INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Ticp E LIGA Ti-13Nb-13Zr COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE
SUPERFÍCIE-TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Carola Gomez Ágreda

**Tese como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências na área de Tecnologia
Nuclear-Materiais.**

**Orientadora: Dra. Ana Helena de
Almeida Bressiani**

**Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN**

São Paulo

2013

DEDICATÓRIA

**Ao meu querido Diego (amigo, companheiro e marido)
que me apoia, incentiva e conforta em todos
os momentos na trajetória de nossas vidas.**

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e ao INCT- BIOFABRIS pela concessão de verba que auxiliou esta pesquisa.

À minha orientadora Profa Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani pela confiança, incentivo e ensinamentos valiosos durante toda esta jornada. Tive o privilégio de ser sua aluna e tenho profunda admiração e respeito pela pessoa e grande pesquisadora em que me espelho como exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto e a Dra Eliana Rigo pelas considerações em meu exame de qualificação, importantes para o norteamto deste trabalho.

À Dra Christiane Ribeiro, sempre atenciosa e prestativa, esclarecendo dúvidas e proporcionando ensinamentos na prática laboratorial.

À Dra Tamiye Simone Goia, amiga e colega profissional, tanto na prática da Odontologia quanto na pesquisa. Agradeço todo o apoio, parceria e amizade.

Ao amigo e colega Msc Kalan Violin, pela parceria na pesquisa, convívio e amizade.

À Dra Vânia Trombini pela ajuda e ensinamentos, presteza e amizade.

Ao Dr. Antônio Carlos da Silva pelas análises de DRIFT e cordialidade.

Aos profissionais do CCTM Celso, Nildemar, Rene, Glauson, Flávia, Pedro por toda a colaboração e dedicação nas análises necessárias para este trabalho.

À Dra Karolina Tonello pelo convívio agradável, amizade e sempre solícita.

Agradecimentos

Aos amigos e colegas do IPEN: Marcos, Rodrigo, Márcio, Nara, Roberta, Thais, Heveline pela cordialidade e presteza.

Aos meus pais, Victor e Hilda e ao meu irmão Victor, pelo incentivo e compreensão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ticp E LIGA Ti-13Nb-13Zr COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE-TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO*

Carola Gomez Ágreda

RESUMO

O titânio e suas ligas são biomateriais metálicos extensamente utilizados em aplicações médicas e odontológicas, apesar de não formarem ligação química com o osso circundante. Por isto é desejável técnicas que proporcionem a bioatividade na superfície desses metais. A proposta deste estudo foi avaliar e comparar, por testes *in vitro* e *in vivo* o comportamento de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr utilizando diferentes tratamentos de superfície frente à formação do recobrimento biomimético e ao processo de osteointegração. Foram utilizadas placas comerciais de Ti e amostras da liga e de Ticp, obtidas por M/P. As amostras foram submetidas a quatro diferentes tratamentos de superfície (padrão - tratamento alcalino; 1º- tratamento alcalino e térmico; 2º- tratamento ácido e alcalino; 3º- tratamento alcalino, CaCl_2 , térmico e água quente), analisadas quanto à formação de apatita em SBF em períodos de 1 a 21 dias. Os recobrimentos obtidos foram caracterizado por MEV e DRIFT. Para a avaliação *in vivo* dos implantes, obtidos por M/P, de Ticp e da liga, com e sem tratamentos superficiais, foram utilizados coelhos adultos machos. A avaliação teve duração de 7 semanas em que foram aplicados marcadores celulares ósseos em tempos e sequência específicos do pós-operatório. Na avaliação *in vitro*, os recobrimentos de maior espessura foram nas amostras obtidas por M/P, comparativamente à amostra laminada. Todos os tratamentos foram efetivos na promoção da bioatividade. O 2º tratamento obteve recobrimento com maior espessura nos períodos avaliados para todas as superfícies. Na avaliação *in vivo*, ocorreu crescimento ósseo com osteointegração em todos os implantes com e sem tratamentos superficiais. O crescimento ósseo na interface osso/implante ocorreu de forma contínua em todo o período de reparação para o Ticp, o Ticp com tratamento padrão, o Ticp com o 2º tratamento e a liga com o 1º tratamento; e ocorreu de forma mais intensa no primeiro e terceiro período de reparação para os demais implantes. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* não são passíveis de analogia direta neste estudo, pois forneceram informações importantes sobre a formação, morfologia e taxa de aposição do recobrimento aos diferentes tratamentos de superfície e a efetividade da osteointegração destes tratamentos de superfície em modelo animal.

Ticp AND Ti-13Nb-13Zr ALLOY WITH DIFFERENT SURFACE TREATMENTS – IN VITRO AND IN VIVO TESTS

Carola Gomez Ágreda

ABSTRACT

Titanium and its alloys are widely used metallic biomaterials in medical and dental applications for patient rehabilitation. However, these materials cannot bond with surrounding bone. For this reason, it is desirable to provide a bone-bonding ability for metallic surface. The aim of this study was to evaluate and compare *in vitro* and *in vivo* tests of Ti and Ti-13Nb-13Zr alloy subjected to different surface treatments. Laminate titanium plates and Ti and alloy Ti samples obtained by powder metallurgy were used in this study. The samples were subjected to four different surface treatments (pattern- alkali treatment; 1°- alkali and heat treatments; 2°- acid and alkali treatments; 3°- alkali, CaCl₂, heat and hot water treatments) and evaluated for apatite coating in SBF for periods of 1 to 21 days. The coated specimens were analyzed by SEM (surface and cross section) and DRIFT. For *in vivo* evaluation of osseointegration were used Ticp and alloy implants obtained by powder metallurgy with and without surface treatments in male adult rabbits. The evaluation was 7 weeks which were applied bone cell markers at selected times. *In vitro* evaluation, surfaces obtained by powder metallurgy had a coating of greater thickness when compared to the laminate surface. All treatments were effective in promoting the bioactivity. The 2nd treatment provided coating thicker in the evaluation periods for all surfaces. The osseointegration occurred in all implants with and without surface treatments. However, growth in the bone/ implant interface was continued all over repair period for Ticp, Ticp with pattern treatment, Ticp with 2nd treatment and alloy with 1st treatment. Bone growth in interface occurred more intensely for first and third period to repair for remaining implants. *In vitro* and *in vivo* tests are not liable to direct analogy in this study because provided important information on the formation, morphology and apposition rate of coating on different surface treatments and the effectiveness of osseointegration in animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um osso longo	11
Figura 2: Representação esquemática dos eventos biológicos decorrentes da implantação de um biomaterial metálico	13
Figura 3: Representação esquemática dos eventos químicos e celulares na superfície do titânio após sua implantação no tecido ósseo. Em A: Água liga-se à superfície seguindo-se a incorporação de íons hidratados, B: Adsorção de proteínas, C: depois de diferenciação, osteoblastos maduros produzem a matriz extracelular (ECM)42.	14
Figura 4: Microestrutura da liga Ti-13Nb-13Zr	19
Figura 5: Representação do parâmetro Rugosidade média (Ra) 65.....	20
Figura 6: Parâmetro Ry67.....	21
Figura 7: Representação esquemática do parâmetro Rz.	21
Figura 8: Representação esquemática do metal titânio passivado por TiO ₂ (a), camadas formadas quando o Ti é submetido a ataque ácido(b) e depois exposto à atmosfera oxidante27.....	25
Figura 9: Representação esquemática da superfície de titânio quando submetido a tratamento com solução alcalina de NaOH 75.....	26
Figura 10: Representação esquemática da formação da apatita em titânio tratado com NaOH e submetido ao tratamento térmico	30
Figura 11: Início da formação de apatita após três dias de imersão em SBF 97 ..	31
Figura 12: Micrografia de superfície do titânio (esquerda); secção transversal da camada de apatita formada em SBF após tratamento com solução de NaOH e tratamento térmico 85	31
Figura 13: Micrografias das superfícies do titânio submetidas aos diversos tipos de tratamentos 99.	33
Figura 14: Micrografias das superfícies dos implantes submetidos ao SBF por 1,3 e 7 dias após diferentes tratamentos superficiais 100.	34
Figura 15: Lâminas histológicas relativas às amostras dos três grupos após 3 meses pós-operatório para implantação em músculo de cães, barra de aumento - A,C e E (1mm) e B, D e F (100µm)100.....	35
Figura 16. Representação esquemática do corte histológico.....	46

Figura 17: Exemplo de análise em MEV com EDS para a lâmina histológica com o implante da liga Ti-13Nb-13Zr submetida ao 3º tratamento. Micrografia do implante com o tecido ósseo, imagem obtida com elétrons retroespalhados (a), mapeamento evidenciando os elementos Ti e Ca (b), mapeamento do elemento Ca, em azul (c), mapeamento do elemento Ti, em verde (d).	47
Figura 18: Morfologia do pó de partida (a) e espectro de difração de raios X do pó de titânio hidretado (b).	49
Figura 19: Pó de Ti: MEV mostrando morfologia irregular (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina hexagonal compacta foi observada (b).	50
Figura 20: Pó de Nb: MEV mostrando a morfologia irregular com partículas pontiagudas (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina cúbica de corpo centrado foi observada (b).	50
Figura 21: Pó do Zr: MEV mostrando a morfologia arredondada e uniforme (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina hexagonal compacta foi observada (b).	50
Figura 22: Micrografia óptica (a) e DRX do Ticp (b) de amostras obtidas por M/P.	51
Figura 23: MEV de amostra polida e atacada por solução de Kroll da liga (a) e DRX evidenciado as fases $Ti\alpha$ e $Ti\beta$ (b).	52
Figura 24: DRX da placa de comercial laminada de Ti.	52
Figura 25: Aspecto morfológico da amostra de Ticp obtida por M/P (a), da liga (b) e da placa de Ti laminada (c).	53
Figura 26: Micrografias da superfície das amostras condicionadas em tratamento padrão; Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), (e) e EDS da região (f) e placa laminada (g), (h) e EDS da região (i).	54
Figura 27: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo primeiro tratamento (1T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), (e) e EDS da região (f) e placa laminada (g), (h) e EDS da região (i). ...	56
Figura 28: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo segundo tratamento (2T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), e EDS da região (e) e placa laminada (f) e EDS da região (g).	57
Figura 29: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo terceiro tratamento (3T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), e EDS da região (e) e placa laminada (f) e EDS da região (g).	58

- Figura 30: Gráfico com os valores de rugosidade, parâmetros Ra e Ry nos três tipos de amostras (Ticp e liga obtidas por M/P e placa de Ticp laminada) antes e após os tratamentos de superfície.61
- Figura 31: Micrografias das amostras de Ticp processadas por M/P após segundo tratamento e imersão em SBF por 6 dias e EDS com a presença dos elementos sódio e cloro (A) e (B), os picos não identificados no espectro de EDS correspondem ao elemento Au do recobrimento para observação em MEV.63
- Figura 32: Aspecto morfológico do recobrimento após 1 dia em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa laminada de Ti (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).64
- Figura 33: Aspecto morfológico do recobrimento após 3 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).65
- Figura 34: Aspecto morfológico do recobrimento após 6 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).66
- Figura 35: Aspecto morfológico do recobrimento após 9 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e

liga obtida por M/P (i). Para o 3° tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).	67
Figura 36: Aspecto morfológico do recobrimento após 15 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1° tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2° tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3° tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).	68
Figura 37: Aspecto morfológico do recobrimento após 21 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1° tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2° tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3° tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).	69
Figura 38: Micrografia referente a morfologia do recobrimento em Ticp obtido por M/P condicionado ao 3° tratamento (3T) e após imersão em SBF por 9 dias (a) EDS da região (b).	70
Figura 39: Gráficos de DRIFT para as superfícies de Ticp laminada (a), Ticp (b) e liga(c) obtidas por metalurgia do pó referentes às superfícies com os quatro tratamentos, após a imersão de 1 dia em SBF.	72
Figura 40: Corte transversal evidenciando a camada formada e a análise de EDS da região para amostras submetidas ao 3° tratamento e imersão em SBF por 15 dias; Ticp obtida por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c).	73
Figura 41: Mensuração da camada biomimética formada (μm), utilizando o programa Image Pro Plus® 6.1, na amostra de Ticp obtido por M/P submetido ao 2° tratamento e imerso em SBF por três dias,	74
Figura 42: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao tratamento padrão, em função do tempo de imersão em SBF.....	75

Figura 43: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 1º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.....	76
Figura 44: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 2º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.....	77
Figura 45: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 3º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.....	78
Figura 46: Incisão para o acesso cirúrgico ao osso, perfurações com trefina e colocação dos implantes.....	86
Figura 47: Sutura do periósteo, da pele e curativo no pós-operatório.....	86
Figura 48: Fotografia do bloco da tíbia contendo dois implantes e radiografias com diferentes orientações para evidenciar o posicionamento dos mesmos.	86
Figura 49: Micrografia de implante de Ticp sem tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E).....	93
Figura 50: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao tratamento padrão, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).....	94
Figura 51: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 1º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E).....	95
Figura 52: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 2º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E e F).	96
Figura 53: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 3º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E, F e G).	97
Figura 54: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr sem tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C,	

D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam um osteoclasto (E).....	98
Figura 55: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao tratamento padrão no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E e F).....	99
Figura 56: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 1º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).....	100
Figura 57: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 2º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Seta indica osteona (E).	101
Figura 58: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 3º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).....	102
Figura 59: Tecido ósseo (tíbia de coelho) referente à implantação de Ticp processado por M/P com e sem tratamentos de superfície: (A) - Ticp,(B) – TP, (C) – 1T, (D) – 2T e (E) – 3T, coloração HE, (*) espaço referente ao implante removido. Seta indica osteocondução.	104
Figura 60: Tecido ósseo (tíbia de coelho) referente à implantação de liga Ti-13Nb-13Zr processado por M/P com e sem tratamentos de superfície: (A) – liga Ti-13Nb-13Zr, (B) – TP, (C) – 1T, (D) – 2T e (E) – 3T, coloração HE, (*) espaço referente ao implante removido.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Biomateriais em relação à resposta do organismo	7.12
Tabela 2: Propriedades físicas do titânio	16
Tabela 3: Classificação do titânio conforme o grau de impurezas	16
Tabela 4: Valores do módulo de elasticidade de ligas de titânio e do osso.	18
Tabela 5: Tratamentos de superfície no titânio e suas ligas para aplicações biomédicas ⁴⁶	23
Tabela 6: Concentrações iônicas dos SBFs e do Plasma Humano Sangüíneo ⁸⁵ .	28
Tabela 7: Seqüência dos reagentes e suas quantidades para o preparo do SBF ⁸⁵	29
Tabela 8: Comparação da concentração iônica (mmol.dm-3) do SBF e do plasma sanguíneo.	42
Tabela 9: Reagentes analíticos (A) e massa (em gramas (B)) para o preparo do SBF.....	43
Tabela 10: Espessura (µm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo tratamento padrão e imersas em diferentes períodos em SBF.....	74
Tabela 11: Espessura (µm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 1º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.	75
Tabela 12: Espessura (µm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 2º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.	76
Tabela 13: Espessura (µm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 3º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Tecido ósseo, constituintes e classificação	10
2.2 Biomateriais e Biocompatibilidade	11
2.3 Osteointegração.....	12
2.4 Titânio e suas ligas	15
2.4.1 Ti-13Nb-13Zr	17
2.5 Ligas de Titânio obtidas por Metalurgia do Pó.....	19
2.6 Rugosidade.....	19
2.7 Tratamentos de superfície	22
2.7.1 Tratamento ácido.....	24
2.7.2 Tratamento alcalino	25
2.7.3 Recobrimento biomimético	26
2.8 SBF (Simulated Body Fluid).....	27
2.9 Bioatividade em metais.....	29
3.OBJETIVOS.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Caracterização do material particulado	40
4.2 Obtenção das amostras e implantes de Ticp e da liga	40
4.3 Caracterização Física	41
4.4 Tratamentos de superfície	41
4.5 Ensaio “in vitro”- Recobrimento biomimético	42
4.5.1 Caracterização do recobrimento biomimético.....	43

4.6 Ensaaios <i>in vivo</i>	44
4.6.1 Obtenção e análise das lâminas histológicas	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Caracterização do material particulado.....	49
5.2 Caracterização das amostras sinterizadas e da amostra comercial	51
5.3 Tratamentos de superfície	53
5.4 Recobrimento biomimético - ensaio <i>in vitro</i>	62
5.5 Ensaaios <i>in vivo</i>	85
5.5.1 Análise das lâminas histológicas	87
5.5.2 Comparação da análise <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	106
6. CONCLUSÕES.....	110
7. ANEXOS.....	112
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

INTRODUÇÃO

Biomateriais metálicos são amplamente utilizados na Implantodontia e Ortopedia para o restabelecimento de partes do corpo ou funções perdidas. A superfície dos implantes pelas características topográficas e pelo uso de tratamentos superficiais que induzem a bioatividade pode influenciar no processo de osteointegração. Visando a obtenção de respostas e melhorias neste processo, o que justifica a pesquisa multidisciplinar associando avaliações *in vitro* e *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

Biomateriais metálicos são extensamente utilizados na área médica e odontológica como substitutos de tecidos perdidos, e/ou lesionados, decorrentes de acidentes, e/ou processos patológicos. Para a aplicação ortopédica, são utilizados o aço inoxidável F138, ligas de Co-Cr, ligas à base de titânio, tais como Ti-6Al-7Nb e Ti-6Al-4V^{1,2}. Para promover a reabilitação oral, são usados, além de implantes de titânio comercialmente puro (Ticp), implantes de ligas à base de titânio^{3,4}. A ampla aceitação do titânio e suas ligas para aplicações biomédicas ocorrem devido às propriedades desejáveis de excelente biocompatibilidade, alta resistência mecânica e boa estabilidade química⁵.

Como o tecido ósseo é geralmente o sítio receptor dos biomateriais metálicos, uma desvantagem à sua implantação é a diferença entre o módulo de elasticidade do metal e o do osso⁶. Uma grande diferença de rigidez pode culminar em carga excessiva ao tecido de suporte, influenciando o processo de remodelação e cicatrização podendo comprometer o processo de osteointegração⁷. O tecido ósseo possui módulo de elasticidade de 10 a 40 GPa, dependendo do tipo ósseo e direção da mensuração. O Ticp e a ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb apresentam valores de módulo de elasticidade considerados próximos ao do osso (105-110 GPa) comparativamente à outras ligas utilizadas em ortopedia. No entanto, estudos demonstraram que a longo prazo, a liberação de pequenas quantidades de vanádio podem induzir efeitos citotóxicos no organismo e a liberação de alumínio pode estar associado a desordens neurológicas^{8,9}. Dessa forma, a liga Ti-13Nb-13Zr, comercializada desde a década de 90 para implantes ortopédicos, apresenta propriedades superiores quando comparadas às ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb, principais concorrentes no setor. A liga Ti-13Nb-13Zr, além de apresentar valores de módulo de elasticidade de ~80 GPa, resistência à tração de 1300MPa, boa resistência à corrosão, possui todos os elementos constituintes biocompatíveis.

A interação biológica de um implante com o tecido ósseo é significativamente influenciada por suas características de superfície, tais como o padrão topográfico. Esta característica topográfica aumenta a área de contato com o tecido ósseo, permitindo maior adesão celular e retenção mecânica, favorecendo a osteointegração^{10,11,12,13}. Além das características físico-morfológicas da superfície dos implantes, podem ser realizados tratamentos superficiais condicionantes que induzam propriedades desejáveis à união osso-implante^{14,15,16}. Os tratamentos podem ser mecânicos, físicos e químicos¹⁷. Dentre as diversas técnicas estudadas e propostas, o recobrimento biomimético destaca-se por

permitir o recobrimento de diversos substratos com uma camada uniforme de HA de até 15 μm de espessura. Este recobrimento pode ser empregado no Ti e suas ligas, aço inoxidável, Pt e Cu, Al_2O_3 , ZrO_2 , vidro de sílica e polímeros tais como o polimetacrilato de metila, polietileno, poli(tereftalato de etileno). Para a obtenção do recobrimento é necessário que ocorra a nucleação e crescimento de cristais de apatitas semelhante aos do osso, utilizando soluções iônicas, SBF (Simulated Body Fluid), próximas às condições encontradas no plasma humano e temperatura corpórea. Dessa forma, confere-se característica de bioatividade ao substrato recoberto^{18,19,20,21,22}.

Para a promoção desta bioatividade em biomateriais metálicos, tais como o Ti e suas ligas deve-se submeter a tratamentos superficiais prévios a imersão em SBF^{13,23}. O tratamento alcalino com NaOH é um dos tratamentos de superfície mais utilizados na literatura com este propósito, pois permite que grupamentos hidroxila ancorem na superfície metálica, que em contato com o fluido corporal ou com o SBF permitirá a formação de uma camada à base de fosfato de cálcio^{24,25,26,27}. Muitos tratamentos de superfície estão sendo estudados em busca de um melhor desempenho em aplicações biomédicas. A comparação entre diferentes tratamentos de superfície que apresentaram bons resultados na literatura torna-se interessante e contribui para essa busca. A utilização da avaliação *in vitro* em SBF pode simular condições corpóreas de formação de fosfatos de cálcio e suas características na superfície das amostras de Ti e liga Ti-13Nb-13Zr quando submetidos aos tratamentos de superfície.

