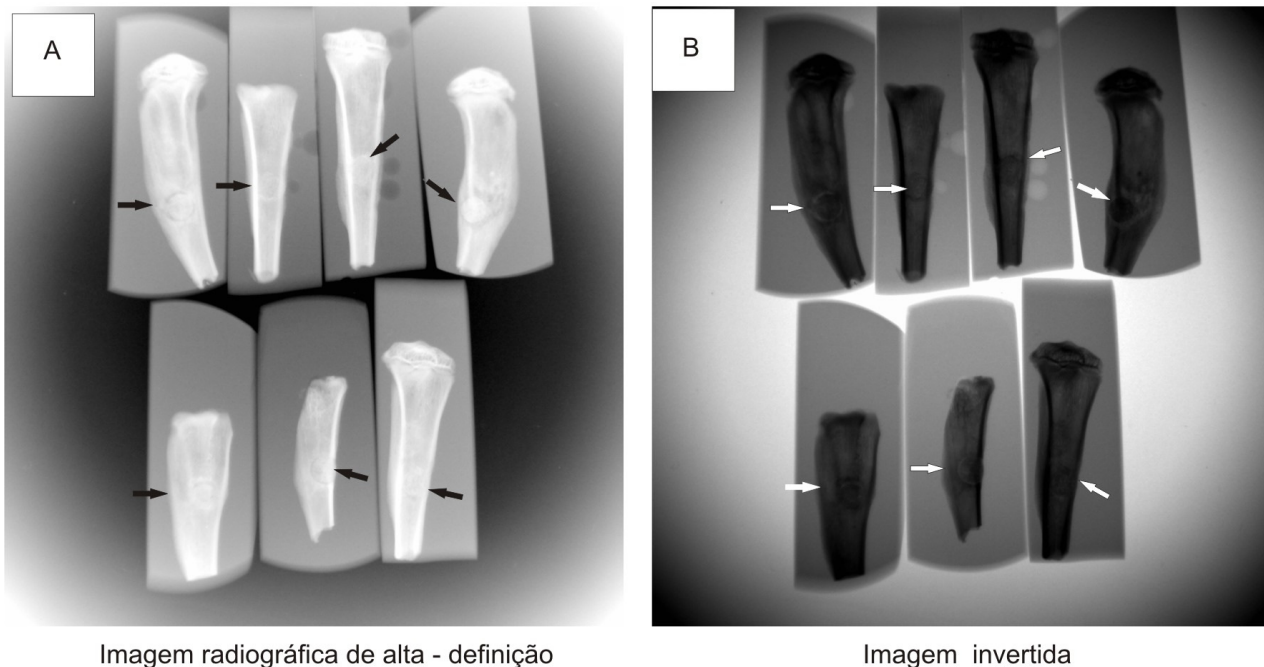
Radiografia de alta definição foi realizada e as análises foram comparativas entre os grupos controle (alumina porosa) e implante infiltrado (alumina porosa recoberta com materiais bioativos). O objetivo dessa análise é complementar o estudo de osteointegração dos implantes, para investigação na interface osso-implante.

Radiopacidade aos raios x indica região de tecido duro como osso, pode ser região com calcificação e região radio translúcida indica menor calcificação. O implante aparece como uma região branca ou opaca. As imagens de (A) são mostradas invertidas nas imagens (B), pois em alguns casos a região de implantação fica mais evidente.

Nas Figuras (A) de 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23 vêem-se imagens radiográficas, as imagens foram obtidas com as tíbias de ratos após os períodos experimentais, cada imagem foi obtida com a colocação das tíbias pertencentes à cada grupo.

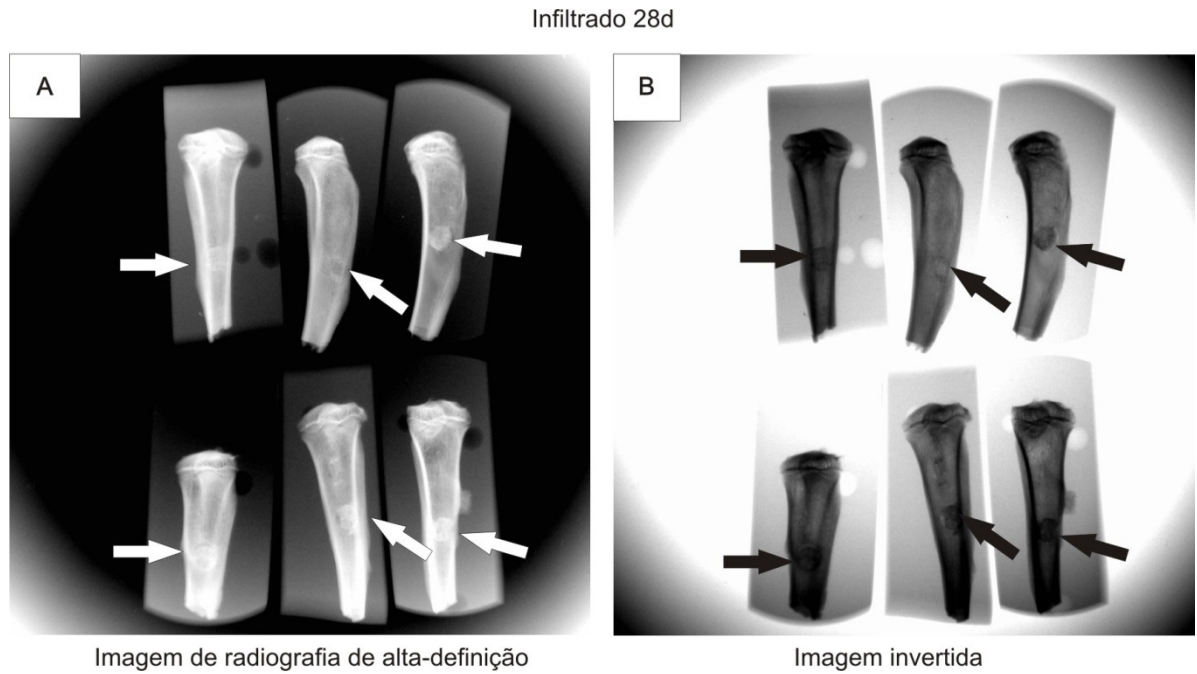
Na Figura 4.20 imagem radiográfica das tíbias do grupo infiltrado após 14 dias de implantação em tíbias.

Infiltrado - 14d



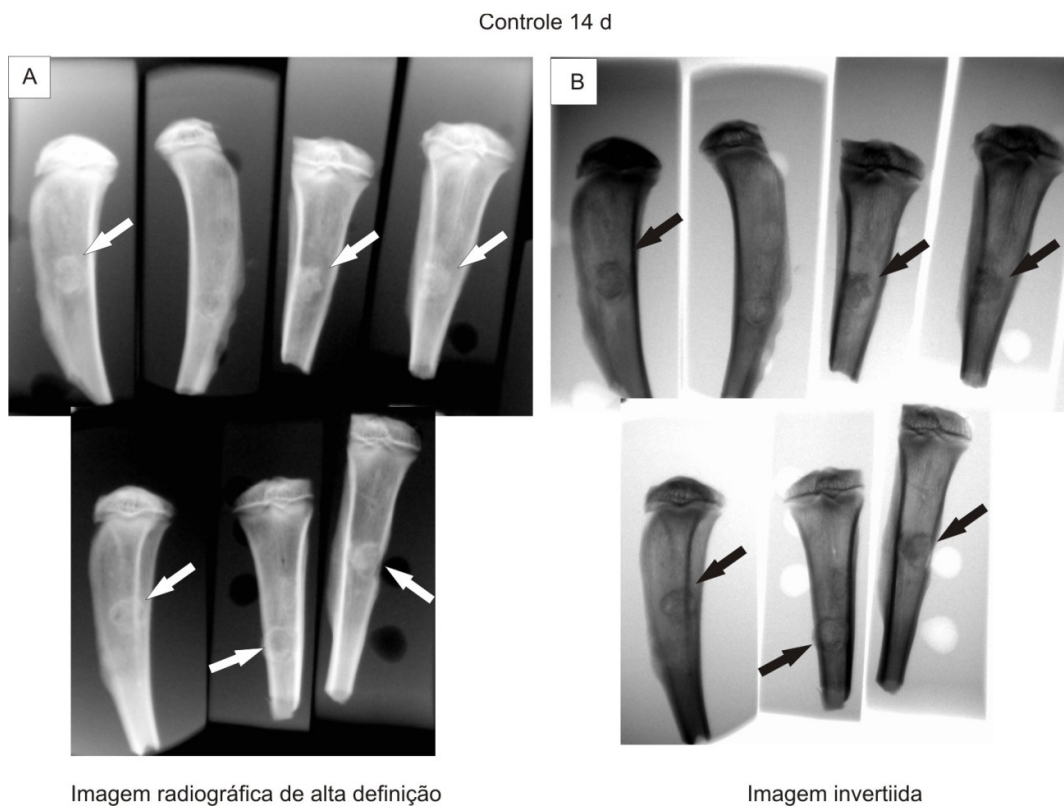
**Figura 4.20** – Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 14 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes infiltrados. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida

Na Figura 4.21 vê-se imagem radiográfica das tíbias do grupo infiltrado após 28 dias do período experimental.



**Figura 4.21** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 28 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes infiltrados. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida

Na Figura 4.22 vê-se imagem radiográfica das tíbias do grupo controle após 14 dias do período experimental.



**Figura 4.22** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 14 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes controle. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida

Na Figura 4.23 vê-se imagem radiográfica das tíbias do grupo controle após 28 dias do período experimental.



**Figura 4.23** - Imagem radiográfica de alta definição de tíbias após período experimental de 28 dias, as setas indicam a região de implante. Grupo com implantes controle. Em (A) imagem radiográfica, em (B) a mesma imagem em tonalidade invertida

As imagens foram salvas em 8 bits possuem tons de cinza, os quais possuem valores entre 0 a 256, sendo que o extremo 0 é a cor preta e 256 é a cor branca, entre esses dois valores são os tons intermediários. É considerado que quanto maior o valor encontrado, maior a radiopacidade da região analisada, o que representa região mais mineralizada na interface osso-implante.

Os valores da radiopacidade estão na Tabela 4.8, os quais estão expressos em média e desvio padrão, valores máximos e mínimos. Foram comparados os implantes infiltrados e controle, entre os períodos experimentais de 14 e 28 dias.

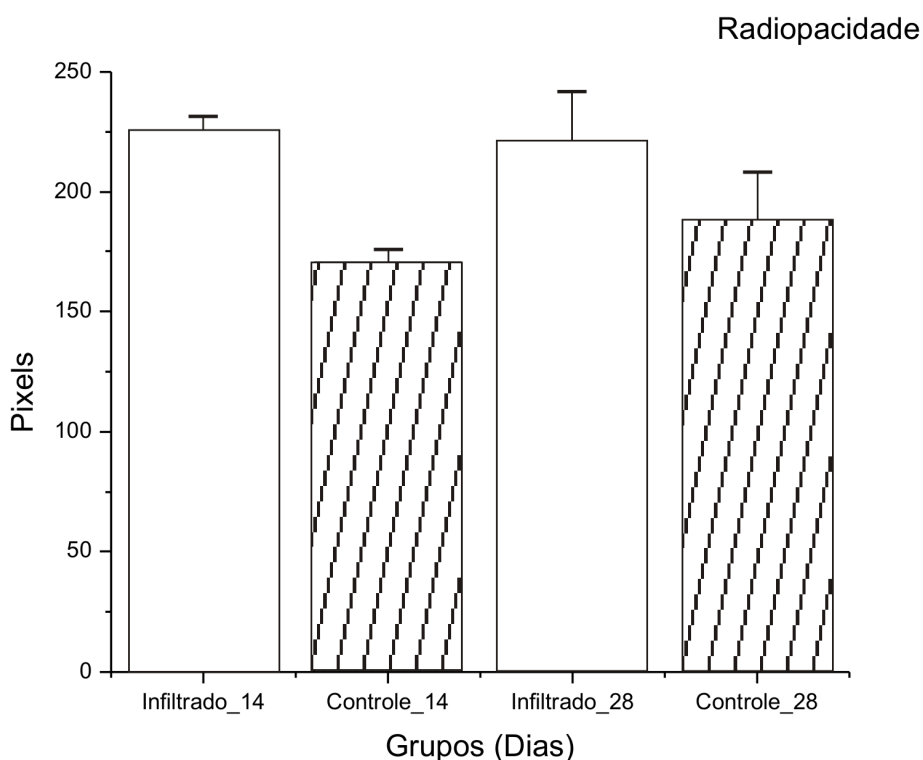
**Tabela 4.8** – Valores de radiopacidade em *pixels*, média, mínimo, máximo das imagens radiográficas das tíbias após período experimental. Comparação entre os grupos controle (alumina porosa) e o grupo infiltrado (alumina recoberta)

Grupos (n=5)	Radiopacidade ( <i>Pixels</i> )	Mínimo	Máximo
Infiltrado 14 dias	225,8±5,54	206,2±10,32	240,8±0,83
Controle 14 dias	170,4±5,41	131±13,43	218,6±18,03
Infiltrado 28 dias	220,2±21,68	192,4±19,67	244,4±18,29
Controle 28 dias	188,2±19,76	154,6±16,27	218,4±21,73

A média dos valores de radiopacidade na interface osso-implante, os valores mínimos e máximos foram maiores para o implante infiltrado, sendo que foram identificados valores médios de região radiopaca maiores para o período de 14 dias. No entanto, os valores máximos, para o implante infiltrado, foram maiores no período de 28 dias.

No período de 14 dias, a comparação entre os grupos infiltrados e controle, os valores da radiopacidade foram considerados com aumento significativo para o implante infiltrado, no período de 14 dias,  $p < 0,005$ . No período de 28 dias, a diferença entre os grupos infiltrados e controle, apresentou aumento para o grupo infiltrado considerado pouco significativo,  $p = 0,0505$ .

Os valores das médias e desvio padrão da radiopacidade dos implantes controle e infiltrado estão expressos no gráfico da Figura 4.24.



**Figura 4.24** – Valores de radiopacidade (*Pixels*), comparação entre os grupos controle (alumina porosa) e infiltrado (alumina infiltrada), nos períodos de 14 e 28 dias

O estudo radiográfico das tíbias com implantes evidenciaram interface contínua entre o implante e o osso, com maior radiopacidade (maior mineralização) após o período experimental de 28 dias para ambas as amostras.

#### **4.1.10 Espectroscopia de Energia Dispersiva – Energy Dispersive Spectroscopy – (EDS) e *Line Scan***

Esta análise foi realizada para confrontar com os resultados da histologia realizada neste trabalho, para a realização desta investigação não é necessário cortar a amostra nem corar, e também não se deve descalcificar o osso. Estes fatores preservam a amostra sem as possíveis variáveis provocadas pela microtomia e coloração.

As amostras foram investigadas em duas Fases, sendo que com a realização dos primeiros EDS *Line-scan* na Fase 1, foi possível ajustar e aperfeiçoar os parâmetros para a Fase 2, fase em que os períodos experimentais foram de 14 e 28 dias.

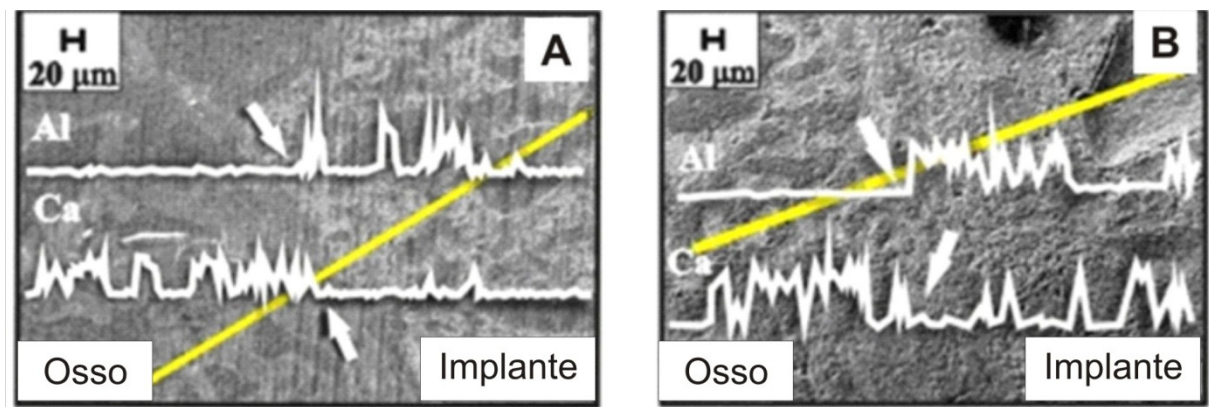
##### **EDS *Line –scan* – Fase 1**

Na Fase 1 esta análise foi realizada com a utilização do detector de elétrons secundário (SE). Com este detector as imagens obtidas foram como as que estão ilustradas na Figura 4.25.

Foi realizada sobre a imagem a sobreposição do espectro do elemento alumínio, presente na matriz porosa de alumina, e de cálcio presente no tecido ósseo. O tecido ósseo está presente na superfície do implante e investigou-se a presença de tecido nos poros também.

Nas imagens da Figura 4.25, vê-se em (A) e em (B) imagem de MEV e espectro da interface osso-implante infiltrado e controle, respectivamente.

Com esta análise pretende-se investigar a presença de tecido nos poros do biomaterial. Os espectros são obtidos após traçar a linha amarela com tamanho de 1 mm, na Figura 4.25.



**Figura 4.25** – Em (A) e (B) MEV e espectro dos elementos químicos, Cálcio (Ca) e Alumínio (Al), observados com *Line Scan* da interface osso-implante. Em (A) implante recoberto com bioativos e em (B) implante controle. As setas indicam a interface. Tamanho da linha: 1.0 mm

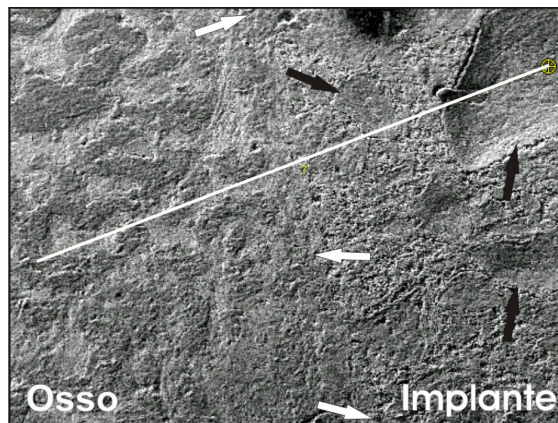
A caracterização dos implantes após os períodos experimentais foi realizada com Microscopia eletrônica de varredura seguida EDS e análise com *Line scan*, os seguintes elementos químicos foram encontrados: cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), magnésio (Mg), flúor (F), cloro (Cl), alumínio (Al) e oxigênio (O).

Não foi observado alumínio nos poros nem na área de tecido ósseo. A presença de cálcio foi observada nos poros e na área de tecido ósseo. Comparativamente, o cálcio nos poros do implante recoberto foi observado em uma profundidade de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ . Deve-se salientar que o mapeamento de EDS do implante recoberto com bioativos antes de ser implantado apresentou os elementos químicos contidos HAp e no biovidro com uma profundidade de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .



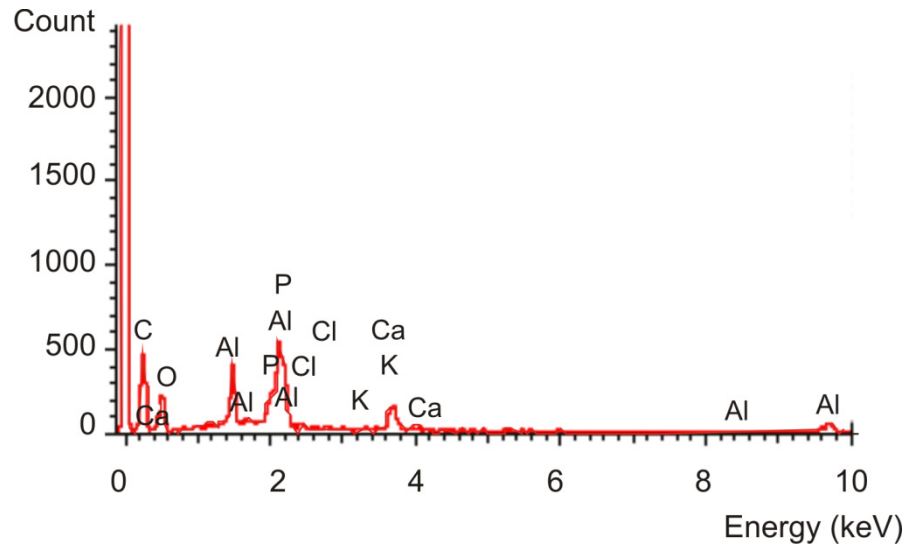
Esses resultados sugeriram vantagem para a alumina recoberta, relativamente a alumina sem bioativos, pois nos implantes controle houve a presença de cálcio na região óssea próxima ao implante e em proporção menor nos poros. Na interface, para os implantes controle a porcentagem encontrada foi de 13.12% para o alumínio e 9.04% para o cálcio e para os implantes recobertos a quantidade de alumínio foi de 22.43% e de cálcio 29.3%.

