

**ANA CRISTINA POSCH MACHADO**

**BIOCOMPATIBILIDADE *in vivo* DE IMPLANTES DE  
TITÂNIO SUBMETIDOS AO PROCESSO  
BIOMIMÉTICO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em  
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho  
Co-Orientadora: Dra. Marize Varella de Oliveira

São José dos Campos  
2008

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MACHADO ACP. Biocompatibilidade *in vivo* de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

São José dos Campos. 13 de fevereiro de 2008.

### Banca Examinadora

- 1 - Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP.
- 2 - Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- 3 - Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo - USP.
- 4 - Prof. Dr. Carlos Alberto Alves Cairo  
Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA)  
Comando Geral de Tecnologia Aeroespacial (CTA).
- 5 - Profa. Dra. Monica Calixto Andrade  
Instituto Politécnico do Rio de Janeiro  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, **Ana Maria e Celso**, por tudo o que consegui nesta vida. Sem vocês todas estas conquistas não teriam sentido. Muito obrigado por todo amor e sacrifício dedicado em minha formação.*

*Ao meu companheiro, **Jessen**, pelo carinho, compreensão e paciência. Amo você.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*À Profa. Dra. **Yasmim Rodarte Carvalho**, Professora Adjunta da área de Biopatologia Bucal, pelo voto de confiança ao me aceitar como orientada na pós-graduação, pela amizade e firme orientação na formação científica e na realização deste trabalho. Que a nossa amizade permaneça sempre a mesma.*

*Meu sincero agradecimento e respeito.*

*À pesquisadora Dra. **Marize Varella de Oliveira**, do Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro, pela sua atenção, disponibilidade e por sua ajuda indispensável principalmente durante as análises do material realizadas neste estudo. Obrigado por tudo isto e , sobretudo, pela nossa amizade.*

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – juntamente com a Divisão de Materiais do Comando-Geral de Tecnologia Aeroespacial (IAE/AMR - CTA) e com Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro (INT) por oferecerem a base e a estrutura para a realização deste estudo.

À Direção da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – na pessoa do digníssimo diretor Prof **José Roberto Rodrigues** por ter oferecido todas as condições para a realização do curso de pós-graduação

Ao pesquisador **Carlos Alberto Alves Cairo**, da Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE/AMR) no (CTA) pela orientação, atenção disponibilizada, amizade, confiança, incentivo e exemplo.

Aos Professores do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, à Profa. Adj. **Rosilene Fernandes da Rocha**, ao Prof. Adj. **Luiz Eduardo Blummer Rosa** e à Prof. Dra. **Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, por toda ajuda e compreensão.

Ao pesquisador Dr. **Mário Lima de Alencastro Graça**, pelo auxílio durante este estudo sempre que foi preciso.

À amiga e pesquisadora Dra. **Luana Marotta Reis de Vasconcellos** pela inestimável ajuda prestada em todas as fases deste trabalho.

À pesquisadora **Elizabeth Godoy César Salgado** pela ajuda durante a fase de análise topográfica e química dos implantes.

À amiga **Cristina Werkman**, por toda amizade e valiosa ajuda na realização deste trabalho, inclusive aos sábados, domingos e feriados.

À aluna de iniciação científica **Danielle Riera Paschotto** pela ajuda durante a fase experimental deste estudo

À pesquisadora **Waléria Medeiros** pelo auxílio no desenvolvimento do processo biomimético

Ao colega farmacêutico **Thiago Figueiredo** pela grande ajuda na confecção do fluido corpóreo simulado

À pesquisadora **Neila de Almeida Braga** e ao INPE pelas contribuições na espectroscopia Raman

Ao Prof Dr. **Ivan Balducci**, pela análise estatística deste trabalho.

Aos funcionários do IAE/AMR e da Faculdade de Odontologia, em especial, **João Bernardes, Gil, Fábio, Lourival, Antônio Domingos**, pela colaboração em todos os momentos deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Erena Michie Hasegawa, Rosemary de Fátima Salgado, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lílian Faria das Graças** pela ajuda sempre que solicitadas

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela colaboração e convívio durante este período.

À minha família, bem como meus amigos queridos, de São José dos Campos, Guaratinguetá, São Caetano do Sul, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Osseointegração.....	16
2.2 Biomateriais.....	19
2.3 Topografia dos implantes.....	23
2.4 Recobrimento da superfície de implantes metálicos.....	31
2.5 Processo biomimético.....	39
2.6 Caracterização do recobrimento.....	47
3 PROPOSIÇÃO.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Obtenção e caracterização dos implantes.....	51
4.2 Processo biomimético e análise da superfície.....	56
4.3. Instrumentação Raman.....	59
4.4 Procedimento cirúrgico.....	60
4.5 Análise histológica e histomorfometria.....	71
4.6 Teste mecânico.....	72
4.7 Análise estatística.....	76



5 RESULTADOS.....	77
5.1 Caracterização dos implantes - Análise metalográfica.....	77
5.2 Caracterização do revestimento – MEV, EDS e Raman.....	79
5.2.1. EDS e MEV.....	79
5.2.2 Espectroscopia Raman.....	83
5.3 Análise qualitativa da neoformação óssea.....	84
5.4 Análise quantitativa da neoformação óssea.....	98
5.5 Teste mecânico.....	101
6 DISCUSSÃO.....	104
7 CONCLUSÃO.....	119
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXOS.....	135
APÊNDICES .....	136
<i>ABSTRACT</i> .....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = análise de variância

AR = alta rugosidade

BR = baixa rugosidade

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , = fórmula da hidroxiapatita

$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  = fórmula da fluorapatita

CaP= fosfato de cálcio

$\text{cm}^{-1}$  = comprimento de onda

DEXA = Raios X por absorptometria

EDS = energia por dispersão de raios X

FCSm = fluido corpóreo simulado modificado

FHA = fluorhidroxiapatita

FT-IR = espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GC = grupo controle

GPa = giga Pascal

GT = grupo teste

HA = hidroxiapatita

INT = Instituto Nacional de Tecnologia

IR = infravermelho

Kg = kilograma

Md = mandíbula

MEV = microscopia eletrônica de varredura

Mg = Magnésio

mg = miligrama

mL = mililitro

MO = microscopia de luz

MPa = mega Pascal

$\mu\text{m}$  = micrometro

N = newton

Ni = níquel

$^{\circ}\text{C}$  = graus Celsius

RFA = frequência de ressonância

SBF = do inglês *simulated body fluid* traduzido para fluido corpóreo simulado

Ti = titânio

Ti6Al7Nb = liga titânio alumínio nióbio

TOF – SIMS = espectrometria de massa por íon secundário

TPS = do inglês *titanium plasma sprayed*, traduzido pra jateamento com plasma de titânio

TS = tempo de sacrifício

MACHADO ACP. Biocompatibilidade *in vivo* de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos; 2008.

## RESUMO

Propõe-se neste estudo avaliar a neoformação óssea no interior dos poros e ao redor de implantes porosos de titânio, submetidos ao processo biomimético modificado, inseridos em tíbias de coelhos. Foram confeccionados 180 implantes de titânio puro grau 2, com porosidade controlada, obtidos por meio da metalurgia do pó. Noventa implantes foram pré-tratados com solução de NaOH à 130°C/1h, submetidos à temperatura de 200°C/1h e posteriormente imersos em fluido corpóreo simulado modificado por 14 dias. Os implantes foram inseridos em 30 coelhos sendo que cada um recebeu 3 implantes tratados na tíbia esquerda e 3 sem tratamento na tíbia direita. Os animais foram sacrificados em 15, 30 e 45 dias após a cirurgia e os fragmentos das tíbias contendo os implantes foram submetidos à análise histológica, histomorfométrica e teste mecânico de cisalhamento. A análise microestrutural das amostras foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria por energia dispersiva de raios X (EDS) e espectroscopia Raman e a avaliação da neoformação óssea por microscopia de luz (MO) e MEV, comparando implantes sem tratamento com aqueles submetidos ao tratamento biomimético. O EDS indicou que a superfície do implante após o tratamento biomimético continha principalmente cálcio (Ca) e fósforo (P) além da presença de titânio. A Espectroscopia Raman do implante de titânio, após o tratamento biomimético, indicou pico característico e de grande magnitude a  $960\text{cm}^{-1}$  devido à formação de uma camada de hidroxiapatita. As imagens ao MO e MEV demonstraram que houve neoformação óssea na interface osso-implante e no interior dos poros, inclusive naqueles mais centrais. Observou-se que a porcentagem média de neoformação óssea nos implantes tratados nos três tempos de sacrifício foi maior do que nos implantes não tratados, sendo observada diferença significativa no período de 15 dias. O teste mecânico mostrou que implantes com recobrimento foram deslocados com maior tensão do que os implantes sem recobrimento, diferença esta significativa. Conclui-se, portanto, que o tratamento biomimético induziu a formação de hidroxiapatita sobre a superfície dos implantes e em relação à osseointegração estes apresentaram melhor desempenho que os implantes sem recobrimento.