Na avaliação *in vivo* utilizando coelhos como modelo animal pode-se verificar a resposta tecidual óssea frente à utilização de implantes com os mesmos tratamentos de superfície utilizados no teste *in vitro*. Nas duas formas de avaliação (*in vitro* e *in vivo*) espera-se obter correspondência dos resultados em que se realize a inferência dos melhores tratamentos de superfície para o mecanismo de osteointegração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conhecimento de diversas áreas correlatas ao estudo de biomateriais metálicos faz-se necessário para relacionar e explicar as reações biológicas da inserção de implantes metálicos no sistema biológico. Neste capítulo, é apresentando embasamento teórico importante para a compreensão deste estudo. São abordados aspectos como a forma de interação dos implantes metálicos com o tecido ósseo; características do titânio e da liga Ti-13Nb-13Z; influência do padrão topográfico do implante na reação tecidual e a utilização de tratamentos de superfície para a bioatividade dos biomateriais metálicos utilizando o SBF para a avaliação *in vitro* destes tratamentos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido ósseo, constituintes e classificação

O conhecimento dos constituintes do tecido ósseo torna-se importante para compreender os mecanismos fisiológicos da interação com os biomateriais. O osso é um dos tecidos do organismo que possui grande capacidade regenerativa, por restaurar, estrutura e função original quando lesionado, incluindo fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração²⁸. É constituído por células distintas responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura. São elas: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são responsáveis pela formação e mineralização óssea, derivadas das células pluripotenciais mesenquimais. Possuem a capacidade de secretar fosfatase alcalina, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, pró-colagenase, ativador de plasminogênio e proteína morfogenética do osso, entre outras^{29,30}. Já, os osteócitos são pequenas células aplainadas contidas na matriz óssea, ligadas por canalículos que contém fluido ósseo extracelular. Podem-se apresentar ligadas entre si, como também ligadas às células osteoblásticas. Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea, derivadas de precursores hematopoiéticos, capazes de produzir fatores que podem estimular sua própria formação e atividade. Dessa forma, pode-se afirmar que o tecido ósseo está em constante processo de remodelação através de uma sequência ordenada e complexa de atividades³¹.

Quanto à classificação do tecido ósseo, pode-se citar o osso compacto, zona cortical ou compacta externa, e a zona trabecular ou tecido ósseo esponjoso³². A microarquitetura óssea é constituída da associação dos dois, conferindo uma geometria típica capaz de adaptação funcional e fisiologia necessária para suportar esforços mecânicos externos³³.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de um osso longo³⁴

2.2 Biomateriais e Biocompatibilidade

O termo biomateriais pode ser utilizado para se referir a materiais destinados à aplicações médicas com o objetivo de se obter uma reação (interação) com o sistema biológico. De forma mais ampla, uma definição estabelecida pela *American Society of Metals (ASM)*, define os biomateriais como *“qualquer substância ou combinação de substâncias (que não sejam drogas ou fármacos), de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como o todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo humano”*¹. Com o advento da engenharia de tecidos e o constante aprimoramento da área biomédica, o termo biomateriais encontra-se sujeito à reformulações. Neste contexto, Williams (2009)³⁵, propôs a seguinte definição: *“Biomaterial é uma substância que foi elaborada isoladamente ou como parte de um sistema complexo, para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em humanos ou medicina veterinária.”*

De forma geral, os biomateriais podem ser classificados segundo a sua interação com o tecido circundante⁷ (Tabela 1).

O sucesso do biomaterial depende da reação do organismo à sua implantação. Avalia-se a resposta induzida pelo material e sua degradação em fluidos corpóreos. A baixa resistência à corrosão dos implantes metálicos pode resultar na liberação de íons

metálicos não-compatíveis no organismo, causando reações tóxicas e alérgicas³⁶. Portanto é favorável que os biomateriais metálicos possuam alta resistência à corrosão aumentando a longevidade do material no organismo, assegurando uma osteointegração favorável.

Tabela 1: Classificação dos Biomateriais em relação à resposta do organismo⁷.

Classificação	Resposta do organismo	Exemplos
Materiais Biotoleráveis	Formação de uma fina cápsula de tecido conjuntivo (0,1- 10µm), sem aderência desta cápsula à superfície do implante.	Polimetacrilato de metila (PMMA), Titânio e suas ligas, ligas de Co-Cr.
Materiais Bioativos	Formação de tecido ósseo ao redor do implante e forte interação (ligação química) à superfície do implante.	Biovidros, Compostos à base de fosfatos de cálcio sintéticos incluindo a hidroxiapatita (HA).
Materiais Biorreabsorvíveis	São degradados, solubilizados ou fagocitados após certo período de contato com o tecido. Seus produtos de degradação não são tóxicos e eliminados pelo metabolismo.	Poliácido láctico, polímeros poliglicólicos, fosfato tricálcico (β-TCP).

2.3 Osteointegração

Para que a osteointegração seja considerada efetiva, é necessária a formação óssea envolvendo o implante. Este mecanismo é resultante da modelação e remodelação do tecido ósseo, cuja arquitetura é fundamental na distribuição de carga mecânica. A modelação óssea é uma atividade específica da superfície (aposição ou reabsorção), que produz uma alteração em cadeia no tamanho e ou formato do osso; é um mecanismo fundamental do crescimento. Já a remodelagem pode ser definida como uma modificação ou reestruturação interna do osso previamente existente³⁷.

Os fenômenos químicos e fisiológicos da interface osso/implante são dependentes de fatores como rugosidade e a porosidade da superfície do implante, influenciando significativamente no crescimento ósseo³⁸.

O crescimento circundando a superfície do implante ocorre através de um processo gradual de mineralização. Dessa forma, para que a osteointegração ocorra de forma mais acelerada, os implantes devem induzir respostas positivas das células ao redor do implante e dos tecidos, assegurando a adesão celular³⁹.

A Figura 2 representa um exemplo da cascata de eventos decorrentes da inserção de um implante dental no tecido ósseo dos maxilares.

Figura 2: Representação esquemática dos eventos biológicos decorrentes da implantação de um biomaterial metálico ⁴⁰.

Pelo esquema:

1. Região de contato entre a superfície do implante e do osso, evidenciando que o sítio ósseo nunca é perfeitamente congruente com o formato do implante.
2. Representação de um coágulo.
3. Região óssea danificada por trauma mecânico e térmico decorrente da utilização do motor cirúrgico para perfuração óssea.
4. Osso sadio.
5. Representação do implante.
6. Início do processo de cicatrização.
7. Após o período inicial de cicatrização, o tecido ósseo vital encontra-se em contato direto com o implante, sem que haja um tecido intermediário. A região mais próxima ao implante sofre remodelação óssea devido aplicação de cargas mastigatórias.
8. Em casos de insucesso do implante, um tecido não mineralizado, constituído de fibroblastos é formado entre a superfície do implante e o osso.
9. O desenvolvimento desse tecido conectivo pode ser iniciado devido a trauma excessivo na preparação do sítio ósseo, infecção, aplicação de cargas muito precocemente, antes da formação da matriz mineralizada. Uma vez formado, esse tecido conectivo pode apresentar certo grau de organização, mas não o

suficiente para garantir a ancoragem do implante, devido sua pobre capacidade mecânica e biológica⁴⁰.

Inicialmente, o processo de osteointegração, em termos bioquímicos, é regulado pela interação dos fluidos teciduais com a superfície do implante. Imediatamente após esse contato, é formada na superfície do implante uma camada de macromoléculas glicoprotéicas e água, que será determinante como parte do substrato necessário para adesão, proliferação, diferenciação e síntese proteica de células de fenótipo osteoblástico⁴¹. Na Figura 3 é apresentado um esquema representativo dos fenômenos descritos frente à inserção de um implante de Ti no tecido ósseo.

Figura 3: Representação esquemática dos eventos químicos e celulares na superfície do titânio após sua implantação no tecido ósseo. Em A: Água liga-se à superfície seguindo-se a incorporação de íons hidratados, B: Adsorção de proteínas, C: depois de diferenciação, osteoblastos maduros produzem a matriz extracelular (ECM)⁴¹.

Em paralelo ao processo de reparação do tecido ósseo necrótico remanescente no alvéolo cirúrgico, uma série de eventos bioquímicos é desencadeada, começando com alteração do pH tecidual da região e culminando com a liberação de proteínas e enzimas reguladoras do processo de divisão e diferenciação celular, entre elas os fatores de crescimento e as citocinas⁴².

Em uma segunda etapa, com a presença de tecido de granulação na região entre a base óssea e o implante, tem início um processo de reparação tecidual muito semelhante ao reparo ocorrido em fraturas ósseas, com a deposição de matriz colágena não- calcificada e a consequente formação de matriz fibrosa. Cálcio, fosfato, sódio, magnésio e vários outros componentes minerais do tecido ósseo de origem sistêmica, se agregam gradativamente a essa matriz fibrosa em sítios específicos localizados entre as fibras colágenas, e são os responsáveis pela maturação estrutural do tecido ósseo³¹. Com o aumento gradual da incorporação de componentes inorgânicos à matriz, uma terceira etapa do processo de osteointegração tem início, com o modelamento e o posterior remodelamento dessa cobertura parcialmente mineralizada ao redor do implante. Convém salientar que, a interação dos fatores mecânicos e metabólicos, no controle da remodelagem óssea adulta em humanos, ainda não é bem compreendida. Apesar do motivo exato da resposta sustentada da remodelagem não ser claro, o seu controle fisiológico parece fortemente relacionado à distribuição da tensão mecânica concentrada no osso adjacente à interface (osso/implante)^{43,31}.

Essa terceira etapa é regulada, dentre outros fatores, pela carga funcional recebida e por aspectos sistêmicos do paciente. Os principais componentes responsáveis por esse processo de “plastia” óssea nas regiões adjacentes ao implante são as células que respondem pela formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) óssea. A matriz óssea formada após essa sequência de eventos celulares apresenta em torno de 20 % de água, 45 a 55 % de componentes inorgânicos (cálcio, fosfato, sódio, magnésio, entre outros) e 25 a 35 % de componentes orgânicos (colágeno, glicosaminoglicanas e proteoglicanas)⁴²

É fundamental compreender os eventos biológicos associados à interação dos implantes metálicos no tecido ósseo. Também é crucial conhecer a respeito dos desses materiais metálicos, tais como o titânio e suas ligas, já que são amplamente utilizados em aplicações biomédicas.

2.4 Titânio e suas ligas

Existem relatos de que em 1791, houve a identificação de um elemento metálico, na Inglaterra pelo pesquisador denominado W. Gregor, o qual denominou tal elemento de “menacanita”. Posteriormente, na Alemanha, M.H. Klaproth descobriu um novo metal contido no rutilo que recebeu o nome de titânio. Verificou-se que os elementos descobertos eram o mesmo e por consagração, manteve-se a denominação de titânio⁴⁴.

Titânio puro é um metal branco, brilhante, de boa ductilidade e considerado um elemento de grande abundância na litosfera. Apesar disso, sabe-se que o custo para sua obtenção é considerado alto, em virtude da complexidade dos processos que envolvem sua produção e purificação. Dentre os minérios considerados mais importantes para sua obtenção pode-se citar a ilmenita e o rutilo.⁴⁵ Algumas propriedades físicas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físicas do titânio ⁴⁶

PROPRIEDADE	VALOR
Número atômico	22
Massa atômica (g/mol)	47,9
Densidade (g/cm ³)	4,51
Temperatura de fusão (°C)	1668
Temperatura de ebulição (°C)	3260
Coeficiente de expansão térmica a 20°C (K ⁻¹)	8,4x10 ⁻⁶
Condutividade térmica (W/mK)	19,2
Módulo elástico (GPa)	105

Nas propriedades químicas, destaca-se a alta reatividade do titânio com gases, tais como, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio. Estes elementos dissolvem-se rapidamente no metal líquido, ou sólido acima de aproximadamente ~ 400 °C provocando a perda de ductilidade, ou fragilização do titânio ⁴⁷. As propriedades físicas do titânio tem variações segundo a quantidade de impurezas (Tabela 3)

Tabela 3: Classificação do titânio conforme o grau de impurezas ⁴⁸

Valor Mínimo das Propriedades do Ti, de acordo com o grau de pureza (%)							
Tipo	Limites Máximos de impurezas (%)					Resistência à Tração (MPa)	Alongamento (%)
	N	Fe	O	C	H		
Grau 1	0,03	0,20	0,18	0,10	0,01	240	24
Grau 2	0,03	0,30	0,25	0,10	0,01	340	20
Grau 3	0,05	0,30	0,35	0,10	0,01	450	18
Grau 4	0,05	0,30	0,40	0,10	0,01	550	15

O titânio apresenta alotropia, ou seja, possui estrutura cristalina hexagonal compacta, fase alfa, estável até 882°C; acima desta temperatura há mudança para a estrutura cúbica de corpo centrado, fase beta. O titânio e suas ligas são classificados de acordo com a fase dominante em temperatura ambiente. Elementos de liga como Al, Sn, Ni e Cu estabilizam a fase alfa, enquanto que Mo, V, Zr e Ta tendem a estabilizar a fase β ⁴⁹. A adição de outros metais para a formação de ligas e do processamento termomecânico são a base para o desenvolvimento de uma gama de propriedades. As ligas são classificadas em alfa (α), alfa + beta ($\alpha + \beta$); próxima- β ou beta (β), dependendo da microestrutura à temperatura ambiente⁴⁵.

As ligas Ti-alfa apresentam elevada resistência à corrosão, porém baixa resistência mecânica à temperatura ambiente. As ligas beta possuem alta conformabilidade, endurecem por tratamento térmico e são requeridas quando há necessidade de resistência elevada em temperaturas baixas. As ligas alfa + beta possuem características que somam as propriedades das fases α e β , em que se podem obter qualidades favoráveis dessa combinação como, boa resistência mecânica em qualquer faixa de temperatura acima da ambiente, boas condições de conformabilidade e usinabilidade e boa resistência à corrosão⁵⁰.

A utilização do titânio e suas ligas apresentou um crescimento significativo a partir da década de 70. A liga Ti-6Al-4V de microestrutura ($\alpha + \beta$) é bastante aplicada em próteses ortopédicas, no entanto, a longo prazo, a liberação de alumínio e vanádio no organismo, decorrente do desgaste da prótese, pode acarretar em toxicidade neurológica, assim como desordens do trato respiratório para trabalhadores envolvidos no processamento destes materiais⁵¹.

2.4.1 Ti-13Nb-13Zr

A liga Ti-13Nb-13Zr foi desenvolvida e patenteada por Smith and Nephew Richard Inc., em 1996 e posteriormente padronizada pela ASTM⁵², como um material que pode ser utilizado em dispositivos cirúrgicos. A proposta do desenvolvimento da liga era desenvolver um material com características favoráveis à implantação em meio biológico, sem que os elementos constituintes causassem reação adversa ao organismo⁵³. Dentre as ligas ternárias, a liga Ti-13Nb-13Zr apresenta módulo de elasticidade menor que a liga Ti-6Al-4V, o que pode ser considerado mais favorável por ser mais próximo do módulo elástico da estrutura óssea. Na tabela 4, é apresentado o módulo de elasticidade de diversas ligas de Ti e do osso humano:

Tabela 4: Valores do módulo de elasticidade de ligas de titânio e do osso⁵⁴.

Material	Módulo de Elasticidade (GPa)
Ti-6Al-4V	105
Ti-6Al-7Nb	110
Ti-5Al-2,5Fe	105
Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF)	110
Ti-15Mo-5Zr-3Al	74-85
Ti-15Mo-2,8Nb-3Al	75
Ti-35Nb-5Ta-7Zr	82
Ti-15Mo	55
Ti-16Nb-10Hf	78
Ti-29Nb-4,6Zr	81
Ti-13Nb-13Zr	80
Osso	79
	10-40

A liga Ti-13Nb-13Zr contém, três dos seis elementos (Ti, Nb, Zr, Ta, Pt e Au), que não produzem reações adversas aos sistemas biológicos⁵⁵. Possui 13% em peso de nióbio, um β -estabilizador, que proporciona a redução no módulo de elasticidade aproximando-se ao da estrutura óssea. A adição do Zr também atua como β -estabilizador. A microestrutura é definida pelo controle da precipitação da fase beta no resfriamento, que pode resultar na estrutura martensítica. Isto caracteriza que a liga Ti-13Nb-13Zr é semelhante a uma liga $\alpha+\beta$ ao invés de próxima- β ⁵⁶. Observa-se áreas aciculares, correspondentes a fase alfa na matriz beta⁵⁹ (Figura 4). Comparativamente à liga Ti-6Al-4V, pode ser considerada mais apropriada para a utilização em implantes ortopédicos por apresentar maior resistência à corrosão e maior biocompatibilidade⁵⁷.

Figura 4: Microestrutura da liga Ti-13Nb-13Zr⁵⁸

2.5 Ligas de Titânio obtidas por Metalurgia do Pó

A utilização de metalurgia do pó para a fabricação de implantes cirúrgicos permite, além da obtenção de peças próximas ao formato final (“near-net-shape”), a possibilidade de escolha precisa da composição química do material, com porosidade e geometria controlada. As duas técnicas mais utilizadas para a obtenção de ligas de titânio por metalurgia do pó são: “Prealloyed” (PA) que utiliza pós pré-ligados, obtidos geralmente por atomização, e compactação posterior por prensagem isostática à quente e “Blended elemental” (BE), em que as peças são obtidas pela associação da prensagem isostática a frio e posterior sinterização^{59,60,61}. A técnica PA permite obter peças com excelentes propriedades mecânicas, no entanto, apresenta custo elevado. A alternativa para redução do custo é a utilização da técnica BE. Nesta técnica, a sinterização após a compactação determina a microestrutura e propriedades do material. No processo de sinterização ocorre redução da área e energia superficial das partículas pelo crescimento de pescoços entre as partículas e formação dos contornos de grãos. A consequência é a diminuição da energia de superfície e aumento da densidade do material⁶⁰.

2.6 Rugosidade

A importância dos parâmetros de superfície de um biomaterial está intimamente relacionada ao comportamento deste no meio biológico. Sabe-se que a composição

química, a energia de superfície e a topografia norteiam a resposta biológica frente aos implantes⁶², influenciando no mecanismo de osteointegração.

A rugosidade é uma importante característica de superfície, pois o aumento da área superficial atua no coeficiente de atrito e proporciona a retenção mecânica⁶³. Em escala microscópica, a rugosidade aumenta a possibilidade de contato de sítios para que as células realizem ligações com os tecidos e aumentem a estabilidade mecânica^{64,65}. Relata-se também que o padrão topográfico de rugosidade deve ser controlado porque as células necessitam de pontos de ancoragem na superfície do implante, iniciando a proliferação e garantindo biofixação⁶³. O processo tem início pelo aumento da energia de superfície propiciando aumento da adsorção proteica, migração e proliferação celular óssea culminando na osteointegração⁶⁶.

Para a mensuração da rugosidade existem parâmetros que classificam as heterogeneidades superficiais como ondulações e variações em relação a um perfil. Os três parâmetros mais utilizados são o Ra, Rz e Ry, descritos a seguir⁶⁷:

1- Ra - Representa a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas do perfil efetivo em relação à linha média em um comprimento de amostragem. Não define a forma das irregularidades do perfil e não faz a distinção entre picos e vales⁶⁵.

Figura 5: Representação do parâmetro Rugosidade média (Ra) ⁶⁵

2- Ry – Distância entre o pico mais alto e o vale mais baixo, dentro de um perfil de rugosidade. ⁶⁷ No entanto, uma desvantagem é que o pico mais alto pode estar no começo do perfil analisado, e o vale mais profundo pode estar no final. Isto pode fazer que com ocorra a idéia incorreta sobre o perfil da superfície.

Figura 6: Parâmetro R_y ⁶⁷.

3- R_z – Média das maiores distâncias entre picos e vales mais pronunciados em 5 comprimentos de amostragem ⁶⁷.

Este parâmetro complementa-se ao R_y , para fornecer maiores informações sobre a variação de acabamento superficial. Valores diferentes ao R_y , pode ser indicativo de áreas com defeitos superficiais.

Figura 7: Representação esquemática do parâmetro R_z .

Dos três parâmetros apresentados, o R_a é o mais utilizado, podendo ser empregado no controle das linhas de produção de implantes, dentre os quais, as superfícies usinadas apresentam sulcos bem orientados⁶⁴.

2.7 Tratamentos de superfície

Tratamentos de superfície em implantes podem influenciar várias etapas do desenvolvimento e estabelecimento do processo de osteointegração, tanto na diferenciação das células presentes na interface osso-implante, como no tipo de osteogênese e na quantidade de matriz óssea calcificada depositada na superfície⁶⁸. Pode ser realizada a modificação superficial em implantes biomédicos buscando a melhoria das qualidades funcionais. Tratamentos de superfície no titânio podem aumentar a justaposição óssea e a adesão e migração das células. Entretanto, pouco é conhecido sobre as respostas bioquímicas das células em relação às outras propriedades de superfície, como espessura do óxido, topografia da superfície, ou as mudanças de superfície que podem ocorrer após a de implantação de um biomaterial^{69,70,71}.

A caracterização da superfície modificada é necessária, devido à ampla variedade de tratamentos dos implantes de Ti. Dessa forma, podem-se associar as respostas biológicas ao tipo de tratamento utilizado⁷².

Diversos são os tratamentos que podem ser realizados em titânio e suas ligas para a aplicação biomédica⁷³. A tabela 5 apresenta a classificação de métodos de modificação superficial, seus objetivos e a camada modificada. A tabela divide os métodos de modificação superficial em métodos mecânicos, químicos e físicos. Complementando as informações da tabela para modificação superficial pelo método físico inclui-se a modificação por laser que permite a aquisição de uma superfície com estruturas micrométricas e submicrométricas alterando a rugosidade do material, melhorando a adesão osso-implante. Além disso, a utilização do laser permite a deposição de filmes finos na superfície⁷⁴.

Tabela 5: Tratamentos de superfície no titânio e suas ligas para aplicações biomédicas⁴⁶.

MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL			CAMADA MODIFICADA	OBJETIVOS
Métodos Mecânicos	Usinagem		Superfície lisa ou rugosa do implante	Produzir topografias superficiais específicas; superfície limpa e rugosa; melhorar a adesão osso-implante.
	Polimento			
	Jateamento de Partículas			
	Abrasão			
Métodos Químicos	Ataque Ácido		<10nm de camada óxida	Remover camadas óxidas e contaminações; melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea.
	Alcalino		~1µm de titanato de sódio gel	
	Peróxido de Hidrogênio		~5nm de camada oxida inerte densa e camada exterior porosa	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea
	Sol-gel		~10µm de filme fino, como fosfato de cálcio e TiO ₂	Melhorar a biocompatibilidade. Bioatividade ou condutividade óssea
	Oxidação Anódica		~10nm a 40µm de camada de TiO ₂ , adsorção e incorporação de ânions eletrolíticos	Produzir topografia específica; melhorar a resistência à corrosão; melhorar a biocompatibilidade; bioatividade ou condutividade óssea
	CVD		~1µm de filmes finos de TiN, TiC, TiCN, diamante, diamante-carbono	Melhorar a resistência abrasão e à corrosão e compatibilidade sanguínea
Métodos Físicos	Aspersão Térmica	Flame Spray	~30 a 200 µm de recobrimento de Ti, HA, silicato de cálcio, Al ₂ O ₃ , ZrO ₂ , TiO ₂	Melhorar a resistência à abrasão e à corrosão.
		Plasma Spray		
	HVOF			
	DGUN		~1µm de filmes finos de TiN, TiC, TiCN, diamante, diamante-carbono	Melhorar a resistência à abrasão e à corrosão e compatibilidade sanguínea.
	PVD	Evaporação		
		Íon Plating		
		Sputtering		
	Implantação e deposição iônica		~10nm de camada da superfície modificada e ou µm de filmes finos	Modificar a composição superficial; melhorar a resistência à abrasão e à corrosão e a biocompatibilidade.
	Beam-line íon implantation			
Tratamentos com descarga de Plasma		~1 a 100nm de camada da superfície modificada	Limpeza, esterilização, oxidação, nitretação da superfície; remover camada oxidativa nativa.	

2.7.1 Tratamento ácido

Nos tratamentos ácidos, implantes metálicos são imersos em ácido puro ou em solução, e mantidos por um determinado intervalo de tempo. O objetivo é a remoção de óxidos ou contaminações, para a obtenção de uma superfície limpa e uniforme. Ocorre também a formação de pits, em função do tempo de aplicação, concentração, volume e temperatura do ácido determinando a profundidade destes. Pode-se usar de uma combinação de ácidos para o tratamento de titânio e suas ligas. A utilização de 10-30 vol% de HNO_3 e 1-3 vol% de HF em água destilada para o Tícp, permite a obtenção de superfície relativamente suave, com microtopografia com diferentes orientações, em virtude da variada velocidade de ataque de grãos e sub-grãos^{75,76}. Com isto, favorece a fixação de estruturas de fibrina, promovendo a adesão de células osteogênicas e aposição óssea⁷⁷.

A superfície do titânio possui grande afinidade com o oxigênio, o que leva a formação de uma fina camada de óxido, estável, contínua e aderente. Dentre as estequiometrias existentes, o rutilo (TiO_2) apresenta boas propriedades como resistência ao desgaste, boa biocompatibilidade e excelente desempenho fotocatalítico⁷⁸. A representação do óxido na superfície encontra-se na Figura 8 a. Durante o ataque ácido, como por exemplo, pelo HCl, essa camada é dissolvida e há a formação de TiH_2 . Em contato com o ar uma nova camada de óxido de titânio é formada (Figura 8 b).

Para melhor compreensão do processo químico ocasionado pelo ataque ácido, encontra-se a seguir as formulações decorrentes do ataque de HCl em titânio⁵⁸:

(Durante o ataque ácido em HCl, a camada de óxido se degrada)

(Simultaneamente, o titânio reage com HCl para formar TiCl_3 e H_2 .)

(Formação do TiH_2 presente no esquema da Figura 8b)

Figura 8: Representação esquemática do metal titânio passivado por TiO_2 (a), camadas formadas quando o Ti é submetido a ataque ácido(b) e depois exposto à atmosfera oxidante²⁷.

Para a realização do ataque ácido em titânio, deve ser levado em conta, a sua possível fragilização, ocasionada pela incorporação de hidrogênio ao material, advinda das reações do ácido com o óxido. O resultado são micro-trincas na superfície, podendo reduzir a resistência à fadiga do material. Em implantes dentais pode acarretar na ocorrência de fraturas⁷⁷.

2.7.2 Tratamento alcalino

Tratamentos alcalinos para titânio e suas ligas podem ser utilizados como parte inicial do procedimento de obtenção de superfícies bioativas^{76,77}. Geralmente é utilizada uma solução com uma base forte, no caso o NaOH. Para o titânio, a reação química que ocorre da solução de NaOH com o óxido de presente da superfície é apresentada a seguir:

A camada de óxido de titânio é parcialmente dissolvida na solução alcalina pelo ataque corrosivo do grupo hidroxila. Ocorre a formação de uma camada de titânia amorfa de característica negativa e que contém os íons sódio (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática da superfície de titânio quando submetido a tratamento com solução alcalina de NaOH ⁷⁶

Após essa etapa, o material pode receber tratamento térmico e posteriormente ser imerso em solução simulada de fluídos corpóreos (SBF) para a formação do recobrimento biomimético⁷¹.

2.7.3 Recobrimento biomimético

A técnica de recobrimento biomimético foi desenvolvida por Abe e colaboradores⁷⁹ e consiste na utilização de fluido corporal simulado (SBF), em condições próximas ao plasma humano e temperatura corpórea (36,5°C)⁷⁶, para recobrir diversos tipos de substrato com uma camada à base de fosfatos de cálcio. O experimento de Abe et al., foi colocar uma placa de vidro G bioativo juntamente com o substrato a ser recoberto, a uma distância de ~0,5 mm em solução sintética, durante 7 dias, em condições controladas de temperatura. Observaram a formação de uma camada contínua e homogênea de 1 µm de espessura composta por cristais de apatita muito finos e de aparência fibrosa, alongados, sobre o substrato. A reimersão do material em uma solução 1,5 vezes mais concentrada do que a primeira permite a obtenção de camadas mais espessas.

Diversos são os substratos que podem ser recobertos, como metais e polímeros⁸⁰. O recobrimento biomimético é uma técnica considerada promissora por possibilitar propriedades favoráveis dos fosfatos de cálcio presentes na superfície quando utilizados como implantes em tecido ósseo. Estes compostos possibilitam a bioatividade, característica importante para aplicação biomédica⁸¹. A morfologia dos precipitados está diretamente vinculada ao tipo de material bem como as características de sua superfície, que não pode liberar substâncias inibidoras da nucleação dos compostos à base de fosfatos de cálcio^{82,83}. De modo geral, observa-se que vários parâmetros podem interferir no processo de nucleação destes compostos como, tipo de tratamento prévios realizados no substrato, pH da solução, tempo e natureza de exposição (estático ou dinâmico), além da razão entre a área da amostra/volume da solução.

O SBF pode ser usado para a técnica do recobrimento biomimético, como também, para simular reações de troca iônica entre a superfície do implante e o meio corpóreo. Trabalhos afirmam que a avaliação *in vitro* com SBF pode prever a bioatividade que ocorre *in vivo*^{86,90}. Entretanto comparações entre as duas formas de avaliação não foram descritas na literatura.

2.8 SBF (Simulated Body Fluid)

Hench e colaboradores⁸⁴, em 1971, demonstraram que utilizar um biovidro em SBF ocorre a formação de uma camada rica em SiO_2 e de um filme de fosfato de cálcio em sua superfície, que possibilita a ligação com o tecido ósseo. Posteriormente, no início da década de 90, Kokubo et al⁸⁵, identificaram a camada de fosfato de cálcio formada como sendo apatita cristalina, por Microdifração de Raios X. Constataram ainda que, a formação de apatita “in vivo” na superfície do vidro poderia ser reproduzida em SBF em concentrações semelhantes à do plasma sanguíneo⁸⁶. Além da análise por Difração de Raios X, foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), observando-se que a apatita formada em SBF possui estrutura e composição semelhantes às do osso mineral. Pelos resultados obtidos, foi proposto que a bioatividade óssea de um material poderia ser avaliada pelo exame de formação de apatita em SBF.

Desde a proposta inicial da concentração iônica do SBF por Kokubo et al⁸⁵, a solução foi sendo modificada e aprimorada buscando similaridade ao plasma sanguíneo associado a estabilidade e reprodutibilidade na formação de apatita em materiais sintéticos^{86,87, 88,89}. As diferentes concentrações iônicas das soluções de SBF estudadas e comparadas às concentrações iônicas do plasma sanguíneo estão dispostas na Tabela 6.

Pela Tabela 6, é possível observar mudanças referentes à concentração de compostos como SO_4^{2-} , Cl^- e HCO_3^- , em que a influência na formação do recobrimento biomimético foi avaliada. Após essa análise, o Comitê Técnico ISO-TC150 concluiu que o c-SBF atendia os pré-requisitos, como uma solução com capacidade de formação “in vitro” da apatita em materiais para implante e simuladora do fluido corporal^{86,90}.

Tabela 6: Concentrações iônicas dos SBFs e do Plasma Humano Sangüíneo ⁸⁶.

	Concentração de íons (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²
Plasma humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF Original	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
SBF Corrigido (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
SBF Revisado (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF Melhorado (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Um trabalho que propõe avaliar a influência da variação da concentração iônica do SBF é o de Müller, L. e Müller, F.A.,⁹¹ em 2006. Foram analisados cinco tipos de SBF com composição, em que variou a concentração do HCO₃⁻ (5.0 e 27 mM), a fim de verificar sua influência na formação recobrimento em amostras de Ti, submetidas ao tratamento ácido e alcalino. As conclusões do trabalho foram que mesmo variando a quantidade de bicarbonatos, foi possível simular a parte inorgânica do plasma sanguíneo humano; o grau de supersaturação das soluções indicou que é mais provável ocorrer à formação de apatita contendo carbonato do SBF do que a formação da hidroxiapatita estequiométrica; as análises com difração de raios X da camada precipitada indicaram que a quantidade de HCO₃⁻ em SBF influencia a composição e estrutura dos fosfatos de cálcio obtidos⁹¹.

Aspectos relativos ao SBF

O SBF é uma solução supersaturada em relação a cálcio, fosfato e carbonato^{86,88,90}. Sua preparação deve ser criteriosa para evitar a precipitação durante o processo. Os reagentes utilizados, suas quantidades, bem como a ordem de preparo, preconizados por Kokubo e Takadama⁸⁶ (2006) encontram-se descritos a seguir:

Tabela 7: Seqüência dos reagentes e suas quantidades para o preparo do SBF⁸⁶.

Ordem	Reagentes	SBF(g)
1	NaCl	8.035
2	NaHCO ₃	0,355
3	KCl	0,225
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311
6	HCl -1M	39 ml
7	CaCl ₂	0,292
8	Na ₂ SO ₄	0,072
9	Tris	6,118
10	HCl-1M	0-5 ml

No preparo da solução, após a dissolução de cada reagente em água ultrapura, o pH deve ser próximo de 2 ou 3, que será alterado com a colocação de Tris. A temperatura no preparo deve ser de aproximadamente 36,5°C e o pH será aumentado até 7,4.

A solução de SBF deve ser armazenada em recipiente de polietileno com tampa, e mantida sob refrigeração em temperaturas entre 5° e 10°C, e utilizado em até 30 dias de sua preparação. Preferencialmente, a amostra em SBF, deve ser colocada em posição que evite a precipitação da apatita, mas de forma que proporcione a adsorção de íons em sua superfície⁸⁶. Estes aspectos relacionados à preparação do SBF foram normatizados pela ISO/FDIS 23317⁹².

2.9 Bioatividade em metais

Muitos estudos são realizados para o desenvolvimento da bioatividade do titânio, variando os tratamentos químicos de superfície, previamente à imersão em solução de SBF. Para promover essa bioatividade, é necessário ancorar alguns grupos específicos, responsáveis pela indução da nucleação dos fosfatos de cálcio. Dentre estes grupos, destacam-se as hidroxilas (Ti-OH, Si-OH, Zr-OH, Nb-OH, Ta-OH), carboxílas (-COOH) e os ortorfosfatos H₂PO₄⁹³. Estes grupos funcionais possuem pares de elétrons livres que atraem os íons cálcio da solução formando assim uma camada de cálcio amorfo⁸⁸. O

método mais reportado na literatura é o tratamento alcalino com NaOH^{94,95,96} que reage com o óxido presente na superfície do metal, segundo a Equação 1.

Além do condicionamento alcalino, pode-se realizar tratamento térmico em atmosfera oxidante, para gerar uma camada de titanato de sódio amorfo $\text{Na}_2\text{O-TiO}_2$. Após imersão desse material em SBF, há troca iônica dos íons Na^+ da camada amorfa com os íons H_3O^+ presentes na solução, o que resultando na formação de uma camada de Ti-OH na superfície do titânio, que reage com os íons cálcio da solução, formando um composto de cálcio amorfo. Este, ao reagir com os íons fósforo e carbonato da solução resultam na formação de camada de apatita²⁷. O processo encontra-se esquematizado na Figura a seguir:

Figura 10: Representação esquemática da formação da apatita em titânio tratado com NaOH e submetido ao tratamento térmico⁹⁷.

Um exemplo do processo de formação da apatita pode ser observado na micrografia (Figura 11) do estudo de Gil et al.⁹⁸ Os autores inicialmente condicionaram a superfície de titânio em tratamento alcalino (0,5 M NaOH a 60°C por 24 h) e subsequente submeteram a tratamento térmico a 600°C/1 hora, com taxa de aquecimento de 5°C/min. O início da formação do composto de fosfato de cálcio foi observada, após a imersão em SBF.

Figura 11: Início da formação de apatita após três dias de imersão em SBF ⁹⁸

Além do aspecto morfológico do recobrimento observado por MEV, pode-se analisar a espessura da camada formada em corte transversal⁸⁵, como mostrado na Figura 12.

Figura 12: Micrografia de superfície do titânio (esquerda); seção transversal da camada de apatita formada em SBF após tratamento com solução de NaOH e tratamento térmico

⁸⁶

Sabe-se que quando o tratamento térmico é realizado em uma faixa entre 400°C e 600°C, um recobrimento com apatitas de baixa cristalinidade semelhantes às biológicas é originado. Em temperaturas maiores, a apatita apresenta-se mais cristalina⁹⁹.

Um aspecto interessante é a influência da liberação de íons Na^+ na superfície do titânio submetido ao tratamento alcalino. Os íons Na^+ aumentam a supersaturação da apatita em solução de SBF, por aumento do pH. Porém, em meio corpóreo, o aumento

destes íons aumentaria a alcalinidade da região do implante e conseqüentemente, uma resposta inflamatória que poderia levar à morte celular. Por este fato, Jonasova et al.²⁷, avaliaram este comportamento *in vitro* e verificaram que a taxa de formação da apatita não é significativamente influenciada pela menor quantidade de Na^+ na superfície. Concluíram ser um fator positivo para implantes com menor quantidade deste íon para evitar exacerbada reação inflamatória.

Um estudo que propõe uma nova metodologia para obtenção da bioatividade em metais é o de Kizuki et al.¹⁰⁰. Os autores obtiveram uma superfície bioativa enriquecida por íons cálcio, com alta aderência da camada de apatita ao substrato. Observaram também maior estabilidade da camada, mesmo quando a amostra era armazenada em ambiente úmido. Foi estudado o efeito químico das superfícies do titânio expostas a diferentes tratamentos em SBF, a Figura 13 mostra micrografias dos procedimentos avaliados. No titânio somente tratado em solução alcalina a 5M de NaOH, foi evidenciada baixa habilidade de formação de apatita (Figura 13 a) . Após o tratamento térmico a 600°C, por uma hora, é visível o aumento desta capacidade (Figura 13 b). Amostras submetidas ao tratamento alcalino, com NaOH, e posterior imersão em solução de CaCl_2 (100mM), mostraram habilidade ligeiramente maior para formação de apatita quando comparada ao tratamento somente com NaOH. Foi evidenciado que ocorre uma incorporação de íons cálcio na superfície por substituição aos íons Na^+ , formando assim o hidrogel titanato de cálcio (Figura 13 c). No entanto este tratamento mostrou apenas uma ligeira habilidade na formação de apatita e uma baixa resistência da aderência da camada. Submetendo-se estas amostras ao tratamento térmico prévio à imersão em SBF, foi mostrado que a superfície adquire alta aderência da camada formada ao substrato, porém uma taxa muito baixa de incorporação de apatita (Figura 13 d). Este fato foi atribuído a baixa mobilidade dos íons cálcio do titanato de cálcio após o tratamento térmico. A capacidade de formação de apatita só foi aumentada com subsequente tratamento em água quente ultra-pura a 80°C ou em autoclave a 121 °C por 0,5h (Figura 13 e/f). Isto indicou que parte dos íons cálcio, do titanato de cálcio, foi substituído por íons H_3O^+ , que possuem maior mobilidade na estrutura cristalina do óxido. Portanto, espera-se que os íons Ca^{2+} possam migrar facilmente na estrutura de cristal, quando os íons Ca^{2+} são parcialmente substituídos por íons H_3O^+ . É esperado¹⁰⁰ que em SBF os íons Ca^{2+} , do titanato de cálcio, sejam liberados por troca com H_3O^+ ao redor do fluido. Isto propicia a formação de grupos Ti-OH negativos na superfície que se combinam com os íons Ca^{+2} presentes no SBF. Além do aumento da habilidade de formação da apatita, este tratamento possibilita alta resistência ao risco e armazenamento mesmo em ambiente úmido.

Figura 13: Micrografias das superfícies do titânio submetidas aos diversos tipos de tratamentos ¹⁰⁰.

O estudo desenvolvido por Takemoto et al.¹⁰¹ compara três tipos de tratamentos de superfície no titânio poroso comercial cedido pela empresa Kobe Steel Ltd., quanto a eficácia da osteoindutividade em cães. Um grupo de implantes foi submetido ao tratamento alcalino com NaOH e posterior tratamento térmico (grupo AH). Um segundo grupo de amostras, foi submetido ao tratamento alcalino, água quente e tratamento térmico (grupo Water-AH). Já um terceiro grupo, foi submetido ao tratamento alcalino, ataque com HCl, água quente e posterior tratamento térmico (grupo HCl-AH). O primeiro grupo corresponde ao denominado tratamento convencional para a bioatividade do titânio. O segundo grupo, que utiliza a água quente após tratamento alcalino para remoção do sódio e subsequente tratamento térmico, demonstrou-se mais eficaz na bioatividade ¹⁰². O terceiro grupo com a utilização do HCl após ao tratamento alcalino, se justifica pela intenção de remover o sódio dos poros do titânio, uma vez que apenas o acréscimo do tratamento com água quente não seria suficiente para intermear na

estrutura porosa e tridimensional. Na Figura abaixo, é evidenciado o desempenho dos três grupos avaliados quando imersos em SBF:

Figura 14: Micrografias das superfícies dos implantes submetidos ao SBF por 1,3 e 7 dias após diferentes tratamentos superficiais ¹⁰¹.

Na Figura 14 observa-se no terceiro grupo (tratamento alcalino, ataque com HCl, água quente e posterior tratamento térmico), a formação de esferulitas de maior tamanho após 1 dia de imersão em SBF, com relação aos outros grupos. Verifica-se também que o segundo grupo, no tempo 3 dias em SBF há maior quantidade de esferulitas. E todos os grupos estavam recobertos de apatita no 7º dia de imersão em SBF¹⁰¹. Com relação a osteoindutividade, o terceiro grupo se destacou no tempo de 3 meses do pós-operatório (Figura 15).

Figura 15: Lâminas histológicas relativas às amostras dos três grupos após 3 meses pós-operatório para implantação em músculo de cães, barra de aumento - A,C e E (1mm) e B, D e F (100µm)¹⁰¹.

O primeiro grupo visualizado em A e B (Figura 15), não apresenta nenhuma formação óssea, apenas alguma invasão vascular. O segundo grupo Water-AH, (Figura 15 C e D), apresenta uma pequena indicativo da formação de tecido ósseo, pela presença de compostos de cálcio e fósforo comprovados por EDS. Já o terceiro grupo HCl- AH, (Figura 15 E e F), apresenta formação óssea com visualização de osteócitos. Este trabalho da literatura conclui que a utilização do tratamento com HCl foi efetivo na remoção de sódio da camada de titanato de sódio em titânio submetido ao tratamento alcalino e com isso contribuiu para formação da camada de titânia na superfície do titânio poroso bioativo. O grupo que recebeu o tratamento exibiu melhor osteoindutividade no crescimento de osso ectópico.

Com relação ao estudo envolvendo a liga Ti-13Nb-13Zr com modificações superficiais, Müller et al.⁵⁸, em 2007, realizaram tratamento químico de superfície para a liga para iniciar a formação de hidroxiapatita carbonatada (HCA) durante teste bioativo “in vitro” em fluido de corpo simulado (SBF). Para isso, foram confeccionadas amostras, por

metalurgia do pó, estas foram atacadas em meio ácido divididos em grupos de HCl, de H_3PO_4 e por uma mistura de $\text{HF} + \text{HNO}_3$. Todos os grupos após o ataque ácido foram imersas em solução de NaOH. Foram utilizadas técnicas de MEV, EDS, FTIR. A liga sinterizada apresentou microestrutura de Widmannstätten ($\alpha+\beta$). As amostras atacadas em HCl e H_3PO_4 , após uma semana em SBF, mostram a formação de HCA em suas superfícies, porém, nas amostras tratadas com $\text{HF}+\text{HNO}_3$, não houve essa formação. Após duas semanas em SBF, a taxa de formação de HCA aumentou em todos os grupos, sendo a maior taxa para as amostras tratadas com HCl, seguidas das amostras tratadas por H_3PO_4 e das amostras atacadas pela mistura de $\text{HF}+\text{HNO}_3$. Uma vez que a formação de HCA “in vitro” em SBF geralmente é aceita como característica típica de material bioativo, o trabalho pressupõe que o ataque com HCl, com subsequente tratamento com NaOH, aumenta a habilidade de união da liga Ti-13Nb-13Zr ao osso in vivo.

OBJETIVOS

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

3.OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral:

- Comparar as respostas da avaliação in vitro (recobrimento biomimético) e in vivo (utilizando coelhos como modelo animal) de amostras de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por metalurgia do pó e submetidas a diferentes tratamentos superficiais, visando selecionar tratamentos superficiais efetivos para o mecanismo de osteointegração.