A técnica consiste em obter a imagem da interface osso-implante como nas Figuras 4.26 e 4.27, e segue-se com EDX como nas Figuras 4.26 e 4.27.



**Figura 4.26** – Microscopia eletrônica de varredura da interface do implante controle. A linha branca é tracejada a partir do implante. As setas brancas indicam a interface. As setas pretas indicam os poros no biomaterial

A partir da imagem selecionada é realizado EDS da região e obtêm-se o espectro dos elementos químicos presentes, como na Figura 4.27. O ouro (Au) é o revestimento para a análise e não faz parte dos componentes do implante.



**Figura 4.27** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface osso-implante controle. O ouro (Au) é o recobrimento para a análise e não faz parte dos elementos do implante

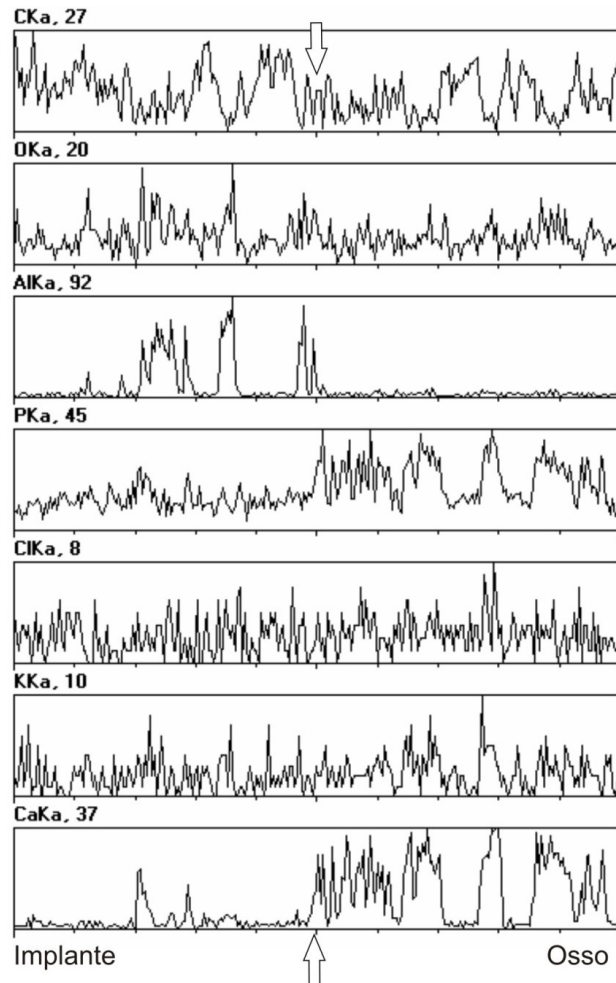
A partir do EDS obtêm-se a proporção dos elementos dos implantes controle e infiltrado como apresentado na Tabela 4.9, porcentagem expressa em massa dos elementos químicos. Os valores de Fósforo (P) apresentaram-se não significativos, pois ocorreu interferência do recobrimento de ouro. Um recobrimento mais adequado seria Paládio ou Carbono em vez de ouro, pois o Fósforo (P) sobe juntamente com o ouro (Au), ou seja, o pico de fósforo trabalha em função da raia de absorção do ouro. A saber, Raia m do Au = 2,121 e a Raia  $\kappa\alpha$  do P = 2,013.

**Tabela 4.9** – Elementos químicos presentes na interface osso-implante controle e infiltrado na Fase 1, períodos experimentais 14 e 21 dias

Proporção em massa dos elementos (%)		
EDS Elemento químico (%) Interface	Controle 14 dias	Infiltrado 21 dias
Ca	9.04	34.45
Al	13.12	15.13
O	42.69	48.97
Outros (K, Cl, Mg, Na)	0.80*	1.44*
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

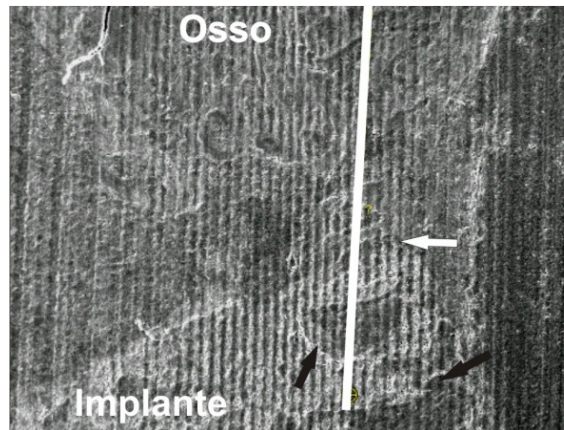
\* = <2 Sigma: valores não significativos. Potássio (K), Cloro (Cl), Magnésio (Mg), Sódio (Na)

Devem ser observados na Figura 4.28, principalmente os elementos cálcio (Ca) e alumínio (Al). Nos espectros, a interface entre o implante e o osso é indicada pelas setas superiores e inferiores, picos do elemento cálcio são observados quando não há picos de alumínio. Os outros elementos químicos não se apresentam com picos e vales pronunciados.



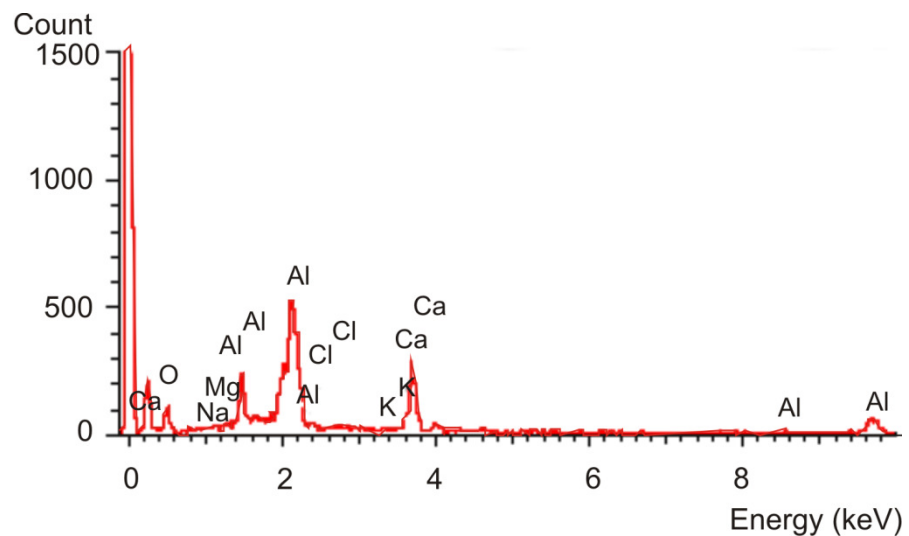
**Figura 4.28** – *Line scan* da interface do implante controle. Espectro dos elementos químicos encontrados: Carbono (C), Oxigênio (O), Alumínio (Al), Fósforo (P), Cloro (Cl), Potássio (K), Cálcio (Ca), respectivamente. Tamanho da linha aproximadamente: 1,00 mm. As setas brancas indicam a interface osso-implante

As Figuras 4.29, 4.30, 4.31 são referentes ao *Line scan* da interface do implante recoberto com bioativos.



**Figura 4.29** – Microscopia eletrônica de varredura da interface do implante recoberto com materiais bioativos. A linha branca é tracejada a partir do implante. As setas brancas indicam a interface. As setas pretas indicam os poros no biomaterial

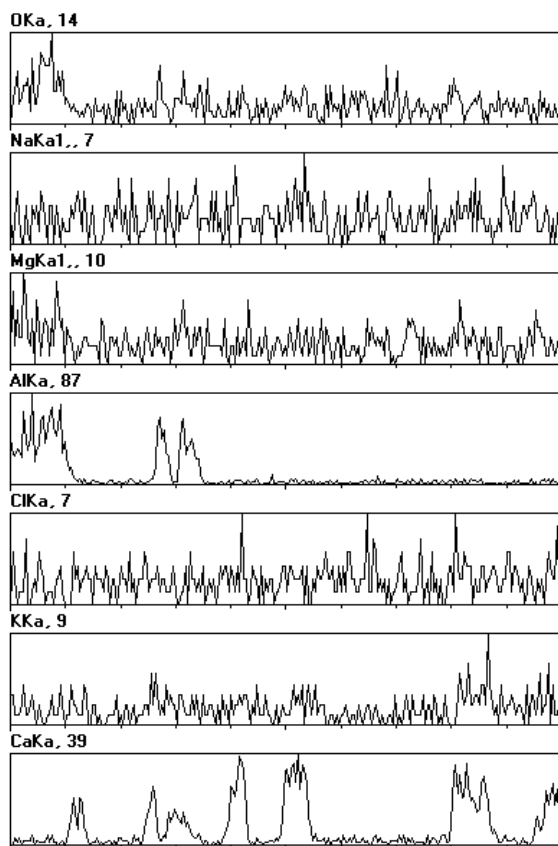
A partir da imagem selecionada é realizado EDS da região e obtêm-se o espectro dos elementos químicos presentes na interface osso-implante infiltrado, como na Figura 4.30. O ouro (Au) é o revestimento para a análise e não faz parte dos componentes do implante.



**Figura 4.30** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface do implante infiltrado. O ouro (Au) é o revestimento para a análise e não faz parte dos elementos do implante

Observa-se na Figura 4.31, principalmente o elemento cálcio (Ca) com o espectro evidenciando a interface entre o implante e o osso. Outro elemento que apresenta interface

pronunciada é o alumínio (Al) do implante. Os outros elementos não se apresentam da mesma forma.



**Figura 4.31** – Espectro dos elementos químicos presentes na interface osso-implante infiltrado. Espectro obtido com a técnica EDS *Line-scan*. Tamanho da linha aproximadamente: 1,00 mm

Nos resultados da Fase 1 compararam-se os implantes infiltrado e controle nos períodos experimentais de 14 e 21 dias. Foi observado cálcio nos implantes recobertos em profundidade de 500  $\mu\text{m}$  e a quantidade de cálcio na interface também foi maior no implante infiltrado quando comparado com o implante controle. Esses resultados sugeriram vantagem dos implantes recobertos relativamente aos controles, pois nos poros do controle encontrou-se muito menor quantidade de cálcio.

## EDS *Line-scan* Fase 2

Na Fase 2, os implantes infiltrado e controle foram comparados entre os períodos de 14 e 28 dias. Com o recobrimento de carbono foi observado que os espectros dos elementos cálcio e fósforo são parecidos. Com a utilização do detector de elétrons retro-espalhados, as imagens ficaram mais nítidas e foi possível a detecção das regiões entre tecido ósseo e implante.

Os elementos químicos encontrados nas amostras estão descritos com a porcentagem em massa dos elementos na Tabela 4.10. Nas Figuras 4.32, 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36 é observado como esses elementos estão distribuídos nas amostras com implante controle, o Cálcio e o Fósforo, por exemplo, aparecem na superfície de contato com o implante e nos poros, o Alumínio aparece na região da peça implantada, pois é elemento da alumina.

**Tabela 4.10** – Percentual em massa dos elementos químicos encontrados nos implantes controle e infiltrado após os períodos experimentais

EDS Elemento químico (%)	Controle		Infiltrado	
	14 dias	28 dias	14 dias	28 dias
Ca	14.52	12.94	14.79	18.65
P	8.05	7	7.95	9.98
Si	-0.08*	0.04*	0.98	-0.12*
Al	18.92	28.87	21.90	16.51
O	58.58	51.15	54.38	54.98
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

(\*) Sigma < 2 : não significativo.  
Ca (Cálcio), P (Fósforo), Si (Silício), Al (Alumínio), O (Oxigênio)

Nos valores da Tabela 4.10, o percentual de alumínio mensurado é maior para o implante controle no período de 28 dias, no entanto o percentual de cálcio e de fósforo,

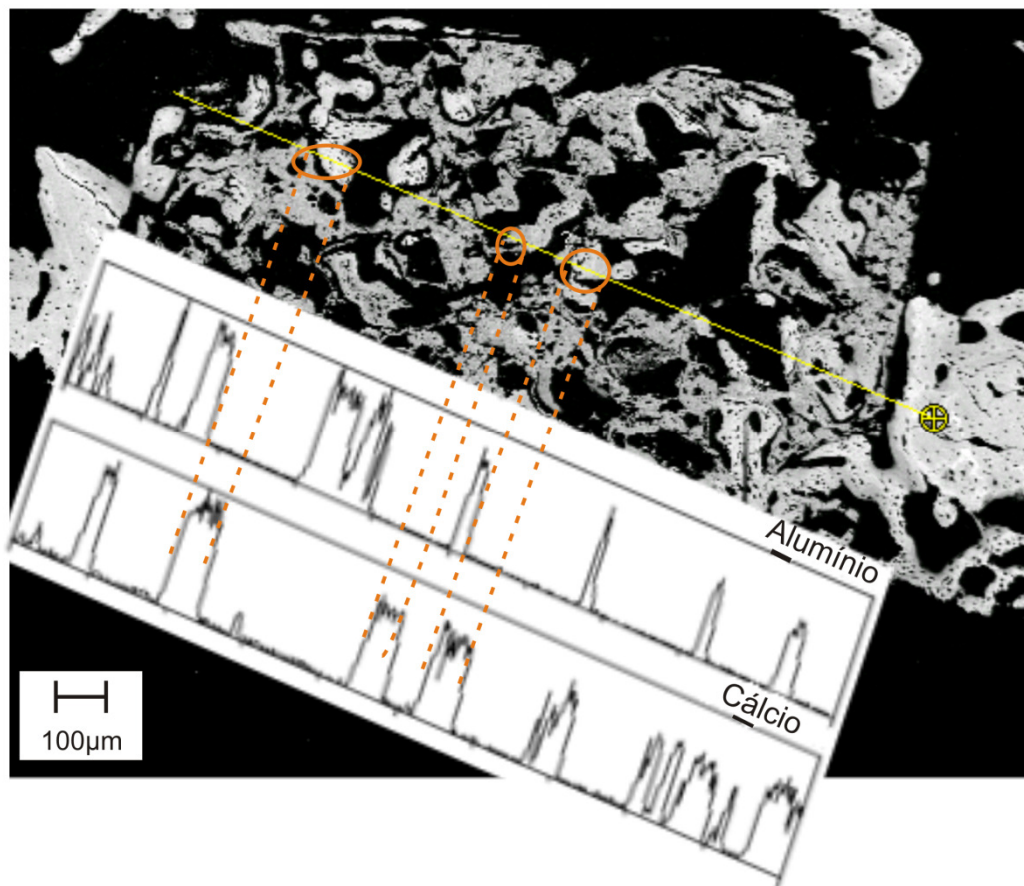
elementos da hidroxiapatita, é maior para o implante infiltrado com 28 dias. A região mensurada apresentou maior proporção de implante para o grupo controle.

Na Fase dois foram traçadas três a quatro linhas sobre a interface osso-implante e sobre a região porosa do implante. Foi observada a presença do elemento fósforo (P), de cálcio (Ca) e de Alumínio (Al). Como o fósforo e o cálcio são elementos que se apresentam com espectro parecido, pois ambos fazem parte da estrutura da hidroxiapatita sintética ou natural, foi apresentado o espectro de fósforo apenas nas primeiras imagens do EDS-MEV-*Line-scan*.

O espectro dos elementos químicos encontrados na amostra foi sobreposto à imagem para correlacionar com a região do implante em que se encontram.

Na Figura 4.32, pode-se observar o traçado da linha na interface e sobre o implante do implante controle no período de 14 dias.

Controle\_14 dias



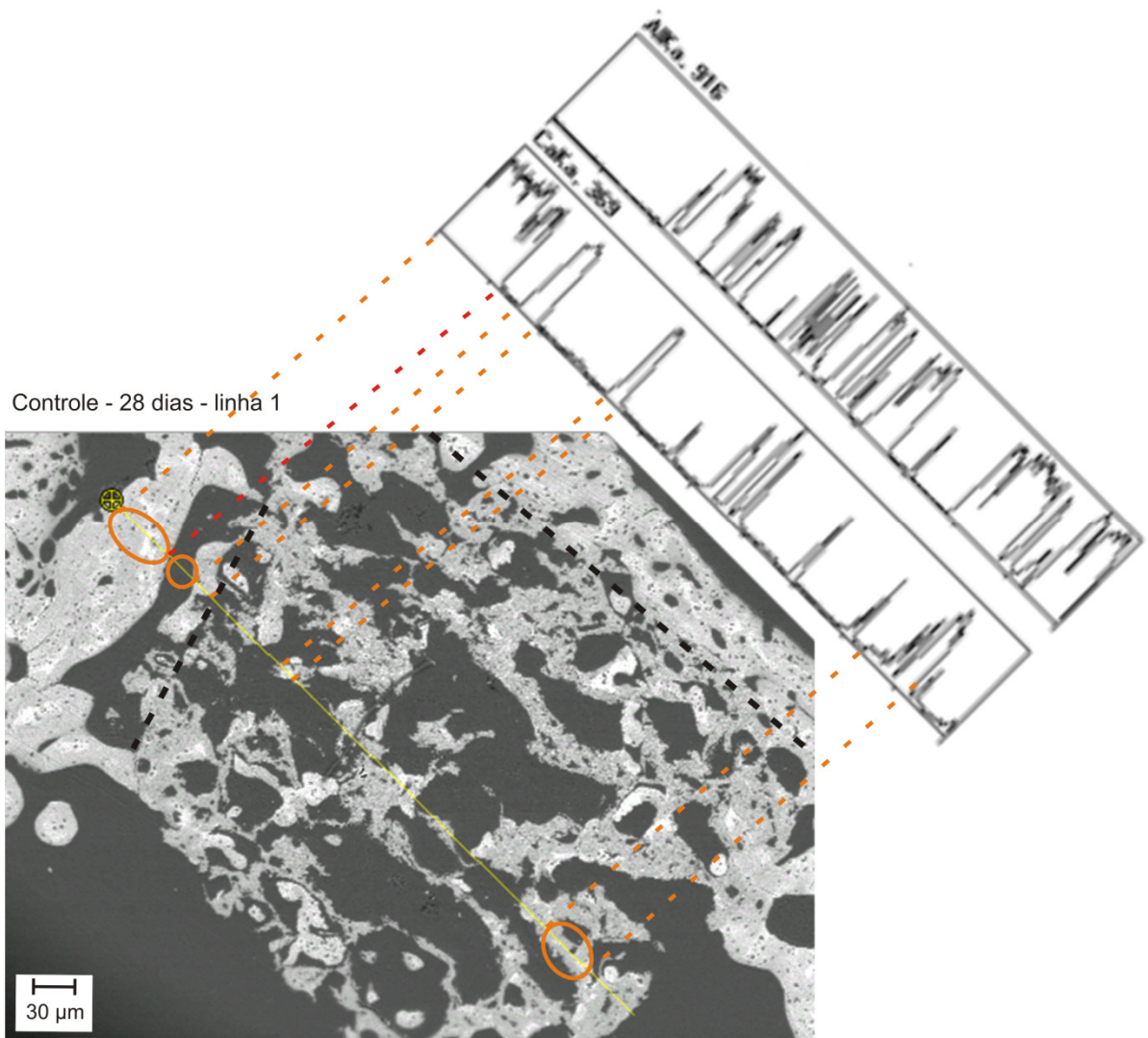
**Figura 4.32** - Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 14 dias. A linha amarela foi traçada desde a interface osso-implante e atravessa o implante

Outras linhas foram traçadas foi possível observar que com 14 dias de implantação no implante controle os elementos cálcio e fósforo nos poros e na interface. Nas imagens, o tecido formado nos poros não está em contato com a superfície nem com a parede dos poros em todos os pontos.

Nas Figuras 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36, são ilustradas as imagens de MEV – EDS – *Line-scan* do implante controle no período de 28 dias. Foram traçadas quatro linha sobre a região de implante.