Palavras-chaves: Próteses e implantes; titânio; porosidade; materiais biomiméticos; osseointegração

## 1 INTRODUÇÃO

A substituição de partes perdidas do corpo humano por materiais sintéticos tem sido uma grande preocupação da humanidade. A implantodontia dos anos 50, 60 e 70 caracterizou-se por experiências, falhas e controvérsias no que diz respeito aos princípios biológicos. A obtenção de uma interface fibrosa perimplantar era almejada por numerosos autores e a anquilose era considerada um fator negativo para o prognóstico do implante. No início dos anos 80, Per-Ingvar Brånemark<sup>19</sup> trabalhando com materiais à base de titânio comercialmente puro, notou que o organismo não rejeitava a presença deste material em sua proximidade, gerando uma adesão ao metal de maneira íntima, desta forma iniciou-se a chamada era da osseointegração na implantodontia.

A osseointegração é definida como uma união anatômica e funcional direta entre o osso remodelado e a superfície do implante<sup>19</sup> sendo que a eficácia do implante depende essencialmente da bioatividade do material, ou seja, da sua capacidade de estabelecer uma interface mecanicamente sólida, sem a presença de tecido fibroso, com a completa união entre a superfície do material e o tecido ósseo<sup>6,64</sup>.

Dentre os materiais, o titânio comercialmente puro e suas ligas, apresentam excelentes propriedades mecânicas e boa resistência à corrosão, o que tem motivado seu uso em diversos procedimentos médicos e odontológicos<sup>118</sup>. A camada de óxido de titânio formada na superfície do implante, aderente e estável ao ambiente corporal, confere uma excelente biocompatibilidade ao material<sup>92</sup>. As observações ao microscópio eletrônico de varredura e de transmissão mostraram que a interface osso-implante é isenta de tecido fibroso, garantindo assim a osseointegração<sup>118,120</sup>.

A geometria e a topografia da superfície são importantes para o sucesso da integração osso-implante a curto e a longo prazo. A quantidade e a qualidade da osseointegração estão relacionadas às propriedades superficiais dos biomateriais. Tanto a composição química, a capacidade hidrofílica quanto à rugosidade são parâmetros importantes no aumento da união mecânica do implante ao osso<sup>12,34,91,103</sup>.

A superfície do implante, pelo seu íntimo contato celular, é a região principalmente associada com o processo de osseointegração, sobre a qual ocorre a diferenciação de células não osteogênicas em osteoblastos com conseqüente proliferação e morfogênese óssea<sup>43</sup>. A modificação mecânica da superfície do implante tem sido interesse de várias investigações na literatura<sup>17,84,136</sup>. Entretanto, o aparecimento de uma superfície bioativa para a melhora da osseointegração não é obtida somente por meio de alterações mecânicas.

Diversas técnicas, físicas e químicas, vêm sendo propostas para o tratamento da superfície do titânio visando aumentar a sua biocompatibilidade e o desenvolvimento da osseointegração. A pulverização com plasma de titânio (*plasma spraying* – TPS)<sup>91</sup>, o tratamento térmico<sup>98</sup>, o recobrimento com materiais osteocondutores como a hidroxiapatita<sup>32,33,67,131</sup>, o fosfato de cálcio<sup>96,135</sup> ou a fluorapatita<sup>43</sup> são alternativas avaliadas nos estudos demonstrando resultados divergentes.

O método denominado biomimético e introduzido por Abe et al.<sup>1</sup> é uma das técnicas mais promissoras para a produção de biomateriais sob condições ambientes. Este método consiste na imersão do substrato em uma solução sintética de composição química e pH semelhante aos do plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano. Devido a essas condições é possível recobrir materiais de formas complexas, como materiais porosos, e também materiais sensíveis a altas temperaturas, como é o caso dos polímeros. Além disso, com esta técnica pode-se recobrir implantes com diferentes fases de fosfatos de

cálcio, as quais possuem características benéficas para a formação óssea<sup>11</sup>.

Por isso, pesquisas complementares são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre a superfície do implante modificada quimicamente e suas conseqüências para a osseointegração, desenvolvendo, finalmente, um modelo de implante que promova atração, adaptação e condução das células ósseas com mais rapidez.

Assim, o objetivo deste estudo será analisar as características da reparação óssea ao redor de implantes porosos, confeccionados com titânio puro grau 2 e submetidos ao tratamento biomimético.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Osseointegração

A necessidade de substituir o tecido ósseo perdido ou mesmo dentes com outros materiais é evidenciada desde os tempos pré-históricos. Achados arqueológicos mostram que corais, conchas, madeira, metais, como o ouro e a prata, entre outros, são alguns dos diversos materiais utilizados para a substituição principalmente dos dentes<sup>82</sup>.

Nos dias atuais, para a correção da grande maioria dos defeitos e substituições do tecido ósseo utiliza-se o osso autógeno obtido do próprio indivíduo de sítios diferentes, ou alógeno obtido de outros indivíduos da mesma espécie. Entretanto, diversas complicações e desvantagens acompanham o uso destes procedimentos, no caso do autógeno há extenso trauma para o paciente, possibilidade de morbidade da área doadora e disponibilidade limitada. Quanto ao alógeno, além de limitado suplemento e altos custos, a transmissão viral e a reação imunológica são complicações pertinentes<sup>80,101</sup>.

Portanto, existe um crescente interesse em desenvolver materiais sintéticos com propriedades e composição semelhantes ao osso para substituir o tecido perdido, sem reações adversas ou complicações.

Geralmente, materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são encapsulados por um tecido fibroso. Entretanto, em 1972, Hench et al.<sup>60</sup> mostraram que alguns vidros, chamados *bioglass*, uniam-se espontaneamente ao tecido ósseo sem a formação de tecido fibroso. Desde então, vários tipos de materiais têm sido utilizados clinicamente para substituição do tecido ósseo<sup>72</sup>.



Dentre os materiais, comerciais e experimentais, utilizados recentemente, incluem-se metais, polímeros, fosfatos de cálcio de origem natural e sintética, hidroxiapatita sintética, vidros bioativos, entre outros<sup>30, 31,60,101</sup>.

O objetivo principal é a obtenção da osseointegração, caracterizada por uma conexão estrutural e funcional direta entre o osso e a superfície de um implante<sup>88</sup>. Essa adesão, também conhecida como "anquilose funcional"<sup>116</sup> pode ser comparada com uma regeneração direta, onde o tecido ósseo é depositado diretamente sobre o tecido de granulação formado na região da fratura, sem a formação de um tecido fibroso ou fibrocartilaginoso intermediário<sup>115</sup>.

Após a implantação no organismo humano, o implante é recoberto primeiramente por neutrófilos e macrófagos podendo ocorrer a formação de células gigantes a partir de macrófagos ativados, o que pode levar a uma reação de corpo estranho. Além disso, a liberação de citocinas pelos macrófagos atrai fibroblastos que realizam a encapsulação do processo<sup>89</sup>. Simultaneamente, células osteoprogenitoras migram para o sítio de implantação e se diferenciam em osteoblastos produzindo osso. Inicialmente, após o implante ser exposto à matriz óssea e ao fluido extracelular, ocorre a interação com a água e íons, e a partir desta reação, há adsorção de proteínas não-específicas<sup>89</sup>. Posteriormente proteínas não-colagenosas e fatores de crescimento são ativados e liberados, vindos primeiramente da circulação sanguínea e fluidos teciduais e tardiamente da atividade celular da região, sendo responsáveis pela reparação. As células da medula óssea e do periósteo são atraídas para o local, onde se diferenciam em osteoblastos e se multiplicam, interagindo com o material inorgânico do implante<sup>22,69</sup>.