Os objetivos específicos são:

- Obtenção de amostras sinterizadas de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr por metalurgia do pó (M/P), tecnologia que permite a aquisição de peças “near net shape” com presença de rugosidade típica da técnica e porosidade controlada;
- Análise da influência da superfície de amostras obtidas por metalurgia do pó e de amostras laminadas de Ticp, com os diversos tratamentos superficiais e a formação do recobrimento biomimético;
- Avaliação “in vivo” da osteointegração de implantes, com e sem tratamentos de superfície, utilizando marcadores fluorocromáticos para avaliação das fases da osteointegração e análise da histomorfologia através de lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE).

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho envolve os materiais e técnicas para obtenção do Ticp e liga Ti-13Nb-13Zr. Apresentam-se os diferentes tratamentos de superfície utilizados no estudo. As caracterizações dos ensaios *in vitro* e *in vivo* são descritos detalhadamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o processamento (incluindo caracterização física) para a obtenção de amostras de Ticp e liga Ti-13Nb-13Zr. Para o estudo *in vitro*, as amostras de Ticp e da liga, obtidas por metalurgia do pó, e as amostras comerciais de Ticp laminado foram submetidos a quatro tipos de tratamentos superficiais, posteriormente imersas em SBF e avaliadas em intervalos de 1 a 21 dias. Esta avaliação permite comparar os tratamentos superficiais quanto à formação do recobrimento biomimético, simulando as trocas iônicas entre a superfície metálica e o fluido corpóreo. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados implantes de Ticp e liga Ti-13Nb-13Zr obtidos por metalurgia do pó com e sem tratamentos de superfície, das quais avaliou-se a resposta tecidual óssea frente a estes implantes.

4.1 Caracterização do material particulado

Para a obtenção das amostras e implantes de Ticp sinterizados foi utilizado hidreto de Ti na forma de particulada (TiH_2 , Brats). A caracterização deste pó foi realizada por: difração de Raios-X (DRX) (DMAX 2000, Rigaku) com radiação Cu-K α . Para a liga Ti-13Nb-13Zr, utilizou-se a mistura dos pós metálicos de Ti (268496, Sigma-Aldrich), Nb (262722, Sigma-Aldrich) e Zr (403296, Sigma-Aldrich). O hidreto de Ti e os pós metálicos foram caracterizados quanto a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Philips XL 30), distribuição granulométrica (CILAS granulometer – modelo 1064) e difração de Raios X (DRX) (DMAX 2000, Rigaku).

4.2 Obtenção das amostras e implantes de Ticp e da liga

O processamento por metalurgia do pó foi realizado com utilização de moldes de silicone contendo o pó de TiH_2 , ou a mistura de pós metálicos, compactados com pressão isostática a 200 MPa. As amostras foram retiradas do molde, com densidade à verde e sinterizados em forno de alto vácuo com elemento resistivo de tungstênio, ou em forno tubular com sistema de vácuo acoplado. A sinterização para as amostras de Ticp foi a 1400°C/1hora de patamar e taxa de aquecimento de 10°C/min, para a liga foi a 1300°C/3 horas com a mesma taxa de aquecimento. As amostras foram obtidas no formato

cilíndrico com dimensões aproximadas de 3 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento para os testes *in vivo*.

Foram utilizadas também placas comerciais retangulares de Ti retificadas (NAS Titânio) de dimensões aproximadas (0,5x0,5x1,5mm) para realização da comparação da formação do recobrimento biomimético em SBF com a superfície obtida por M/P (avaliação *in vitro*).

4.3 Caracterização Física

As amostras sinterizadas e as amostras de Ti retificadas foram caracterizadas quanto a densidade hidrostática (ρ), método de Archimedes; morfologia, por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30); fases cristalinas, por difração de raios X (DMAX 2000, Rigaku) e rugosidade (determinação dos parâmetros R_a e R_y (SJ-201, Mitutoyo).

4.4 Tratamentos de superfície

Os tratamentos de superfície utilizados no estudo foram realizados nas amostras obtidas por M/P (Ti e liga) e nas amostras de Ti laminadas. Estas amostras foram retificadas, previamente a limpeza e foram lixadas com carbeto de silício (#600) nas superfícies de corte para a regularização e padronização da rugosidade. Todas as amostras foram lavadas em acetona, 2-propanol e água ultrapura em ultrassom por 30 min, nessa sequência¹⁰¹. As amostras foram divididas em grupos segundo o tipo de tratamento superficial. A seguir, estão listados os tratamentos utilizados:

- ✓ **Tratamento padrão (TP):** as amostras foram submersas em solução de NaOH a 5M, a 60° C por 24 h²⁵.
- ✓ **Primeiro tratamento (1T):** após o tratamento padrão, as amostras foram lavadas em água ultrapura e receberam tratamento térmico a 600°C, por uma hora, em atmosfera oxidante (O₂), com taxa de aquecimento de 5° C/min¹⁹.
- ✓ **Segundo tratamento (2T):** as amostras receberam tratamento químico em HCl a 37% a 50° C, por 45 min, sendo depois lavadas em água ultrapura e submetidas ao tratamento padrão⁵⁸.
- ✓ **Terceiro tratamento (3T):** as amostras foram submetidas ao tratamento padrão, lavadas com água ultrapura e imersas em solução aquosa de 0,1M CaCl₂ a 40° C, por 24 h. A etapa seguinte incluiu novamente em lavagem com água ultrapura e tratamento térmico a 600° C, por uma hora, com taxa de aquecimento de 5°C/min,

em atmosfera oxidante (O_2). Finalmente, as amostras foram imersas em água destilada e deionizada a $80^\circ C$, por 24 horas¹⁰⁰.

Após os tratamentos superficiais, as amostras foram lavadas com água ultrapura e secas em estufa a $40^\circ C$.

4.5 Ensaio “in vitro”- Recobrimento biomimético

As amostras dos grupos descritos anteriormente foram acondicionadas em frascos de polipropileno contendo SBF, mantidas em equipamento Shaker, com sistema de agitação ajustado a 65 rpm e temperatura fixa de $\sim 36,5^\circ C$. As soluções foram renovadas a cada 3 dias e amostras retiradas do SBF nos tempos: 1, 3, 6, 9, 15 e 21 dias. A concentração iônica ($mmol.dm^{-3}$) do SBF utilizada para a avaliação da bioatividade das amostras, é apresentada na tabela 8, comparativamente com o plasma sanguíneo:

Tabela 8: Comparação da concentração iônica ($mmol.dm^{-3}$) do SBF e do plasma sanguíneo.

	Na^+	K^+	Ca^{+2}	Mg^{+2}	HCO_3^{-2}	Cl^-	HPO_4^{-2}	SO_4^{-2}
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	4,2	147,8	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,5

Para o preparo do SBF são necessários reagentes analíticos e as respectivas massas são apresentadas na tabela 9:

Tabela 9: Reagentes analíticos (A) e massa (em gramas (B)) para o preparo do SBF.

A	B
NaCl	7,9946
NaHCO ₃	0,3528
KCl	0,2236
K ₂ HPO ₄	0,1742
Na ₂ SO ₄	0,0701
HCl	10mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3676
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,3050
Tris	pH 7,25

O preparo do SBF é dividido em etapas, sendo que a primeira consiste na obtenção de uma solução com metade do volume final, contendo os primeiros cinco sais e o ácido clorídrico (0,1M). Os componentes são adicionados na ordem apresentada na tabela 10, em água deionizada, com agitação constante e a temperatura de 36,5°C. Dessa forma, evita-se a precipitação de sais, garantindo a dissolução completa dos componentes. A segunda etapa compreende a preparação de uma solução contendo os dois últimos sais em um volume de ~ 100 mL de água deionizada, mantendo a condição já relatada de temperatura e pH, conforme Rigo et al, 2004¹⁰³. As duas soluções preparadas são misturadas e adicionado o tris-metilaminometano (NH₂C(CH₂OH)₃ a 0,05M, até que se atinja um pH de 7,25, e ajustado a 36,5°C, em um volume de 1 litro. Para conservação da solução, esta deve ser guardada em frasco de polietileno e mantida em geladeira, tendo uma vida útil de até 30 dias.

4.5.1 Caracterização do recobrimento biomimético

As amostras foram caracterizadas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS) para a análise da morfologia do recobrimento e, em corte transversal, para avaliação da espessura da camada, além de espectroscopia de infravermelho por reflectância difusa (DRIFT) para determinação dos grupos funcionais existentes.

4.6 Ensaios *in vivo*

Foram utilizados implantes cilíndricos da liga Ti-13Nb-13Zr e de Tícp, obtidos por metalurgia do pó, que receberam os tratamentos de superfície descritos na metodologia. Foi incluído também o grupo controle de Tícp e da liga, sem tratamento de superfície. Os implantes foram identificados, acondicionados individualmente e esterilizados a uma dose de 25 kGy por meio de radiação gama (Co60, Gammacell modelo 220 do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares).

Dez coelhos da raça *New Zealand*, adultos, machos, com peso médio de 2,5 Kg (4 meses de idade), foram designados como modelo animal neste estudo. Os animais foram alojados no biotério do IPEN, em sala climatizada com temperatura de ~22 °C. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas individuais dentro de estantes ventiladas e tratados com dieta à base de ração seca irradiada apropriada para coelhos e água *ad libitum*. A experimentação animal seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo estes princípios e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN (Parecer – Projeto nº 69/10)(Anexo I).

Como medicação anestésica para realizar o procedimento cirúrgico, foram administrados, por via intramuscular: Quetamina (30-50mg/kg) + Xilazina (5mg/kg). O efeito anestésico para finalidade cirúrgica foi de 20 a 30 minutos e a duração da anestesia, tempo em que o animal permaneceu sedado foi de ~120 minutos, após o acompanhamento e medicações pós-cirúrgicas o animal foi mantido em sua respectiva gaiola. O anestésico local administrado na área cirúrgica foi o Cloridrato de lidocaína sem vaso constritor a 3%, em tubetes de 1,8mL. Após a cirurgia foi administrado em dose única Pentabiótico® (princípio ativo: Benzilpenicilina benzatina + Benzilpenicilina procaína + Benzilpenicilina potássica + Diidroestreptomicina base (sulfato) + Estreptomicina base (sulfato)) intramuscular (1 mL/animal) e três doses consecutivas de 24 em 24 horas de Cloridrato de Tramadol (3mg/kg) com a finalidade de promover analgesia e Cetoprofeno (3mg/kg) para ação anti-inflamatória, diminuindo o estresse e a dor pós-cirurgia, melhorando o bem-estar dos animais.

Para a cirurgia a região da tíbia dos animais foi tricotomizada e realizada a anti-sepsia com gluconato de clorhexidina a 2% e iodopovidona. A incisão foi realizada nos tecidos moles, com cabo de bisturi (nº 3) munido de lâmina 15, de forma que a incisão fosse retilínea de movimento único, paralelamente ao longo eixo da porção medial da tíbia. O descolamento do perióstio foi realizado com objetivo de proporcionar acesso e

visão à área operatória. A localização do leito cirúrgico foi na porção medial da tíbia, na região epifisária.

O leito de inserção dos implantes foi preparado com a utilização de trefinas (Φ 3 mm) acopladas a contra-ângulo com redução de 16:1, movido por motor elétrico com velocidade de 454 rpm e 55 N.cm de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%)¹⁰⁴. Após a instalação dos implantes, o periósteo foi suturado com fios de sutura mononylon 5.0 com ponto simples contínuo, a pele foi suturada com ponto em “U” (imbricação lateral) contínuo. Após a sutura da pele, a mesma foi limpa com anti-séptico e a região da sutura recebeu pomada Nebacetin® (princípio ativo: sulfato de neomicina e bacitracina) e bandagem protetora com micropore.

A duração da experimentação *in vivo* foi de 7 semanas para a avaliação do processo de osteointegração dos implantes. Com o objetivo de determinar o processo de formação óssea, foram aplicados marcadores ósseos fluorocromáticos. Cada marcador foi administrado (subcutaneamente) uma vez por semana durante duas semanas consecutivas, com início no 7º dia pós-operatório, na sequência: Tetraciclina (60mg/kg), Alizarina (30mg/Kg) e Calceína (10mg/Kg). Totalizando 49 dias de experimentação até a eutanásia dos animais. Os marcadores celulares ósseos apresentam-se na forma de pó, necessitando de diluição. Os pós são pesados em balança de precisão e diluídos em 1 mL de soro fisiológico com 2mg de Na_2HPO_4 .

Os animais foram eutanasiados seguindo a sequência: anestesia geral do animal em plano profundo (Quetamina 30-50mg/kg + Xilazina 10mg/kg), injeção intravenosa de cloreto de potássio ou pentobarbital (30mg/kg).

4.6.1 Obtenção e análise das lâminas histológicas

Os tecidos moles foram dissecados e os conjuntos contendo osso e implante, foram removidos, com o auxílio de disco diamantado e micromotor elétrico, e foram mantidos imersos em solução de formol a 4%, por pelo menos 30 dias. O procedimento de inclusão das amostras segue o protocolo da Resina Technovit® 9100 NEU até a etapa de obtenção das lâminas (Anexo II).

Para a etapa de obtenção das lâminas histológicas, o conjunto osso-implante embutido em resina, foi fixado em uma máquina de corte (Isomet 2000) de forma que o disco diamantado ficasse posicionado transversalmente ao longo eixo do osso. Nos cortes obtidos, foi possível observar o longo eixo do implante e a transversal óssea,

permitindo uma visão geral da superfície e da interface osso/implante, área importante na avaliação da resposta tecidual frente aos tratamentos superficiais realizados. A representação do corte está presente na Figura 16.

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

Figura 16. Representação esquemática do corte histológico¹⁰⁴.

As lâminas histológicas, sem coloração, foram analisadas por microscopia de fluorescência. Cada imagem foi obtida em coloração monocromática com três diferentes filtros: D, N2.1 e I3, para os marcadores ósseos tetraciclina, alizarina e calceína, respectivamente. As imagens foram captadas no microscópio Leica DM2500 com câmera digital acoplada Leica DFC310FX em tons de cinza, monocromático. A análise qualitativa procedeu-se com a sobreposição das imagens obtidas individualmente para cada filtro, no programa ImagePro Plus 6.1, cada imagem foi colorida com a cor verde representando a calceína, vermelho representando a alizarina e o azul representando a tetraciclina. A presença das cores amarela, magenta, ciano e branco são resultantes da combinação das cores primárias atribuídas a cada filtro usado, sendo o amarelo da combinação de verde e vermelho, o magenta, combinação de vermelho e azul, o ciano da combinação de azul e verde, o branco é relativo à combinação das três cores primárias, vermelho, verde e azul.

Além da análise pela técnica da fluorescência nas lâminas histológicas, a interface osso/implante foi observada em MEV e os elementos cálcio e fósforo foram identificados

pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), conforme exemplificado na Figura 17.

A histomorfologia foi realizada a partir da análise da coloração das lâminas de Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo III). Para esta análise foi realizada a descalcificação do tecido e a remoção dos implantes.

Figura 17: Exemplo de análise em MEV com EDS para a lâmina histológica com o implante da liga Ti-13Nb-13Zr submetida ao 3º tratamento. Micrografia do implante com o tecido ósseo, imagem obtida com elétrons retroespalhados (a), mapeamento evidenciando os elementos Ti e Ca (b), mapeamento do elemento Ca, em azul (c), mapeamento do elemento Ti, em verde (d).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados deste estudo acompanhados da argumentação. A ordem de apresentação segue a seguinte sequência: caracterização dos pós de partida; das amostras sinterizadas e da amostra comercial de Ti utilizada como comparativo; avaliação dos tratamentos de superfície empregados nas amostras, avaliação dos recobrimentos obtidos utilizando imersão em SBF das amostras com diferentes tratamentos (teste *in vitro*); caracterização da osteointegração dos implantes com os diversos tratamentos de superfície após testes *in vivo* utilizando coelhos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do material particulado

Para obtenção das amostras de Ticp por M/P, foi utilizado pó hidreto de Ti. Este pó apresenta partículas de formato angular, como é observado na Figura 18a. O diâmetro médio de partícula foi de 92 μm . Por difratometria de raios X, observam-se apenas as fases cristalinas de Ti (ICDD: 89-5009) e TiH_2 (ICDD: 9-0371), (Figura 18b).

Figura 18: Morfologia do pó de partida (a) e espectro de difração de raios X do pó de titânio hidretado (b).

Para obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr por M/P foram utilizados pós metálicos de titânio (Ticp), nióbio (Nb) e zircônio (Zr) e caracterizados quanto à morfologia, distribuição granulométrica e difração de raios X. O titânio particulado apresenta diâmetro médio de 120 μm , com morfologia irregular (Figura 19). O pó de nióbio possui diâmetro médio de 36 μm e além da morfologia irregular, evidenciou-se a presença de partículas pontiagudas (Figura 20). O zircônio é o pó metálico com menor tamanho de partícula (5,5 μm), e aspecto morfológico mais uniforme e arredondado. Este pó vem do fabricante em meio líquido devido à alta reatividade (Figura 21).

Figura 19: Pó de Ti: MEV mostrando morfologia irregular (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina hexagonal compacta foi observada (b).

Figura 20: Pó de Nb: MEV mostrando a morfologia irregular com partículas pontiagudas (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina cúbica de corpo centrado foi observada (b).

Figura 21: Pó do Zr: MEV mostrando a morfologia arredondada e uniforme (a); espectro de difração de raios X, apenas a fase cristalina hexagonal compacta foi observada (b).

A caracterização do material particulado é muito importante para o processo de metalurgia do pó, já que a morfologia e a granulometria influenciam na compactação,

densificação e homogeneidade das amostras sinterizadas. Estes parâmetros influenciam não apenas a sinterização e homogeneização, mas também o padrão topográfico do material. Este aspecto repercute na energia de superfície e na interação com o fluido corporal quando utilizados como implantes em tecido ósseo.

5.2 Caracterização das amostras sinterizadas e da amostra comercial

Foi realizado um estudo inicial para definir os melhores parâmetros de densificação para o Ticp, e de densificação e homogeneização para a liga Ti-13Nb-13Zr. Para a obtenção de amostras de Ticp com alta densidade, pela técnica de metalurgia do pó, foram realizadas sinterizações de amostras a 1300°C, 1400°C e 1500°C com uma hora de patamar. Nessas amostras, a densidade foi medida e a microestrutura observada em microscópio óptico. Buscava-se valor de densidade mais próximo à densidade teórica do Ticp e tamanho de grãos não muito elevado. O padrão de sinterização que melhor atendeu aos requisitos foi a sinterização de amostras a 1400°C/1hora de patamar. As amostras de Ticp utilizadas neste estudo, foram sinterizadas seguindo esse padrão e caracterizadas por DRX, em que apenas a fase $Ti\alpha$ foi identificada (Figura 22 b). A densidade foi de $\sim 3,98 \text{ g/cm}^3$, correspondendo a 88% da densidade teórica do titânio. Por micrografia óptica foi possível observar os contornos de grãos e a porosidade residual (Figura 22 a).

Figura 22: Micrografia óptica (a) e DRX do Ticp (b) de amostras obtidas por M/P.

Para a liga, foi utilizada a sinterização a 1300°C, com 3 horas de patamar, condição que permitiu a completa dissolução dos elementos constituintes, com boa homogeneidade estrutural. As amostras apresentaram densidade de $\sim 4,42 \text{ g/cm}^3$ (88%

da densidade teórica da liga) e a presença das fases α e β do titânio caracterizadas por DRX. Para evidênciação da microestrutura da liga Ti-13Nb-13Zr foi realizado o polimento da amostra e submetido a ataque ácido em solução de Kroll (1mLHF: 3mL HNO₃: 50mL H₂O) por 30s. A estrutura típica de Widdmanstatten (fases α e β) foi observada por MEV, sendo a fase α , em formato acicular contida em matriz β (Figura 23).

Figura 23: MEV de amostra polida e atacada por solução de Kroll da liga (a) e DRX evidenciando as fases $Ti\alpha$ e $Ti\beta$ (b).

A placa de Ti laminada foi caracterizada por DRX, tendo apresentado apenas os picos referentes ao $Ti\alpha$ (Figura 24). A densidade destas amostras foi $\sim 4,42 \text{ g/cm}^3$ correspondente a 98% da densidade teórica, com a alta densidade, como esperado para um material laminado.

Figura 24: DRX da placa de comercial laminada de Ti.

As amostras processadas por M/P ($Ti\alpha$ e liga) possuem uma superfície característica dessa tecnologia, isto é, bastante irregular. As diferenças entre as

superfícies da amostra laminada e amostras sinterizadas podem ser observadas na Figura 25.

Figura 25: Aspecto morfológico da amostra de Ticp obtida por M/P (a), da liga (b) e da placa de Ti laminada (c).

Para a diferenciação do perfil topográfico das amostras utilizadas no estudo, realizou-se a medição dos parâmetros de rugosidade R_a e R_y , constatando-se que a liga Ti-13Nb-13Zr ($R_a = 6,2\mu\text{m} \pm 0,3$) obteve valores de rugosidade maiores que o Ticp ($R_a = 5,7\mu\text{m} \pm 1,1$) processado por M/P. Esta diferença pode ser atribuída aos diferentes tamanhos de partículas constituintes da liga que pode ter repercutido num perfil topográfico mais rugoso. A placa comercial de Ti obteve baixos valores ($R_a = 1\mu\text{m}$), conforme esperado para um material laminado. Os aspectos relativos à influência da rugosidade para estas amostras serão discutidos e comparados juntamente com os valores de rugosidade obtidos após os quatro diferentes tratamentos de superfície.

5.3 Tratamentos de superfície

Amostras de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por M/P, e a placa de laminada de Ticp foram submetidas aos tratamentos de superfície descritos na metodologia. No tratamento padrão (TP) que consiste em condicionamento alcalino com solução de NaOH (5M), observa-se para o Ticp obtida por M/P, a presença de estruturas em formato agulhado (Figura 26a). Estas estruturas dão a impressão de estarem “fincadas” na matriz metálica (Figura 26b). Pela análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), constata-se a presença do elemento sódio (Figura 26c), indicativo da formação do gel de titanato de sódio. Este aspecto morfológico na superfície do Ticp também foi observado em outros estudos referentes ao condicionamento da superfície em solução de NaOH^{15,12,96}. Para a liga Ti-13Nb-13Zr e o Ticp laminado não é observado um padrão similar. Para as duas superfícies são observados precipitados dispersos na superfície metálica (Figuras 26d, e, g e h). Embora a morfologia seja diferente no Ticp obtido por

M/P, constata-se por EDS que tanto a superfície laminada de Ticp, quanto a liga contem em sua composição o elemento sódio (Figuras 26f e 26i), comprovando a efetividade do tratamento alcalino..