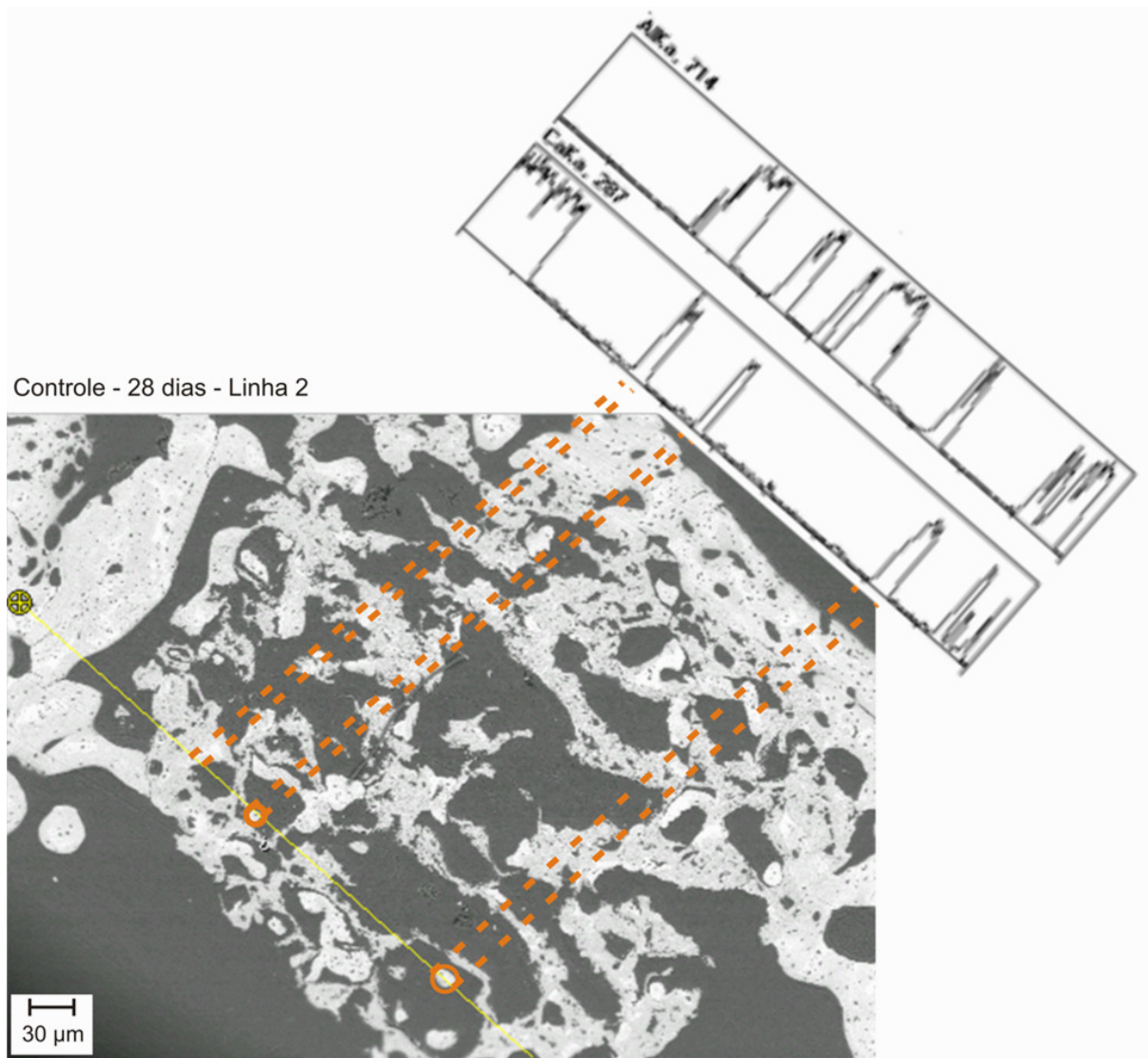
Na Figura 4.33 a linha foi traçada da interface osso-implante e sobre a região central o biomaterial. Observe que cálcio nos poros da região central.





**Figura 4.33** – Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 1 traçada na região de implante. Traçada na região do implante, tamanho da Linha 2.0 mm

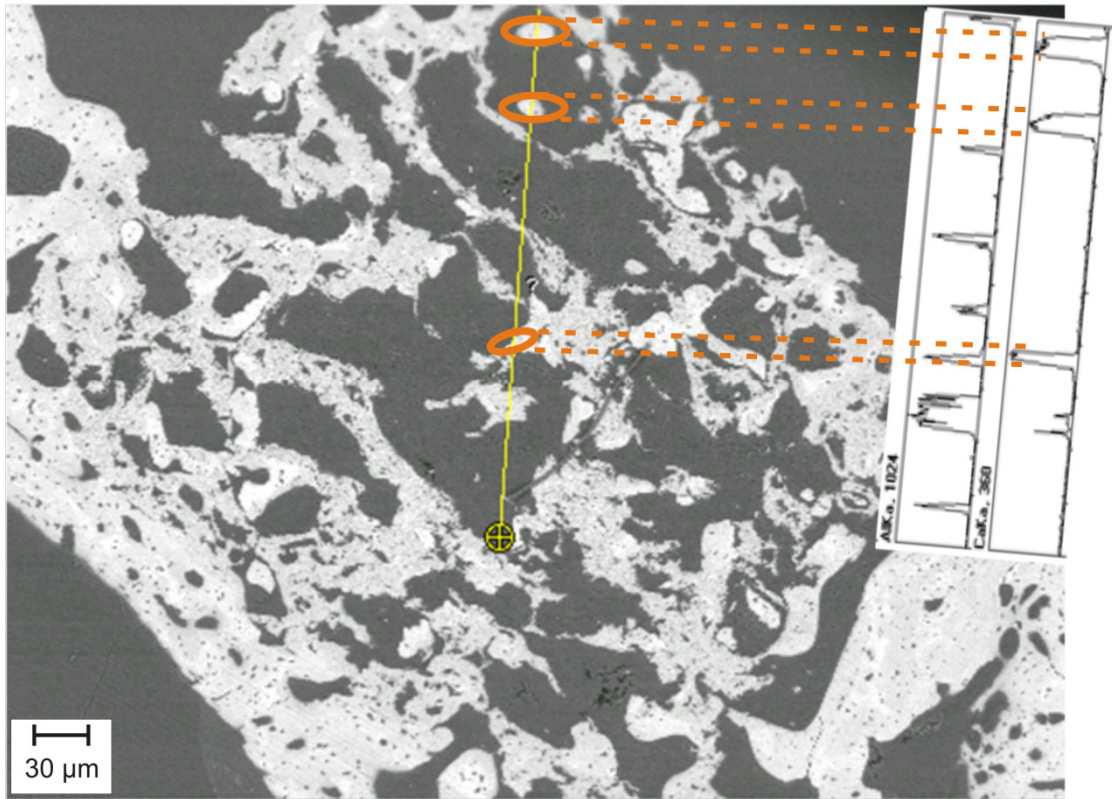
Na Figura 4.34 a linha foi traçada da interface osso-implante e passa sobre a região porosa do biomaterial mais próxima a região medular do osso. Observa-se que há cálcio nos poros mais internos dos poros no período de 28 dias, porém o contato com a parede do poro do implante é pouco observado.



**Figura 4.34** – Microscopia eletrônica de varredura do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 2 traçada na região de implante. Linha (2) traçada na região do implante, tamanho da Linha 1,7 mm

Outra linha foi traçada na diagonal do implante, do centro para a região mais interna, observa-se também a presença de cálcio com pouco contato ósseo (Figura 4.35).

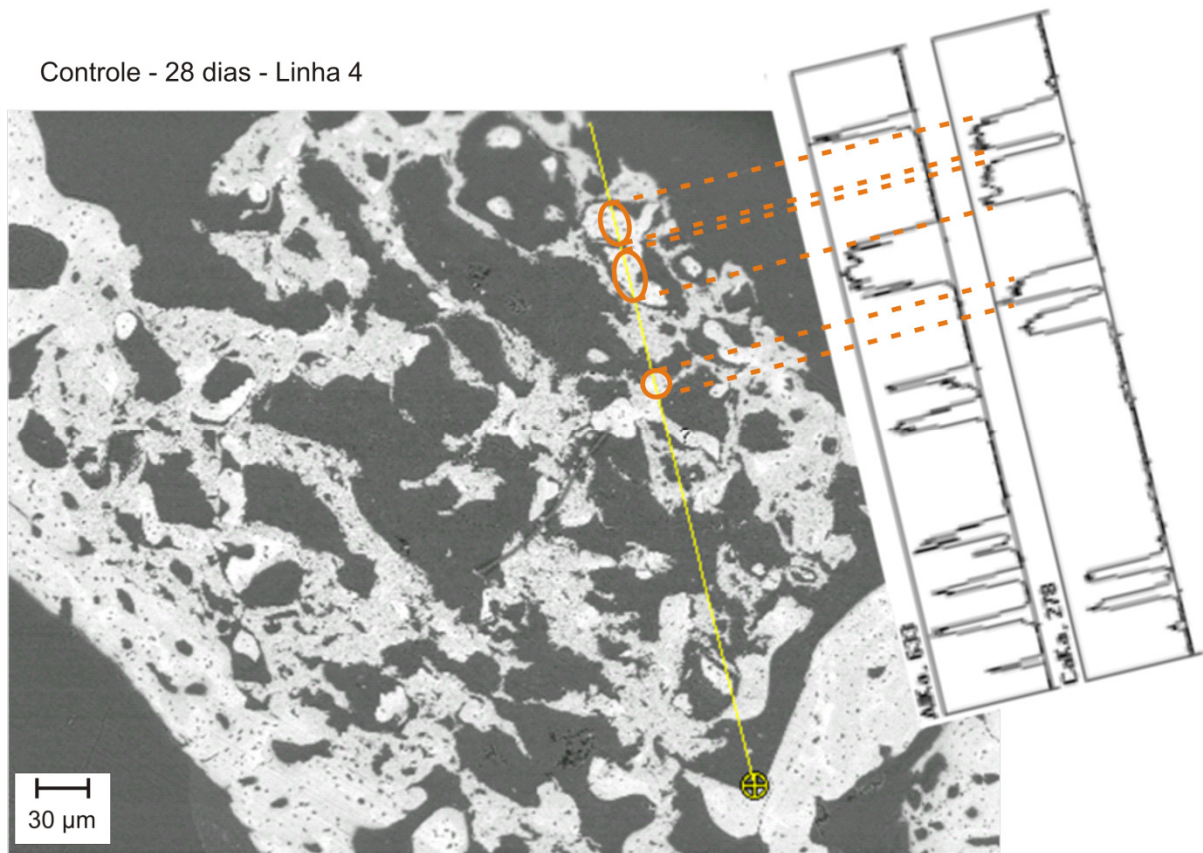
Controle - 28 dias - Linha 3



**Figura 4.35** – Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha 3 traçada na região de implante. Tamanho da Linha 1,1 mm

Outra linha foi traçada no implante controle com 28 dias de implantação. Nesta análise medida na diagonal do implante até a região mais interna ao osso, em quase toda a

extensão há cálcio e fósforo, no entanto observa-se pouco contato com a parede dos poros.



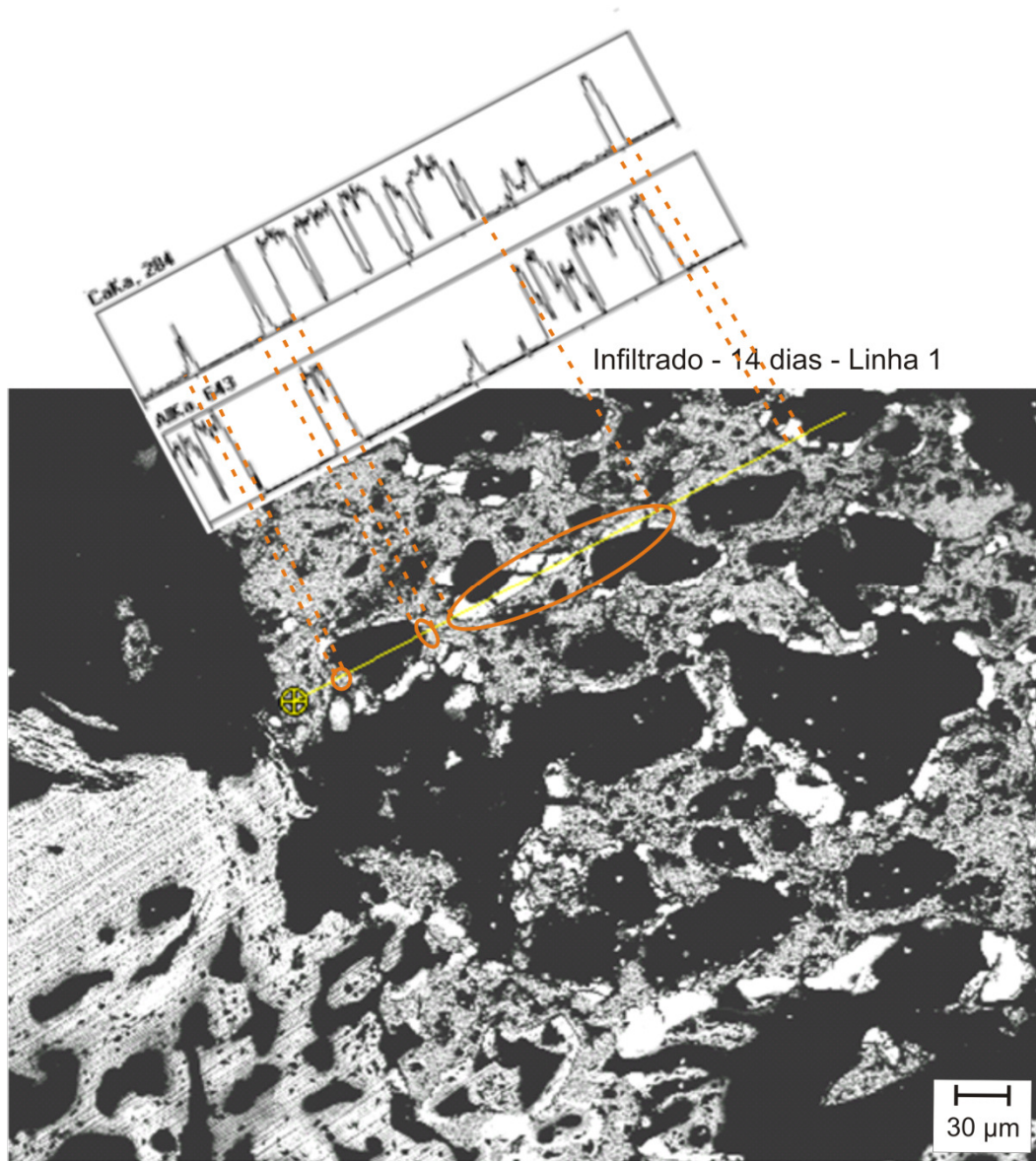
**Figura 4.36** - Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante controle após período experimental de 28 dias. Linha traçada desde em diagonal. Tamanho da Linha 1,5mm

Nas Figuras 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36 são observados o MEV-EDS-*Line-scan* de implante controle no período de 28 dias, as linhas foram traçadas sobre o implante.

Ao analisar o EDS-*Line-scan* dessas figuras ficou evidente o que se observou na histologia dos implantes controle, o tecido ósseo mineralizado, é formado na superfície e nos poros dos implantes controle, porém entre esse tecido e a parede do poro ou a superfície do implante existe um tecido ainda não mineralizado, tipo tecido de granulação.

Na sequencia foram traçadas linhas na superfície dos implantes infiltrados. As Figuras 4.37 à 4.39 são referentes ao MEV – EDS – *Line scan* dos implantes **infiltrados**. Na Figura 4. 37 observam-se a presença dos elementos cálcio e fósforo na superfície e nos poros do implante com período experimental de 14 dias.

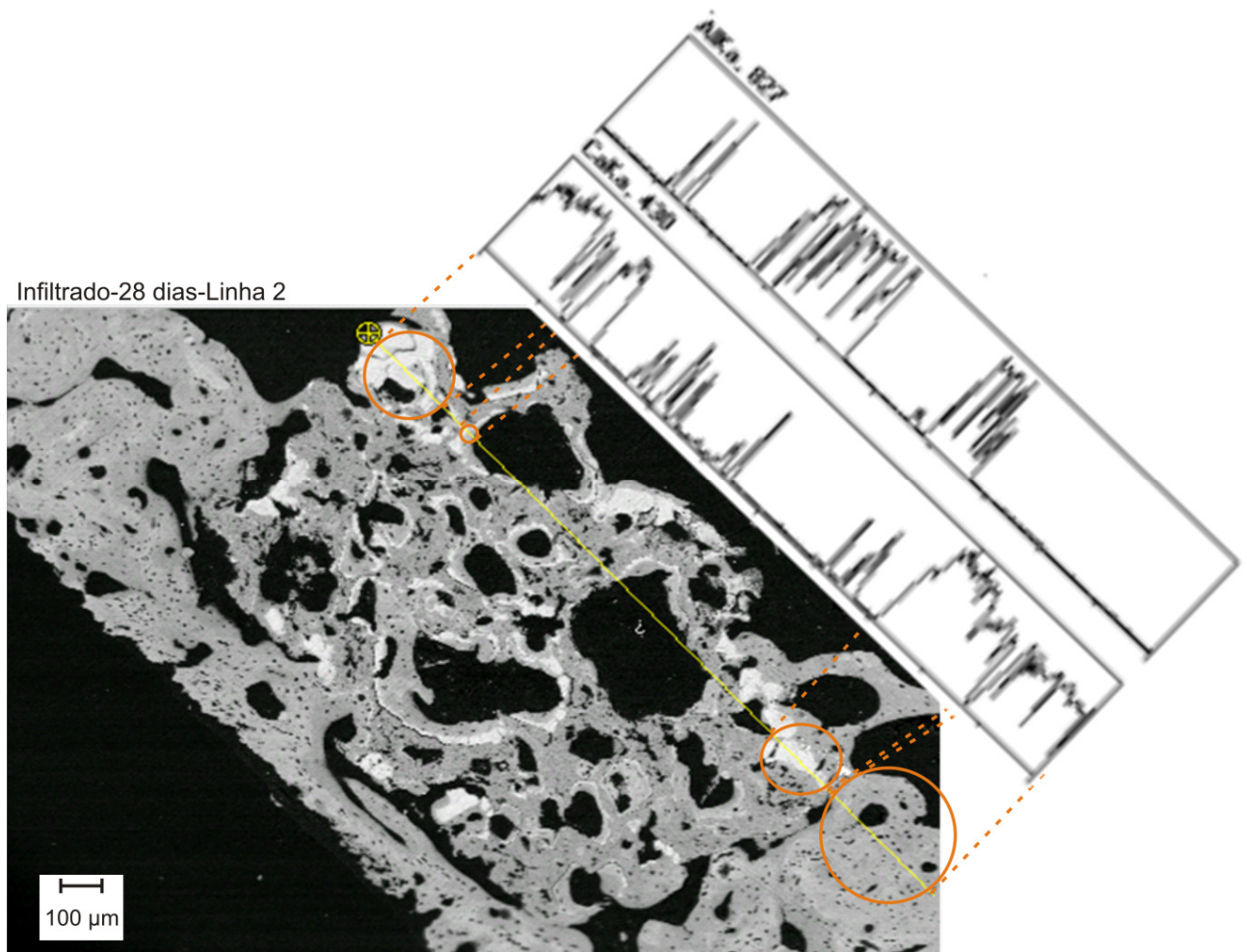
Na imagem da Figura 4.37 pode-se verificar a presença de cálcio e fósforo em contato com a parede dos poros, na sobreposição dos espectros com a imagem, observa-se que os pontos mais brancos, contêm os elementos cálcio e fósforo.