A osseointegração desenvolve-se através de três estágios programados. Primeiramente é depositado um tecido ósseo imaturo que usualmente se origina do tecido adjacente em direção à superfície do implante; a partir do 2º mês inicia-se o depósito de um tecido ósseo

lamelar e, dentro de um mês, o estágio de remodelação óssea se inicia com eventos simultâneos de reabsorção óssea pelos osteoclastos e de formação através dos osteoblastos. Os eventos deste último estágio se mantêm ao longo da vida, sendo assim importantes para a longevidade do implante<sup>115</sup>.

As primeiras fases da osseointegração estão diretamente relacionadas com a adesão e o espalhamento das células. A adesão depende de eventos que ocorrem a curto prazo, como as ligações físico-químicas entre as células e o material (forças iônicas, forças de *Van der Waals*) e, além disto, depende de eventos a longo prazo, envolvendo moléculas biológicas como células, proteínas, entre outras. A qualidade destes eventos irá influenciar a capacidade de proliferação das células em contato com o implante<sup>6,64</sup>.

Schenk e Buser<sup>115</sup> relataram que a estrutura do osso adjacente é responsável por modificações na resposta tecidual aos diferentes tipos de implantes dentários, principalmente no que diz respeito à estabilidade primária. O osso compacto, cujo volume da densidade da matriz óssea é de aproximadamente 80 a 90%, é o tecido que mais contribui para a estabilidade primária. Nas regiões corticais a estabilidade é obtida pela fixação direta do implante ao osso, porém, a pressão exercida pela colocação do implante promove deformação plástica das lamelas, compressão e ruptura de vasos sanguíneos com conseqüente necrose de algumas áreas. Por isso ocorre a formação de espaços, porém, mesmo assim, a estabilidade ainda permanece. Por meio da remodelação óssea as áreas avasculares são substituídas por tecido ósseo maduro. Por outro lado, o osso esponjoso que apresenta um volume da densidade da matriz óssea de somente 20 a 25%, contribui muito pouco para a estabilidade primária. Em contrapartida, uma grande área da superfície do implante fica exposta à medula óssea, na qual existe ampla vascularização e muitas células precursoras de osteoblastos. No primeiro contato as trabéculas ósseas livres servem como âncoras

ósseas de suporte para o implante e, posteriormente, os espaços são recobertos por osso lamelar e finalmente sujeitos à contínua remodelação, promovendo não só uma qualidade óssea desejável como também a dimensão e orientação dos elementos de suporte.

De acordo com Kasemo e Lausmaa<sup>68</sup> a interação de um material inorgânico com o sistema biológico ocorre em nível molecular, e, a partir desta, desenvolvem-se as reações biológicas celulares. O material é recoberto por uma mistura de lipídeos, açúcares, íons e proteínas, sendo que a topografia, a densidade da carga e a composição química da superfície do implante vão determinar qual tipo de molécula vai adsorver e de que forma será esta adesão<sup>15</sup>. Geralmente o implante é separado do tecido ósseo por uma fina camada de material não mineral e a osseointegração é atribuída a rugosidades da superfície e a presença de poros<sup>89</sup>.

Portanto, três estruturas precisam ser consideradas no desenvolvimento da osseointegração: a superfície óssea preexistente, o tecido ósseo neoformado na interface implante-osso e a superfície do implante<sup>115</sup>. A formação óssea ao redor do implante é um processo complexo e ainda pouco compreendido.

Vários fatores como metabolismo do hospedeiro, características químicas e topográficas da superfície são importantes na otimização da osseointegração<sup>125</sup>.

## **2.2 Biomateriais**

Os biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que podem ser utilizadas por tempo indeterminado na substituição total, parcial ou reparação de tecidos vivos danificados. Os

biomateriais possuem a característica fundamental da biocompatibilidade, ou seja, são inertes biologicamente, não causando nenhum efeito nocivo ao organismo. Eles atendem ao requisito de funcionalidade para o qual foram desenvolvidos, provocando, assim, o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos não sendo rejeitados quando implantados<sup>51</sup>.

Do ponto de vista clínico, um biomaterial sintético ideal como substituto ósseo, além de provocar uma reação fibrosa mínima, deve ser bioativo, capaz de levar à neoformação óssea e troca de íons com o tecido ósseo. Mecanicamente, o material deve apresentar resistência similar ao tecido cortical ou trabecular que está sendo substituído<sup>51</sup>. Além disto, deve possuir características de superfície favoráveis para o depósito de tecido ósseo, ao que chamamos de osseocondutividade<sup>47,122</sup>.

Bioatividade é definida como a propriedade do material de desenvolver uma união direta, firme e forte com o tecido ósseo, observada primeiramente com as cerâmicas de vidro<sup>106</sup>. Estudos *in vitro* demonstraram que esta propriedade é atribuída a materiais que têm a habilidade de formar na sua superfície carbonato-hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$ ), principal componente presente na fase mineral ou inorgânica do osso<sup>60,76</sup>. A HA -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - apresenta alta bioatividade, biocompatibilidade e uma grande integração ao tecido ósseo vivo<sup>1</sup>.

Segundo Ilan e Ladd<sup>62</sup>, a osseocondutividade é um processo pelo qual o material se comporta como um arcabouço onde se dá o crescimento ósseo, sem atuar na neoformação óssea. É a propriedade do material de suportar o crescimento do tecido ósseo e o desenvolvimento das células osteogênitoras, facilitar e orientar a neoformação vascular e a criação de novos sistemas haversianos para ocorrer a neoformação óssea<sup>51</sup>. Tanto a composição química quanto a arquitetura geométrica do material determinam esta propriedade que

permite o encaixe, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas para neoformação e aposição direta do tecido ósseo ao material<sup>17</sup>.

Por outro lado, a osseoindução é a habilidade de um material estimular ou promover a formação óssea no local onde é implantado. Constitui um mecanismo que não só recruta como também induz células mesenquimais a se diferenciarem em células osteoblásticas que darão origem à neoformação óssea<sup>137</sup>. Fujibayashi et al.<sup>47</sup> relataram que os biomateriais podem ser osteoindutores na presença adicional de agentes como as proteínas ósseas morfogênicas e fatores de crescimento.

Estas são características que evidenciam a biocompatibilidade dos biomateriais, pois aumentam a capacidade de adesão e espalhamento das células na sua superfície, com conseqüente melhora na interação do tecido com o material do implante<sup>6</sup>.

Como o sistema imunológico humano pode rejeitar materiais estranhos encontrados no corpo, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de tornar possível e eficaz o uso de materiais sintéticos para substituição do tecido ósseo perdido<sup>51</sup>.

Dentre os materiais empregados, o titânio comercialmente puro e suas ligas vêm sendo utilizados como material de escolha, não só pela sua excelente biocompatibilidade, mas também pelas suas propriedades de alta resistência mecânica, ductilidade, baixo módulo de elasticidade, alta resistência à fadiga e à corrosão<sup>59,89,97</sup>. Além disto, é considerado um material inerte, não desenvolvendo reações imunológicas celulares adversas no tecido adjacente e sua toxicidade nos tecidos humanos é observada apenas em concentrações acima de 2000 ppm<sup>59</sup>.

Quanto à superfície do implante, a sua composição química e a sua microestrutura parecem exercer um papel importante nas reações celulares na interface osso-implante, levando a uma união íntima ou até mesmo a estimulação do crescimento ósseo<sup>37,39</sup>. Atualmente,

investiga-se muito a influência da composição química e elétrica, da estrutura e microestrutura, da contaminação e esterilização dos implantes sobre as respostas teciduais.

Uma característica inerente do titânio é a capacidade de formar espontaneamente, quando exposto ao ar, uma camada de óxido estável e protetora contra a dissolução do material<sup>89,120</sup>. A propriedade de oxidação da superfície dos implantes de titânio é responsável pelo seu alto grau de biocompatibilidade, interação química e melhora da ligação com a matriz extracelular, fatores importantes na dinâmica do processo de osseointegração<sup>69,92, 118,120</sup>.