O tratamento alcalino (TP) também acarreta na mudança de reatividade da superfície condicionada do titânio, que passa de uma característica hidrofóbica (sem condicionamento) para uma superfície hidrofílica causada pela ancoragem de grupamentos hidroxila. Estes grupamentos estão relacionados a um aumento da afinidade celular e promoção da adesão na superfície do metal^{19,105}.

Figura 26: Micrografias da superfície das amostras condicionadas em tratamento padrão; Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), (e) e EDS da região (f) e placa laminada (g), (h) e EDS da região (i).

No primeiro tratamento (1T), as amostras foram submetidas a tratamento térmico (600°C/1h) após o tratamento alcalino. O tratamento térmico tem como finalidade converter a camada amorfa de hidrogel titanato de sódio, formada durante o ataque

alcalino em titanato de sódio cristalino, conferindo maior estabilidade para esta camada^{15,79,106,107}. O aspecto das superfícies das amostras condicionadas ao primeiro tratamento (1T), pode ser observado na Figura 27. O Ticp obtido por metalurgia do pó apresenta estruturas aciculares, diferindo do aspecto observado na superfície submetida apenas ao tratamento alcalino (Figura 26 a). Podem-se notar estruturas arredondadas recobrimdo a superfície (Figura 27b). Para a liga, o aspecto da superfície condicionada mostra-se texturizada em toda superfície (Figuras 27d e 27e). Na placa laminada, da mesma forma encontrada no tratamento padrão, apenas são verificadas pequenas regiões com geometria irregular (Figuras 27g e 27h). Pela técnica de EDS, foi observada a presença do elemento sódio em todas as amostras condicionadas (Figuras 27c, 27f e 27 i) e também os componentes da matriz (Ti e Ti, Nb e Zr para a liga).

O segundo tratamento (2T) inclui a utilização de HCl a 37% inicialmente e posterior tratamento alcalino. O ácido provoca a formação de micro-trincas, fator que pode fragilizar a estrutura. Por este motivo, o tempo de imersão deve ser controlado para evitar ataque excessivo da estrutura pelo HCl. Já foi relatado que o condicionamento ácido proporciona a formação de sítios na estrutura que permitem a ancoragem da fibrina e células osteoblásticas, favorecendo o processo de osteointegração¹⁰⁶.

A morfologia da superfície das amostras de Ticp e liga processadas pela M/P e superfície laminada condicionadas pelo segundo tratamento pode ser observada na Figura 28. Nas três superfícies é observada uma superfície de aspecto poroso (Figura 28a, 28d e 28f), como descrito em outros estudos^{57,94,100,104}. No entanto, diferenças na forma do ataque ácido são observadas entre as superfícies. Para a liga Ti-13Nb-13Zr foi possível observar o ataque preferencial em áreas aciculares, provavelmente correspondentes à fase $Ti\alpha$ da liga (Figura 28d).

Na placa laminada de Ticp, o ácido clorídrico foi efetivo em revelar os contornos de grãos, alterando o padrão topográfico da amostra (Figura 28f). Após ataque ácido, as amostras foram imersas em solução de NaOH. Nas três superfícies, a técnica de EDS mostrou a presença do elemento sódio, caracterizando a efetividade do condicionamento alcalino (Figuras 28c, 28e e 28g). Apenas o Ticp apresentou morfologia superficial semelhante ao tratamento padrão, com a presença de estruturas agulhadas (Figura 28b). A análise de EDS também mostrou a presença dos elementos constituintes das amostras (Ti; Ti, Nb e Zr para a liga).

Figura 27: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo primeiro tratamento (1T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), (e) e EDS da região (f) e placa laminada (g), (h) e EDS da região (i).

Figura 28: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo segundo tratamento (2T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), e EDS da região (e) e placa laminada (f) e EDS da região (g).

O terceiro tratamento (3T) é mais complexo e necessita de várias etapas para sua finalização. Este tratamento foi idealizado por Kizuki et al.¹⁰⁰, e segundo os autores, é um tratamento com grande potencial para a formação de apatita em SBF, com o diferencial de apresentar maior estabilidade e possibilidade de armazenamento em ambiente úmido. A utilização da solução de cloreto de cálcio dihidratado após o tratamento alcalino proporciona troca iônica dos íons sódio, do titanato de sódio, com os íons cálcio, favorecendo a formação do titanato de cálcio. Esta etapa permite a retirada de íons sódio da superfície, fator considerado positivo, já que autores afirmaram que o excesso de íons sódio na superfície do implante pode acarretar em resposta inflamatória exacerbada^{13,101}. Após esta etapa, é feito o tratamento térmico para estabilização da camada de titanato de cálcio. No entanto, os idealizadores deste tratamento observaram que a imersão das amostras em SBF, neste estágio, não permite a formação do recobrimento biomimético. Por isto, é necessário o tratamento em água quente após o tratamento térmico, tendo maior potencial de formação de compostos à base de fosfatos de cálcio. O tratamento em

água quente permite a mobilidade iônica do cálcio na solução de SBF, permitindo o processo de incorporação destes íons no substrato e formação do recobrimento¹⁰⁰.

Quanto ao aspecto morfológico da superfície após o terceiro tratamento, pode-se observar a presença de recobrimento na amostra de titânio e liga processadas por M/P (Figura 29a, 29d), acompanhando todas as irregularidades da superfície. Na Figura 29 b, é observada uma pequena área na amostra de Ticp que parece desprender-se da superfície metálica. Esta área pode ter se soltado pelo manuseio e preparação da amostra para observação em microscópio ou devido a utilização do vácuo durante a análise em MEV. Para a placa laminada de Ticp, o recobrimento presente na superfície difere das amostras obtidas por metalurgia do pó. Verifica-se a presença de elementos agrupados na superfície de formato geométrico (Figura 29f). Apesar dessas diferenças morfológicas, ao ser realizada análise por EDS das amostras (Figuras 29c, 29e, 29g), foi constatada, a presença do elemento cálcio e ausência de sódio, fator indicativo que na superfície das amostras esteja presente o titanato de cálcio, assim como esperado e respaldado pela literatura¹⁸.

Figura 29: Micrografias da superfície de amostras condicionadas pelo terceiro tratamento (3T); Ti obtida por M/P (a), (b) e EDS da região (c); liga obtida por M/P (d), e EDS da região (e) e placa laminada (f) e EDS da região (g).

Após as amostras serem submetidas aos tratamentos de superfície, foi realizada mensuração da rugosidade pelos parâmetros Ra e Ry, sendo possível avaliar o perfil topográfico das amostras com diferentes tratamentos e compará-las em relação ao processamento (M/P ou laminação) (Figura 30). Esta diferenciação é importante, já que a topografia de um implante pode influenciar diretamente no mecanismo de osteointegração e fixação biomecânica¹⁰⁸. Neste contexto, a rugosidade pode ser dividida em três escalas: macro, micro e nano, considerando-se o parâmetro Ra. A macro-rugosidade compreende características da geometria do implante e os valores são considerados acima de $10\mu\text{m}$ ²⁵. Este tipo de superfície proporciona maior estabilidade mecânica em longo prazo, no entanto, a literatura reporta que ao ser utilizada em aplicações odontológicas, pode aumentar o risco de peri-implantites por possibilidade de contaminação na região oral, ocasionado pela maior adesão e proliferação da flora bacteriana¹⁰⁹.

A micro-rugosidade é definida por valores entre 1- $10\mu\text{m}$, caracterizando uma rugosidade que possibilita o embrincamento entre o osso e a superfície do implante. Neste estudo, os valores de rugosidade para amostras obtidas por metalurgia do pó (Ticp e liga) enquadraram-se nesta categoria, em que muitos autores afirmam que valores de rugosidade compreendidos nessa faixa, melhoram o contato osso-implante e aumentam a resistência ao torque se comparados a outros tipos de implantes com diferente padrão topográfico^{63,64,65,66,108,109}. Ainda é válido ressaltar que em escala nanométrica, a rugosidade aumenta a energia de superfície, contribuindo com a adsorção de proteínas, migração e proliferação de células osteoblásticas que apresentam afinidade à rugosidade. Este processo celular contribui para a osteointegração²⁵.

A comparação dos valores de rugosidade foi realizada para cada tipo de superfície em relação ao tratamento realizado:

Amostras de Ticp obtidas por M/P

Para a superfície de amostras de Ticp obtidas por M/P, foi observado que com a utilização dos tratamentos: padrão (TP), 1T e 3T obtêm-se maiores valores de rugosidade comparativamente às amostras sem tratamento. Após TP, a amostra de Ticp (Figura 26a e 26b), apresenta estruturas em formato agulhado na superfície. Estas estruturas influenciaram na mensuração da rugosidade, aumentando visivelmente o parâmetro Ry (diferença entre picos e vales). Após 1T, o aumento da rugosidade foi mais discreto, o que seria esperado, já que nas amostras (Figuras 27a e 27b), são observadas

estruturas com menor diferença entre picos e vales. No entanto, o recobrimento da superfície para o aumento do Ra é visível. Após 3T, os valores são mais próximos aos da amostra sem tratamento. Nas Figuras 29a e b é possível observar a fina camada formada seguindo as irregularidades da superfície. Como existem estruturas geométricas dispersas na matriz metálica, o aumento da rugosidade é evidente. O 2T foi o único tratamento a ter os valores menores de rugosidade quando comparados à superfície da amostra de Ticp.

Amostras da liga obtidas por M/P

Para a liga Ti-13Nb-13Zr após tratamento superficial foram obtidos valores de rugosidade semelhantes ao da amostra sem tratamento para o 3T, ligeiramente menores para o TP e maiores para o 1T.

Após 3T, a Figura 29d, é observada uma superfície levemente texturizada acompanhando as irregularidades típicas da superfície de amostras obtidas por M/P. Por este motivo, o parâmetro Ra apresenta valores similares ao da superfície sem condicionamento. Após o TP, nas amostras, Figuras 26d e 26e, verifica-se apenas pequenos aglomerados dispersos na superfície. No 1T, ao se realizar o tratamento térmico, além da estabilização da camada de titanato de sódio, há a formação de uma camada de oxida, ocorrendo diferenças de uniformidade e proporcionando no aumento de rugosidade. Nas Figuras 27d e 27e, é observada a influência dessa camada com regiões aparentemente mais espessas. Da mesma forma que o observado nas amostras de Ticp, o 2T propicia a diminuição dos valores da rugosidade.

Amostras de Ticp - placa laminada

Para a amostra de Ti laminada, após o TP são encontrados valores similares de rugosidade quando comparados à amostra sem tratamento, evidenciando a menor reatividade do tratamento em um material com alta densidade. A morfologia das amostras após TP é parecida à amostra sem tratamento, observando-se apenas com algumas áreas de compostos aglomerados (Figuras 26 g e 26h).

Após 1T, os valores de rugosidade são ligeiramente maiores, o que é coerente com a observação da superfície (Figuras 27g e 27h). Após 3T, os valores de rugosidade são expressivamente maiores. Pela micrografia apresentada na Figura 29f, podem-se ver

estruturas geométricas em quantidade suficiente para alterar os valores de rugosidade. Nestas amostras, a rugosidade também diminuiu após 2T.

Figura 30: Gráfico com os valores de rugosidade, parâmetros Ra e Ry nos três tipos de amostras (Ticp e liga obtidas por M/P e placa de Ticp laminada) antes e após os tratamentos de superfície.

Após a realização dos tratamentos de superfície, as amostras foram submetidas a ensaios *in vitro*, utilizando SBF e analisadas em relação à formação de recobrimento biomimético. Os tratamentos de superfície também foram realizados nos implantes para avaliação *in vivo*, em que os leitos receptores foram em tíbias de coelhos. As fases da osteointegração foram avaliadas por marcadores fluorocromáticos. Vale salientar que a escolha dos tratamentos de superfície utilizados neste trabalho refere-se aos tratamentos descritos na literatura como os de melhor desempenho para a formação de apatita em SBF. Neste estudo, foi avaliada também a correspondência entre os resultados da avaliação *in vitro* e *in vivo*.

5.4 Recobrimento biomimético - ensaio *in vitro*

Foram realizados ensaios utilizando o SBF com o objetivo de obter recobrimento biomimético nos três tipos de amostra. No início foi utilizada a seguinte razão de volume de SBF e área superficial de: $V_{\text{SBF}} = \text{área superficial}$, 1:10⁽⁸⁶⁾, sem considerar a rugosidade e porosidade das amostras de Ticp obtidas por M/P. Esse volume preconizado é aplicado para o recobrimento de superfícies lisas, assim, não foi obtido, o recobrimento à base de fosfato de cálcio nas amostras processadas por metalurgia do pó. Houve a formação de grande quantidade de cloreto de sódio (NaCl) independente do tipo de tratamento superficial realizado no Ticp obtido por metalurgia do pó antes da imersão em SBF (Figura 31). Testes utilizando Ticp com superfície laminada foram realizados, como em trabalhos da literatura^{18,19,21,25,26,106}, em que foi constatada a formação da camada à base de fosfato de cálcio. Este resultado permitiu concluir que a maior área superficial das amostras processadas por metalurgia do pó possui grande influência na formação do recobrimento, havendo a necessidade da utilização de maior volume de SBF e com os testes realizados, encontrou-se a razão de 1:1 (volume de SBF: área superficial), como ideal para amostras obtidas por M/P.

Após ajuste da forma de obtenção do recobrimento biomimético, amostras de cada grupo de tratamento superficial foram imersas em SBF. As figuras 32 a 37 apresentam o aspecto morfológico do recobrimento obtido na superfície dos diferentes tipos de amostras para cada tratamento superficial após 1, 3, 6, 9, 15 e 21 dias de imersão em SBF.

Figura 31: Micrografias das amostras de T1cp processadas por M/P após segundo tratamento e imersão em SBF por 6 dias e EDS com a presença dos elementos sódio e cloro (A) e (B), os picos não identificados no espectro de EDS correspondem ao elemento Au do recobrimento para observação em MEV.

1 dia de imersão em SBF

Figura 32: Aspecto morfológico do recobrimento após 1 dia em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa laminada de Ti (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1° tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2° tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3° tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

3 dias de imersão em SBF

Figura 33: Aspecto morfológico do recobrimento após 3 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

6 dias de imersão em SBF

Figura 34: Aspecto morfológico do recobrimento após 6 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1° tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2° tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3° tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

9 dias de imersão em SBF

Figura 35: Aspecto morfológico do recobrimento após 9 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

15 dias de imersão em SBF

Figura 36: Aspecto morfológico do recobrimento após 15 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

21 dias de imersão em SBF

Figura 37: Aspecto morfológico do recobrimento após 21 dias em SBF nos diferentes tratamentos e tipos de superfície. No tratamento padrão - Ticp obtido por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c). Para o 1º tratamento - Ticp obtido por M/P (d), placa de Ti laminada (e) e liga obtida por M/P (f). Para o 2º tratamento - Ticp obtido por M/P (g), placa de Ti laminada (h) e liga obtida por M/P (i). Para o 3º tratamento - Ticp obtido por M/P (j), placa de Ti laminada (l) e liga obtida por M/P (m).

Nas figuras 32 a 37 são apresentados exemplos da morfologia e forma de nucleação na superfície das amostras avaliadas para os diferentes tratamentos e tempos de imersão em SBF. Os recobrimentos são à base de fosfatos de cálcio, pela presença dos elementos cálcio e fósforo identificados pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Ressalta-se que para cada micrografia, foi realizada análise por EDS, como exemplificado na Figura 38.

Figura 38: Micrografia referente a morfologia do recobrimento em Tícp obtido por M/P condicionado ao 3º tratamento (3T) e após imersão em SBF por 9 dias (a) EDS da região (b).

A análise por espectroscopia de infravermelho por reflectância difusa (DRIFT) foi realizada para os recobrimentos obtidos nas três superfícies avaliadas (Tícp e liga, obtidos por M/P e placa laminada de Tícp) para todos os tratamentos superficiais utilizados (Figura 39). Na análise realizada após 1 dia de imersão em SBF, já foram encontradas as bandas e grupos funcionais característicos da formação do recobrimento à base de fosfato de cálcio, apresentados na Figura 39. Como não há mudança significativa para os outros períodos de imersão não são apresentados os espectros relativos a eles.

Os espectros de DRIFT para os três tipos de amostras apresentam bandas bem definidas na região entre $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ (características do grupamento OH). É evidenciada em 1650 cm^{-1} , a banda referente a H_2O . Também são observadas as bandas referentes ao grupamento PO_4^{3-} : As bandas do CO_3^{2-} apresentam-se na faixa de 870 e 1450 cm^{-1} . A presença deste grupo funcional sugere a incorporação destes íons no recobrimento, possivelmente ocorrendo a formação de apatita carbonatada.

Figura 39: Gráficos de DRIFT para as superfícies de Ticp laminada (a), Ticp (b) e liga(c) obtidas por metalurgia do pó referentes às superfícies com os quatro tratamentos, após a imersão de 1 dia em SBF.

A observação da superfície dos recobrimentos permite avaliar diferenças morfológicas e a forma da nucleação, quantidade e tamanho das esferas de apatita. Por análise de EDS, constatou-se também em algumas amostras, a presença de NaCl. Para complementar estas informações, foram obtidas micrografias de corte transversal de cada amostra, para determinação da espessura da camada formada nos diferentes períodos. Com isto, pode-se inferir a qualidade e tempo de resposta da nucleação dos fosfatos de cálcio relativos à topografia e ao tratamento superficial.

Para a avaliação da espessura da camada formada, as amostras foram embutidas em resina de cura à frio, cortadas ao meio, desbastadas e polidas com uma sequência de lixas de carbetto de silício (# 80, 160, 420, 600, 1000, 1200, 2400 e 4000). Salienta-se que a mesma amostra foi utilizada para as micrografias da superfície e em corte transversal. Um exemplo de imagem obtida em corte transversal para os três tipos de amostra (Ticp e liga obtidos por M/P e placa de Ti laminada) com a análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) é apresentada na Figura 40, sendo possível comparar a camada formada na superfície das amostras submetidas ao 3º tratamento e imersão em SBF de 15 dias.

Figura 40: Corte transversal evidenciando a camada formada e a análise de EDS da região para amostras submetidas ao 3º tratamento e imersão em SBF por 15 dias; Tícp obtida por M/P (a), placa de Ti laminada (b) e liga obtida por M/P (c).

A partir das imagens de corte transversal de todos os grupos, foram realizadas as mensurações da espessura da camada formada (μm) em toda a extensão da superfície, utilizando o programa de edição de imagem (Image Pro Plus 6.1®), conforme exemplo apresentado na Figura 41.

Figura 41: Mensuração da camada biomimética formada (μm), utilizando o programa Image Pro Plus® 6.1, na amostra de Ticp obtido por M/P submetido ao 2º tratamento e imerso em SBF por três dias,

Os valores referentes à espessura da camada formada em cada grupo nos diversos tempos de imersão em SBF foram organizados em tabelas e gráficos e são apresentados a seguir.

Tabela 10: Espessura (μm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo tratamento padrão e imersas em diferentes períodos em SBF.

Dias em SBF	Espessura da camada-Média/Desvio padrão (μm) Tratamento padrão		
	Ti (M/P)	Ti (placa)	Liga (M/P)
1	1,0 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,8
3	1,7 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,7
6	3,0 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,6
9	4,2 $\pm$ 1,4	1,4 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 1,2
15	5,0 $\pm$ 2,0	2,4 $\pm$ 0,6	3,8 $\pm$ 1,7
21	4,9 $\pm$ 1,1	3,0 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 1,7

Figura 42: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao tratamento padrão, em função do tempo de imersão em SBF.

Tabela 11: Espessura (μm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 1º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.

Dias em SBF	Espessura da camada-Média/Desvio padrão (μm) 1º Tratamento		
	Ti (M/P)	Ti (placa)	Liga (M/P)
1	2,2 $\pm$ 1,5	1,0 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 1,2
3	3,5 $\pm$ 3,3	1,0 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 1,1
6	5,0 $\pm$ 1,8	1,9 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 1,2
9	5,5 $\pm$ 2,4	2,3 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 2,5
15	5,9 $\pm$ 1,9	2,7 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 2,7
21	6,9 $\pm$ 2,4	2,7 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 2,2

Figura 43: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticip e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 1º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.

Tabela 12: Espessura (µm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 2º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.

Dias em SBF	Espessura da camada-Média/Desvio padrão (µm) 2º Tratamento		
	Ti (M/P)	Ti (placa)	Liga (M/P)
1	1,8±0,2	1,1±0,1	4,1±1,9
3	4,4±3,4	2,3±0,6	6,3±4,4
6	6,0±2,7	3,5±1,2	7,5±2,9
9	6,9±2,2	4,8±0,7	8,6±2,8
15	10,0±7,4	6,4±1,0	8,9±2,8
21	10,7±6,3	7,7±0,7	9,3±2,0

Figura 44: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ticp e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 2º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.

Tabela 13: Espessura (μm) da camada formada nas amostras após condicionamento pelo 3º tratamento e imersas em diferentes períodos em SBF.

Dias em SBF	Espessura da camada-Média/Desvio padrão (μm) 3º Tratamento		
	Ti (M/P)	Ti (placa)	Liga (M/P)
1	2,7 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 1,0
3	3,4 $\pm$ 1,4	1,6 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 2,4
6	3,7 $\pm$ 1,7	2,3 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 2,1
9	4,7 $\pm$ 1,1	3,0 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 1,9
15	5,1 $\pm$ 2,5	3,2 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 2,7
21	5,7 $\pm$ 1,9	3,2 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 2,7

Figura 45: Gráfico da espessura da camada biomimética formada nas amostras Ti (M/P) e liga obtidas por M/P, e Ti placa laminada quando submetidas ao 3º tratamento, em função do tempo de imersão em SBF.