**Figura 4.37** - Microscopia eletrônica de varredura e EDS-Line-scan do implante Infiltrado após período experimental de 14 dias. Linha 1 traçada na região porosa do implante

Na imagem da Figura 4.38 verifica-se, com a sobreposição dos espectros, que há cálcio e fósforo nos poros e na interface osso-implante. Contudo fica evidente que no

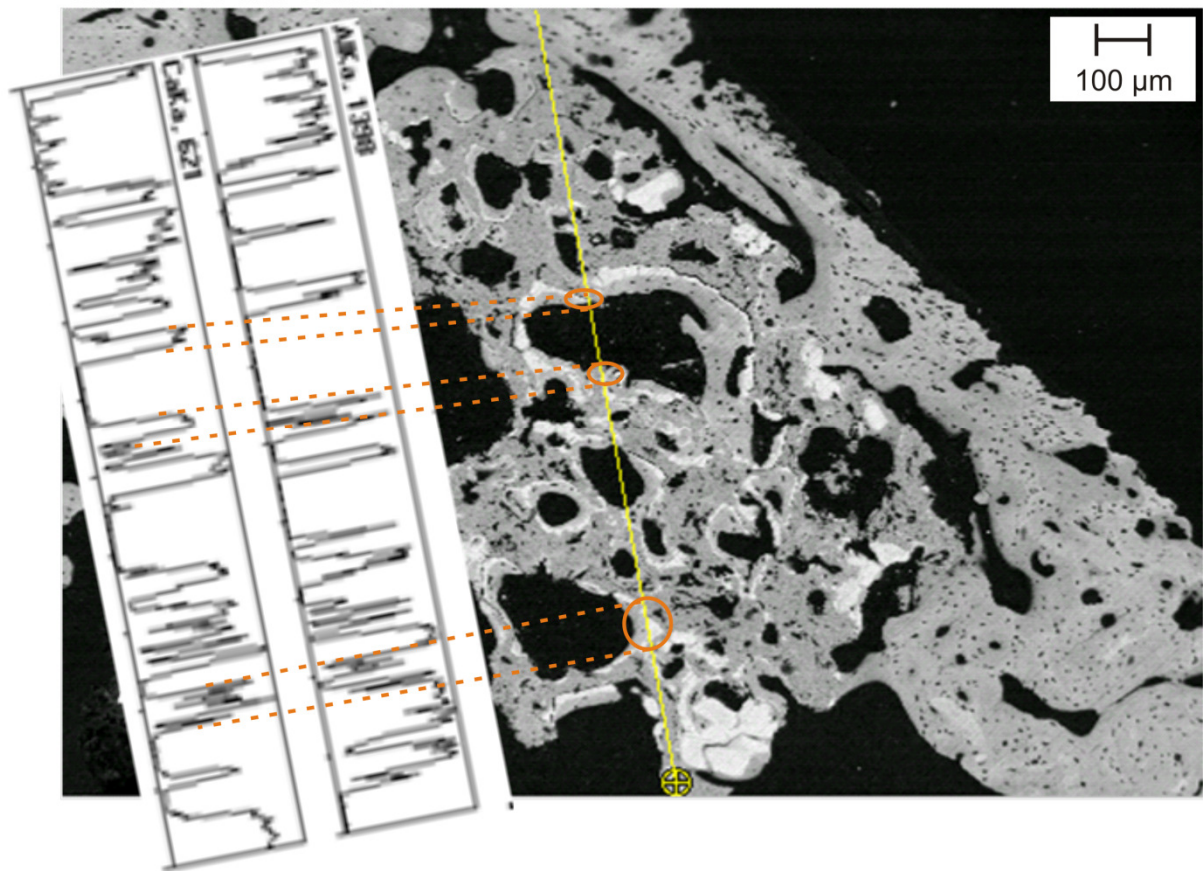
período de 28 dias (Figura 3.8) ao analisar a distribuição do que parece ser tecido ósseo recém formado está em contato direto com o poro e com a superfície do implante. Nota-se que o tecido contorna a parede dos poros. A linha foi traçada na região mais interna do implante próximo à região medular do osso.



**Figura 4.38** – Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante Infiltrado após período experimental de 28 dias. Linha 2 traçada na região porosa do implante, próxima à região medular do osso. É observado o elemento cálcio nos poros e na superfície de contato osso-implante. Cálcio (Ca) e alumínio (Al)

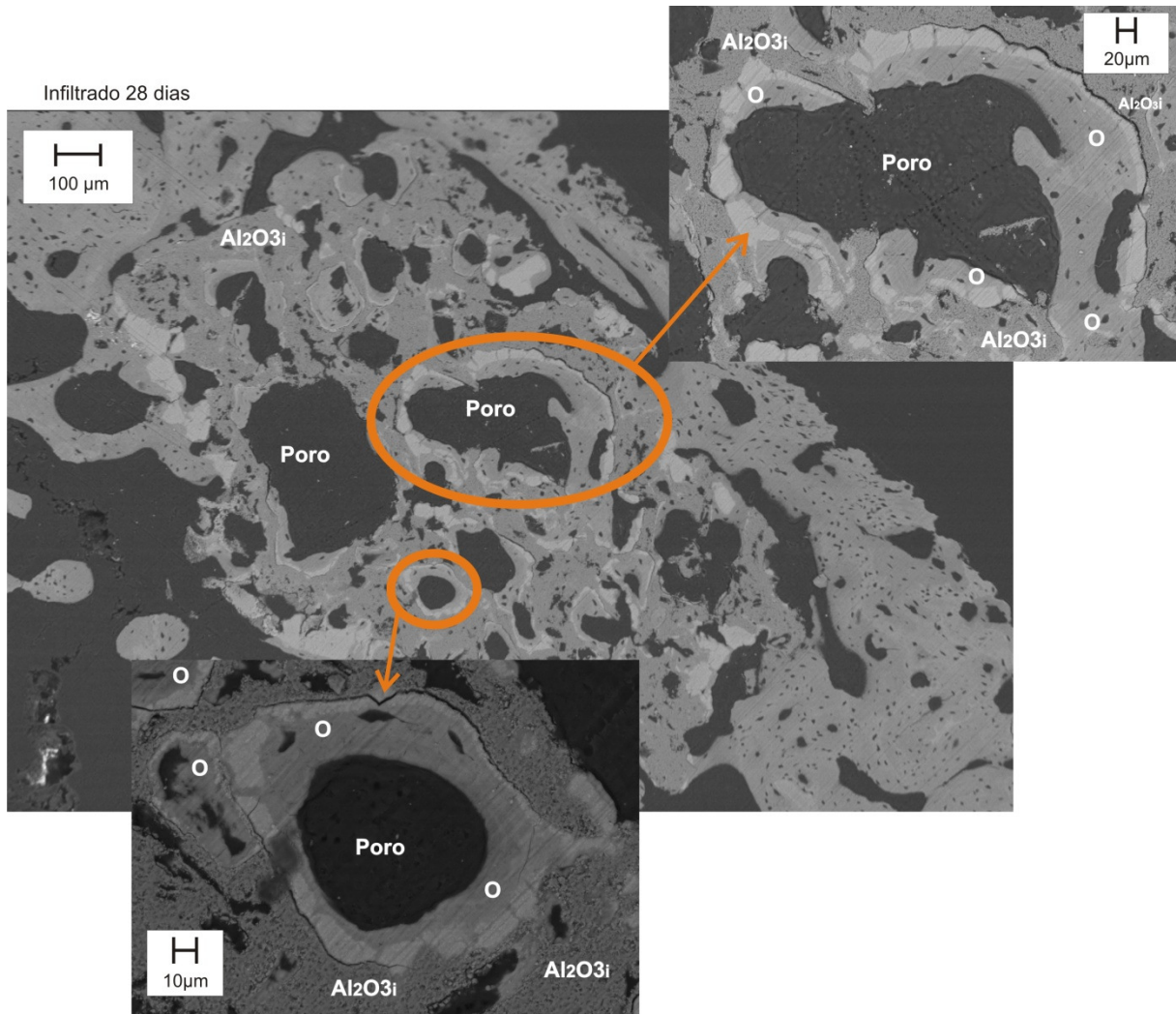
Na imagem da Figura 4.39, a linha 3 foi traçada sobre o implante infiltrado no período de 28 dias. A linha foi traçada em sentido diagonal ao implante dos poros próximo à região medular para a superfície de implantação do biomaterial, a qual se encontra recoberta por tecido calcificado, com características morfológicas de tecido ósseo cortical.

Infiltrado-28 dias-Linha 3



**Figura 4.39** – Microscopia eletrônica de varredura e EDS-*Line-scan* do implante Infiltrado após período experimental de 28 dias. Linha 3 traçada na diagonal do implante. Há cálcio desde os poros mais próximos da região medular até os da superfície de implantação. Cálcio (Ca) e alumínio (Al)

Na Figura 4.40 com maior aumento da região porosa da imagem na Figura 4.39, pode-se confirmar o que parece ser tecido ósseo recém-formado nos poros do implante infiltrado com 28 dias de implantação



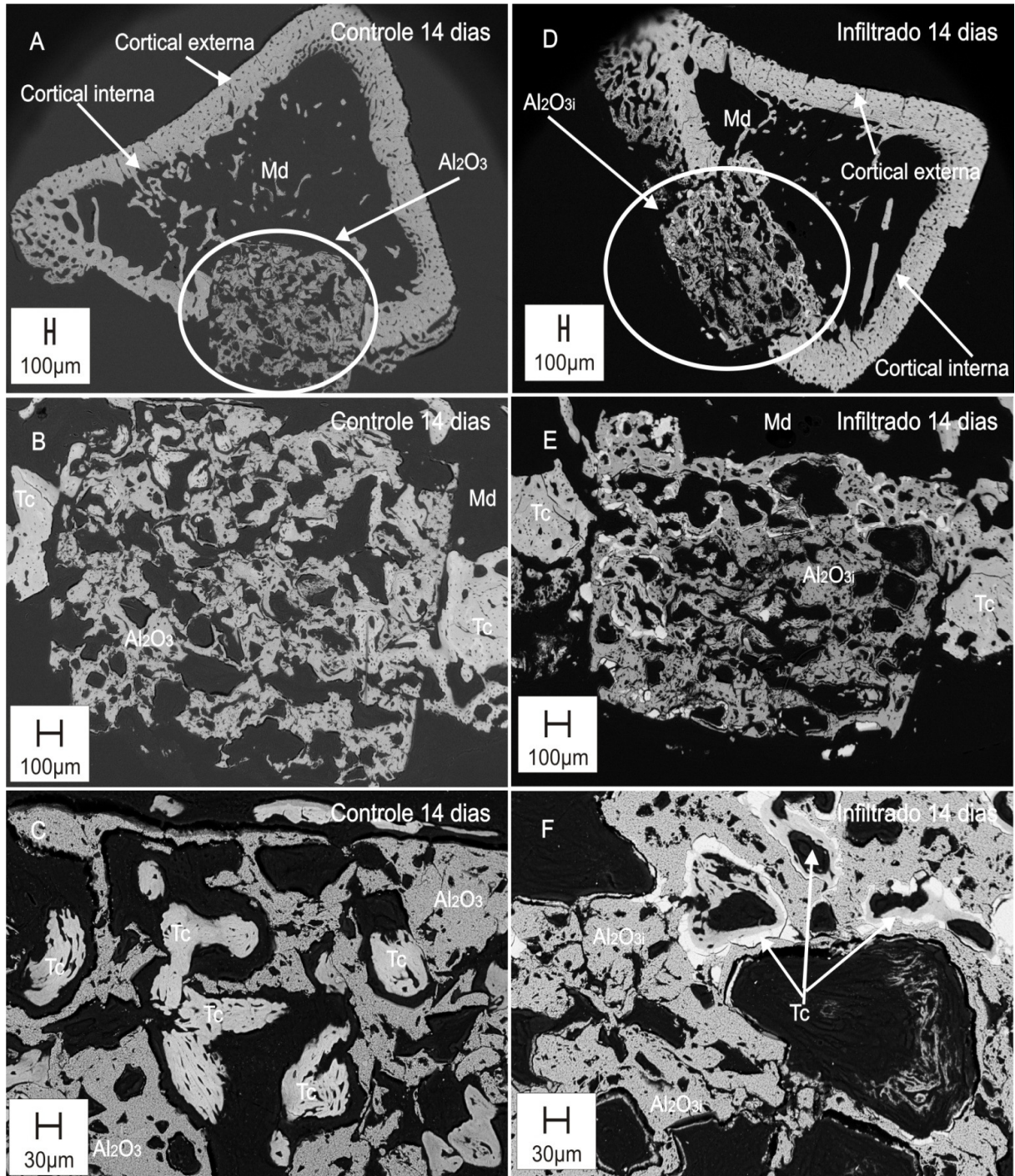
**Figura 4.40** – Microscopia eletrônica de varredura de implante infiltrado após período experimental de 28 dias. Observa-se o que parece ser tecido ósseo em contato direto com a parede dos poros. A região de implante está indicada por  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$  (alumina infiltrada), o tecido ósseo está indicada por (O)

Nas imagens das Figuras 4.41 e 4.42 são ilustrados os implantes controle em A, B e C e implante infiltrado em D, E e F.

Na Figura 4.41 observa-se região de implantação no período experimental de 14 dias, na Figura 4.42 período experimental de 28 dias. Em A e D imagens da secção da tíbia em menor aumento para ilustrar o posicionamento dos implantes. Em B e E imagem mais aproximada. Em C e F em maior aumento sobre a região de implante.

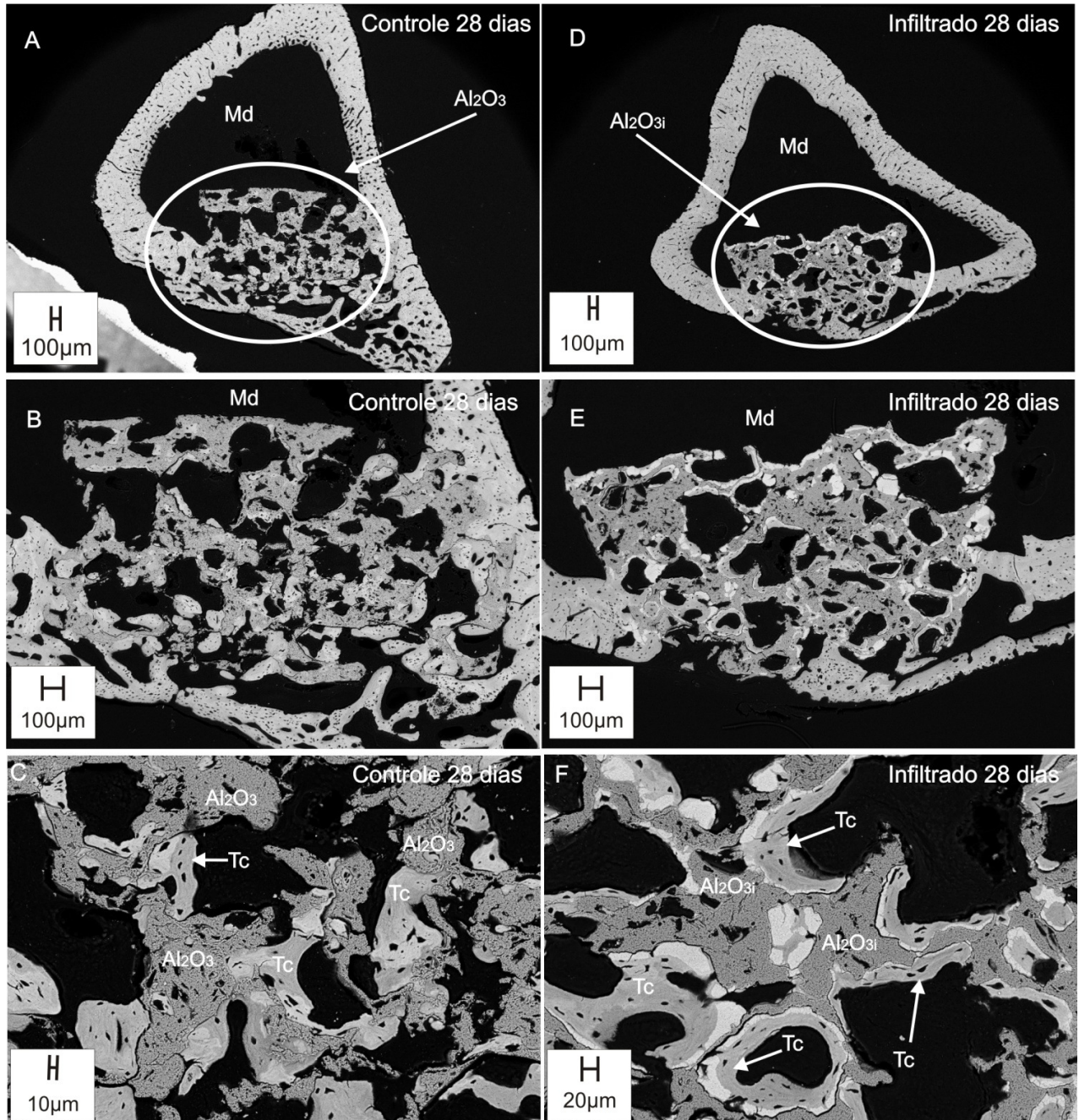


Na Figura 4.41, em A, B, D e E observa-se que os implantes não foram recobertos por tecido ósseo no período experimental de 14 dias.



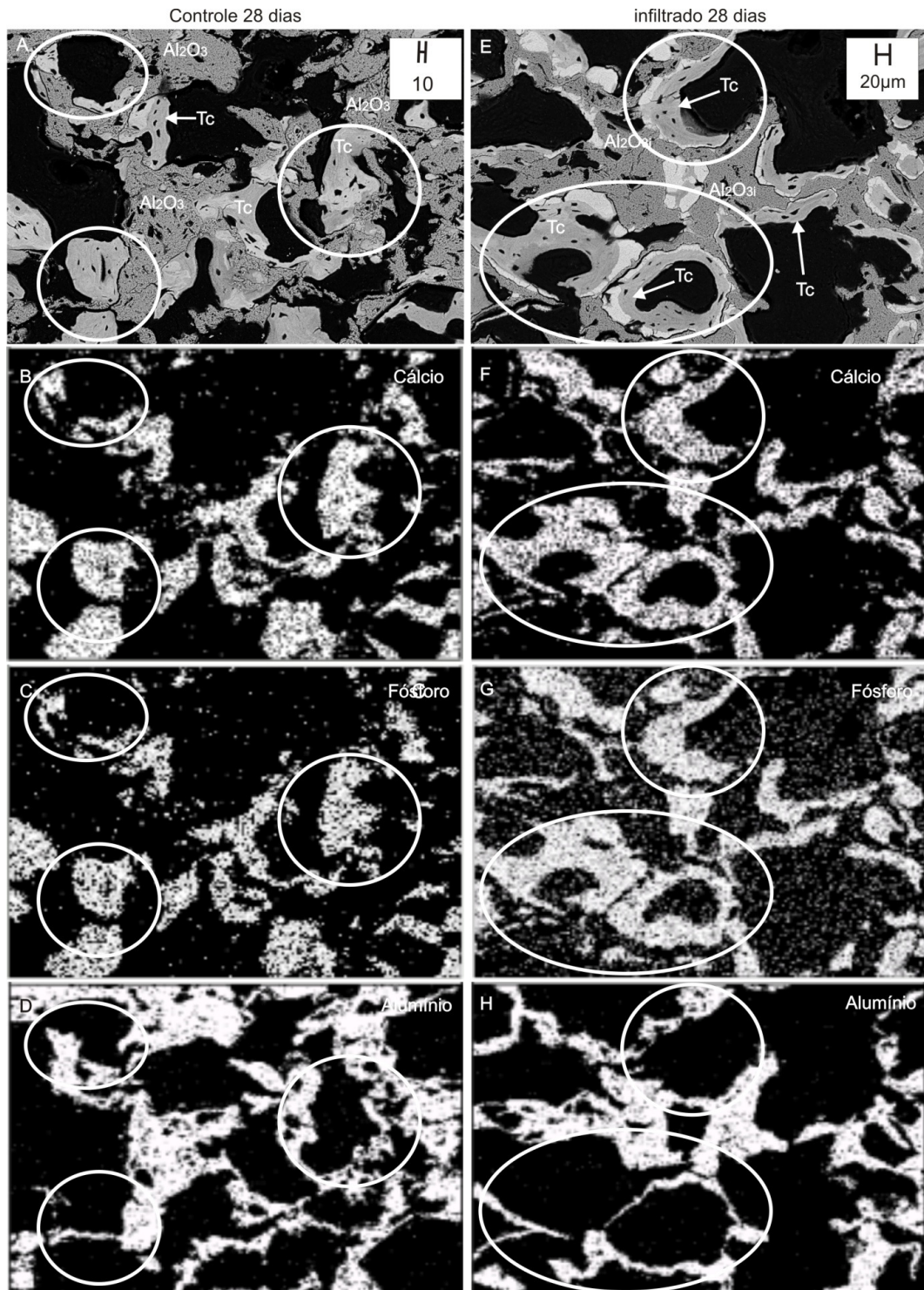
**Figura 4.41** – Microscopia eletrônica de varredura de tíbias com implantes controle em A, B e C e infiltrado em D, E e F, após período experimental de 14 dias. Em A e D imagens da secção da tíbia em menor aumento para ilustrar o posicionamento dos implantes. Em B e E imagem mais aproximada, observa-se que os implantes ainda não foram recobertos por tecido ósseo. Em C e F em maior aumento sobre a região de implante. Sendo região de medula óssea (Md), Região tecidual (Tc), região de implante controle ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e de implante infiltrado ( $\text{Al}_2\text{O}_{3i}$ )

Na imagem da Figura 4.42, em B e E imagem mais aproximada, observa-se que os implantes foram recobertos por tecido ósseo ainda em processo de organização tecidual.