A superfície do titânio não é suficientemente bioativa para induzir o crescimento de tecido ósseo e a boa fixação óssea leva normalmente vários meses, por isso, modificações na superfície melhoram o controle das interações osso-implante e diminuem o tempo para se obter a estabilidade<sup>105</sup>.

Por outro lado, as apatitas, conhecidas por sua grande bioatividade e capacidade de união direta ao tecido ósseo apresentam limitações quanto à aplicação clínica por apresentarem propriedades mecânicas diferentes das do tecido osso. Estes materiais normalmente apresentam alto módulo de elasticidade o que causa estresse, bem como fratura do material quando utilizados para substituição óssea<sup>101</sup>.

Portanto, a bioatividade do titânio pode ser incrementada por meio de tratamentos químicos e térmicos específicos capazes de formar na sua superfície fosfatos de cálcio *in vitro*, como a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ), que poderá se ligar diretamente ao osso quando implantado, sem perder suas propriedades mecânicas similares às daquelas do tecido ósseo<sup>47,101,132</sup>.

### 2.3 Topografia dos implantes

Albrektsson et al.<sup>2</sup> sugerem que para o sucesso da osseointegração são importantes seis fatores: material do implante, formato, condições da superfície, qualidade do osso, técnica cirúrgica e carga do implante.

Os métodos mecânicos para a modificação da superfície dos implantes, como polimento, usinagem, pulverização, jateamento, entre outros, têm como objetivo obter diferentes topografias e rugosidades superficiais, remover a contaminação e melhorar a fixação do material e a resposta osteogênica<sup>89</sup>. Diversos estudos mostraram um aumento na fixação do osso ao implante de superfície rugosa ou porosa, em comparação com amostras de superfície lisa<sup>14,34,35,42,46</sup>.

Brunette et al.<sup>21</sup> avaliaram a influência da superfície do implante, lisa ou porosa, de diferentes marcas comerciais na orientação e proliferação celular. Os resultados demonstraram que as células epiteliais foram mais aderentes às ranhuras do que às regiões lisas adjacentes.

Kasemo e Lausmaa<sup>68</sup> demonstraram que variando a superfície do implante entre liso e rugoso, ocorreram diferentes tipos de contato e adesão celular, concluindo, portanto, que as reações biológicas do tecido vivo estão diretamente relacionadas com as propriedades da superfície do implante.

A revisão realizada por Pilliar<sup>110</sup> em 1998 comparou a reparação óssea por meio do MEV, de diversos formatos e superfície de implantes metálicos endósseos: rosqueados, colocados sob pressão, com superfície modificada quimicamente, com superfície submetida a tratamento de *plasma spray* e porosa. Este estudo demonstrou que os implantes com superfície porosa e irregular são mais efetivos para a fixação ao osso.

Nishiguchi et al.<sup>98</sup>, e Jonásová et al.<sup>63</sup> mostraram que os implantes de titânio com superfície lisa quando não submetidos a solicitações mecânicas, durante um certo período, possuem a tendência de serem encapsulados por tecido fibroso e apresentam força de ligação óssea reduzida.

Contrariando vários estudos, Hallgren et al.<sup>58</sup> compararam implantes com superfícies de diferentes texturas: rugoso e liso, quanto à integração dos implantes ao osso. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos e após o sacrifício, o material foi submetido à análise de frequência de ressonância e análise de torque. Este estudo demonstrou que não houve influência da textura da superfície no processo de osseointegração.

O aumento da rugosidade também pode ser obtido por meio do ataque ácido<sup>78,163</sup> ou o tratamento com *plasma spray*<sup>67,91</sup>. As melhores propriedades, no caso de implantes com superfície rugosa, estão relacionadas com o crescimento ósseo na direção das pequenas reentrâncias, promovendo uma forte ligação e boa resistência da interface osso-implante<sup>64</sup>.

Por outro lado, o desenvolvimento de uma microestrutura composta por uma rede tridimensional de poros em toda a sua espessura, vem sendo interesse de uma série de pesquisas<sup>13,78,103</sup>. Os poros e suas interconexões tridimensionais proporcionam uma via de acesso para o crescimento ósseo, conhecido como *bone ingrowth*<sup>34,35</sup>, melhorando o imbricamento mecânico, a interdigitação do tecido ósseo com o implante e evitando a sua mobilidade<sup>10,103,117</sup>. O tempo para a fixação mecânica do implante neste caso é reduzido, assim como o período de imobilização da área reabilitada<sup>71,87,113</sup>.

O tamanho mínimo dos poros necessário para o crescimento ósseo deve ser suficiente para evitar a formação de tecidos moles entre o implante e o tecido ósseo e a interconectividade entre os poros deve permitir a penetração óssea e a sua vascularização<sup>15,22,117</sup>.



Desta forma a qualidade do tecido ósseo proliferado para o interior dos poros está diretamente relacionado como tamanho dos poros interligados<sup>24</sup>.

Embora o crescimento ósseo possa ocorrer dentro de poros muito pequenos, com 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, é recomendável o tamanho de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , para que ocorra um forte entrelaçamento do implante com o osso com expressivo crescimento ósseo<sup>42</sup>. Pilliar et al.<sup>111</sup> indicam o tamanho de 50 a 400  $\mu\text{m}$  dos poros e, em contrapartida, Kusakabe et al.<sup>79</sup> consideram o diâmetro adequado dos poros entre 500 e 1000  $\mu\text{m}$ . Um material poroso ideal deve ser composto por meso ou microporos para promover a adesão e adsorção de metabólitos biológicos e macroporos possibilitando um meio de acesso para o crescimento ósseo interno e fornecimento de nutrientes possibilitando a regeneração tecidual nas regiões mais internas<sup>54,118</sup>.

Portanto, a alta porosidade e a presença de poros amplos são propriedades morfológicas importantes para a reparação óssea pois contribuem para a proliferação e osseointegração do material implantado. Além disto, há uma redução na diferença do módulo de elasticidade entre o titânio e o osso, diminuindo o estresse na interface<sup>127</sup>.

Wen et al.<sup>132</sup> utilizaram o titânio comercialmente puro, com grânulos de 45  $\mu\text{m}$ , associado a partículas de carboreto de hidrogênio-amônia que funcionavam como espaçadores, sob a forma de grânulos de 200 a 600  $\mu\text{m}$ , para desenvolver um modelo de titânio poroso, por meio da metalurgia do pó. Utilizaram prensagem isostática com 200 MPa e tratamento térmico em duas fases de 200°C/ 5 horas e 1200°C/ 2 horas. A avaliação foi feita por meio de microscopia de luz (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), metalografia e ensaio de compressão. As imagens ao MEV mostraram dois tipos de poros, macroporos interligados e com tamanho variando de 200 a 500  $\mu\text{m}$  e microporos com diâmetro em torno de 12  $\mu\text{m}$ . A porcentagem de todos os poros da amostra foi de 80%. No ensaio de compressão o valor de

resistência obtido foi de 40 MPa. Os autores concluíram que esta amostra pode ser fabricada com sucesso pela técnica de metalurgia do pó e preenche todos os requisitos para ser utilizada clinicamente. A técnica permite o controle da forma, tamanho e porcentagem de poros, tornando o material biocompatível e osseocondutor.

Keller e Young<sup>70</sup> avaliaram, por meio de análise histomorfométrica, a quantidade de crescimento ósseo para o interior dos poros de implantes inseridos em mandíbulas de macacos. Os resultados mostraram que cerca de 65% dos poros foram preenchidos por osso e não ocorreu a formação de tecido fibroso na interface osso-implante.

Frosch et al.<sup>46</sup> pesquisaram o crescimento, mineralização e formação de osso sobre corpos de prova de titânio apresentando poros com diâmetro de 300, 400, 500, 600 e 1000  $\mu\text{m}$ . Para o estudo, os autores utilizaram cultura de células osteoblásticas de humanos e os resultados foram avaliados por meio de MEV, microscópio de transmissão, imunofluorescência, histologia, radiografias de alta resolução, teste enzimático para fosfatase alcalina e microscópio de força atômica. Concluíram que a osseointegração se inicia por células precursoras de osteoblastos e é influenciada pelo diâmetro dos poros, sendo que aqueles com 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro exibiram maior proliferação celular. Em continuidade, os mesmos autores, Frosch et al.<sup>45</sup>, incubaram com osteoblastos os implantes e posteriormente implantaram em fêmur de coelhos, observando acelerada formação de tecido ósseo e contato significativamente maior entre osso-implante.