Associando a análise das micrografias das superfícies dos recobrimentos e das medidas de espessura em cortes transversais das amostras constata-se que houve a formação dos compostos à base de fosfato de cálcio, comprovados pelas técnicas de EDS e DRIFT, em todas as amostras avaliadas, para os quatro tipos de tratamentos de superfície, mesmo após curto período de imersão em SBF (1 dia ou mais) (Figura 32). No entanto, as diferenças na forma e velocidade de nucleação dos compostos à base de fosfato de cálcio, quantidade e morfologia dos recobrimentos obtidos são bastante significativas. A descrição do aspecto morfológico dos recobrimentos em função do tempo de imersão em SBF e tipo de tratamento de superfície são informações relevantes já que é ressaltado na literatura que recobrimentos com maior tamanho de esferas e homogêneas são considerados mais favoráveis para estabilidade do recobrimento. A seguir é apresentado essas características na formação do recobrimento em cada um dos tratamentos de superfície e para cada tipo de amostra.

Tratamento padrão

Amostras de Ticp obtidas por M/P

Na superfície das amostras de Ticp obtidas por M/P é possível observar, em todos os períodos de imersão em SBF, a presença de um recobrimento com áreas de nucleação em formato esférico que coalescem e formam uma camada à base de fosfato de cálcio (Figuras 32 a 37). Verifica-se também a existência de trincas nessa camada que pode ser decorrente do aumento progressivo da espessura, como também evidenciando em outros trabalhos^{13,18,20,21,22,24}. A espessura da camada aumenta progressivamente do 1º ao 21º dia de imersão em SBF, com valores iniciais de ~ 1µm a ~ 5µm, respectivamente (Tabela 10 e Figura 42). São verificados valores altos de desvio-padrão, significando diferenças na espessura da camada, explicados pelo perfil topográfico (rugosidade) dessa superfície (Figura 42). Pode ser observado que o recobrimento permeia as porosidades e as reentrâncias da superfície, sendo que nas “paredes laterais” dessas reentrâncias são encontrados os menores valores de espessura da camada formada.

Amostras de Ticp - placa laminada

A placa de Ticp laminada apresenta regiões específicas de nucleação até o 3º dia de imersão em SBF (Figura 33). Após seis dias de imersão, o recobrimento apresenta-se mais uniforme (Figuras 34 a 37). Apesar dos valores de espessura da camada obtida aumentar em função do tempo, ao final da experimentação foram obtidos valores inferiores a 3,5 µm de recobrimento (Tabela 10 e Figura 42). Comparativamente ao Ticp obtido por M/P, a superfície laminada apresenta nucleação mais lenta e formação do recobrimento com menor espessura.

Amostras de liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por M/P

Pelas micrografias das superfícies, é observado que até 9 dias de imersão em SBF, há a formação de poucas regiões com nucleação da camada de fosfato de cálcio, levando à impressão de que o recobrimento seria incipiente (Figuras 32 a 35). No entanto, na observação por MEV da secção transversal das amostras, constata-se a

formação do recobrimento mesmo para curtos períodos de imersão, permitindo inferir que somente com a observação da superfície da amostra, não se pode concluir muita coisa a respeito da formação do recobrimento de apatita. A partir do 15° ao 21° dias de imersão em SBF, o recobrimento apresenta-se com diferente morfologia, tendo havido a formação de grandes esferas de apatita (na ordem de 5µm) (Figura 36 e 37). O aumento da espessura da camada foi progressivo em função do tempo, apresentando valores ligeiramente menores que os valores encontrados para amostras de Ticp obtidos por M/P (Tabela 10 e Figura 42).

1° Tratamento

Amostras de Ticp obtidas por M/P

Pode ser observado que já no 1° dia de imersão em SBF, há a formação de nanoapatitas em toda a superfície associadas a núcleos maiores (10-20µm) (Figura 32). No 3° dia, o aspecto morfológico apresenta esferas de apatita menores e regulares (Figura 33). A quantidade de esferas vai aumentando progressivamente do 6° ao 15° dias de imersão em SBF (Figuras 34 a 36) e no 21° dia são observados blocos que se desprendem da superfície em função do aumento da espessura (Figura 37). Os valores de espessura aumentaram progressivamente com o tempo e são maiores que os valores obtidos pelo tratamento padrão. Após 21 dias, o recobrimento tem uma espessura média de ~7 µm (Tabela 11 e Figura 43).

Amostras de Ticp - placa laminada

Após 1 dia de imersão em SBF, agregados de compostos à base de fosfato de cálcio são observados (Figura 32), esse aspecto não foi bem evidente no 3° dia em SBF (Figura 33). Somente após nove dias de imersão (Figura 35) é encontrada maior quantidade de núcleos de apatita, aumentando progressivamente no 15° dia e no 21° dia, sendo foi possível observar as trincas do recobrimento ocasionadas pela elevada espessura (Figura 37). A espessura da camada formada aumenta progressivamente com o tempo de avaliação. Os valores são ligeiramente maiores quando comparados ao tratamento padrão. Ao final dos 21 dias de imersão em SBF, a camada formada não atinge valores superiores a 4µm (Tabela 11 e Figura 43).

Amostras de liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por M/P

A liga apresenta morfologia diferente ao encontrado nas outras superfícies avaliadas, com aspecto texturizado, sem a evidência de núcleos esféricos de apatita, principalmente entre 9° e o 15° dia de imersão em SBF (Figura 35 a 37). Assim como em outras superfícies, a espessura aumenta progressivamente, com resultados médios de ~1,5 µm para o 1° dia de imersão em SBF, chegando ao valor médio de ~ 5,5 µm após 21 dias em SBF (Tabela 11 e Figura 43).

2° Tratamento

Amostras de Ticp obtidas por M/P

Após imersão por 1 dia em SBF (Figura 32), é possível observar a superfície atacada pelo ácido, com aglomerados de apatita na superfície. O aspecto de superfície atacada pelo ácido já não é vista a partir do 3° dia em SBF (Figura 33), dado a homogeneidade do recobrimento e a presença de núcleos de apatita. A quantidade de núcleos aumenta drasticamente no 6° dia de imersão em SBF comparativamente aos outros tratamentos de superfície (Figura 34). Após nove dias em SBF, além das esferas de apatita, é possível verificar trincas caracterizando aumento do recobrimento (Figura 35). Após os ensaios em 15 e 21 dias em SBF, a superfície parece ter um recobrimento em que houve o coalescimento das esferas de apatita, não sendo observados os núcleos de formação (Figuras 36 e 37).

Assim como em outros tratamentos e superfícies avaliadas, a espessura da camada formada aumenta progressivamente em função do tempo. Este tratamento apresenta melhor desempenho em relação aos valores de espessura da camada formada quando comparados aos outros tratamentos superficiais em todos os períodos de imersão em SBF. Após 21 dias em SBF, a camada apresenta valor médio de ~10,5µm (Tabela 12 e Figura 44).

Amostras de Ticp - placa laminada

Para a placa de Ticp laminada observa-se após um dia em SBF, é possível observar uma textura granular na superfície (Figura 32), que aumenta progressivamente em núcleos esféricos de apatita para os períodos avaliados em SBF (Figuras 33 a 37). A

espessura também aumenta progressivamente em função do tempo e são obtidos os maiores valores de média para este tratamento quando comparado aos demais. Ao final de 21 dias de imersão em SBF, a camada atinge valores de $\sim 7,5 \mu\text{m}$ (Tabela 12 e Figura 44).

Amostras de liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por M/P

Após 1 dia de imersão em SBF, é possível observar a presença do recobrimento em toda a superfície da amostra (Figura 33). Após 3 dias de imersão, é observada uma grande quantidade de nanoesferas de apatita (Figura 34), em que a morfologia difere bastante das características dos recobrimentos de outras superfícies e outros tratamentos. A espessura em períodos curtos de imersão atinge os maiores valores comparados às outras superfícies e tratamentos avaliados para o mesmo tempo de imersão. Foi obtido valor de $\sim 4 \mu\text{m}$ para o 1º dia de imersão em SBF. A taxa de crescimento da camada mantém-se alta até o 6º dia. Nos demais tempos, há uma diminuição na taxa de crescimento da camada. Ao final de 21 dias de imersão em SBF, são obtidos valores médios de $\sim 9,5 \mu\text{m}$ (Tabela 12 e Figura 44).

3º Tratamento

Amostras de Ticp obtidas por M/P

Após um dia em SBF, nota-se que esta superfície apresenta aglomerados de fosfatos de cálcio (Figura 32) e sua espessura é de $2,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (média/desvio-padrão) (Tabela 13 e Figura 45), sendo o maior valor de espessura do recobrimento comparado aos demais tratamentos nesse período. No 3º dia, é observada a presença de recobrimento com nanoapatitas coalescidas (Figura 33). A espessura da camada aumenta com o tempo, porém para o 3º dia de imersão em SBF esta camada obtém valores maiores quando comparada ao tratamento padrão, valores similares ao 1º tratamento e menores do que com o 2º tratamento (Tabela 10 a 13).

A quantidade de núcleos de apatita aumenta após 6 dias em SBF (Figura 34), mas a espessura tem apenas um ligeiro aumento, evidenciando uma queda na taxa de aposição dos fosfatos de cálcio quando comparado aos outros tratamentos para o mesmo período de imersão em SBF (Tabela 13). O aumento da espessura é mais evidente após 9 dias de imersão em SBF, porém os valores de espessura somente são

maiores do que os valores obtidos no tratamento padrão, para o mesmo período de imersão em SBF (Tabela 10 a 13). Após este período de imersão, o padrão morfológico obtido é de grande quantidade de esferas de apatita com menor tamanho, sendo possível visualizar a presença de algumas trincas na camada (Figura 35). A camada de recobrimento aumenta aos 15 e 21 dias de imersão em SBF mantendo menor taxa de crescimento quando comparada aos demais tratamentos. Ainda assim, os valores de espessura são maiores do que nas amostras de Ticp obtidas por M/P e condicionadas ao tratamento padrão. Morfologicamente, verifica-se nesses períodos de imersão em SBF (15 e 21 dias) (Figuras 36 e 37), a diminuição da nucleação de esferas de apatita e a presença de agregados geométricos típicos da formação de NaCl, evidenciando o motivo da diminuição da taxa de crescimento da camada à base de fosfato de cálcio.

Amostras de Ticp - placa laminada

A placa laminada de Ticp tratada com o 3T e após imersão de 1 dia em SBF apresenta aglomerados de fosfatos de cálcio (Figura 32) com espessura semelhante aos demais tratamentos (excetuando tratamento padrão que obteve menores valores de espessura da camada) (Tabela 10 a 13). O aumento dos núcleos de apatita e dos valores de espessura é progressivo ao longo dos 9 dias de imersão em SBF (Tabela 13 e Figura 45). Somente aos 15 e 21 em SBF, verifica-se que a espessura mantém-se constante, denotando que não ocorreu deposição de compostos de fosfatos de cálcio na superfície do substrato pela possível ausência de sítios reativos para troca iônica com o SBF.

Amostras de liga Ti-13Nb-13Zr obtidas por M/P

A liga obtida por M/P, neste 3° tratamento obtém um padrão de nucleação diferente dos outros tratamentos. Verifica-se que após 1 dia de imersão em SBF, a morfologia apresentava-se com abundante textura em toda superfície (Figura 32). Após 9 dias em SBF, a amostra exibe uma superfície com trincas e poucos aglomerados esféricos de apatita (Figura 35). Os valores de espessura são semelhantes aos encontrados na superfície de Ticp obtida por M/P e contrariamente a esta superfície, constata-se uma valores médios e taxa de crescimento maior após 15 dias de imersão em SBF e um ligeiro crescimento da camada aos 21 dias de imersão (Tabela 13 e Figura 45). Nestes dois períodos os valores de espessura são maiores quando comparados à superfície de Ticp obtida por M/P. Observando-se o recobrimento, constata-se que aos

15 dias em SBF, são observados núcleos esféricos de apatita e aparência texturizada com superfície craquelada (Figura 36). Diferentemente, aos 21 dias, tem-se a impressão de “ausência” da camada de apatita, por não apresentar morfologia típica dos recobrimentos (Figura 37), no entanto, na avaliação da espessura da camada em corte transversal, verifica-se que a camada presente tem valores de espessura de $\sim 7,9\mu\text{m}$.

Aspectos importantes - comparação entre as superfícies e tratamentos

Após a descrição da morfologia e espessura das camadas dos diferentes tratamentos e tempos de imersão em SBF tem-se a constatação de que as amostras obtidas por metalurgia do pó (Ticp e liga) possuem superfícies com melhor desempenho e com valores expressivamente maiores, no que se refere à espessura da camada formada e quantidade de núcleos de apatita presentes na superfície desde o 1º dia de imersão em SBF comparados à superfície de Ti laminada. O perfil topográfico com maior rugosidade evidencia grandes diferenças na forma de deposição da camada e regiões com menor reatividade para a troca iônica com o SBF, um fator positivo é a evidência de que o recobrimento permeia as irregularidades presentes. Fica evidente que o padrão topográfico e morfologia das superfícies obtidas por metalurgia do pó são promissores na indução da bioatividade por ter uma maior área específica e aumentando sítios condicionados e a troca iônica com o SBF. Constata-se também que a morfologia de nucleação dos fosfatos de cálcio é multifatorial, podendo ser associada a diferenças da composição do substrato metálico, formas de condicionamento pelos diferentes tratamentos utilizados e consequente reatividade. Com relação aos tratamentos avaliados verifica-se que todos foram satisfatórios na formação de recobrimento biomimético para todas as superfícies avaliadas. No entanto, o melhor desempenho em relação à espessura da camada formada tem-se com o 2º tratamento, por apresentar maiores valores de espessura e de taxa de crescimento da camada obtida ao longo dos 21 dias de imersão em SBF. Este padrão foi observado nos três tipos de amostras avaliadas (Ticp e liga obtidas por M/P e placa de Ticp laminada). Para o 1º tratamento foi observado que o Ticp obtido por M/P obteve maiores valores de espessura ao longo dos 21 dias de imersão em SBF, seguido pela liga e por último, pela placa de Ticp laminada. Já para o 3º tratamento, valores similares foram obtidos para as superfícies obtidas por M/P até o 9º dia de imersão em SBF. A partir do 15º e 21º dias, observam-se maiores valores de espessura para a liga. O tratamento padrão apresenta os menores valores de

espessura da camada formada comparativamente aos demais tratamentos para todas as superfícies avaliadas.

Ressalta-se que estas inferências sobre os recobrimentos formados a partir do condicionamento das superfícies toma por base a forma de nucleação, a espessura da camada obtida e a taxa de crescimento. Porém, existem outros fatores que podem determinar o melhor desempenho da camada formada, tais como adesão ao substrato metálico, estabilidade e tipo de composto de fosfato de cálcio formado. Estes fatores são interessantes para futuros estudos.

Neste estudo, optou-se por realizar as análises de EDS e DRIFT para caracterização dos recobrimentos biomiméticos. A análise por difração de raios X foi realizada para todas as amostras, no entanto, devido ao perfil topográfico das amostras obtidas por M/P, a caracterização destas amostras foi bastante complexa. Em muitas amostras foram obtidos difratogramas com elevado background, sem a detecção de picos referentes ao substrato metálico. Associando ao fato que compostos à base de fosfatos de cálcio apresentam diversas fases (amorfas e cristalinas), os resultados de caracterização por DRX não parecem ter muita confiabilidade; dessa forma, optou-se em não apresentá-los.

5.5 Ensaio *in vivo*

Dez coelhos foram utilizados para os ensaios *in vivo*. Foram instalados 4 implantes em cada animal (2 em cada tíbia). Para cada um dos animais foi utilizado um tipo de material, isto Ticp ou liga, e um tratamento de superfície (4 tratamentos diferentes) perfazendo 8 animais. Os implantes de Ticp e da liga sem tratamento de superfície foram utilizados como grupo controle (2 animais), necessários para a comparação do desempenho dos tratamentos superficiais na osteointegração. Os procedimentos cirúrgicos ocorreram conforme descrito na metodologia. Durante o experimento, ocorreram duas perdas; a primeira devido a fratura da pata ocasionada por queda do animal 6 dias do pós-cirúrgico e a segunda devido à automutilação na pata do animal. A eutanásia precoce dos animais foi aplicada nestes casos. As repetições pertinentes à confiabilidade do estudo foram realizadas posteriormente. As Figuras 46 e 47 apresentam as etapas cirúrgicas de colocação dos implantes.

Figura 46: Incisão para o acesso cirúrgico ao osso, perfurações com trefina e colocação dos implantes.

Figura 47: Sutura do periósteo, da pele e curativo no pós-operatório.

Ao final dos 49 dias de experimentação *in vivo* foi realizada a eutanásia dos animais, com a remoção da tíbia contendo os implantes e colocação em solução formalina a 10%. Todos os blocos contendo os implantes foram fotografados e radiografados, com o objetivo de evidenciar o posicionamento em que estes estavam no osso, conforme exemplo da Figura 48. Além disso, a importância do exame radiográfico é verificar que houve uma imagem indicativa do sucesso do processo de osteointegração do implante, com ausência de imagens radiolúcidas que poderiam indicar que houve falha deste processo.

Figura 48: Fotografia do bloco da tíbia contendo dois implantes e radiografias com diferentes orientações para evidenciar o posicionamento dos mesmos.

5.5.1 Análise das lâminas histológicas

As lâminas histológicas foram obtidas conforme descrito na metodologia. As figuras 49 a 58 apresentam as micrografias referentes à análise do implante no tecido ósseo. São apresentadas imagens da interface implante/osso, utilizando elétrons retroespalhados (A), com mapeamento para os elementos Ti e Ca, obtidos por EDS (B, C e D), mostrando o nível de integração nessa interface e imagens das lâminas histológicas obtidas pela técnica de fluorescência (E e F) dos implantes referentes a cada tipo de tratamento superficial e para os dois materiais sem tratamento. Como padrão, foram obtidas duas imagens de fluorescência correspondentes às corticais ósseas das duas laterais do implante que estão em contato direto com o osso. No entanto, a Figura 52 apresenta uma imagem referente a uma cortical mostrando uma lateral implante/osso e outra imagem correspondente à porção do implante encostando-se à medular oposta do leito de inserção. A Figura 53 apresenta três imagens de fluorescência, duas imagens correspondem como as apresentadas nos outros implantes e a terceira imagem corresponde a mesma apresentada na Figura 52 (porção do implante encostando-se à medular oposta do leito de inserção).

Pelas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), pode-se observar o implante em toda sua extensão. Selecionando uma área de interface osso/implante para todos os grupos, foi possível observar pelo EDS (mapeamento), a clara distinção entre o elemento Ti, em verde, presente no implante e o elemento Ca, em azul, constituinte no tecido ósseo (tanto para implantes de Ticp como da liga). Nota-se em todas as micrografias o íntimo contato do tecido ósseo com o implante. Além disso, em alguns implantes com tratamentos de superfície, foi possível verificar a presença do elemento Ca (comprovado pelo EDS) em poros residuais do implante, sendo indicativo da formação de tecido mineralizado, aspecto interessante e favorável do comportamento celular frente à estas superfícies. Os implantes (Ticp e liga) possuem características típicas do processamento por metalurgia do pó, isto é, existe porosidade residual, neste caso ~12% de poros distribuídos homogeneamente na estrutura. Nas micrografias pode-se observar o crescimento ósseo no interior de poros mais próximos à superfície. Este crescimento pode ser observado em implantes de Ticp submetidos ao tratamento padrão (Figura 50), Ticp submetido ao 2º tratamento (Figura 52), liga submetida ao 1º tratamento (Figura 55) e liga submetida ao 3º tratamento (Figura 58). A não visualização do elemento Ca no interior dos poros, nas outras micrografias referentes aos outros implantes pode ser em virtude aos poros serem fechados nesses implantes.

Além da rugosidade, os tratamentos superficiais podem ter contribuído para a bioatividade da superfície dos implantes, no entanto, isso fica mais evidente no 2º tratamento, que por ter sido condicionado pelo ácido clorídrico, teve a superfície do implante com topografia com diferentes orientações pela variada velocidade de ataque aos grãos. Isto pode favorecer a fixação de estruturas como a fibrina, promovendo adesão de células osteogênicas e aposição óssea⁷⁶.

Com relação às imagens obtidas pela técnica de microscopia por fluorescência, foram selecionadas, em geral, duas imagens representativas da interface osso/implante de cada grupo avaliado. As imagens obtidas por essa técnica são formadas à partir da utilização de filtros específicos, sendo possível observar as diferentes regiões ósseas associadas a cada marcador, e portanto ao tempo de crescimento e reparação, de acordo com o período de aplicação de cada fluoróforo. As colorações para cada marcador foram: azul - para a tetraciclina, vermelho - para alizarina e verde - para a calceína, e além das primárias, pode-se observar colorações como o magenta da associação do azul e vermelho, o ciano da combinação de azul com o verde, amarela da combinação de vermelho e verde e o branco da combinação das três cores primárias, vermelho, verde e azul (RGB).

As imagens de todos os grupos avaliados apresentaram evidente coloração dos três marcadores aplicados, mostrando as diferentes fases de crescimento ósseo associado aos implantes. Conforme descrito na metodologia, os marcadores foram aplicados na seguinte ordem: tetraciclina, alizarina e calceína. Portanto, as fases de atuação da resposta tecidual óssea e marcação ocorreram após a aplicação dos marcadores na 1ª e 2ª semana para a tetraciclina (primeiro período de reparação), 3ª e 4ª para a alizarina (segundo período de reparação) e 5ª e 6ª semana para a calceína (terceiro período de reparação).

Para o implante de Ticp sem tratamento superficial (Figura 49), é observada uma grande marcação da cor azul (tetraciclina) na interface, e mais afastado do implante, observa-se a coloração magenta (tetraciclina e alizarina). A alizarina (vermelho) apareceu marcada principalmente como uma linha definida na cortical externa (região referente ao preparo para a inserção do implante). Abaixo da marcação de alizarina, ainda no tecido corticalizado, pode-se visualizar forte marcação da calceína. As osteonas presentes no osso também foram marcadas em verde. Observando-se a interface/osso, constata-se que grande parte do processo de reparo ósseo ocorre no primeiro período de reparação, no entanto, ele foi contínuo, já que houve também a marcação alizarina e da calceína.