**Figura 4.42** – Microscopia eletrônica de varredura de tíbias com implantes controle em A, B e C e infiltrado em D, E e F, após período experimental de 28 dias. Em A e D imagens da secção da tíbia em menor aumento para ilustrar o posicionamento dos implantes. Em B e E imagem mais aproximada, observa-se que os implantes foram recobertos por tecido ósseo ainda em processo de organização tecidual. Em C e F em maior aumento sobre a região de implante. Observa-se que a formação óssea nos poros do implante infiltrado (em F) ocorre de forma mais concêntrica, quando comparada com o implante controle (em C). Sendo região de medula óssea (Md), Região tecidual (Tc), região de implante controle ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e de implante infiltrado ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{i}$ )

Na Figura 4.43 observa-se o EDS das imagens C e F da Figura 4.42, ou seja, do implante controle e infiltrado após 28 dias de implantação. A distribuição dos elementos químicos cálcio (Ca), fósforo (P) e alumínio (Al) na amostra foi detectada com EDS.



**Figura 4.43** – Microscopia eletrônica de varredura (A e E) seguida de EDS (B, C, D, F, G, e H) dos implantes controle (A, B, C, D) e infiltrado (E, F, G e H) após 28 dias de implantação. A distribuição dos elementos químicos cálcio (Ca), fósforo (P) e alumínio (Al) na amostra foi detectada com EDS. Observa-se que a formação óssea nos poros do implante infiltrado ocorre de forma mais concêntrica, quando comparada com o implante controle

A distribuição dos elementos químicos cálcio e fósforo na amostra é indicativo de que há hidroxiapatita nos poros dos implantes controle e infiltrado.

No entanto para o implante infiltrado os elementos cálcio e fósforo distribuem-se de forma concêntrica e em contato com os poros do implante.

No implante Infiltrado o tecido ósseo mineralizado é formado em contato direto com a parede do poro ou com a superfície do implante. Esses resultados corroboram com os resultados histológicos, biomecânicos e radiológicos de que os implantes infiltrados apresentam osseointegração mais acelerada do que os implantes controle.

Os resultados do EDS-*line scan* indicaram que nos implantes controle, o tecido ósseo mineralizado está presente na interface e nos poros do implante e também há a presença de tecido de granulação (observado na histologia) entre o tecido mineralizado e o biomaterial. Esses achados também corroboram com os resultados histológicos, biomecânicos e radiológicos.

Deve-se considerar que a espessura dos cortes histológicos foram entre 39 e 4  $\mu\text{m}$  e durante a histologia havia a dúvida se cortes histológicos menores que 10  $\mu\text{m}$  iriam interferir na análise de contato ósseo. Conjecturou-se à respeito da possível perda de material durante o desgaste das lâminas. Com o EDS *Line-scan* confirmou-se, para este estudo, que a espessura de corte provavelmente não interferiu nas análises qualitativas e quantitativa, pois as amostras não foram desgastadas para a realização do EDS e foram analisadas incluídas em resina, em blocos, sem realização de cortes.

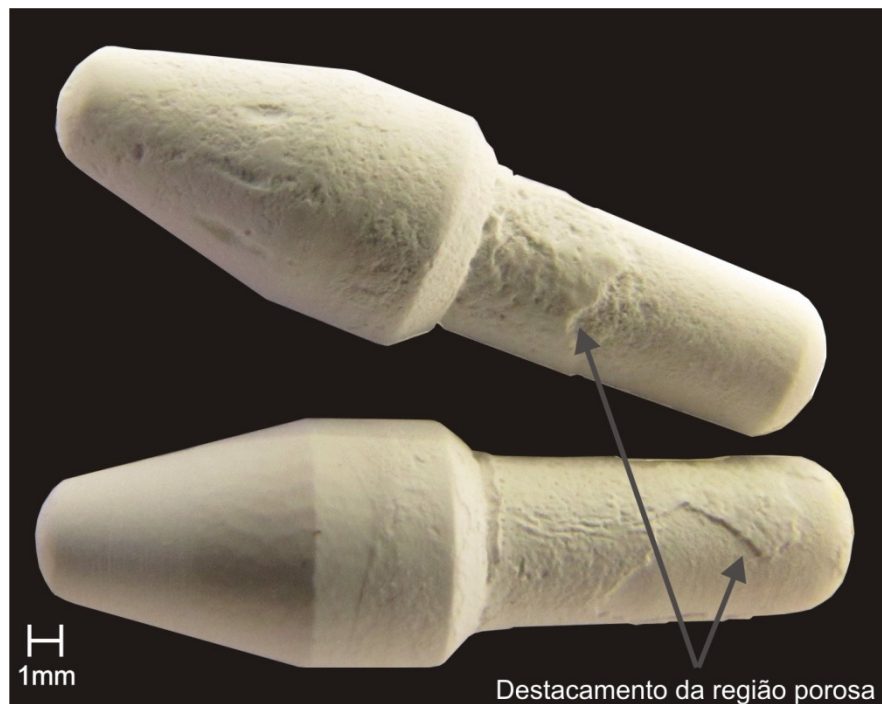
#### **4.2 Manufatura das Peças com Núcleo Denso e Superfície Gradualmente Porosa**

As tentativas para obtenção de pino em gradiente funcional de porosidade foram desenvolvidas com as técnicas *Dipping* (A) e Co-prensagem (B). Durante o desenvolvimento

do trabalho foram realizados ajustes na manufatura com projeto do molde para a obtenção do pino dentário.

#### 4.2.1 Técnica (A)

Esta técnica consistiu em imersão (*Dipping*) do pino (prensado isostaticamente a 100 MPa após usinagem á verde) em barbotina porosa, seco e encapsulado à vácuo em membrana polimérica, seguido de nova prensagem isostática (100 MPa) e sinterização, com permanência de 1 hora a 1550 C°. Observou-se destacamento (delaminação) da superfície porosa em relação a densa. Na Figura 4.44 observa-se superfície porosa delaminada.



**Figura 4.44** – Imagem de pino denso em alumina com recobrimento em alumina porosa, manufaturado pela técnica *Dipping* (Imersão do pino na barbotina com formador de poros). A camada porosa destacou

Como a imersão em barbotina para formar a região porosa resultou em delaminação, foi realizada outra tentativa com a técnica descrita em Técnica (B).

#### 4.2.2 Técnica (B)

A técnica B de co-prensagem consistiu no depósito da barbotina na parede interna do molde e subseqüentemente secagem com soprador de ar (para a região porosa) e também com centrifugação sem soprador de ar, preenchimento da cavidade remanescente com pó de alumina (para região densa) seguido de co-prensagem isostática.

Com a técnica de co-prensagem alterações no formato do molde foram realizadas para dar forma de pino de dente nas peças e manter o silicone como material para revestir a parte interna do molde (Camisa de silicone),

O uso de soprador de ar para secar a barbotina forma um filme entre as camadas de poroso, devido a secagem do ligante PVB existente na barbotina. Este fato pode ser causador de delaminação na peça.

Como uma camada de barbotina apresentou-se ainda úmida ao secar com soprador de ar, testou-se a secagem somente com centrifugação em ar ambiente.

Para realizar a técnica o molde foi fixado (Fig. 3.13) em um dispositivo centrifugador. A secagem da barbotina na parede do molde foi realizada com a centrifugação e com soprador de ar. Com este molde foi possível realizar a secagem sem a necessidade de soprador de ar, além de ser utilizado na prensagem isostática.

Foram realizadas modificações no molde utilizado, devido à fraturas em sentido radial das peças. Na Figura 4.45 observa-se uma peça após a prensagem isostática manufaturada com molde de borracha delgado.



**Figura 4.45** – Imagem de peça em MGF manufacturada com co-prensagem. A peça fraturou após a prensagem isostática

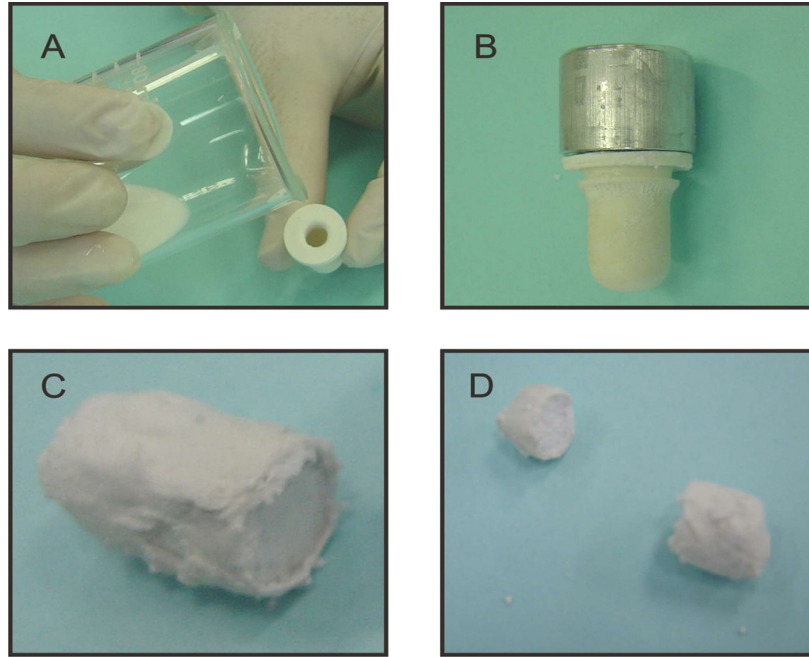
Como a peça fraturou após a prensagem isostática, foram realizadas outras tentativas. Seguiram-se com co-prensagem em molde de borracha mais espesso e em molde de silicone, as peças prensadas em molde de borracha fraturaram em duas ou em três partes (Figura 4.46). As peças prensadas em molde de silicone fraturaram em duas partes e obteve-se também peças inteiras conforme se vê na Figura 4.47.

Na Figura 4.46 vêem-se etapas da manufatura do gradiente funcional em que se utilizou o molde de borracha.

Em (A) vê-se o molde durante o recobrimento da superfície interna com a barbotina; em (B) vê-se o molde com a tampa metálica preenchido com o pó para a região densa e com a barbotina na parede, após essa fase encaminhou-se para a prensa isostática, em (C) vê-se a peça inteira, porém irregular em sua superfície; em (D) uma peça fraturada em duas partes após a prensa isostática.

As peças fraturadas foram encaminhadas para a Microscopia de Varredura Eletrônica para estudo das diferentes densidades porosas.





**Figura 4.46** - Etapas da manufatura das peças em gradiente funcional por co-prensagem com a utilização de molde de borracha mais espesso. Em (A) molde durante o recobrimento da superfície interna com a barbotina. Em (B) molde com a tampa metálica preenchido com o pó para a região densa e com a barbotina para região porosa na parede interna. Em (C) peça inteira e em (D) peça fraturada em duas partes após a prensagem isostática

Na Figura 4.47 observa-se peças manufaturas pelo método de co-prensagem com molde cilíndrico de silicone, a cada quatro peças uma ou duas fraturaram.



**Figura 4.47** – Peças em Gradiente Funcional manufaturas pelo método de co-prensagem em molde de silicone

Com o molde de borracha a cada quatro peças prensadas, três fraturavam na prensagem isostática; com o molde de silicone cilíndrico a cada quatro peças prensadas uma ou duas fraturavam durante a prensa isostática.

Após estas etapas iniciou-se o projeto do molde para dar forma de pino de dente nas peças. O molde está ilustrado na Figura 3.13 do capítulo sobre materiais e métodos.

Com este molde em formato cônico, após a prensagem isostática, todas as peças fraturavam em dois, três, quatro ou cinco partes em sentido radial após a prensagem isostática (Figura 4.48). Este fato deve ter ocorrido devido à tração dos compactados durante a descompressão da prensa.

As partes das peças fraturadas foram preparadas para MEV conforme item 3.3.3 do capítulo sobre materiais e métodos deste trabalho, para analisar a presença ou ausência de trinca ou delaminação.

#### **4.2.3 Projeto de molde integral para Aperfeiçoamento da Técnica (B)**

Iniciou-se o projeto do molde para dar forma de pino de dente nas peças, na Figura 3.13 vê-se em (A) o desenho do molde projetado e manufaturado para conformar peças em forma cônica. Em (B) uma fotografia do molde com a camisa de silicone.

No entanto, nesse molde as peças continuaram a apresentar fraturas em duas partes em sentido radial.

O prosseguimento dos testes foi realizado com lubrificação da parede da camisa de silicone. Foi utilizada vaselina. Seguiu-se com a manufatura com co-prensagem na isostática, e as peças continuaram com fraturas em duas partes.

Outra tentativa foi realizada com acréscimo de grafite em pó no revestimento de vaselina na parede interna da camisa de silicone revestida pelo molde de metal. Nesta tentativa todas as peças saíram inteiras após a prensagem isostática. Após a obtenção das

peças inteiras em formato cônico fez-se o projeto de usinagem à verde para obtenção do pino de dente.

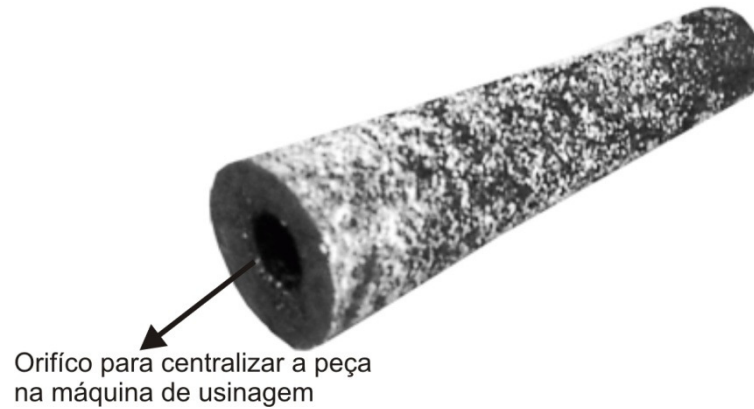
O projeto do pino de dente entrou como estudo de caso. Foi como uma possível aplicação do gradiente funcional.

Após a lubrificação da parede da camisa de silicone com grafite em pó e a fixação da parte inferior da camisa de silicone no molde proporcionaram a obtenção das peças sem fratura em sentido radial. Todas as peças fraturadas foram avaliadas com MEV quanto a presença ou ausência da continuidade entre as diferentes densidades das amostras.



**Figura 4.48** – Peça em Gradiente Funcional em formato cônico manufacturada com co-prensagem. A peça fraturou em 5 partes após a prensagem isostática

Essas fraturas evidenciaram que a avaliação da lubrificação da parede do molde dever ser requerida. Foi avaliada a lubrificação, com filme de vaselina e de grafite em pó, não se obteve sucesso com lubrificação a base de vaselina e obtiveram-se peças inteiras com o uso do grafite em pó conforme o que está ilustrado na Figura 4.49.

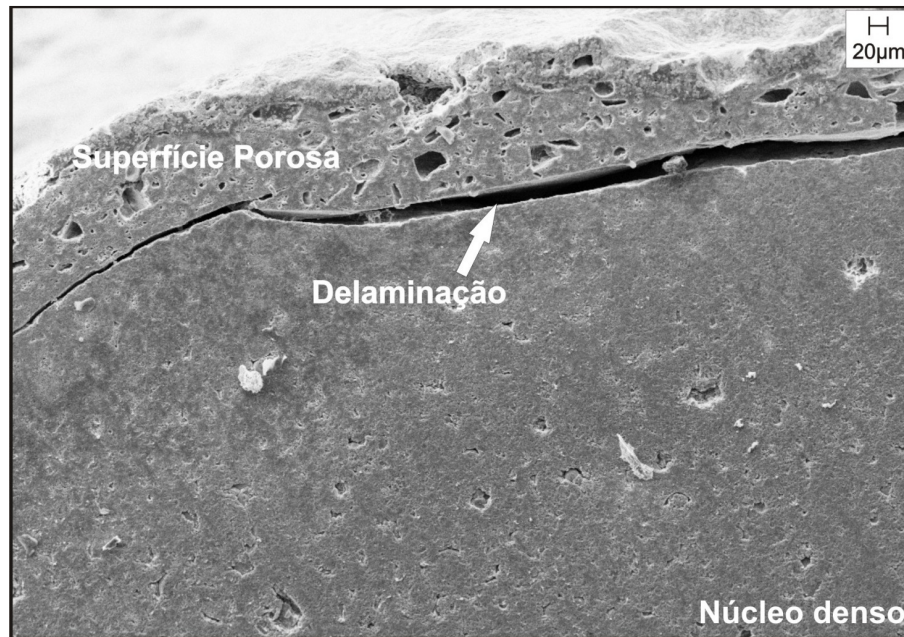


**Figura 4.49** – Imagem da peça em gradiente funcional manufacturada por co-prensagem, pronta para usinagem e sinterização

A peça apresenta coloração externa em preto por causa da utilização do grafite que fora completamente removido na usinagem à verde. Após usinagem para obtenção do formato final de pino de dente, as peças foram submetidas à pré-sinterização seguida de sinterização.

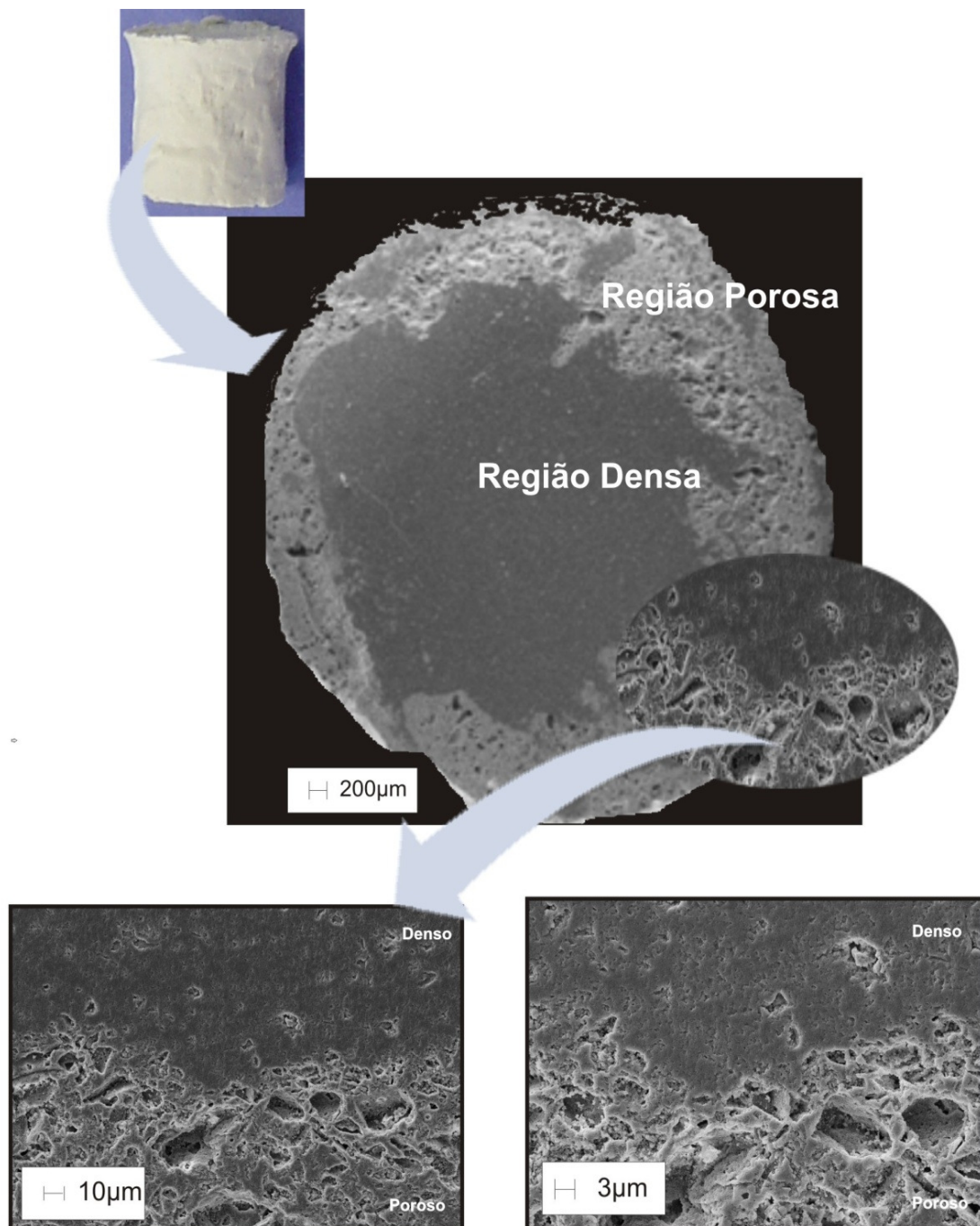
#### 4.2.4 Microscopia de Varredura Eletrônica das Peças em MGF

As peças manufacturadas com técnicas que se utilizou o soprador de ar para secar a barbotina resultaram em delaminação da região porosa conforme ilustra a Figura 4.50. A provável justificativa é a formação de um filme (pele) de PVB na superfície da camada depositada que coibiu a interação entre as partículas de alumina.