A resposta da reparação óssea dos tecidos circunjacentes a implantes de liga de titânio com superfície porosa inseridos em mandíbula de cães foi avaliada por Deporter et al.<sup>37</sup> por meio de análise histológica e histomorfométrica. Os autores analisaram o tempo mínimo requerido para o crescimento de osso para o interior dos poros, cujo diâmetro variava entre 50 e 200  $\mu\text{m}$ . Um grupo de animais foi sacrificado com quatro semanas e o outro com oito semanas. Os resultados

apresentados sugerem que o período de cicatrização não deve passar por mais de quatro semanas, uma vez que não houve diferença entre os grupos, com relação à quantidade de tecido ósseo presente na superfície do implante.

Bobyn et al.<sup>12</sup> fabricaram, por meio da metalurgia, implantes porosos caracterizados com porosidade de 35 a 40% e poros com o diâmetro de 200 a 250 µm. Estes implantes foram colocados em 12 cães e 11 em humanos. Após um período de cicatrização que variou de quatro semanas a sete anos foram realizadas análises histológica e radiográfica. A partir dessas análises foi verificado que todos os implantes exibiram crescimento ósseo para dentro dos poros, com variação de 30 a 50% de preenchimento. Porém, a análise radiográfica não foi bom indicador do grau de formação óssea.

Deporter et al.<sup>36</sup> compararam, por meio de análise histológica, dois tipos de implantes porosos e rosqueados lisos. Para o estudo foram utilizados seis cães, cada um recebeu dois implantes na região de terceiro e quarto pré-molar inferior esquerdo e direito. Após seis semanas foi colocado o cicatrizador após reabertura do local dos implantes. Após 18 meses os animais foram sacrificados para a realização das análises. Os resultados mostraram que o implante poroso permite osseointegração mais efetiva, uma vez que a área de contato do implante está aumentada devido a presença de poros.

Vasconcellos<sup>128</sup> avaliou a reparação óssea ao redor de implantes de titânio puro grau 2, porosos e densos, confeccionados via metalurgia do pó. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos, e após 4 e 8 semanas os animais foram sacrificados. Os resultados foram obtidos por meio de análise histológica, histomorfométrica e pelo ensaio de cisalhamento, concluindo-se que os implantes porosos apresentaram maior contato na área de interface osso-implante e maior adesão ao osso, melhorando a osseointegração.

Eriksson et al.<sup>40</sup> avaliaram o grau de mineralização do

tecido ósseo ao redor de implantes de titânio poroso implantados em tíbias de ratos. Após uma semana foi realizada espectrometria de massa por íon secundário (TOF-SIMS). Após esta análise, concluiu-se que a porosidade apresentou uma leve correlação positiva com relação à mineralização.

A influência da porosidade sobre a neoformação óssea em 4 diferentes estruturas porosas, utilizando algoritmos específicos para análise tri-dimensional de interligação baseada no sistema de tomografia computadorizada foi avaliada por Ohtsuki et al.<sup>101</sup> As análises histomorfométricas foram realizadas *in vivo* após os períodos de 6 e 12 semanas de implantação das estruturas em fêmur de coelhos. Os resultados revelaram que os poros com “pescoço” fino, isto é, via de vascularização estreita eram preenchidos com tecido ósseo pouco diferenciado. Os autores concluíram que o número de interligações entre os poros é mais importante do que o diâmetro das interligações para a boa circulação dos fatores de crescimento.

Dentre os diversos processos aplicados para a confecção de implantes porosos, as técnicas de metalurgia do pó vêm sendo cada vez mais usadas na fabricação de implantes cirúrgicos e revestimentos porosos à base de titânio e suas ligas, em substituição aos processos metalúrgicos convencionais. Os primeiros revestimentos porosos metálicos produzidos por metalurgia do pó foram desenvolvidos em 1963 por Welsh, que utilizando esta metodologia fabricou peças metálicas com a mistura de dois ou mais pós, seguida da compactação (uniaxial e isostática) da mistura e posterior sinterização do material. A produção de uma estrutura porosa por meio deste método é resultado da utilização de materiais orgânicos, denominados espaçadores, que são removidos por meio da evaporação em baixas temperaturas (200°C a 500°C), anteriormente ou durante a sinterização<sup>14,20,103</sup>.

Bram et al.<sup>18</sup> produziram amostras de titânio, ligas de níquel (Ni) e aço inoxidável com alta porosidade a partir da utilização de

carbamida (uréia). Primeiramente foram selecionadas partículas esféricas do aditivo orgânico que tivessem diâmetro entre 0,8 mm e 6 mm. A quantidade de uréia variou de acordo com a porcentagem de porosidade exigida após a sinterização (60, 70 ou 80%). Em seguida, foi realizada uma mistura do pó do metal com este aditivo orgânico e compactação em uma matriz cilíndrica em uma prensa uniaxial. Posteriormente, realizou-se a prensagem isostática com 166 MPa. A uréia então foi removida à 200°C em estufa e o processamento foi finalizado com sinterização de 1200°C no forno a vácuo. As amostras foram avaliadas em microscópio óptico (MO) e microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que a adição de um aditivo orgânico, utilizando a técnica de metalurgia do pó, produzia uma porosidade adequada de 60 a 80%, poros de diâmetros entre 0,1 a 2,5mm e distribuição homogênea dos mesmos. Os autores concluíram que a técnica de metalurgia do pó produziu porosidade adequada quando associada a um aditivo orgânico.

No estudo de Wen et al.<sup>132</sup> para a confecção de amostras com poros medindo entre 200 µm e 500 µm, os autores utilizaram pós de titânio (Ti) e de Magnésio (Mg) associados às partículas de carboreto de hidrogênio amônia e de carbamida e prensagem isostática de 100 MPa. A porosidade final da amostra de Ti foi de 78% e da amostra de Mg foi de 50%, sendo que ambos resistiram à implantação e à aplicação de carga *in vivo*. Observou-se dois tipos de poros: os microporos isolados, pequenos e distribuídos nas paredes dos macroporos que se tornaram abertos e interligados. De acordo com os autores estes microporos provavelmente foram resultantes do volume de contração que ocorreu nas amostras durante o processo de sinterização.

A metalurgia do pó, segundo German<sup>50</sup>, apresenta diversas vantagens: alta produtividade, fácil automação, baixo custo, controle exato da composição química do material, possível fabricação de peças com alta pureza, utilização de 100% das matérias primas, homogeneidade estrutural e das propriedades, produção de peças com

formas complexas e definitivas sem a necessidade de usinagem posterior, obtenção de uma porosidade controlada e melhor acabamento superficial das peças.

O processamento dos implantes via metalurgia do pó realizado em baixas temperaturas, possibilita economia de matéria prima, redução do número de etapas complementares, refinamento da microestrutura e, como consequência, a otimização simultânea das propriedades de ductilidade e resistência à corrosão<sup>37</sup>. Por meio da metalurgia do pó, a configuração, o diâmetro e a porosidade dos metais podem ser controlados<sup>18,102,103</sup>.

Diversos fatores podem influenciar na morfologia dos poros, desta forma, Oliveira et al.<sup>104</sup> avaliaram a superfície de quatro diferentes amostras confeccionadas variando dois tipos de substrato e a pressão isostática (200 e 300 MPa). Os resultados, obtidos por meio do MEV e metalografia, demonstraram que a distribuição dos poros ao longo das amostras foi heterogênea variando de acordo com os diferentes valores da pressão isostática. As características morfológicas foram melhores naquelas submetidas à pressão isostática de 200 MPa, pois apresentou 24% de porosidade com poros de 119  $\mu\text{m}$ .

Oliveira et al.<sup>103</sup> avaliaram o tamanho dos poros e os níveis de porosidade adequada de implantes utilizando revestimento de pó de titânio puro com tamanho de 30 a 70  $\mu\text{m}$  ou de 80 a 100 $\mu\text{m}$ , e ainda a adição de um aglomerante (pó de naftaleno). A compactação isostática a frio foi realizada com 300 MPa e a sinterização à 1200°C. A análise metalográfica quantitativa e ao MEV permitiram aos autores concluir que o tamanho das partículas de titânio e o uso de aglomerante influenciaram no controle da porosidade nestas condições.