Para o implante de Ticp submetido ao tratamento padrão (tratamento alcalino) (Figura 50), verifica-se uma interface (região específica) intensamente marcada pela

tetraciclina, estendendo-se para regiões mais afastadas do implante (região de matriz óssea). Em outra imagem da interface do implante, a marcação é magenta, com regiões marcadas pela calceína. Neste tratamento, observa-se a predominância da marcação da alizarina quando se compara ao implante de Ticp. A alizarina (vermelho) esteve presente fortemente na cortical abrangendo uma região maior, com presença de áreas específicas nos poros do implante e ainda no início de formação das osteonas. A calceína marcou as osteonas presentes na matriz óssea.

As imagens relativas ao implante de Ticp submetido ao 1º tratamento (Figura 51) exibem um padrão diferente de marcação quando comparados com o Ticp e o Ticp com tratamento padrão. Nas imagens pode-se constatar intensa marcação da tetraciclina em maior área, desde uma interface até a região de matriz óssea. Na outra interface do implante encontra-se a predominância de marcação da calceína. Este fato permite inferir que a resposta de osteointegração na interface osso/implante não foi contínua em toda a extensão e ocorreu em períodos diferentes. A tetraciclina também é observada em região afastada do implante e próxima ao leito de preparo ósseo para a inserção deste implante. A alizarina exibe menor marcação neste tratamento, aparecendo na cortical externa próxima ao leito de implantação de forma mais tênue. A coloração magenta também é vista em menor marcação na interface. A coloração tendendo ao branco aparece próxima às regiões marcadas pela calceína. As osteonas possuem marcação em tetraciclina e calceína. A resposta tecidual óssea neste tratamento foi preferencial em algumas regiões da interface e estendendo-se para a remodelação da matriz óssea no primeiro período de reparação. No segundo período, o processo foi mais tênue e no terceiro período de reparação, o processo tornou-se mais ativo, incluindo outras regiões da interface osso/implante. A forte marcação da tetraciclina indica que houve uma resposta rápida do osso em relação ao implante, ocorrendo a formação óssea estendendo-se para a matriz. Como não houve sobreposição de marcadores, o osso depositado ainda não sofreu remodelação.

Para o implante de Ticp submetido ao 2º tratamento (tratamento ácido e alcalino) (Figura 52), pode ser observada intensa coloração azul relativa à tetraciclina em regiões da interface/osso e também marcando áreas de matriz óssea e osteonas, isto é, intensa atividade de formação óssea presente no primeiro período de reparação. Alizarina em região menor de interface do implante com o osso, presente em algumas osteonas e região de cortical externa. Marcação verde da calceína em diversas osteonas da matriz e também em região de interface. Este tratamento propicia a intensa atividade para formação e remodelação óssea como primeira resposta à colocação do implante (tetraciclina), menor atividade entre no segundo período de reparação e aumento da

atividade de remodelação vista pela marcação de calceína, sendo semelhante ao padrão encontrado no Ticp com 1T.

Nas imagens do implante de Ticp submetido ao 3º tratamento (tratamento alcalino, CaCl_2 , tratamento térmico e em água quente)(Figura 53), é possível observar que a marcação em tetraciclina na interface osso/implante ocorreu em menor proporção quando comparado à marcação da calceína. Em uma das imagens, nota-se uma orientação na marcação da calceína, sendo indicativo do potencial osteocondutor do implante submetido ao 3T. A tetraciclina também está presente em algumas regiões da matriz óssea. A alizarina tem uma menor marcação, podendo ser vista no interior dos poros do implante e em regiões pontuais da matriz óssea. Este tratamento tem como característica principal maior atividade celular óssea no terceiro período de reparação do pós-operatório para o mecanismo de osteointegração.

Para o implante da liga Ti-13Nb-13Zr sem tratamento superficial (Figura 54), observa-se intensa marcação em azul pela tetraciclina em uma imagem de interface osso/implante. Em outra imagem, a interface osso/implante, além de possuir a coloração azul, existe regiões em verde pela calceína. Na região da matriz óssea, observou-se uma área de reabsorção marcada mais proeminentemente pela alizarina, em que se observa a presença de um osteoclasto, sugerindo um processo de remodelação óssea. A matriz óssea encontra-se marcada em algumas regiões pela alizarina, em quantidade moderada pela tetraciclina e em maior quantidade pela calceína. As osteonas são predominantemente marcadas em verde pela calceína. O processo de formação e remodelação óssea esteve presente desde o primeiro período até o terceiro período de reparação (término da experimentação).

Nas imagens de fluorescência do implante da liga submetido ao tratamento padrão, (Figura 55), nota-se uma marcação com padrão diferente da marcação encontrada no implante de Ticp com o mesmo tratamento. Há a predominância na interface osso/implante das marcações de tetraciclina e calceína. Pode-se observar a coloração magenta em poucas regiões próximas ao implante. Ao contrário das imagens de Ticp com este tratamento, para a liga submetida ao tratamento alcalino, não se observou intensa marcação da alizarina. O vermelho esteve presente de forma muito tênue. A predominância de marcação na matriz óssea foi em verde, pela calceína. Assim, pode-se inferir que o processo de reparação óssea foi intensa no primeiro período de reparação, menor atividade celular óssea no segundo período e predominante no terceiro período de reparação.

Nas imagens referentes ao implante da liga submetido ao 1º tratamento (tratamento alcalino e térmico) (Figura 56), observa-se que na interface osso/implante

houve a coloração dos três marcadores fluorocromáticos. Podem-se observar duas regiões bem delimitadas de tetraciclina e calceína nas quais as colorações estendem-se em direção à matriz óssea. A alizarina também está presente na interface em regiões mais esparsas, além disso, é vista na cortical externa como uma linha bem delimitada. Também está presente nas osteonas. Abaixo da marcação de alizarina na cortical, pode-se observar a calceína com a mesma orientação retílica. As osteonas possuem predominantemente marcação de calceína. A diferenciação com o implante de Ticp submetido ao mesmo tratamento está na presença da marcação de alizarina na interface osso/implante para o implante da liga. Portanto, o processo de reparação óssea e remodelação neste caso foram evidentes em regiões específicas da interface osso/implante e ocorrendo em todos os períodos de reparação. A disposição estratificada de marcação da tetraciclina, alizarina e calceína na região do implante em direção à matriz sugere que o osso depositado não foi remodelado até esse período e indica a velocidade de maturação desse osso em contato com o implante e adaptação posterior do osso adjacente ao osso novo evidenciados na marcação.

A marcação na interface osso/implante, presente nas imagens referentes ao implante da liga submetido ao 2º tratamento (Figura 57), possui regiões de tetraciclina e calceína. A matriz óssea e osteonas possuem uma marcação predominante de calceína, mas está presente também a tetraciclina, em azul.

Para o 3º tratamento no implante da liga (Figura 58), a marcação na interface osso/implante, assim como em outros tratamentos, foi predominantemente de tetraciclina e calceína. Da mesma forma, essa foi a predominância na matriz óssea, com osteonas marcadas pela calceína. A alizarina está evidenciada na região de cortical.

Num contexto geral, no Ticp, na liga e em todos os tratamentos de superfície utilizados são observadas as três colorações específicas, mostrando as fases em que houve o crescimento ósseo. Observando-se a região de interface osso/implante, pode-se verificar que há casos em que são observadas as três colorações, portanto os três marcadores fluorocromáticos e em outros, apenas as colorações azul (tetraciclina) e verde (calceína).

Os grupos em que são observadas as três colorações na interface são: o Ticp, o Ticp com tratamento padrão, o Ticp com o 2º tratamento e a liga com o 1º tratamento. Marcações com tetraciclina e calceína, são observadas na maioria dos casos: Ticp com o 1º e 3º tratamento, liga, liga com todos os tratamentos excetuando o 1º tratamento. Pela interface osso/implante, infere-se que as situações em que há as três colorações, a resposta de formação óssea foi em todos os períodos de reparação do pós-operatório. Para as duas marcações, há uma resposta celular óssea mais exacerbada no primeiro

período de reparação em sítios específicos, um período latente para a interface e uma continuidade do processo de osteointegração no terceiro período de reparação. Verifica-se que o Ticp e a liga tiveram um padrão de comportamento diferente na interface, podendo ser atribuído a diferenciais de composição, microestrutura e padrão topográfico de cada tipo de implante.

Figura 49: Micrografia de implante de Ticp sem tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E).

Figura 50: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao tratamento padrão, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).

Figura 51: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 1º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E).

Figura 52: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 2º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E e F).

Figura 53: Micrografia de implante de Ticp condicionado ao 3º tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E, F e G).

Figura 54: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr sem tratamento, no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam um osteoclasto (E).

Figura 55: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao tratamento padrão no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Setas indicam osteonas (E e F).

Figura 56: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 1º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).

Figura 57: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 2º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F); Seta indica osteona (E).

Figura 58: Micrografia de implante da liga Ti-13Nb-13Zr condicionado ao 3º tratamento no tecido ósseo (A); Mapeamento do elemento Ca (azul) e do elemento Ti (verde) (B, C, D); Imagens obtidas pela técnica de fluorescência (E e F).

Além da técnica de fluorescência, realizou-se a análise da histomorfologia do tecido ósseo frente à utilização de implantes de Tícp e liga Ti-13Nb-13Zr obtidos por M/P, com e sem os tratamentos de superfície. Foram utilizadas lâminas histológicas de tecido descalcificado corado por Hematoxilina-Eosina (Figuras 59 e 60). Pela observação dos cortes histológicos constatou-se que houve crescimento ósseo acompanhando o perfil de superfície para todos os implantes estudados. No osso formado em contato com a superfície do implante, removido para esta análise, foi observada a presença dos constituintes ósseos com morfologia preservada. Os osteócitos apresentaram-se em organização não lamelar e lamelar primário e foram evidenciados por núcleos de cor roxa em um halo claro dispersos na matriz óssea mineralizada. Esta matriz foi caracterizada pela coloração rosa difundida em todo o tecido. Nesse meio também, foram observados a presença de vasos sanguíneos antigos e neoformados, decorrentes da formação de osso novo e remodelação óssea.

Apesar de ser evidente a remodelação e neoformação óssea, não foi possível identificar pela técnica, osteoclastos e osteoblastos de forma característica. Ainda assim constatou-se a presença de endóstio recobrindo a medular do osso, responsável pelo suprimento de células osteoprogenitoras (osteoblastos).

O formato irregular do osso formado é condizente com o perfil de superfície dos implantes avaliados, mesmo após a remoção destes para o processamento morfológico. Essa característica mostra que o osso neoformado estava em íntimo contato com o implante, evidenciando o caráter de osteointegração. Também foi possível observar o caráter osteocondutivo dos implantes, em que o exemplo pode ser observado na Figura 59 D, já que é possível observar crescimento ósseo da região medular óssea em direção ao implante.

Figura 59: Tecido ósseo (tíbia de coelho) referente à implantação de Ticp processado por M/P com e sem tratamentos de superfície: (A) - Ticp, (B) – TP, (C) – 1T, (D) – 2T e (E) – 3T, coloração HE, (*) espaço referente ao implante removido. Seta indica osteocondução.

Figura 60: Tecido ósseo (tíbia de coelho) referente à implantação de liga Ti-13Nb-13Zr processado por M/P com e sem tratamentos de superfície: (A) – liga Ti-13Nb-13Zr, (B) – TP, (C) – 1T, (D) – 2T e (E) – 3T, coloração HE, (*) espaço referente ao implante removido.

5.5.2 Comparação da análise *in vitro* e *in vivo*

No estudo *in vitro* utilizou-se SBF para avaliação da formação dos compostos à base de fosfatos de cálcio para todos os tratamentos de superfície utilizados. Verificou-se que todos os tratamentos superficiais foram efetivos para a promoção da bioatividade. As diferenças entre os tratamentos estiveram na espessura de formação da camada e taxa de aposição desta ao longo dos períodos. Como no estudo *in vitro*, também se realizou um comparativo entre o padrão topográfico das superfícies (amostras obtidas por metalurgia do pó e amostras laminadas), constatou-se a grande influência que uma superfície rugosa e com porosidade típica da M/P possui na reatividade com o SBF. Foi observado que o recobrimento intermeia as irregularidades da superfície e porosidades, no entanto, a forma de nucleação parece ser preferencial em certas áreas da superfície, contribuindo para a formação de uma camada com espessuras variadas.

No estudo *in vivo* foram utilizados os implantes obtidos por M/P foram utilizados (Ticp e liga), com a típica característica topográfica. Foram utilizados implantes de Ticp e de liga desses materiais submetidos aos mesmos tratamentos de superfície que as amostras analisadas no estudo *in vitro*. Na experimentação animal foi possível constatar que o crescimento ósseo ocorreu em todos os grupos avaliados. As fases deste crescimento foram passíveis de serem avaliadas pela coloração dos três marcadores fluorocromáticos. Todos os grupos exibiram forte marcação de tetraciclina indicando intensa atividade, no primeiro período de reparação do pós-operatório e refere-se à primeira resposta tecidual óssea frente à implantação. Foi observado também que a marcação com tetraciclina esteve em regiões específicas da superfície do implante, com um crescimento ósseo preferencial nessa área. Na avaliação *in vitro*, o crescimento da camada de fosfato de cálcio também foi preferencial em regiões específicas.

Dessa forma, a analogia que pode ser feita entre as duas avaliações (*in vitro* e *in vivo*) é que nos dois casos, os tratamentos superficiais utilizados foram efetivos na promoção da bioatividade, proporcionando recobrimentos (avaliação *in vitro*) e crescimento ósseo (avaliação *in vivo*). Um comportamento similar nas avaliações foi a formação preferencial da camada de apatita com variações de espessura (*in vitro*) e forma de marcação da tetraciclina mais exacerbada em sítios específicos (*in vivo*). No entanto deve-se ressaltar que o ensaio *in vitro* teve uma duração de 21 dias e o SBF simula as condições de troca iônica entre a superfície da amostra e a solução para o humano, abordando o comportamento de ligação e nucleação dos compostos à base de fosfatos de cálcio no material. Nos ensaios *in vivo*, realizados em coelhos, sabe-se que o

metabolismo destes animais é cerca de três vezes superior ao do humano, portanto, a primeira resposta tecidual óssea frente à colocação dos implantes que pode ser correspondente ao ensaio *in vitro*, ocorreu na evidência da marcação com tetraciclina (primeiro período de reparação). As características de remodelação da matriz óssea e parâmetros de reparação ao redor do implante não são passíveis de serem avaliados pelo teste *in vitro* com o SBF, assim como o estudo *in vivo*, não pode inferir tipos e formas de nucleação da primeira resposta iônica. Desta forma, as duas avaliações forneceram uma grande gama de resultados e respostas, que contribuem para o estudo da influência das modificações superficiais para a osteointegração.

Considerações finais

Este trabalho contém uma grande quantidade de resultados para as avaliações *in vitro* e *in vivo*. Foram selecionados tratamentos de superfície considerados efetivos para promoção da bioatividade, de acordo com a literatura, e comparados para encontrar o de melhor desempenho. Além disso, a utilização de superfícies rugosas provenientes da técnica de metalurgia do pó, que pelo presente trabalho mostrou-se bastante eficaz para obtenção de recobrimentos com maior espessura quando comparados a superfícies lisas ($Ra = 1\mu m$). Embora o recobrimento só é passível de ser obtido mediante tratamento de superfície, é constatado no teste *in vivo*, que mesmo sem condicionamento prévio da superfície ocorreu a osteointegração dos implantes de TiCp e liga, evidenciando a efetividade dos materiais constituintes do implante associado a superfície de metalurgia do pó. Este é um dado fundamental, já que a maioria dos implantes utilizados no mercado médico-odontológico possuem superfícies usinadas (lisas).

No teste *in vitro*, os resultados evidenciaram diferenças drásticas para a formação, morfologia e taxa de nucleação do recobrimento nos diferentes tratamentos de superfície, em que o 2º tratamento (tratamentos ácido e alcalino) destaca-se como tratamento mais promissor a partir dos parâmetros avaliados. A correspondência de resultados encontrados na avaliação *in vitro* foi utilizada como base para a avaliação *in vivo*. No entanto, não é possível afirmar no teste *in vivo* qual tratamento de superfície apresenta melhor desempenho, pois todos os tratamentos de superfície utilizados mostraram osteointegração como resultado final. Portanto, todos são efetivos e pela análise realizada nenhum tratamento possui evidências biológicas que destacassem como

melhor tratamento de superfície para implantes ósseos. Da mesma forma, não se encontrou diferenças na osteointegração entre implantes de Ticp e liga Ti-13Nb-13Zr, em que ambos foram efetivos.

CONCLUSÕES

Finalizando este estudo, as principais conclusões estão apresentadas neste capítulo.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidas amostras e implantes de Ticp e da liga Ti-13Nb-13Zr por metalurgia do pó com porosidade de 12% e homogeneidade microestrutural. As amostras sem tratamento de superfície, pela avaliação *in vitro*, pode-se concluir que não houve a formação do recobrimento biomimético. Para amostras que receberam os tratamentos superficiais, pode-se concluir pela avaliação *in vitro*:

- Todos os tratamentos de superfície avaliados foram efetivos para a promoção da bioatividade em todas as amostras avaliadas.
- A formação dos compostos à base de fosfatos de cálcio ocorreu nas amostras de Ticp e liga para a superfície obtida por M/P e superfície laminada, desde o primeiro dia de imersão em SBF.
- A quantidade de núcleos de apatita na superfície e a espessura da camada formada foram maiores nas amostras obtidas por M/P quando comparadas com a superfície laminada de Ticp. Isto porque as superfícies obtidas por M/P possuem topografia e morfologia que proporcionam maior área específica, sendo promissoras no condicionamento para promoção da bioatividade.
- O melhor desempenho foi obtido com o 2º tratamento (tratamento ácido e alcalino), por apresentar maiores valores de espessura e de taxa de crescimento da camada nos períodos estudados até 21 dias de imersão em SBF.
- As amostras submetidas ao tratamento padrão e imersas em SBF apresentam os menores valores de espessura da camada à base de fosfato de cálcio quando comparados aos demais tratamentos para todas as superfícies avaliadas e em todos os períodos de imersão em SBF.
- Para o 1º tratamento, as amostras de Ticp obtidas por M/P apresentam, ao longo dos 21 dias, as maiores espessuras de camada formada seguidas pelas amostras da liga e por último, as amostras de Ticp laminada.
- Para o 3º tratamento, as superfícies das amostras obtidas por M/P, apresentam valores similares de espessura da camada formada até o 9º dia de imersão em SBF. A partir do 15º dia, obtêm-se maiores valores de espessura da camada para a liga, seguida do Ticp, ambos obtidos por M/P e por último, a placa de Ticp laminada.

Para a avaliação *in vivo*:

- Para todos os implantes de Ticp e da liga, com e sem tratamento de superfície, houve crescimento ósseo com osteointegração do implante.
- Foi possível identificar os períodos de reparação óssea através dos marcadores fluorocromáticos (tetraciclina, alizarina e calceína).
- O crescimento ósseo na interface osso/implante ocorre de forma contínua em todo o período de reparação para o Ticp, o Ticp com tratamento padrão, o Ticp com o 2º tratamento e a liga com o 1º tratamento; e ocorre de forma mais intensa no primeiro e terceiro períodos de reparação para o Ticp com o 1º e 3º tratamentos, liga, liga com todos os tratamentos, exceto o 1º tratamento.

Os resultados das avaliações *in vitro* e *in vivo* não são passíveis de analogia direta para determinar o melhor tratamento de superfície para implantes de Ticp e liga Ti-13Nb-13Zr, isto porque o teste *in vitro*, fornece respostas inorgânicas frente aos diferentes tratamentos de superfície, em que é possível identificar nucleação, formação, e espessura da camada à base de fosfato de cálcio. Enquanto no teste *in vivo*, é possível obter respostas biológicas das fases da reparação óssea, evidências de remodelação, osteocondução e osteointegração.

7. ANEXOS

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

Parecer - Projeto N° 69/10 - CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE TITÂNIO E SUAS LIGAS”** de responsabilidade do pesquisador **ANA HELENA DE ALMEIDA BRESSIANI** foi considerado APROVADO.