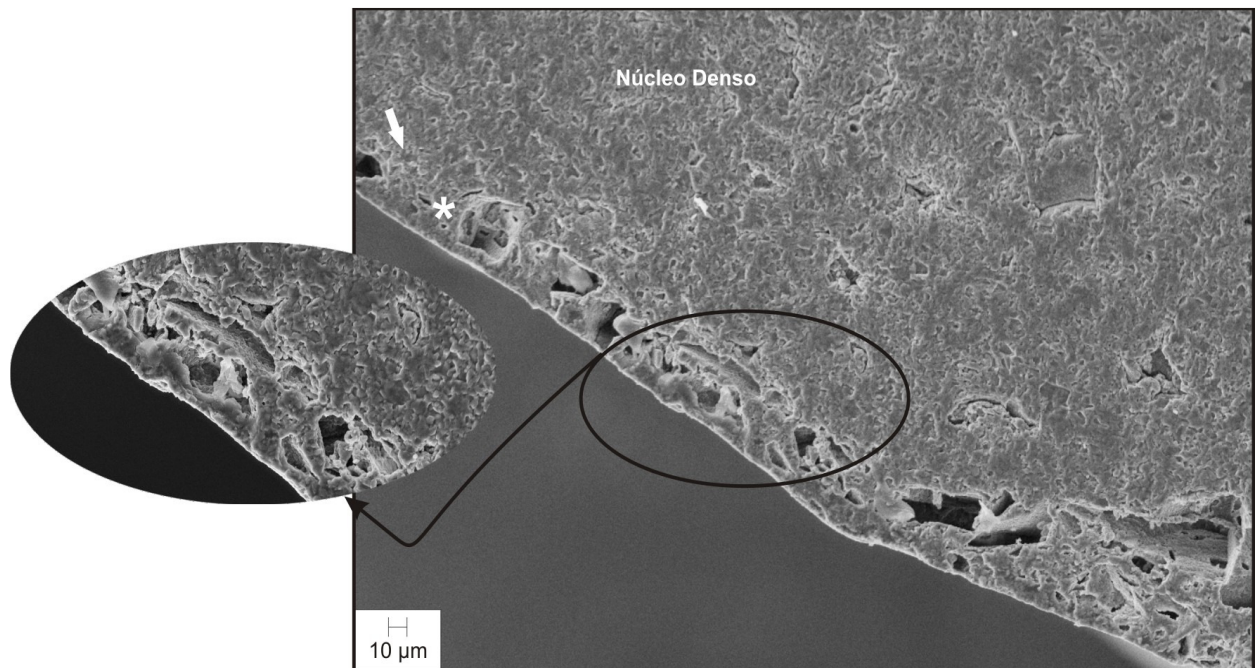
**Figura 4.50** – Imagem de MEV de peça manufacturada com a utilização de soprador para secar a barbotina

As peças manufacturadas por co-prensagem foram analisadas em MEV, na Figura 4.51 vê-se secção radial de uma peça manufacturada com molde cilíndrico de silicone.



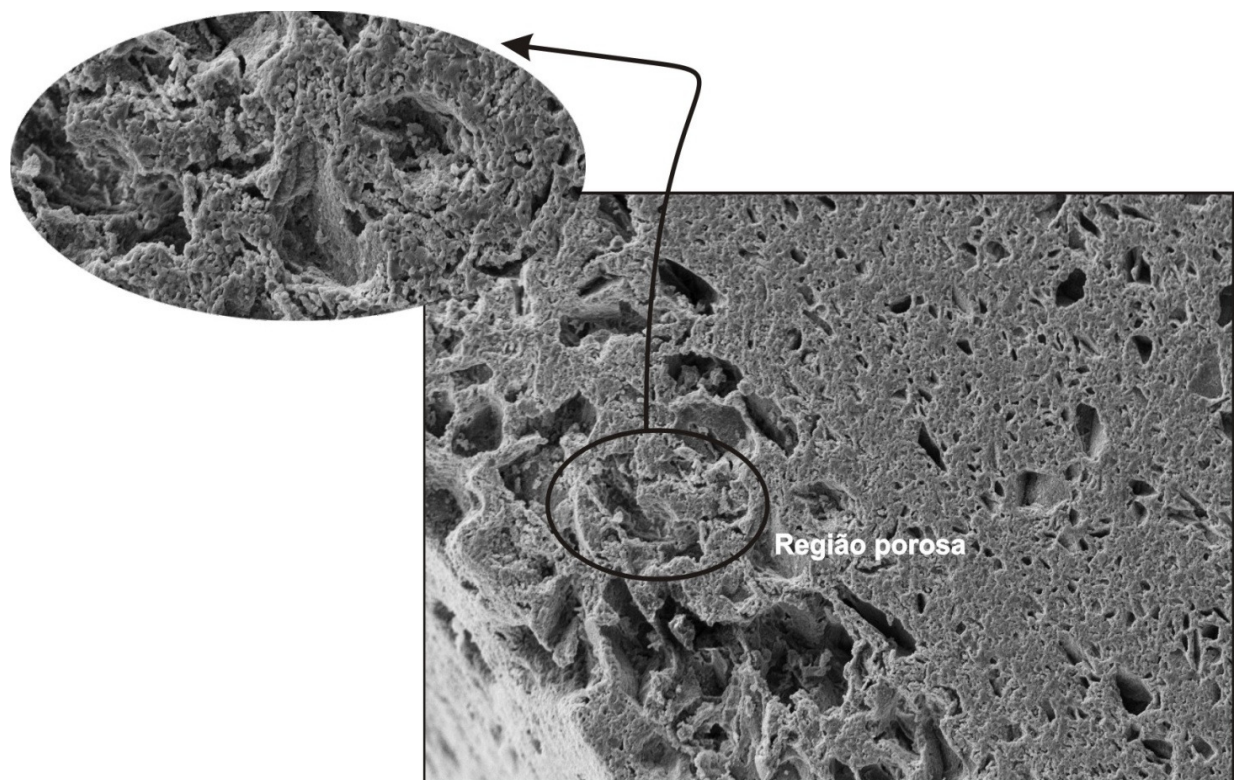
**Figura 4.51** – MGF em alumina com núcleo denso e superfície porosa manufacturado com método de co-prensagem seguido de sinterização. Utilizou-se molde de silicone

Na Figura 4.52 vê-se peça manufacturada com centrifugação seguida de co-prensagem.



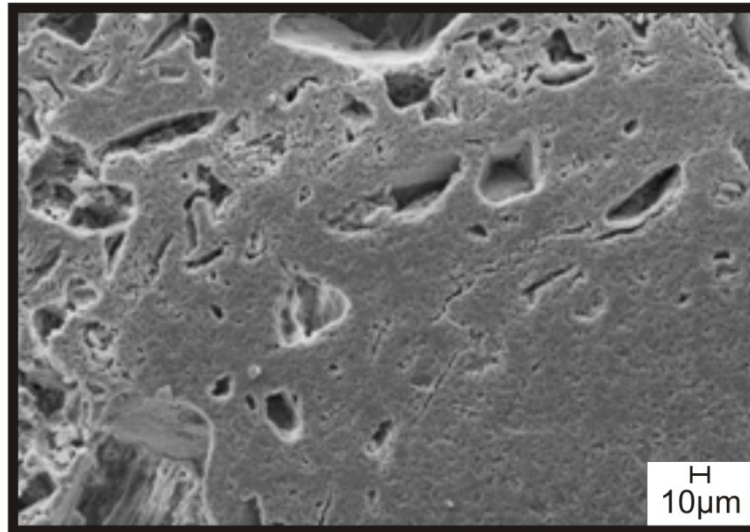
**Figura 4.52** – Imagem de MEV de peça manufacturada com centrifugação seguida de co-prensagem. Observa-se continuidade entre a região porosa e densa

As peças apresentaram também continuidade entre as diferentes densidades de poros conforme se vê na Figura 4.53.



**Figura 4.53** – Imagem de MEV de regiões porosas de peça manufacturada pelo método de co-prensagem e centrifugação. Observa-se continuidade nas diferentes regiões porosas

Na Figura 4.54 observa-se outra peça com o núcleo denso e superfície em porosidade gradual.

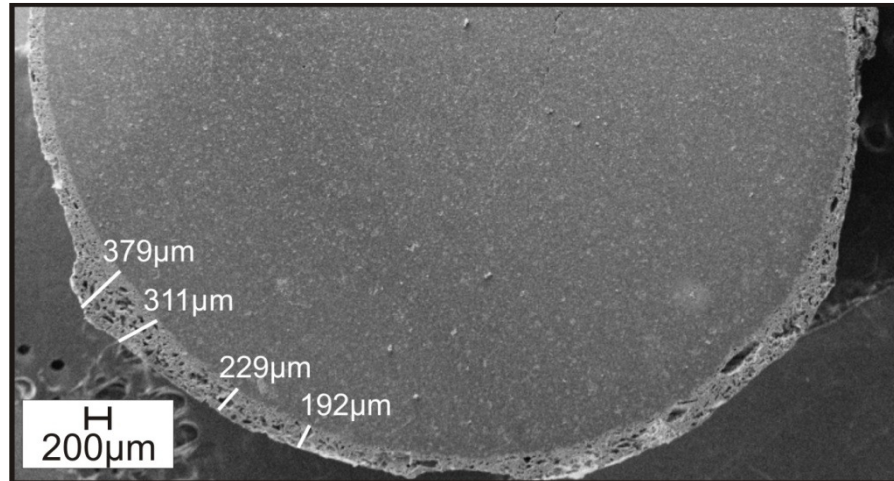


**Figura 4.54** – Peça em alumina com núcleo denso e porosidade gradual

Antes de manufaturar peças com a utilização de centrifugação, quando se utilizou somente a co-prensagem obtiveram-se interfaces não homogêneas conforme ilustra a Figura 4.51. Com a centrifugação as interfaces apresentam-se mais homogêneas e não tortuosas, conforme se vê na Figura 4.52 a interface densa-porosa e nas Figuras 4.53 e 4.54, a interface entre as regiões mais porosa e menos porosa com continuidade.

Com a técnica de co-prensagem pode-se manufaturar peças com espessura da região porosa controlável. O controle da espessura é realizado com a quantidade de camadas de barbotina com formador de poros sobrepostas durante a secagem. Na Figura 4.55 vê-se a imagem de gradiente funcional com núcleo denso e superfície porosa com espessura de região porosa entre 192 e 379  $\mu\text{m}$ .

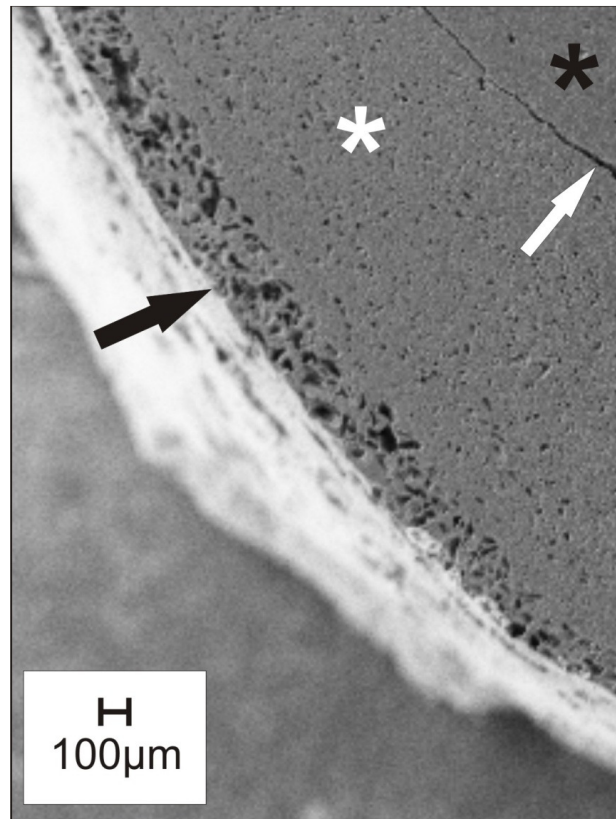




**Figura 4.55** – Imagem de MEV de Material em Gradiente Funcional de porosidade manufacturado pelo método de co-prensagem. Essa peça apresenta espessura de região porosa entre 192 e 379  $\mu\text{m}$

Em uma mesma peça a espessura da região porosa tem uma variação. Os valores das espessuras foram medidos e a seguinte variação por peça foi encontrada: 277 a 324  $\mu\text{m}$ , 94 a 127  $\mu\text{m}$ , 38 a 43  $\mu\text{m}$ , 206  $\mu\text{m}$ .

Espessuras maiores também foram obtidas 1266 a 1510  $\mu\text{m}$  ( $\sim 1$  mm), na Figura 4.55 vê-se uma peça com gradiente de porosidade e delaminação entre o denso e o poroso. A região porosa dessa peça apresenta duas regiões com espessura de porosidade diferentes, a região mais externa com espessura de 220  $\mu\text{m}$  (seta preta) a qual apresenta poros maiores e a região mais interna (asterisco branco) apresenta espessura de 1046  $\mu\text{m}$  com poros menores, a camada porosa delaminou (seta branca), nessa peça o diâmetro da região densa é 6473  $\mu\text{m}$  (asterisco preto),



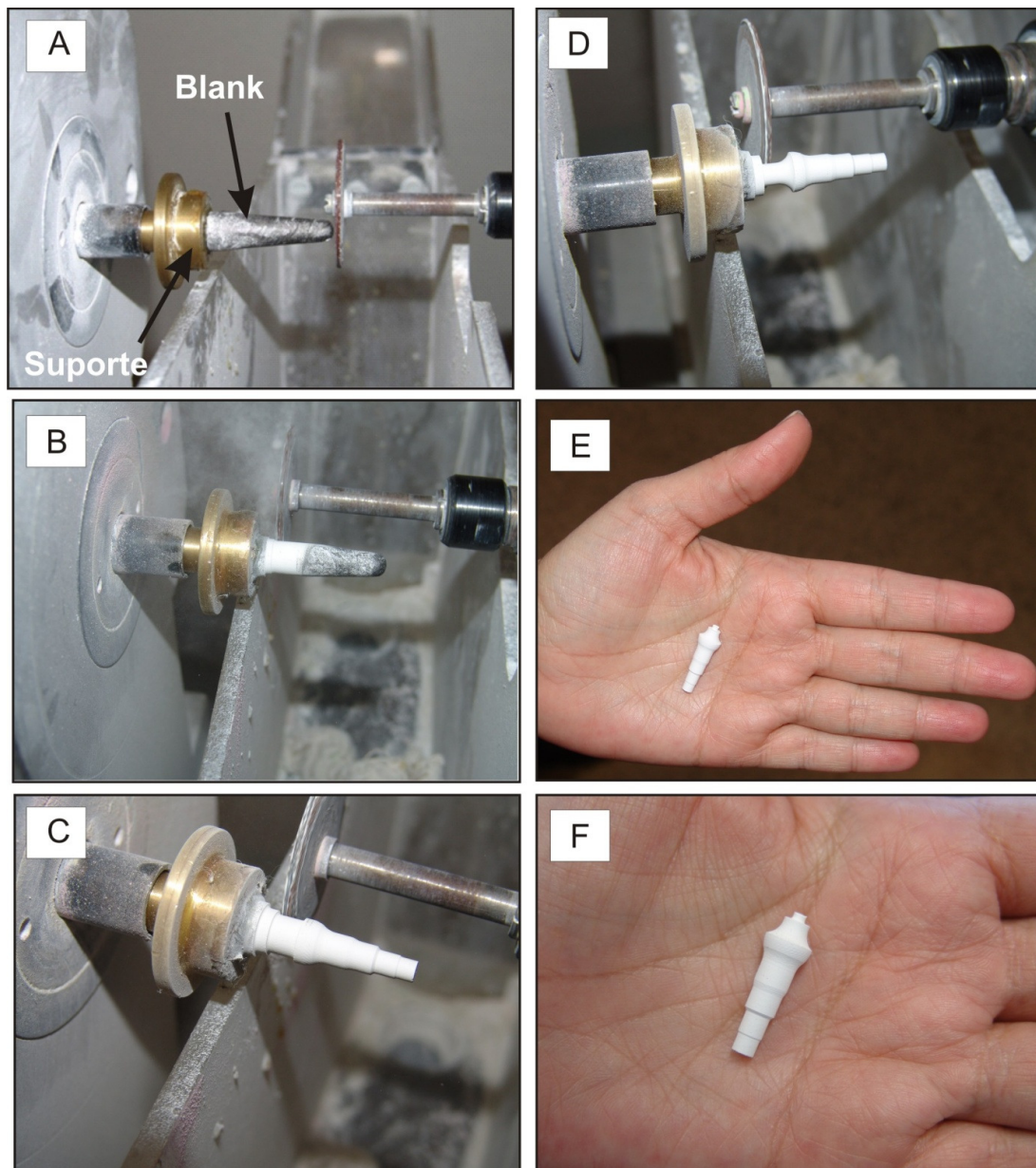
**Figura 4.56** – MEV de Gradiente Funcional com núcleo denso e superfície gradualmente porosa, com delaminação na interface. Método de manufatura co-prensagem. Região mais externa com espessura de 220  $\mu\text{m}$  (seta preta) apresenta poros maiores e a região mais interna (asterisco branco) apresenta espessura de 1046  $\mu\text{m}$  ( $\sim 1$  mm) com poros menores. Delaminação da camada porosa (seta branca), nessa peça o diâmetro da região densa é 6473  $\mu\text{m}$  ( $\sim 6,5$  mm) (asterisco preto)

Outra peça que apresentou delaminação com o diâmetro da região densa 5272  $\mu\text{m}$  e espessura da região porosa 122  $\mu\text{m}$ .

A investigação sobre as causas de delaminação deve ser realizada, pois houve resposta heterogênea para a mesma técnica aplicada. Peças manufaturadas com as mesmas técnicas apresentaram-se com e sem delaminação. Conforme se observa nas Figuras 4.55 sem delaminação e 4.56 com delaminação, sendo que ambas foram manufaturadas com centrifugação e co-prensagem. Talvez a espessura da camada porosa possa interferir na resposta a delaminação, em comparação a peça que não apresentou essa resposta tem espessura de poroso que varia de 192 a 179  $\mu\text{m}$ , e uma das peças que delaminaram apresentam espessura de poroso com valor de 1266  $\mu\text{m}$ ,

### 4.3 Usinagem do Pino de Dente

As peças manufaturadas por co-prensagem (Técnica B) (Figura 4.49), foram usinadas. As etapas da usinagem são ilustradas na Figura 4.57.



**Figura 4.57** – Usinagem do *blank* no formato de pino de dente. (A) *Blank* fixado no suporte. (B) *Blank* durante usinagem. (C) e (D) Usinagem em fase final de acabamento. (E) e (F) Pino usinado

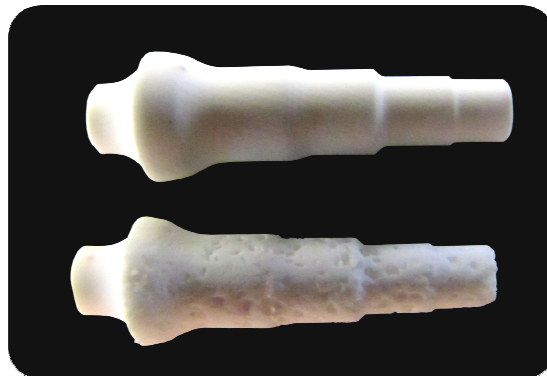
Para realização dos ajustes da máquina de usinagem foram usinados primeiramente pinos densos.

Na sequência as peças em gradiente funcional foram usinadas após a prensagem isostática, no entanto o pino não suportou a usinagem e fraturou durante o final do processo. Para obter peças mais resistentes, essas foram pré-sinterizadas e realizou-se a usinagem. Após a pré-sinterização a peça suportou o processo de acabamento. Pinos em gradiente funcional de porosidade e núcleo denso foram usinados (Figura 4.58) e sinterizados.



**Figura 4.58** – Pino dentário em gradiente funcional, manufaturado pela técnica de co-prensagem e com acabamento realizado através de usinagem à verde, após pré-sinterização

A imagem dos pinos sinterizados está na Figura 4.59.



**Figura 4.59** – Pino dentário em gradiente funcional, manufaturado pela técnica de co-prensagem e com acabamento realizado através de usinagem à verde, após pré-sinterização. Na imagem após processo final com sinterização

Após a usinagem a peça deve ser encaminhada para a sinterização para obtenção de maior resistência mecânica.