## 2.4 Recobrimento da superfície de implantes metálicos

Geralmente os materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são encapsulados por tecido fibroso isolando-os do tecido ósseo ao redor<sup>72</sup>. Porém, diversos tipos de cerâmicas, utilizadas nos últimos 25 anos, vêm demonstrando uma união direta ao osso sem a formação de qualquer tecido fibroso. Esta propriedade é dada pela capacidade destes materiais formar na superfície uma camada de apatita semelhante ao osso<sup>73,77</sup>.

Dentro deste contexto, metais revestidos com fosfatos de cálcio tornaram-se de grande interesse. O resultado destes produtos é um material com boas propriedades mecânicas e boa biocompatibilidade, devido, respectivamente, ao substrato metálico ao revestimento de fosfato de cálcio<sup>5</sup>.

Apesar de ser um metal bioinerte, o titânio e suas ligas não se aderem quimicamente ao osso, exceto em condições específicas. Por este motivo, pode ocorrer a formação de um tecido fibroso ao redor do implante e novas técnicas de recobrimento da superfície estão sendo desenvolvidas para resolver este problema<sup>87</sup>. O objetivo do revestimento de fosfato de cálcio nos implantes de titânio é aumentar a bioatividade, associando-a à sua resistência à fratura e, baixo módulo de elasticidade<sup>76</sup>.

Segundo Wen et al.<sup>133</sup>, diversas técnicas químicas e físicas têm sido aplicadas na deposição de finos revestimentos, realizadas, em geral, a altas temperaturas e resultando na formação de uma apatita quimicamente diferente da apatita óssea, com baixa aderência ao substrato metálico e ao tecido ósseo adjacente, degradação em curto período de tempo após a implantação e deterioração do substrato metálico.

Os métodos químicos para o tratamento do titânio e suas ligas incluem reações químicas e/ou eletroquímicas entre o substrato com uma solução ácida, alcalina, ou com peróxido de hidrogênio. Outro tratamento químico consiste na deposição de vapor por meio de uma reação entre uma substância na forma de gás com o substrato, resultando na deposição de componentes não voláteis sobre o mesmo. Finalmente, o tratamento sol-gel, consiste em uma reação química entre a superfície do material e partículas sólidas em um líquido (sol) ou gel, dentro de uma solução<sup>89</sup>.

Os métodos físicos, onde não ocorrem reações químicas, produzem recobrimento da superfície por meio de energia térmica, cinética e elétrica. Entre eles se incluem o *spray* térmico (*plasma spray*) e deposição física de vapor (processo de evaporação, *sputtering*, implantação de íons)<sup>89</sup>.

Utilizando a técnica de *plasma spray* em implantes porosos, Kim et al.<sup>71</sup> verificaram que este tratamento proporcionou a formação de uma camada de titanato de sódio e de apatita na superfície do titânio o que aumentou, não só o crescimento ósseo para o interior dos poros, mas também a interação química. Entretanto, esta técnica não permite controle preciso da composição química e da estrutura dos cristais do recobrimento. Como resultado, a camada de apatita é mecanicamente e quimicamente instável, constituída por uma mistura de componentes cristalinos e não-cristalinos ou fosfatos de cálcio amorfos, o que torna fraca a união ao substrato metálico<sup>25,55,83</sup>.

Pilliar et al.<sup>111</sup> estudaram a influência do recobrimento de HA obtido por meio do *plasma spray* em implantes porosos colocados em mandíbula de cães. Após 72 semanas, os animais foram sacrificados e o exame histológico das peças demonstrou que o grupo com recobrimento obteve maior ganho de formação de osso comparado com o grupo sem o recobrimento. Adicionalmente os autores verificaram uma reabsorção do revestimento de cerca de 20 a 50  $\mu\text{m}$  num período 18 meses.



Em contrapartida, o estudo de Cook e Rust-Dawicki<sup>28</sup> não encontrou diferenças significativas na adesão dos implantes porosos comparados com aqueles com recobrimento de HA inseridos em mandíbula de cães, avaliando a cicatrização em 2, 4, 8, 12 semanas. Os autores também avaliaram estas características de implantes inseridos no fêmur destes cães e após 2, 4, 8, 12, 16, 24, e 34 semanas de implantação observaram um crescimento ósseo significativamente maior principalmente no período de 12 semanas nos implantes sem o recobrimento.

Vidigal Jr et al.<sup>131</sup> compararam implantes com e sem recobrimento com HA e observaram, por meio de análise histológica, que aqueles recobertos apresentavam uma interface osso-implante mais integrada. Porém, os autores evidenciaram a perda da cobertura com HA em alguns implantes, fato também verificado no estudo de Karabuda et al.<sup>67</sup>.

Svehla et al.<sup>121</sup> estudaram as modificações da resposta osteogênica em contato com superfícies de titânio, comparando amostras porosas, rugosas, lisas e recobertas com HA com espessura de 50 µm. Para o estudo os autores implantaram as amostras na tíbia de cinco cabras que foram sacrificados nos períodos de 4, 8 e 12 semanas. Os melhores resultados de cicatrização óssea bem como de fixação mecânica foram encontrados entre os implantes com superfícies porosa e porosa recoberta com HA.

Peng et al.<sup>109</sup> verificaram por meio do MEV e difração de raios X a deposição de uma fina camada de fosfato de cálcio sob substrato de titânio, utilizando uma reação eletroquímica em um fluido corpóreo simulado à 37°C.

O estudo de Costa et al.<sup>29</sup> avaliou *in vivo* o desempenho de implantes dentários rosqueados, de titânio comercialmente puro, com e sem recobrimento de HA sintética obtido por meio do processo de eletroforese. Este método de acordo com os autores apresenta algumas

vantagens sobre outras técnicas como período curto de execução (2 a 3 min) e grande reprodutibilidade. Os revestimentos foram caracterizados por meio do MEV, EDS e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), demonstrando uma camada de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de carbonato-apatita bem aderida ao substrato metálico. Após 8 e 12 semanas da colocação dos implantes em tíbias de coelhos, estes foram sacrificados. A análise histomorfométrica mostrou uma porcentagem de contato osso-implante significativamente maior nos implantes recobertos com HA. Concluiu-se que os implantes recobertos tiveram melhor desempenho que aqueles sem recobrimento e que o processo de eletroforese parece ser uma alternativa simples e viável para se recobrir implantes de titânio com material ossecondutivo, como a hidroxiapatita.

Takemoto et al.<sup>123</sup> analisaram o efeito do tratamento químico e térmico na capacidade de osteocondução de implantes com estrutura porosa, inseridos em tíbias de coelhos, e as suas propriedades mecânicas. A porosidade foi produzida pela técnica *plasma spray* e perfaziam 40% da amostra, que apresentou resistência à compressão de 80 MPa. Os resultados, observados após o período de sacrifício de 2, 4, 8 e 16 semanas, demonstraram que a porcentagem de contato osso-implante foi estatisticamente maior nos implantes porosos tratados do que nos não tratados.

Tavares et al.<sup>124</sup> realizaram um estudo *in vivo* utilizando cães e analisaram a influência do tratamento químico na neoformação óssea. Oito cães tiveram os pré-molares extraídos e após 3 meses receberam, em cada lado, um implante controle e um implante experimental, os quais foram tratados com ataque ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 4 horas. Após 3 e 8 meses da cirurgia os animais foram sacrificados e as peças avaliadas histológica e histomorfometricamente. Os resultados demonstraram que independente do período avaliado, os implantes de superfície tratada exibiram maior contato com o tecido ósseo, sendo observada diferença estatisticamente significativa. Estes

dados indicam que os implantes com superfície tratada quimicamente aumenta o contato para a osteogênese, aspecto que pode ser benéfico para a colocação de carga imediata nestes implantes.

O recobrimento com fluoridroxiapatita (FHA) ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ) tem sido investigado como uma alternativa porque suas propriedades de osseointegração são similares às da HA e com maior bioestabilidade comparada com outros tipos de revestimento<sup>94</sup>. A análise histológica de implantes com diferentes características superficiais: lisos, rugosos e recobertos com fluoridroxiapatita realizada por Moroni et al.<sup>95</sup>, demonstrou maior ganho de tecido ósseo na interface dos implantes recobertos com FHA, sem diferenças estatísticas quanto à força de torque para a extração.