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

São Paulo, 29 de novembro de 2010

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

IPEN-CNEN/SP
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
 Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
 Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709
 E-mail: nnascime@ipen.br

Anexo II - Protocolo de embutimento para Resina Technovit 9100 NEW

- 1) Amostras fixadas em formol (10%) por 30 dias.
- 2) Desidratação:
 - a. Álcool 50% - 3 horas e 30 min
 - b. Álcool 95% - 3 horas e 30 min
 - c. Álcool 95% - 3 horas e 30 min
 - d. Álcool 95% - 8 horas e 30 min
 - e. Álcool 100% - 3 horas e 30 min
 - f. Álcool 100% - 3 horas e 30 min
 - g. Álcool 100% - 3 horas e 30 min
 - h. Álcool 100% - 8 horas e 30 min
 - i. Xilol – 3 horas e 30 min
 - j. Xilol- 24horas
 - k. Xilol- 24horas
- 3) Pré-infiltração
 - l. Resina (50%) + Xilol (50%)- 24horas
 - m. Resina (estabilizada) + Hardener -1-24horas
 - n. Resina (desestabilizada) + Hardener -1-24horas em geladeira
 - o. Solução A- 1hora em geladeira
 - 1) PMMA
 - 2) Resina desestabilizada
 - 3) Hardener- 1
- 4) Polimerização:
 - p. Solução A (9 partes) + Solução B (1parte) – dias em 8°C até -20°C

Anexo III – Protocolo de coloração das lâminas histológicas

Processamento do material fixado

- 1) Álcool 95° durante 1 hora e 30 minutos
- 2) Álcool 95° durante 1 hora e 30 minutos
- 3) Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 4) Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 5) Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 6) Álcool 100° durante 1 hora e 30 minutos
- 7) Xilol durante 1 hora e 30 minutos
- 8) Xilol durante 1 hora e 30 minutos
- 9) Xilol durante 1 hora e 30 minutos
- 10) Parafina durante duas horas e 30 minutos a 57°C
- 11) Parafina durante 4 horas a 57°C

Hematoxilina e Eosina (HE)

- a) Xilol durante 10 minutos
- b) Xilol durante 10 minutos
- c) Álcool 100° durante 3 minutos
- d) Álcool 95° durante 3 minutos
- e) Álcool 70° durante 3 minutos
- f) Água corrente durante 3 minutos
- g) Hematoxilina durante 5 minutos
- h) Água corrente durante 3 minutos
- i) Álcool ácido uma lavagem

- j) Água corrente durante 10 minutos
- k) Eosina durante 1 minuto
- l) Álcool 95° durante 1 minuto
- m) Álcool 100° durante 2 minutos
- n) Álcool 100° durante 2 minutos
- o) Xilol durante 2 minutos
- p) Xilol durante 2 minutos
- q) Montagem da lamínula com resina

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ BINYAMIN G, SHAFI B.M.,MERY C. M.Biomaterials: A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery* n.15, p.276-83, 2006.
- ² NIINOMI, M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 4, n. 5, p. 445-454, 2003.
- ³ MISCH, C.E. *Implantes dentários contemporâneos*. São Paulo: Santos, p. 685, 2000.
- ⁴ LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement — a materials science perspective. *Biomaterials*, v.19, n.18, p.1621-1639, 1998.
- ⁵ ACERO J., CALDERON J., SALMERON J.I., VERDAGUER J.J., CONCEJO C., SOMACARRERA M.L., The behaviour of titanium as a biomaterial : microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v.27, p.117-23, 1999.
- ⁶ GEETHA M., MUDALI U.K., GOGIA A.K., ASOKAMANI R., RAJ B., Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy. *Corros Sci*, v.46, p.877-92, 2004.
- ⁷ GEETHA M., SINGH A.K., ASOKAMANI R., GOGIA A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants- A review. *Progress in Materials Science* n.54, p.397-425, 2009.
- ⁸ BROWNE, M.; GREGSON, P. J. Effect of mechanical surface pre-treatment on metal ion release. *Biomaterials, Oxford*, v. 21, p. 385-392, 2000.
- ⁹ CHEN, W. J.; MONNAT, R. J. Jr.; CHEN, M.; MOTTET, N. K. Aluminum induced pulmonary granulomatosis. *Hum. Pathol.*, Philadelphia, v. 9, p. 705-711, 1978.
- ¹⁰ SUZUKI K., AOKI K., OHYA K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*, v.21, n.6, p.507-14, 1997.
- ¹¹ BRENTTEL A.S., VASCONCELLOS L.M.R., OLIVEIRA M.V., GRAÇA M.L.A., VASCONCELLOS L.G.O., CAIRO C.A.A., CARVALHO Y.R. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J.Appl Oral Sci* v.14, n.3, p.213-8, 2006.
- ¹² APARÍCIO C., RODRIGUEZ D., GIL F.J., Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering C*, v.31, p320–324, 2011.
- ¹³ JONASOVA L., MÜLLER F.A., HELEBRANT A., STRNAD J., GREIL P. Hydroxyapatite formation on alkali-treated titanium with different content of Na⁺ in the surface layer. *Biomaterials*, n.23, p.3095-101, 2002.
- ¹⁴ LANGHOFF J.D., VOELTER K., SCHARNWEBER D., SCHNABELRAUCH M., SCHIOTTIG F., HEFTU T.Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *J.Oral Maxillofac. Surg.* v.37, p.1125-32, 2008.

-
- ¹⁵ SANG-HYUN AN, MATSUMOTO T., MIYAJIMA H. Surface characterization of alkali- and heat-treated Ti with or without prior acid etching. ***Applied Surface Science*** n.258, p.4377–4382, 2012.
- ¹⁶ JONGE L.T., LEEUWENBURGH C.G. WOLKE J.G.C. JANSEN J.A. Organic-Inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. ***Pharmaceutical Research***, v.25, n.10, p.2358-69,2008.
- ¹⁷ LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. ***Materials Science and Engineering: R: Reports***, v.27, n.3-4, p.49-121, 2004.
- ¹⁸ FUKUDA A., TAKEMOTO M., SAITO T., et al, Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti–Zr–Nb–Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments, ***Acta Biomaterialia*** n.7, p.1379–1386, 2011.
- ¹⁹ KOKUBO T. Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. ***Materials Science and Engineering*** v.25, p.97-104, 2005.
- ²⁰ GIL F.J.,et al. Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants. ***Materials Science and Engineering*** v.22, p.53-60, 2002.
- ²¹ LIN, C. YEN, S. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. ***Materials Science and Engineering***. v. 26. p.54-64, 2006.
- ²² HABIBOVIC P, BARRÉRE F, VAN BLITTERSWIJK C.A., GROOT K., LAYROLLE P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants. ***Journal of the American Ceramic Society***, v. 85, 517–22, 2002.
- ²³ KOKUBO, T; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? ***Biomaterials***, v.27,p.2907-15, 2006.
- ²⁴ FENG, Q.L., WANG, H., CUI, F.Z. et al, Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment, ***Journal of Crystal Growth***, v. 200, n. 3-4, pp. 550-557,1999.
- ²⁵ GUÉHENNEC, L. L.; et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. ***Dental Materials***, v.23, n.7, p.844-854, 2006.
- ²⁶ TAKADAMA H., HASHIMOTO M., MIZUNO M., KOKUBO T. Round-robin teste f SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. ***Phos Res Bull***, v.17, p.119-25,2004.
- ²⁷ JONASOVA, L., MULLER, F.A., HELEBRANT, A. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium, ***Biomaterials***, v. 25, n. 7-8, p. 1187-1194, 2004,.
- ²⁸ SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. ***Revista da Faculdade de Odontologia Brasileira-USP***. v. 8. n. 1 e 2. p. 1-10., 2000
- ²⁹ COMPSTON J E, Sex steroids and bone. ***Physiol Rev.***,v.81, n.1.p. 419-47, 2001.
- ³⁰ COOPER L.F.,Biologic determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements. ***Journal of Prosthetic dentistry***, v.80, n.4, 439-49, 1998.

-
- ³¹ RESENDE, L.C.N. *Interação biológica: implante – tecido ósseo*. São Paulo: Almed, p.43-56,1994.
- ³² ROBERTS, W.E.; GARETTO, L.P. *Fisiologia e metabolismo ósseos*. In: MISCH, C.E. Implantes dentários contemporâneos. São Paulo: Santos, p.225-237,2000.
- ³³ RAAB-CULLEN D.M. et al. Bone response to alternate-day mechanical loading of the tibia. *J Bone Miner Res*, v.9, n.12, p.203-11, 1994.
- ³⁴ Figura retirada em 11/08/2010 e disponível em http://www.3bscientific.com.br/posters-grandes/estrutura-do-osso-v2050m,p_16_61_0_0_2127_image_full.html
- ³⁵ WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* v.30, p.5897-909, 2009.
- ³⁶ BROWNE M., GREGSON P.J. Metal ion release from wear particles produced by Ti-6Al-4V and Co-Cr alloy surfaces articulating against bone. *Materials Letters*, v. 24,n.6,1995.
- ³⁷ OLSZTA M., CHENG X., JEE S.S., KUMAR R., KIM Y-Y., KAUFMAN M.J., DOUGLAS E.P., GOWER L.B. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R* , 2007, doi:10.1016/j.mser.2007.05.001.
- ³⁸ BRACERAS I., et al. Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys. *Surface & Coatings Technology*, v.1996, p. 321-6, 2005
- ³⁹ LARSSON, C., et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and eletropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials*, v.17, p.605-616, 1996.
- ⁴⁰ BRÅNEMARK. P.I The Brånemark novum protocol for same day teeth: a global perspective. Berlim, *Quintessence Books*. p.9-15, 2001.
- ⁴¹ JONGE L.T., LEEUWENBURGH C.G. WOLKE J.G.C. JANSEN J.A. Organic-Inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharmaceutical Research*, v.25, n.10, p.2358-69,2008.
- ⁴² TEIXEIRA, E.R. *Superfícies dos implantes – o estágio atual*. In: DINATO, J. C. Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese. São Paulo: Artes Médicas. p.63-80, 2004
- ⁴³ VROMAN L., ADAMS A.L., KLINGS M. Interactions among human blood proteins at interfaces, *Fed. Proc.* v.30, p.1494-1502,1971.
- ⁴⁴ NIINOMI M., KURODA D., et al. Corrosion Wear Fracture of New β Type Biomedical Titanium Alloys. 2 Edition. *Materials Science and Engineering A*, v.263, p.193-99,1999.
- ⁴⁵ ROCHA MELLO, G.M. *Transformações de Fases e Características Microestruturais de Ligas Ti-Al e Ti-Nb*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2000 Dissertação (Mestrado).
- ⁴⁶ LIU, X.; CHU, P. K.; CHUANXIAN, D. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomadical applications. *Materials Science and Engineering*. v. 47, p. 49-121,2004.
- ⁴⁷ BRAGA, N.A. Aspectos relacionados à obtenção e à caracterização de titânio com porosidade tridimensional. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 27, n. 3, 119-124, 2008.

-
- ⁴⁸ DA SILVA, J.C. “**Estudo Comparativo de Superfícies de Titânio Utilizadas em Implantes.**”Dissertação (Mestrado) – Engenharia e Ciências dos Materiais – PIPE, Universidade Federal do Paraná. (2006).
- ⁴⁹ SHARMA H., VAN BOHEMEN S.M.C., PETROV R., SIETSMA J.Three-dimensional analysis of microstructures in titanium. **Acta Materialia**, 2010, doi:10.1016/j.actamat.2009.12.026.
- ⁵⁰ VAZ, A.P. **Morfologia dos revestimentos de titânio.** “Dissertação (Mestrado) – Engenharia Mecânica- Universidade Federal do Paraná.(2007)
- ⁵¹ BRAMA, Y.L.; SUN, Y.; DANGETI, S.R.K.; MUJAHID, M. Response of sputtered titanium films on silicon to thermal oxidation. **Surface & Coatings Technology**. v.195, p. 189-197, 2005.
- ⁵² WANG K. The use of titanium for medical applications in the USA. **Materials Science and Engineering A**, v.213,p.134-37,1996.
- ⁵³ DAVIDSON J.A., MISHRA A.K. KOVACS P., POGGIE R.A. New surface-hardened low-modulus corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloys for total hip arthroplasty. **Bio-medical Materials and Engineering**, v.243,p.231-36,1998.
- ⁵⁴ LONG M., RACK H.J. Review titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. **Biomaterials**, v.19,p.1621-39,1998.
- ⁵⁵ SONG Y., XU D.S., YANG R., LI D., WU W.T., GUO Z.X. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulu of β -type bio-titanium alloys. **Materials Science and Engineering** v.260, p.269-74,1999.
- ⁵⁶ SCHNEIDER SG. **Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial.**Tese de doutoramento. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, p.141, 2001.
- ⁵⁷ KHAN M.A., WILLIAMS R.L., WILLIAMS D.F. The corrosion behaviour of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. **Biomaterials**, v.20, p.631-37,1999.
- ⁵⁸ MÜLLER F.A., BOTTINO M.C., MÜLLER L., HENRIQUES V.A.R., LOHBAUER U., BRESSIANI A.H.A. et al. In Vitro apatite formation on chemically treated (P/M) Ti-13Nb-13Zr. **Dent Mater**,v.24,p.50-6 2008.
- ⁵⁹ HENRIQUES V.A.R., BELLINATI C.E.,SILVA C.R.M. Production of Ti-6%Al-7%Nb alloy by powder metallurgy (P/M). **Journal of Materials Processing Technology**, v.118, n.1-3, p.212-15, 2001.
- ⁶⁰ BRAGA, N.A.; FERREIRA, N.G. Obtenção de titânio metálico com porosidade controlada por metalurgia do pó. **Quim. Nova**. Vol.30, n. 2, pp. 450 – 457, 2007.
- ⁶¹ HENRIQUES V.A.R., SILVA C.R.M., BRESSIANI J.C. Utilização de técnicas de metalurgia do pó (M/P) na obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr. **Revista Metalurgia e Materiais**, v.59, n.532, 2003.

- ⁶² DAVIES J. E., AJAMI E., MOINEDDIN R., MENDES V.C., The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface. **Biomaterials**, v.34, p.3535-46, 2013.
- ⁶³ McDONALD, D.E.; MARKOVIC, B.; ALLEN, M.; SOMASUNDARAN, P.; BOSKEY, A.L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.41, n.1, p.120-130, 1998.
- ⁶⁴ DELIGIANNI, D.D.; KATSALA, N.; LADAS, S.; SOTIROPOULOU, D.; AMEDEE, J.; MISSIRLIS, Y.F. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and protein adsorption. **Biomaterials**, v.22, n.11, p.1241-1251, 2001.
- ⁶⁵ ELIAS, C.N.; LIMA, J.H.C. Importância da qualidade da superfície dos implantes osseointegráveis na biofixação. **Revista Brasileira de Implantodontia**, vol 7; 21-25:2001
- ⁶⁶ EHRENFEST DMD., COELHO PG., KANG B-S., SUL Y-T., ALBREKTSSON T., Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in Biotechnology**, v.28, n.4, p.198-206, 2010.
- ⁶⁷ PAREDES, R.S.C, VAZ, A.P., SILVA, J.C. **Avaliação da influencia da preparação da superfície de titânio utilizado para implantes odontológico revestidos com titânio depositado por aspensão térmica** P S. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
- ⁶⁸ TEIXEIRA, E.R. **Superfícies dos implantes – o estágio atual**. In: DINATO, J. C. Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p.63-80.
- ⁶⁹ MILLERET V., TUGULU S., SCHLOTTIG F., HALL H., Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clod formation. **European Cells and Materials**, v. 21, p.430-44, 2011.
- ⁷⁰ LINDAHL C., ENGQVIST H., XIA W. Influence of surface treatments on the bioactivity of Ti, **Biomaterials**, <http://dx.doi.org/10.5402/2013/205601>, 2013.
- ⁷¹ KOKUBO T., MATSUSHITA T., TAKADAMA H., KIZUKI T., Development of bioactive materials based on surface chemistry, **Journal of the European Ceramic Society**, v.29, p.1267-74, 2009.
- ⁷² KILPADI, D.V.; WEIMER, J.J.; LEMONS, J.E. Effect of passivation and dry heat sterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. Colloids and Surfaces. A: **Physicochemical and Engineering Aspects.**, v.135, p.89-101, 1998.
- ⁷³ SOBIESZCZYK S. Surface modifications of Ti and its alloys. **Advances in Materials Science**, v.10, n.1, p.29-42, 2010.
- ⁷⁴ NISHIO, K., YAMAGUCHI, T., ERA, H., Surface modification of titanium using laser beam, **Mater. Trans.**, v. 45 n. 5, p.1613-1619, 2004.

-
- ⁷⁵ SITTIG, C. HÄHNER, G. MARTI, A. et al., "The Implant Material, Ti6Al7Nb: Surface Microstructure, Composition and Properties", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.10, p 191 – 98, 1999.
- ⁷⁶ BEHNAMGHADER A., SALEMI H., AFSHAR A., ARDESHIR M., Effect of alkaline-acid treatment on the biomimetic formation of calcium phosphate layers on titanium substrates: an in vitro study. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, p.149-56, 2008.
- ⁷⁷ GUÉHENNEC, L. L.; et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v.23, n.7, p.844-854, 2006.
- ⁷⁸ KRISHNA DSR, SUN Y., Thermally oxidised rutile-TiO₂ coating on stainless steel for tribological properties and corrosion resistance enhancement. **Applied Surface Science**, v.252, p.1107-1116, 2005.
- ⁷⁹ ABE Y., KOKUBO T. AND YAMAMURO T. Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilising a Biological Process. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.1, p. 233-38, 1990.
- ⁸⁰ TANAHASHI M., YAO T., KOKUBO T., MINODA M., MIYAMOTO T., NAKAMURA T. AND YAMAMURO T. Apatite Coating on Organic Polymers by a Biomimetic Process. **J. Am. Ceram. Soc.**, v.77, n.11, p.2805-808, 1994.
- ⁸¹ PIATTELLI A., TRISI P., EMANUELLI M., Bone reactions to hydroxyapatite-coated dental implants in humans: histologic study using SEM, Light microscopy and laser scanning microscopy, **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.8, p.69-74, 1993.
- ⁸² LEITÃO E., BARBOSA M.A. AND DE GROOT K. Influence of Substrate Material and Surface Finishing on the Morphology of the Calcium-Phosphate Coating. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 36, p.85-90, 1997.
- ⁸³ KOKUBO T. Novel Bioactive Materials, **Anales de Química Int.** Ed. 93:S49-55, 1997.
- ⁸⁴ HENCH, L. L.; HENCH J.W.; GREENSPAN, D.C., Bioglass: A Short History and Bibliography, **J. Aust. Ceram. Soc.**, v.40, n.1, p.1-42, 2004.
- ⁸⁵ KOKUBO T., OHTSUKI C., KOTANI S., KITSUGI T., YAMAMURO T. **Surface structure of bioactive glass-ceramic A-W implanted into sheep and human vertebra**. In: HEIMKE G., editor. *Bioceramics*, v.2, Cologne: German Ceramic Society; 1990, p.113-21.
- ⁸⁶ KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v.27, p.2907-15, 2006.
- ⁸⁷ FILGUEIRAS M.R., TORRE G.L., HENCH L.L. Solutions effects on the surface reactions of a bioactive glass. **J. Biomed Mater Res** v.27, p.445-53, 1993.
- ⁸⁸ OYANE A., KIM H.M., FURUYA T., KOKUBO T., MIYAZAKI T., NAKAMURA T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **J Biomed Mater Res**, v.65, p.188-95, 2003.
- ⁸⁹ TAKADAMA H., HASHIMOTO M., MIZUNO M., KOKUBO T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. **Phos Res Bull**, v.17, p.119-25, 2004.
- ⁹⁰ BOHNER M., LEMAITRE J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials** v.30, p.2175-79, 2009.

-
- ⁹¹ MÜLLER L., MÜLLER F.A. Preparation of SBF with different HCO_3^- content and its influence on the composition of biomimetic apatites. **Acta Biomaterialia**, n.2, p.181-89, 2006.
- ⁹² INTERNATIONAL STANDARD, Implants for surgery - In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant, **ISO/FDIS 23317:2007**.
- ⁹³ LEE, B.H., KIM, Y.D., LEE, K.H. XPS study of bioactive graded layer in Ti-In-Nb-Ta alloy prepared by alkali and heat treatments, **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2257-66, 2003.
- ⁹⁴ FENG, Q.L., WANG, H., CUI, F.Z. et al. 1999, "Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment", **Journal of Crystal Growth**, v. 200, n. 3-4, pp. 550-557.
- ⁹⁵ KIM, H.M., MIYAJI, F., KOKUBO, T. et al., "Graded surface structure of bioactive titanium prepared by chemical treatment", **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, pp. 100-107 (1999).
- ⁹⁶ KIM, H.M., MIYAJI, F., KOKUBO, T. NAKMURA, T., "Preparation of Bioactive Ti and Its Alloys Via Simple Chemical Surface Treatment", **Journal of Biomedical Materials Research**, v.32, p. 409 – 417, 1996.
- ⁹⁷ KOKUBO T. Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. **Materials Science and Engineering** v.25, p.97-104, 2005.
- ⁹⁸ GIL F.J., et al. Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants. **Materials Science and Engineering** v.22, p.53-60, 2002.
- ⁹⁹ VERCIK, L.C.; ASSIS, C.M.; FOOK, M.V.L.; SANTOS, M.L.; GUASTALDI, A.C. Recobrimento de apatitas "in vitro" sobre titânio- influencia do tratamento térmico. **Ecl.Quim.** v.28, n.1, p.25-31, 2003.
- ¹⁰⁰ KIZUKI, T; TADAKAMA, H.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, T. KOKUBO, T. Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatments. **Acta Biomaterialia** (2010).
- ¹⁰¹ TAKEMOTO, M. et al. Osteoinductive porous titanium implants: Effect of sodium removal by dilute HCl treatment. **Biomaterials**, v.27, p.2682-91, 2006.
- ¹⁰² UCHIDA M, KIM HM, KOKUBO T, FUJIBAYASHI S, NAKAMURA T. Effect of water treatment on the apatite-forming ability of NaOH-treated titanium metal. **J Biomed Mater Res** v.63, p.522-30, 2002.
- ¹⁰³ RIGO E.C.S., BOSCHI A.O., YOSHIMOTO M. et al, Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants, **Materials Science and Engineering C** v.24, p. 647–651, 2004.
- ¹⁰⁴ GOIA T.S. **Implantes porosos à base de titânio: avaliação "in vitro" e "in vivo"**, Tese apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (doutorado), 2012.
- ¹⁰⁵ AN S-H., MATSUMOTO T., MIYAJIMA H., SASAKI J-I., NARAYANAN R., KIM K-H., Surface characterization of alkali- and heat-treated Ti with or without prior acid etching. **Applied Surface Science**, v.258, p.4377-82, 2012.

-
- ¹⁰⁶ PATTANAYAK D., KAWAI T., MATSUSHITA T., et al, Effect of HCl concentrations on apatite-forming ability of NaOH–HCl- and heat-treated titanium metal, ***J Mater Sci: Mater Med***, v.20, p.2401–2411, 2009.
- ¹⁰⁷ HAMOUDA I M., ENAN E T., AL-WAKEEL E E., YOUSEF MK M., Alkali and heat treatment of titanium implant material for bioactivity, ***Journal of Oral & Maxillofacial Implants***, v.27, n.4, 2012.
- ¹⁰⁸ LE GUÉHENNEC L., GOYENVALLE E., LOPEZ-HEREDIA MA., AMOURIQ Y., LAYROLLE P., Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. ***Clinical Oral Implants Research***, v.19, p.1103-10, 2008.
- ¹⁰⁹ JUNKER R., DIMAKIS A., THONEICK M., JANSEN J A., Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review, ***Clin. Oral Impl. Res***, v.20, n.4, p185-206, 2009.