## 5 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foram implantadas 105 peças em alumina porosa com e sem recobrimento. Esses implantes porosos foram pesquisados no estudo *in vivo*, ao observar o aspecto geral das amostras, 3 tíbias do grupo controle e uma do grupo infiltrado apresentaram calo ósseo pronunciado. A possível causa desses calos exacerbados é a fixação instável do implante. Segundo Doblaré et al. (2004) a formação de calo ósseo é característico de cicatrização secundária. Este tipo de cicatrização ocorre quando não há estabilidade necessária para o reparo do defeito.

Aspectos sobre a análise da densidade mineral óssea são abordados na literatura e de acordo com Mitlank e Sato (1997). Esses autores estudaram sobre a precisão da técnica para realização do exame de DXA mensurou o Coeficiente Variação (CV) da Densidade mineral óssea (DMO) e do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) nas regiões de interesse (ROI) corpo total e coluna lombar em ratos da raça *Wistar* duas vezes em um dia, com reposicionamento entre os mapeamentos, foi utilizado o equipamento Hologic QDR-1000. Os valores de CMO encontrados para o corpo total com variação de 3.23-18,77g, o CV encontrado foi de 0,69%, para a coluna lombar com variação de 0.083-0.745g, o CV mensurado foi de 1.26%; com relação aos valores de DMO em corpo total com variação de 0.087-0.179g/cm<sup>2</sup>, o CV de 0.66%, para a coluna lombar com variação de 0.097-0.289 g/cm<sup>2</sup>, o CV de 0.57%. Na presente pesquisa o Coeficiente de Variação de DMO no Corpo inteiro foi 0,2% e para Coluna lombar foi 0,4.

A análise de rugosidade superficial dos implantes forneceu valores maiores significativamente para os implantes infiltrados esse resultado é favorável para os implantes em alumina recobertos com Bioativos (Infiltrados), pois segundo Kangasniemi et al. (1994) a resistência ao cisalhamento interfacial (ISS) está relacionada com o atrito entre o osso e o implante, o qual depende da rugosidade e da área de contato na superfície. A rugosidade superficial é uma propriedade importante em implantes ósseos, a qual pode interferir

positivamente na osteointegração de biomateriais, Kam et al. (2006) realizaram estudo comparativo da rugosidade superficial (Ra) de implantes em Alumina/Zircônia, Alumina/Zircônia jateada com alumina (50  $\mu\text{m}$ ) e titânio. Os dados foram estudados em termos de média da rugosidade superficial. Os valores de Ra foram 0.91, 0.83 e 0.39 respectivamente. De acordo com os autores, contato osso-implante foi mais pronunciado para o compósito alumina/zircônia quando comparado com o titânio. Este estudo evidenciou para a cerâmica uma osteointegração adequada para implantes odontológicos.

Durante o ensaio mecânico de cisalhamento interfacial, da presente pesquisa, alguns implantes fraturam em três partes, principalmente após o período experimental de 28 dias. Este fenômeno mostra que a osseointegração na interface e adentro da superfície do implante (0,5mm) teve desempenho mecânico superior à resistência mecânica do próprio implante.

Esses resultados corroboram com os resultados de Hing et al. (2004), esses autores observaram que em períodos experimentais maiores os implantes podem fraturar em três ou mais partes, após este ensaio.

O objetivo deste ensaio é determinar a tensão de cisalhamento entre o osso e os implantes. A fixação de implantes ao osso é mensurada com resistência ao cisalhamento interfacial utilizando testes denominados *pull-out* ou *push-out*.

Autores como Hing et al. (1997) e Ogiso et al. (1998) utilizam testes como esses, os quais consistem em puxar ou empurrar o implante com um atuador em equipamentos de ensaios mecânicos. Hing et al. (2004) para pesquisar a resistência ao cisalhamento interfacial (osso-implante) em estrutura porosa de hidroxiapatita, fizeram implante em fêmur de coelhos. A tensão de cisalhamento interfacial foi obtida com ensaio utilizando célula de carga de 2 kN e velocidade de ensaio de 0,5 mm/s. A carga foi aplicada axialmente ao eixo do implante. Implantaram cilindros com  $\varnothing$  4.5mm x 6mm porosos no côndilo femoral distal de coelhos, os tempos experimentais foram 5, 13 e 26 semanas. Os resultados obtidos

foram em 5 semanas de tempo experimental os implantes falharam, sem fraturar; após 13 semanas *in vivo* os implantes falharam por fratura em três ou mais fragmentos.

Considerações sobre a interação entre tecido ósseo com implantes porosos e densos pesquisadas por Anderson (2001) e por Griss et al. (2005) são interessantes, ambos apresentam considerações diferentes sobre a resposta tecidual aos biomateriais no sentido de que Anderson (2001) coloca que implante não poroso tem geralmente, como resposta final fibrose ou encapsulamento fibroso e considerou que existem como exceções os materiais porosos. No entanto, Griss et al. (2005) em estudo sobre implantes densos, compararam implantes em alumina ( $Al_2O_3$ ) e em óxido de magnésio (MgO), com implante de aço inoxidável em fêmur de ratos e encontraram como resultado que os implantes cerâmicos densos apresentavam-se integrados ao tecido enquanto o implante em metal foi isolado por uma cápsula fibrosa além de apresentar características de corrosão.

Na presente pesquisa foram comparados implantes em alumina porosa recoberta com materiais bioativos (Infiltrados) e sem recobrimento (Controle) em tíbias de ratos, os resultados histológicos, morfométricos e do EDS indicaram que nos implantes porosos infiltrados o tecido ósseo apresenta-se em contato direto com a superfície e com as paredes dos poros dos implantes. Os implantes controle apresentam uma camada de tecido de granulação entre o tecido ósseo presente na interface osso-implante e a parede dos poros, com alguns pontos de contato.

O recobrimento com bioativos na alumina porosa estudada nesta pesquisa parece acelerar a integração do implante ao tecido ósseo em comparação à mesma matriz porosa sem recobrimento bioativo.

A alumina, material utilizado para a matriz dos implantes é um material praticamente inerte em meio fisiológico, não absorvível e de extrema dureza. Os implantes porosos com 70 % de porosidade e recobertos com bioativos, apresentam resposta mecânica à compressão 43,27 MPa (CAMILO, 2006; CAMILO et al., 2009). É relatado por Heimke (1987) que corpos totalmente densos alcançam até 4000 MPa, com resultados parecidos



Fortulan (1997) relatou que a alumina densa apresenta valor de tensão de ruptura à compressão 3170 MPa, sendo que em seu trabalho sobre desempenho de cerâmicas estruturais, com cerâmica densa, foram utilizadas as mesmas condições de manufaturada que na presente pesquisa para alumina porosa.

Está estabelecido na literatura que embora a presença de trincas superficiais são concentradoras de tensão e diminui a propriedade mecânica relativa de corpos densos, os materiais densos frequentemente apresentam pouca sinalização celular e não resultam em uma fixação ao tecido hospedeiro como ocorre com materiais porosos.

Conforme Anderson (2001), a resposta na fase final de cicatrização de biomateriais é geralmente a fibrose ou encapsulamento fibroso. No entanto, para os materiais porosos não ocorre o encapsulamento, o que acontece é a regeneração a qual é a substituição do tecido lesionado por células do mesmo tipo.

O desempenho dos biomateriais às respostas do tecido ósseo parece não estar somente envolvido à topografia da superfície, se denso ou poroso, conhecidos como estímulos físicos, mas também à estímulos químicos e ou biológicos como recobrimentos com materiais bioativos e também técnicas de engenharia tecidual.

Chen et al. (2005) pesquisaram tubos em gradiente funcional de porosidade, e lubrificaram a parede interna do molde com vaselina para facilitar a retirada da peça. O método de fabricação desses autores envolvia a utilização de vácuo e sinterização, sem a utilização de prensa isostática.

Na presente pesquisa para a fabricação do gradiente funcional de porosidade utilizou-se o método de co-prensagem na prensa isostática e sinterização, a lubrificação do molde foi realizada com vaselina, mas as peças cilíndricas e cônicas fraturavam em sentido radial durante a prensagem isostática. Alguns detalhes devem ser considerados durante a prensagem, a despressurização deve ser realizada vagarosamente, pois, como a parede dos moldes utilizados (silicone e de borracha) é espessa, a peça fica “aderida” à parede do molde e durante a descompressão a peça pode fraturar. Foram realizados os procedimentos

de lubrificar a parede do molde com vaselina e descompressão vagarosa na prensagem, mesmo com esses cuidados as peças fraturavam.

Decidiu-se, no entanto, lubrificar com vaselina e com grafite em pó, como validação do presente conjunto de moldagem. Foi considerado que a otimização do processo, projetos de molde e materiais podem resolver o problema sem auxílio de lubrificante, feito o uso as peças não fraturaram e obtiveram-se peças em gradiente funcional e em forma de cone e cilíndricas.

A delaminação de camadas com diferentes densidades com tolerância de forma e dimensão é um verdadeiro desafio em projetos de manufatura de gradiente funcional de porosidade.

Peças que em funcionamento necessitam de variações de temperatura de trabalho podem delaminar nessas situações. A temperatura pode influenciar também em projetos de manufatura que fazem a sinterização da peça, nesse caso a retração desigual das regiões com diferentes densidade pode ser o fator causador desse fenômeno.

Em estudo realizado por Sherwood et al. (2002), ao manufaturar MGF procurou-se os motivos da delaminação ocorrida conforme o processo de manufatura, em compósito com polímero e trifosfato de cálcio (TCP) percebem que após lixiviar o cloreto de sódio, material utilizado como formador de poros, houve uma redução diferente entre a parte porosa e parte densa. Esses autores concluíram que a retração aumenta com o tempo de lixiviação, que quanto menor a temperatura de lixiviação, maior a retração.

Para o material estudado por Sherwood. et al. (2002) a retração ocorre durante a lixiviação e não após ou durante a secagem. Na presente pesquisa não se faz a lixiviação em água do MGF, utiliza-se o polvilho para a queima das peças e conseqüente sinterização.

## **Discussão dos resultados**

Na presente pesquisa, com as análises qualitativas e quantitativas foi observado que há ocupação dos poros abertos por tecido ósseo recém formado. O contato osso-implante

foi mais pronunciado nas amostras com 28 dias de implantação para os implantes infiltrados.

Das técnicas de manufatura experimentadas nesta pesquisa a que foi capaz de produzir corpos-de-prova densos internamente com superfície porosa em gradiente funcional foi a técnica de co-prensagem com os ajustes de molde e alterações nas variáveis.

O conceito sobre o gradiente funcional em alumina recoberto com biovidro e hidroxiapatita se apresentou viável como possibilidade em aplicações para implantes cerâmicos sujeito a carregamentos, além de serem osseointegráveis.

### **Estudo dos implantes em Alumina porosa recoberta com Biovidro e Hidroxiapatita (Infiltrado)**

Na **histologia** observou-se a presença de tecido neoformado com contato direto entre o tecido ósseo na interface osso-implante e os poros com neovascularização do implante infiltrado de forma mais pronunciada significativamente nos períodos de implantação de 21 e 28 dias em tíbias de ratos.

Nos períodos de 14 dias e 28 dias estudados na Fase 2 desta pesquisa a análise de lâminas com espessura de 19-4  $\mu\text{m}$ . Identificou-se nos **implantes infiltrados** que o tecido ósseo recém formado está em contato direto entre o osso e o implante, tanto na interface quanto nos poros dos implantes infiltrados, no período experimental de 28 dias.

Para os **implantes controle** (alumina porosa sem recobrimento bioativo) a histologia identificou também presença de tecido nos poros, porém o contato tecido-parede dos poros não se apresentou direto, com presença de tecido de granulação entre o tecido e o implante e alguns pontos de contato. As radiografias de alta-definição evidenciaram região rádio translúcida na interface osso-implante dos controles, o que é indicativo de menor mineralização nessa região e é confirmado na histologia com a presença de tecido de granulação entre o implante controle e o tecido recém formado.

O estudo com tons de cinza evidenciou maior radiopacidade na interface do implante infiltrado, o que é indicativo de maior mineralização.

No **EDS-Line-scan** ficou evidente o que se observou na histologia dos implantes controle, o tecido ósseo mineralizado, é formado na superfície e nos poros dos implantes controle, porém entre esse tecido e a parede do poro ou a superfície do implante existe um tecido ainda não mineralizado, com a presença de tecido de granulação.

Na comparação histológica e ao *EDS-Line-scan* entre os implantes infiltrados e controle observou-se que o tecido ósseo mineralizado é formado em contato direto com a parede do poro ou com a superfície do implante.

A espessura do corte histológico para os implantes controle foi menor que 9  $\mu\text{m}$  e para o *EDS-line-scan* foram utilizados blocos com as amostras implantadas. Conjecturou-se a respeito da perda de material durante o desgaste dos cortes para a histologia. Favoravelmente, ambas as análises, histologia e *EDS-Line scan*, corroboraram com o maior contato osso-implante para as amostras com implante infiltrado. Ao comparar os dois processos de análise e as respostas obtidas, considerou-se que os cortes histológicos seguidos de desgaste realizados em sistema para microtomia de material de extrema dureza, como os estudados neste trabalho podem fornecer informações sobre a osseointegração de implantes cerâmicos porosos sem perda expressiva do biomaterial ou de tecido durante o desgaste.

Portanto, os resultados do *EDS-Line-scan* evidenciam que os implantes infiltrados apresentam osseointegração mais acelerada do que os implantes controles.

A **rugosidade superficial** de alumina porosa recoberta com HAp/Biovidro foi comparada com o mesmo material sem recobrimento. O implante recoberto com bioativos apresentou rugosidade superficial maior de forma significativa. O que favorece as propriedades de osseointegração da alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita.

**Considerações sobre os ensaios mecânicos** de cisalhamento ou *push-out* houve aumento com diferença significativa nos valores de tensão de cisalhamento entre os períodos experimentais de 14 para 28 dias somente nos implantes infiltrados e também no

período experimental de 28 dias para os implantes infiltrados a tensão de cisalhamento foi maior 24%.

Considerações sobre os detalhes do ensaio serão feitas no sentido de que a interface osso-implante não se soltou, mas mesmo com este fato considerou-se que ocorreu tensão de cisalhamento, pois houve cisalhamento entre a região do implante abaixo do atuador com a região do implante que permaneceu intacta e fixa ao osso. Durante o estudo piloto fez-se teste com o atuador no diâmetro dos implantes, nessas condições as tíbias flexionaram e não houve a expulsão do implante, a partir deste fato o atuador foi usinado com diâmetro menor que o diâmetro dos implantes.

A usinagem dos pinos de dente foi realizada como projeto de usinagem e estudo de caso, as peças apresentaram-se íntegras, sem fraturas mesmo nas regiões de extremidade.

Nesta pesquisa desenvolveu-se o projeto e manufatura de implantes em alumina porosa recoberta com biovidro e hidroxiapatita e de implantes em alumina com núcleo denso e superfície gradualmente porosa.

O projeto dos implantes integralmente porosos foi desenvolvido para o planejamento e validação da superfície mais externa do gradiente funcional. Os implantes porosos com recobrimento foram estudados *in vivo* e responderam com osseointegração e biomecânica de forma mais pronunciada que os implantes controle (alumina porosa), este fato é indicativo de que os implantes recobertos com bioativos favorecem a consolidação mais rapidamente.

## 6 CONCLUSÃO

O conceito de *scaffold* poroso em alumina recoberto com biovidro e hidroxiapatita apresentou biocompatibilidade e resposta a osseointegração superior à *scaffolds* de alumina pura, mecânica e biologicamente.

A validação, *in vivo* e *ex vivo*, da osseointegração da superfície do material em gradiente funcional com histologia, MEV – EDS - *Line-scan*, radiografias e ensaios biomecânicos pode-se concluir que a osseointegração ocorre consideravelmente a partir de 28 dias de implantação em tíbias de ratos.

Com o conceito do gradiente funcional em alumina com núcleo denso e superfície porosa desenvolveu-se a técnica de manufatura com capacidade de produzir o gradiente de porosidade e continuidade entre as diferentes densidades de poro, sem delaminação.

Na presente pesquisa, pode-se concluir que ao planejar a região porosa de material em gradiente funcional, há relevância no tamanho de poros. O projeto deve ser capaz de desenvolver poros com diâmetro médio entre 100 e 400  $\mu\text{m}$  e restringir a formação de poros menores que 100  $\mu\text{m}$ , para que não ocorra a presença de poros sem formação de tecido organizado ou “vazios”. Esse planejamento deve ser realizado para aplicações em tecido ósseo.

A técnica de co-prensagem isostática utilizada para manufaturar o gradiente funcional foi viável. A manufatura desenvolvida que produziu a maioria das peças em gradiente funcional de porosidade e núcleo denso, sem delaminação entre diferentes densidades, com continuidade e peças sem fraturas foi a técnica de co-prensagem com centrifugação, com a utilização do conjunto de molde de com silicone, lubrificação do molde com vaselina e grafite em pó, seguida de sinterização a 1550 °C durante 1 hora.

No entanto, as variáveis do processo de manufatura estão em processo de aperfeiçoamento, pois, com esta técnica foram manufaturadas peças com e sem

delaminação. Com a validação da técnica de co-prensagem considera-se que a automação pode contribuir para a precisão e repetibilidade do processo.

## 7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros podem ser realizadas as seguintes sugestões:

Modificações nas variáveis do processo de manufatura de gradiente funcional com co-prensagem.

Variação na formulação da barbotina para a região porosa, com outras quantidades de PVB (Poli-Vinilbutiral) agente ligante, para verificar a sua relação com a presença de delaminação.

Verificações nos fatores causadores de delaminação.

Verificações sobre qual seria a espessura de região densa ideal para oferecer propriedades mecânicas especificar para as aplicações propostas e correlacionar com os possíveis carregamentos mecânicos exigidos pela peça depois de implantada.

Estudo *in vivo* com o gradiente funcional com núcleo denso e superfície porosa e avaliação da resistência ao cisalhamento.

Avaliação da resposta mecânica ao cisalhamento com padronização no diâmetro do atuador.

Avaliação da peça em gradiente funcional em fluido fisiológico para verificar a integridade da continuidade entre as diferentes densidades.

Avaliação do gradiente funcional com ensaios mecânicos à flexão.





## REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T. et al. (1981). Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a longlasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Abindon, v.52, n.2, p.155-170.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v.10, p.S96-S101, Suppl.2.
- ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. (2004). Oral implant surfaces: part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **The International Journal of Prosthodontics**, v.17, n.5, p.536-543
- ALDINI, N.N. et al. (2002). Improvement in zirconia osseointegration by means of a biological glass coating: an *in vitro* and *in vivo* investigation. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.61, n.2, p.282-289, Nov.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (2004). **ASTM-F981-04**: Standard practice for assessment of compatibility of biomaterials for surgical implants with respect to effect of materials on muscle and bone. Washington.
- AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.43, n.3, p.338–348.
- ANDERSON, J.M. (1988). Inflammatory response to implants. **ASAIO Transactions**, Philadelphia, v.34, n.2, p.101-107, Apr./june.
- ANDERSON, J.M. (1993). Capter 4 – mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. **Cardiovascular Pathology**, Amsterdam, v.2, n.3, p.33-42, july/Sept.
- ANDERSON, J.M. (2001). Biological response to materials. **Annual Review of materials Research**, Palo Alto, v.31, p.81-110.
- BACCHI, C.E. et al. (2010). **Patologia**: processos gerais. 5.ed. Rio de Janeiro: Atheneu.
- BERGLUNDH, T. et al. (2007). Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, New York, v.18, n.2, p.147-152, Apr.
- BRÅNEMARK, P.I. et al. (1977). **Osseointegrated titanium implants in the treatment of the edentulous jaw**. Stockholm: Almqvist & Wekseeel.
- BUTZ F. et al. (2006). Harder and Stiffer Bone Osseointegrated to Roughened Titanium. **Journal of Dental Research**. 85(6):560-565, Marc.
- CAMILO, C.C. (2006). **Escafoldes para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro**: análises mecânica e *in vitro*. 134p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

- CAMILO, C.C. et al. (2009). Manufacturing of porous alumina scaffolds with bio-glass and hap coating: mechanical and in vitro evaluation. **Key Engineering Materials**, Millersville, v.396/398, p.679-682.
- CHEN, C.H. et al. (2005). Fabrication on porous alumina tube by centrifugal molding. **Journal of the European Ceramic Society**, Amsterdam, v., n.14, p.3257-3264, Sept.
- CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUERA, M. (1994). Influence of metal implants on infection: an experimental study in rabbits. **Journal of Bone and Joint Surgery: British edition**, London, v.76-B, n.5, p.717-720, Sept.
- DOBLARÉ, M.; GARCIA, J.M.; GÓMEZ, M.J. (2004). Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, Amsterdam, v.71, n.13/14, p.1809–1840, Sept.
- DROSSE, I. et al. (2008). Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. **Tissue Engineering: part C – methods**, New Rochelle, v.14, n.1, p.79-88, Mar.
- DUCHEYENE, P; QUI, Q. (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, Amsterdam, v.20, n.23/24, p.2287–2303, Dec.
- FISHER, H. et al. (2005). Bioactivation of inert alumina ceramics by hydroxylation. **Biomaterials**, Amsterdam, v.26, n.31, p.6151-6157, Nov.
- FORTULAN, C.A. (1997). **Influência dos métodos de injeção e de prensagem isostática no desempenho das cerâmicas estruturais**. 1997. 187p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- FUJI, T. et al. (2009). Octacalcium phosphate-precipitated alginate scaffold for bone regeneration. **Tissue Engineering: part A**, New Rochelle, v.15, n.1, p.3525-3535, Nov.
- GASIK, M.M. (2003). Functionally graded materials VII. **Materials Science Forum**, Millersville, v.423/425, p.17-22.
- GRISS, P. et al. (1973). Biological activity and histocompatibility of dense Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/MgO ceramic implants in rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.7, n.3, p.453-462, Apr.
- HAGA, H. et al. (2005). Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. **Biophysical Journal**, Bethesda, v.88, n.3, p.2250-2256, Mar.
- HAMADOUCHE, M. et al. (2000). Bioactivity of sol-gel bioactive glass coated alumina implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.52, n.2, p.422-429, Nov.
- HE, X. et al. (2008). Zirconia toughened alumina ceramic foams for potential bone graft applications: fabrication, bioactivation, and cellular responses. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, Berlin, v.19, n.7, p.2743-2749, July.
- HEIMKE, G. (1987). Ceramic for osseo-integrated implants. **Advanced Ceramic Materials**, Westerville, v.2, n.4, p.764-770.