Fini et al.<sup>43</sup> investigaram a influência do revestimento de FHA em implantes de uma liga de titânio comparando dois tipos, baixa e alta rugosidade superficial, inseridos na tíbia de oito carneiros e sacrificados após 12 semanas, concluindo que, pelos resultados do exame histológico, histomorfométrico e força de torque para remoção, a melhor osseointegração foi obtida pelos implantes com baixa rugosidade independente do recobrimento com FHA.

Visando melhorar a biocompatibilidade dos implantes de titânio, além do recobrimento com HA e FHA, outros métodos de tratamento alternativos da superfície do material vêm sendo propostos, entre eles, a ionização da superfície<sup>17</sup>, a estimulação térmica e alcalina<sup>99</sup> e a deposição eletroquímica de fosfato de octacálcio<sup>55</sup>.

As características gerais de diversos estudos que comparam diferentes tratamentos da superfície estão descritas no Quadro 1.





Dentre as diferentes técnicas, o revestimento por meio do *plasma spray* é a mais usada comercialmente, apesar das desvantagens no controle da composição e estrutura do fosfato de cálcio formado sobre o metal<sup>4,129</sup>. Em geral, não há uniformidade da espessura da camada depositada e, além disso, não há controle sobre a integridade estrutural e a cristalinidade do revestimento<sup>136</sup> o que pode afetar negativamente a adesão dos osteoblastos<sup>9</sup>. Adicionalmente, Yan et al.<sup>134</sup>, Kim et al.<sup>71</sup> e Nishiguchi et al.<sup>99</sup>, demonstraram que esta técnica, em implantes porosos, leva à redução do volume disponível do poro para o crescimento do tecido ósseo, devido à presença do revestimento. Além disso, há dificuldade em recobrir materiais com superfícies irregulares, resultando na degradação do recobrimento. Por fim, os autores mostraram que *in vivo* a hidroxiapatita se desprende do substrato, mesmo no período inicial de implantação, e o tecido fibroso pode se estender para baixo dessa camada.

A perda progressiva da camada de hidroxiapatita leva com o tempo à reabsorção óssea (osteólise) e conseqüente perda do implante<sup>134</sup>. Segundo Nishiguchi et al.<sup>99</sup>, quando o revestimento de hidroxiapatita está completamente degradado, a interface entre o osso e a superfície do implante fica instável.

Em virtude da necessidade de um revestimento bioativo com maior aderência, uniformidade e alta resistência mecânica, Kokubo et al.<sup>76</sup> estudaram um método de revestimento biomimético de hidroxiapatita através de fluido corpóreo simulado (FCS) para a produção de revestimentos bioativos em implantes metálicos, conhecido como processo biomimético<sup>134</sup>.

## 2.5 Processo biomimético

Muitas pesquisas têm sido focadas no desenvolvimento de revestimentos bioativos especialmente com HA, proporcionando assim uma osseocondução mais rápida do osso adjacente ao implante e união química ao novo osso formado<sup>4,5,25,71,76,99,114,132,137</sup>.

O tratamento da superfície dos implantes de titânio com a utilização de soluções que contenham diversos íons capazes de precipitar heterogeneamente fosfatos de cálcio em substratos metálicos é conhecido como processo biomimético<sup>25,71,76,99,114</sup>. Este tratamento visa obter uma camada de apatita na superfície dos implantes de titânio aumentando a sua osseocondutividade e trazendo benefícios para a osseointegração<sup>134</sup>.

Estudos anteriores demonstraram que uma camada de apatita é formada por meio de uma reação química quando um vidro bioativo é implantado em um defeito ósseo e fica em contato com fluidos corpóreos<sup>60</sup>. Esta apatita também pode ser observada em condições experimentais, quando colocado em fluido corpóreo simulado<sup>77</sup> e consiste de carbonato-apatita com pequenos cristais e baixa cristalinidade, características similares à apatita do tecido ósseo.

A solução proposta por Kokubo<sup>76</sup> chamada de SBF (*simulated body fluid*) contém concentrações de íons semelhantes aos dos fluidos extracelulares sem a presença de células ou proteínas.

Segundo Andrade et al.<sup>5</sup> métodos biomiméticos de revestimento de hidroxiapatita sobre o titânio baseiam – se na nucleação e crescimento do fosfato de cálcio em FCS a 37° C. Associa-se também o pré-tratamento térmico-químico da amostra metálica para aumentar significativamente a adesão química da apatita nucleada e crescida na superfície do titânio. Este método biomimético estimula o crescimento ósseo na superfície de implantes de titânio por meio do revestimento de

fosfato de cálcio, pois forma materiais híbridos com propriedades similares as do tecido ósseo utilizando equipamentos de baixo custo e sob condições simples de confecção<sup>101</sup>.

O processo biomimético apresenta quatro principais vantagens: processamento a baixas temperaturas, podendo ser aplicado a qualquer substrato com sensibilidade térmica, como os polímeros; formação de cristais de hidroxiapatita similares ao tecido ósseo contendo características de alta bioatividade e boa reabsorção para sua substituição; deposição sobre e dentro dos poros em implantes com geometria mais complexa; incorporação de fatores estimulantes de crescimento ósseo<sup>55</sup>.

A adesão química também ocorre entre o fosfato de cálcio e o substrato no processamento biomimético de implantes de titânio resultando na manutenção do revestimento com adequada fixação ao implante<sup>74</sup>.

Segundo Habibovic et al.<sup>55</sup>, o processo biomimético é uma das técnicas mais promissoras para a produção de fosfato de cálcio, pois imita o processo de mineralização óssea. Os implantes metálicos são imersos no fluido corpóreo simulado (FCS) à temperatura e pH fisiológicos. Apesar do fluido corpóreo simular apenas a composição inorgânica, o pH e a temperatura do plasma humano sangüíneo, não se sabe se somente estas são condições ideais para o processo de revestimento. A dificuldade é a estabilidade do FCS que exige a constante manutenção do pH para o crescimento dos cristais de fosfato de cálcio.

O processo de formação de precipitados sólidos a partir de FCS possui três etapas: a) interação química da superfície do implante com a solução e formação heterogênea de núcleos de sólido amorfo; b) lenta transformação dos núcleos em apatita cristalina e, c) crescimento do cristal de apatita<sup>7</sup>.



Kokubo<sup>76</sup> propôs um método de processamento biomimético para implantes de titânio, cujas principais etapas são detalhadas a seguir:

a) pré-tratamento químico e térmico: a superfície metálica do titânio é recoberta espontaneamente com uma fina camada de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), tornando-se assim quimicamente estável. Quando os implantes são imersos em solução alcalina ( $\text{OH}^-$ ) há a dissolução da camada de óxido podendo promover a corrosão e formação de grandes poros na superfície do material, por meio da reação:  $\text{TiO}_2 + \text{OH}^- \rightarrow \text{HTiO}_3^-$ . Assim, quando o titânio e suas ligas são submersos e reagem com solução aquosa NaOH durante o pré-tratamento proposto, ocorre incorporação dos íons sódio aos íons  $\text{HTiO}_3^-$  formando um gel mecanicamente e quimicamente instável, chamado de titanato de sódio -  $\text{Na}_2\text{TiO}_3$ <sup>75</sup>. Para a estabilização deste gel, o titânio é submetido a tratamento térmico ao redor de  $600^\circ\text{C}$ , ocorrendo a desidratação da camada de titanato de sódio. Esta camada se estabiliza como uma camada de titanato de sódio amorfo contendo pequenas quantidades de titanato de sódio cristalino ( $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$ ) e rutilo ( $\text{TiO}_2$ )<sup>75</sup>;

b) formação de fosfato de cálcio em FCS: Após o tratamento alcalino e térmico, os implantes de titânio são submersos em fluido corpóreo simulado à  $37^\circ\text{C}$ , para a formação de uma camada densa e uniforme de apatita na superfície. Primeiramente os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) da camada de titanato

formados com o pré-tratamento são substituídos por íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  do interior do FCS formando grupos  $\text{Ti-OH}^-$  na superfície, esta reação induz a formação de apatita da seguinte forma: a superfície do metal tratado é inicialmente carregada negativamente ( $\text{Ti-OH}^-$ ) o que atrai íons  $\text{Ca}^{+2}$  positivos, do fluido formando assim titanato de cálcio ( $\text{CaTiO}_3$ ) amorfo. Simultaneamente, há o acúmulo de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , tornando a superfície levemente positiva, o que atrai íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-2}$ ), negativos, para formar o fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) amorfo. Esta camada é então cristalinizada e muitos núcleos de apatita são formados na superfície e crescem espontaneamente através do consumo de íons cálcio e íons de fosfato do FCS<sup>44</sup>. A camada de apatita resultante é fortemente ligada ao substrato já que se integra ao titânio através do óxido de titânio<sup>74,99,126,132</sup>.