HELGASON, B. et al. (2008). On The mechanical stability of porous coated press fit titanium implants: a finite element study of a pushout test. **Journal of Biomechanics**, Amsterdam, v.41, n.8, p.1675-1681.

HENCH, L.L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, Easton, v.74, n.7, p.1487-1510, July.

HENCH, L.L.; WEST, J.K. (1996). Biological applications of bioactive glasses. **Life Chemistry Reports**, v.13, p.187-241, Germantown.

HENCH, L.L. (1998). Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, Amsterdam, v.19, n.16, p.1419-1423, Aug.

HENCH, L.L. (1998). Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, Easton, v.81, n.7, p.1705-1728, July.

HING, K.A. et al. (1997). Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, Berlin, v.8, n.12, p.731-736, Dec.

HING, K.A. et al. (2004). Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research – part A**, New York, v.68A, n.1, p.187-200, Jan.

HOHL et al. (2000). Functional gradient materials (FGM). New trends in Vacuum Arc Deposition Plasma technology. "**Tribological Applications**", A. Rodrigo (178o.) © CNEA , Buenos Aires, Argentina 9–19.

HOLLINGER, J.O.; KLEINSCHMIDT, J.C. (1990). The Critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, New Rochelle, v.1, n.1, p.60-68, Jan.

HSU, Y.H.; TURNER, I.G.; MILES, A.W. (2007). Fabrication of porous bioceramics with porosity gradients similar to the bimodal structure of cortical and cancellous bone. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.18, n.12, p.2251-2256, Dec.

IGNATIUS, A. et al. (2005). Osseointegration of alumina with a bioactive coating under load-bearing and unloaded conditions. **Biomaterials**, Amsterdam, v.26, n.15, p.2325-2332, May.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. (2007). **ISO-10993-6**: Biological evaluation of medical devices – part 6 - tests for local effect after implantation. Geneva.

JARCHO, M. (1981). Calcium phosphates ceramics as hard tissues prosthetics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Berlin, v.157, p.259-278.

JUN, Y.K. et al. (2003). The Fabrication and biochemical evaluation of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. **Biomaterials**, Amsterdam, v.24, n.2, p.3731-3739, Sept.

JUNG, H.D. et al. (2007). Fabrication of titanium scaffolds with porosity and pore size gradients by sequential freeze casting. **Materials Letters**, Amsterdam, v.63, n.17, p.1545-1547, July.

- Kam M-H et al. (2006). Histomorphometric Analysis of Zirconia/Alumina Composite and CP Titanium Treaded Implants in Rabbit Tibia. **Key Engineering Materials**. Vols. 309-311, pp. 437-440, May.
- KANGASNIEMI, M.O. et al. (1994). In Vivo tensile testing of fluorapatite and HÁ plasma-sprayed coatings. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v.28, n.5, p.563-572, May.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. (2005). Porosity of 3 D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, Amsterdam, v.26, n.27, p.5474-5491, Sept.
- KAWASAKI, A.; WATANABE, R. (2002). Thermal fracture behavior of metal/ceramic functionally graded materials. **Engineering Fracture Mechanics**, Amsterdam, v.69, n.14/16, p.1713–1728, Sept.
- KEATING, J.F.; MCQUEEN, M.M. (2001.). Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **Journal of Bone and Joint Surgery**, 83:3-8.
- KIENKE, F.M. et al. (2008). Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research – part A**, New York, v.85A, n.3, p.777-786, June.
- KIM, H.W. et al. (2004). Sol-gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zircônia substrate. **Biomaterials**, Amsterdam, v.25, n.15, p.2911-2918, July.
- KIM, H.W.; KIM, H.E.; KNOWLES, J.C. (2004). Hard-tissue-engineered zircônia porous scaffolds with hydroxyapatite sol-gel and slurry coatings. **Journal of Biomedical Materials Research – part B – applied biomaterials**, New York, v.70B, n.2, p.270-277, Aug.
- KOIZUMI, M.; NIINO, M. (1995). Overview of FGM research in Japan. **Materials Research Society Bulletin**, Pittsburgh, v.20, n.1, p.19-21, Jan.
- KUHNE, R. et al. (1994) Bone formation in coralli hydroxyapatite: effects of pore size studied in rabbits. **Acta Orthopaedic**, Kobenhavn, v.65, n.3, p.246-252, Jan. 1994.
- LANGE, F.F. (1979). Powder processing science and technology and increased reliability. **Journal of American Ceramic Society**, Easton, v.72, n.1, p.3-5, Jan.
- LAUF, R.J. et al. (2002). **Method of making a functionally graded material**. USPTO 6375877, 23 Apr. 2002, 24 Apr. 2001.
- LE GUEHENNEC, L. et al. (2005). Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research – part B – Applied Biomaterials**, v.72B, n.1, p.69-78, Jan.
- LEONG, K.F. et al. (2008). Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v.1, n.2, p.140-152, Apr.
- LO, C.M. et al. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. **Biophysical Journal**, Bethesda, v.79, n.1, p.144-152, July.
- MACCHETTA, A.; TURNER, I.G.; BOWEN, C.R. (2009). Fabrication of ha/tcp scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v.5, n.4, p.1319–1327, May.

MENDES, V.C.; MOINEDDIN, R.; DAVIES, J.E. (2007). The Effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v.28, n.32, p.4748-4755, Nov.

MIAO, X.; SUN, D. (2009). Graded/graded porous biomaterials. **Materials**, v.3, n.1, p.26-47.

MITLANK, B.H.; SATO, M. (1997). Bone mineral measurements by DXA in animals. In: ERNETT, T.R.; HENDERSON, B. (Ed.). **Methods in bone biology**. New York: Chapman & Hall. Cap. 11, p.273-289.

MONTENERO, A. et al. (2000). Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrate. **Journal Materials Science**, Berlin, v.35, n.11, p.2791-2797, June.

NAJJAR, T.; KAHN, D. (1977). Comparative study of healing and remodeling in various bones. **Journal of Oral surgery**, Chicago, v.35, p.375-379, May.

OGISO, M. et al. (1998). Comparative push-out test of dense HA implants HA-coated implants: findings in a canine study. **Journal of Biomaterials Research**, New York, v.39, n.3, p.364-372, Mar.

OH, S.H. et al. (2007). In Vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. **Biomaterials**, Amsterdam, v.28, n.9, p.1664-1671, Mar.

PABBRUWE, M.B. et al. (2004). Effect of silicon doping on bone formation within alumina porous domains. **Journal of Biomedical Materials Research – part A**, New York, v.71A, n.2, p.250-257, Nov.

ROCCA, M. et al. (1998). Comparison among 3 different biocoatings for orthopaedic prostheses: an experimental animal study. **International Journal Artificial Organ**, Italy, v.21, n.9, p.553-558.

SHERWOOD, J.K. et al. (2002). A Three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. **Biomaterials**, Amsterdam, v.23, n.24, p.4739-4751, Dec.

SIMSKE, S.J.; AYERS, R.A.; BATEMAN, T.A. (1997). Porous materials for bone engineering. **Materials Science Forum**, Millersville, v.250, p.151-182.

SINGH, M.; BERKLAND, C.; DETAMORE, M.S. (2008). Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. **Tissue Engineering: part B - reviews**, New Rochelle, v.14, n.4, p.341-366, Dec.

SU, B. et al. (2007). Porous and bioactive alumina ceramics for bone grafts and tissue engineering scaffolds. **Key Engineering Materials**, Millersville, v.330/332, p.975-978.

VOGELIN, E. et al. (2005). Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. **Journal of bone Joint Surgery American**, Boston, v.87, n.6, p.1323-1331, June.

WATARI, F. et al. (2004). Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for bio-medical application. **Composites Science and Technology**, Amsterdam, v.64, n.6, p.893-908, May.

WEBSTER, T. J., SIEGEL, R. W., BIZIOS, R. (2001) Nanoceramic surface roughness enhances osteoblast and osteoclast functions for improved orthopaedic/dental implant efficacy, **Scripta Materialia**, 44, pp. 1639-1642.

WERNER, J.P. et al. (2002). Mechanical properties and *in vitro* cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. **Biomaterials**, Amsterdam, v.23, n.21, p.4285-4294, Nov.

WILLIAMS, D.F. (1987). **Progress in biomaterial engineering**: definition in biomaterials. Amsterdam: Elsevier. v.4.

YANG, S. et al. (2002). The Design of scaffolds for use in tissue engineering - part I: traditional factors. **Tissue Engineering**, New Rochelle, v.7, n.6, p.679-689, Dec.

## APÊNDICES



**APÊNDICE A – Sequencia de procedimentos para o preparo e inclusão em resina das tíbias para microtomia, EDS – *Line-scan* e histologia**

	<b>PROCEDIMENTO</b>
<b>A – Fixação</b>	Fixar o osso em Etanol a 70% durante sete dias (4° C).
<b>B – Desidratação</b>	Etanol absoluto (100%) durante sete dias (4° C).
<b>C – Tolueno</b>	Um dia a 4° C.
<b>D – Penetração em Resina</b>	- Sete dias em Solução A* (4° C) - Sete dias em Solução 1 %** - Sete dias em Solução 2 %***
<b>E – Inclusão</b>	Inclusão em uma "pré-base", em frasco com capacidade para 20 ml contendo cerca de 5 ml de Solução 2 % polimerizada em estufa à 37 °C. A amostra é adicionada nesta "pré-base" a seguir, completa-se com mais Solução 2 %. O bloco estará completamente endurecido em cerca de 48 h na estufa a 37°C.
<b>F – Preparação do Bloco</b>	O frasco de 20 ml serve como molde. Quebra-se o vidro e forma-se um bloco retangular. A seguir lixa-se e identifica-se o bloco.
<b>Especificações das soluções</b>	<p><b>* Solução A* para 100 ml</b> 25% de Dibutilftalato (Merck C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> - n<sup>o</sup> 814157) - 25 ml de Dibutilftalato 75% de Poli(metacrilato de metila) - (Merck C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> - 800590) - 75 ml de Poli(metacrilato de metila)</p> <p><b>** Solução 1 % (para 100 ml)</b> Solução A – Um grama de Peróxido de Benzoíla (Sigma C<sub>14</sub>H<sub>10</sub> O<sub>4</sub> B2030).</p> <p><b>***Solução 2 % (para 100 ml)</b> Solução A – Dois gramas de Peróxido de Benzoíla.</p> <p>Todas as soluções são armazenadas em geladeira.</p>

**APÊNDICE B – Equipamentos utilizados para microtomia na Fase 2****Sistema EXAKT**

Corte de osso mineralizado emblocado em Poli (metacrilato de metila) ou resina Tecnovit (72.00 VLC).

- 1 - Máquina de corte com fita diamantada
- 2 - Máquina de micro-desgaste contendo controle digital e sensor da espessura de desgaste
- 3 - Lixas para desgaste e polimento com granulometria na sequência N<sup>o</sup> 320, 800, 1200, 2500 (Grana)
- 4 - Micrômetro com mostrador digital
- 5 - Resinas para fixação adesiva
- 6 - Lâminas plásticas, para fixar o bloco e para fixar a amostra cortada e formar as lâminas para a coloração

## APÊNDICE C – Valores e as diferenças estatísticas da densidade mineral óssea (DMO)

Os valores obtidos com o exame de DXA foram tratados para analisar significância entre as diferenças. Utilizou-se o programa *Instat* 3.0, realizou-se Análise de Variância One-way (ANOVA) e o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer.

**Grupos comparados:** infiltrado, controle e controle-controle

### 1 – DMO – CORPO TOTAL (g/cm<sup>2</sup>)

#### 1.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.1384 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.1406 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.138 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.5681, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado t 14 vs Controle t 14	-0.002600	1.334 ns	P>0.05
Infiltrado t 14 vs Controle-controle t 14	0.000	0.000 ns	P>0.05
Controle t 14 vs Controle-controle t 14	0.002600	1.334 ns	P>0.05

#### 1.2 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.1504 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.1452 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.1495 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.1300, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado t 28 vs Controle t 28	0.005400	3.153 ns	P>0.05
Infiltrado t 28 vs Controle-contolre t 28	0.001400	0.6179 ns	P>0.05
Controle t 28 vs Controle-controle t 28	-0.004000	1.765 ns	P>0.05

## 2 – DMO – COLUNA VERTEBRAL (L1-L4) (g/cm<sup>2</sup>)

### 2.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.201 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2076 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.4503, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 14 vs Controle 14	-0.006600	1.476 ns	P>0.05
Infiltrado 14 vs Cotrl-cotrl 14	0.001000	0.2237 ns	P>0.05
Controle 14 vs Cotrl-cotrl 14	0.007600	1.700 ns	P>0.05

### 2.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2228 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2126 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2215 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.2031, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 28 vs Controle 28	0.01020	2.647 ns	P>0.05
Infiltrado 28 vs Cotrl-cotrl 28	0.001300	0.2550 ns	P>0.05
Controle 28 vs Cotrl-cotrl 28	-0.008900	1.746 ns	P>0.05

### 3 – DMO – TÍBIA DIREITA (g/cm<sup>2</sup>)

#### 3.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2256 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2244 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2202 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.5717, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 14 vs Controle 14	0.001200	0.3240 ns	P>0.05
Infiltrado 14 vs contl-contl 14	0.005400	1.458 ns	P>0.05
Controle 14 vs contl-contl 14	0.004200	1.134 ns	P>0.05

#### 3.2 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2444 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2354 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.227 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.3453, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 28 vs Controle 28	0.009000	1.423 ns	P>0.05
Infiltrado 28 vs Contrl-contl 28	0.01740	2.079 ns	P>0.05
Controle 28 vs Contrl-contl 28	0.008400	1.004 ns	P>0.05

#### 4 – DMO – TÍBIA ESQUERDA (g/cm<sup>2</sup>)

##### 4.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.22 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2264 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2202 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.9082, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado t 14 vs Controle t 14	-0.006000	0.5395 ns	P>0.05
Infiltrado t 14 vs Cntr-ctr t 14	0.000	0.000 ns	P>0.05
Controle t 14 vs Cntr-ctr t 14	0.006000	0.5395 ns	P>0.05

##### 4.2 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2352 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2428 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2195 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.7873, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado t 28 vs Controle t 28	-0.007000	0.3990 ns	P>0.05
Infiltrado t 28 vs Cntr-ctr t 28	0.01600	0.6894 ns	P>0.05
Controle t 28 vs Cntr-ctr t 28	0.02300	0.9910 ns	P>0.05

## 5 – DMO – FÊMUR DIREITO (g/cm<sup>2</sup>)

### 5.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.225 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.239 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2302 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.1984, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 14 vs Controle 14	-0.01400	2.695 ns	P>0.05
Infiltrado 14 vs Contl-cotr 14	-0.005200	1.001 ns	P>0.05
Controle 14 vs Contl-cotr 14	0.008800	1.694 ns	P>0.05

### 5.2 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2702 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2522 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2575 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.2129, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 28 vs Controle 28	0.01580	2.449 ns	P>0.05
Infiltrado 28 vs Contl-contr_28	-0.001400	0.164 ns	P>0.05
Controle 28 vs Contl-contr_28	-0.01720	2.016 ns	P>0.05

## 6 – DMO – FÊMUR ESQUERDO (g/cm<sup>2</sup>)

### 6.1 – PERÍODO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2248 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.241 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2352 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.2969, diferença considerada não significativa

Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 14 vs Controle 14	-0.01620	2.290 ns	P>0.05
Infiltrado 14 vs Contl-cotl 14	-0.01040	1.470 ns	P>0.05
Controle 14 vs Contl-cotl 14	0.005800	0.8197 ns	P>0.05

### 6.2 – PERÍODO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Média (Grupo Infiltrado): 0.2702 g/cm<sup>2</sup>

Média (Grupo Controle): 0.2522 g/cm<sup>2</sup>

Média (grupo Controle-Controle): 0.2575 g/cm<sup>2</sup>

Valor de p=0.0466, diferença considerada significativa



Comparação	Diferença	q	Valor de P
Infiltrado 28 vs Controle 28	0.01800	2.693 ns	P>0.05
Infiltrado 28 vs Contl-contrl 28	-0.01730	1.957 ns	P>0.05
Controle 28 vs Contl-contrl 28	-0.03530	3.993 *	P<0.05

**APÊNDICE D – Dados estatísticos do programa *Instat* da análise de radiopacidade em pixels**

<b>Parâmetro</b>	<b>Infiltrado 14D</b>	<b>Controle 14D</b>	<b>Diferença</b>
Mean:	225.80	170.40	55.400
n	5	5	5
Desvio padrão:	5.541	5.413	2.302
Erro padrão:	2.478	2.421	1.030
Mínimo:	220.00	163.00	52.000
Máximo:	231.00	177.00	57.000

The two-tailed P value is < 0.0001, considered extremely significant.

<b>Parâmetro infiltrado 28D</b>	<b>Controle 28D</b>	<b>Diferença</b>	
Media:	220.20	188.20	32.000
n	5	5	5
Desvio padrão:	21.684	19.766	25.855
Erro padrão:	9.697	8.840	11.563
Mínimo:	184.00	170.00	2.000
Máximo	237.00	213.00	66.000

**APÊNDICE E – Percentual de contato ósseo na superfície dos implantes**

	% Contato ósseo superfície dos implantes	
	14 dias	28 dias
Infiltrado 1	36,8(%)	77,25(%)
Infiltrado 2	31,09(%)	75,02(%)
<b>Média</b>	<b>33,94(%)<math>(\pm)4,03</math></b>	<b>76,13(%)<math>(\pm)1,57</math></b>
Controle 1	25,28(%)	26,64(%)
Controle 2	7,75(%)	25,05(%)
<b>Média</b>	<b>16,51(%)<math>(\pm)12,39</math></b>	<b>25,84(%)<math>(\pm)1,12</math></b>

**ANEXOS**

**ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em experimentação animal do estudo na Fase 1**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 020/2008**

Protocolo nº 021/2008

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 21ª. Reunião, ocorrida em 17/06/2008, **APROVOU** o trabalho intitulado Bioativação de matrizes porosas em alumina infiltrados com biovidro e hidroxiapatita, elaborado por Claudia Cristiane Camilo, Carlos Alberto Fortulan, Nivaldo Antônio Parizotto e Nelson Ferreira da Silva Júnior.

São Carlos, 20 de junho de 2008.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

**ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em experimentação animal do Estudo na Fase 2****APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0218/09**, intitulado: "**ESTUDO DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE SCAFFOLDS DE ALUMINA IMPREGNADOS COM HIDROXIAPATITA E BIOVIDRO EM TÍBIAS DE RATOS: ANÁLISES MECÂNICA E HISTOLÓGICA DA INTERFACE**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello**

Pesquisador (a) Executante: **Claudia Cristiane Camilo**

CAPPesq, 02 de Abril de 2009

**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Presidente da Comissão de**  
**Ética para Análise de Projetos**  
**de Pesquisa**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)