A Figura 1 ilustra as mudanças na superfície do titânio quando submetido ao tratamento com NaOH com conseqüente formação da camada de hidrogel de titanato de sódio e após o tratamento térmico a 600°C com a formação da camada de titanato de sódio amorfo e/ou cristalino (a), posteriormente a imersão em FCS demonstrando a formação da camada de apatita (a, b e c)<sup>89</sup>.

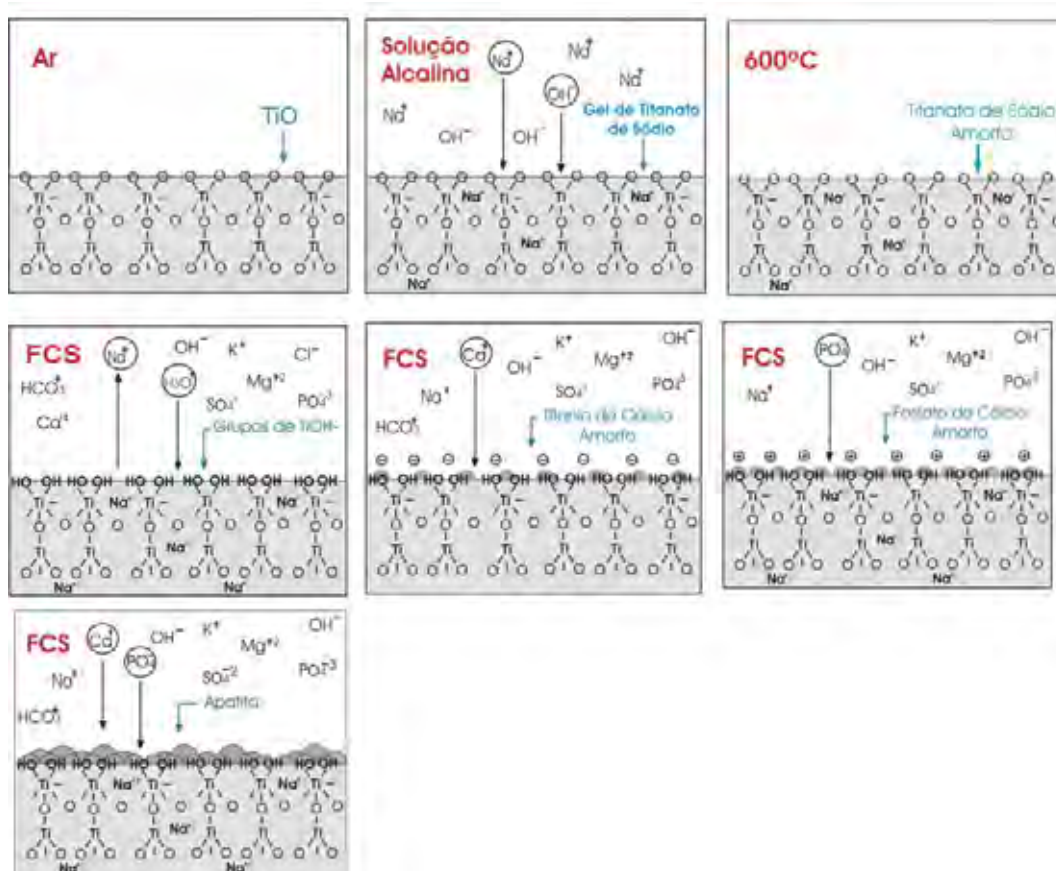


FIGURA 1 – Esquema demonstrando as etapas da formação de apatita por meio das modificações na superfície de implantes de titânio imersos em fluido corpóreo simulado (LIU et al. <sup>89</sup>, 2004).

Após a implantação, o implante possui uma energia de superfície reduzida, permitindo a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos, estes produzem fibras colágenas as quais constituem a fase orgânica do tecido ósseo<sup>44</sup>. Este colágeno é mineralizado e ocorre a neoformação óssea. Assim, o osso ao redor pode entrar em contato direto com a superfície do implante sem a intervenção do tecido fibroso<sup>74</sup>.

Diversas modificações foram propostas e vários pré-tratamentos foram usados desde a primeira composição de FCS criada por Kokubo<sup>76</sup>, a fim de acelerar o recobrimento com HA sobre implantes de titânio e otimizar o processo para melhorar a bioatividade<sup>44</sup>.

O experimento de Stoch et al.<sup>119</sup> demonstrou que o pré-tratamento de imersão em solução gel de óxido de cálcio e sílica e tratamento térmico, a 400°C por 30 minutos, ativam a superfície de implantes de titânio para a nucleação e o crescimento de carbonato - apatita. A concentração do FCS influenciou na quantidade de fosfato precipitado sobre o titânio, e a apatita formada após a imersão no FCS por 20 dias foi biologicamente semelhante à natural, um importante passo para a união direta do implante com o osso. A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) usada no estudo permitiu verificar a composição molecular e a estrutura dos precipitados de fosfato no metal produzido durante o tratamento do metal.

O tratamento térmico (600°C/1h) associado ou não ao tratamento alcalino (NaOH) de amostras de titânio com 40% de porosidade preparadas por meio de processo metalúrgico, e posterior imersão em FCS no estudo de Liang et al.<sup>87</sup> não levou à nucleação de apatita, apenas quando se usou 0,5 ou 1,0M de NaOH nas amostras. Os autores atribuíram a falha à estrutura superficial do implante, formada por poros muitos pequenos.

Vercik et al.<sup>130</sup> verificaram a influência do tratamento térmico em diferentes temperaturas (400, 500, 600, 700 e 800°C) e posterior depósito da camada de apatita sobre implantes de titânio pelo método biomimético. Comprovaram, por meio de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a presença da hidroxiapatita nos revestimentos em qualquer condição experimental, sendo menos cristalina quando submetida a temperaturas entre 400 e 600°C.

Recentemente, conseguiu-se acelerar o processo biomimético clássico de 7-14 dias para 01 dia por meio da imersão do substrato em FCS supersaturado (5xFCS). Mostrou-se a interdependência da força iônica, pH, concentração de carbonato, e a influência coletiva deles na formação do fosfato de cálcio. O pH da solução afeta a cinética da formação da apatita. Uma solução com pH baixo é importante para o

aumento da solubilidade iônica necessária para o FCS supersaturado se as técnicas de aceleração são aplicadas. Mas, no processo de mineralização, o efeito do pH na apatita é desconhecido<sup>26</sup>.

Baker et al.<sup>9</sup> avaliaram o crescimento, caracterização e biocompatibilidade da camada de apatita formada em biomateriais metálicos produzida por meio de imersão em solução química por tempo reduzido. Inicialmente as amostras foram imersas em uma solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  para alimentar e favorecer as trocas iônicas durante as imersões. Posteriormente à imersão, na solução química, foi produzido um revestimento de fosfato de cálcio com espessura de 20 - 30  $\mu\text{m}$  e cristais de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro em 3 dias. Este estudo sugere que a imersão em uma solução química é um método industrial viável e que um simples pré-tratamento pode produzir revestimento de fosfato de cálcio favorecendo as interações biológicas conduzindo a osseointegração.

O estudo de Forsgren et al.<sup>44</sup> avaliou a bioatividade do rutilo e o depósito de HA em amostras de titânio após tratamento térmico e processo biomimético. As amostras de titânio foram submetidas à temperatura de 800<sup>0</sup>C para a produção de  $\text{TiO}_2$  (rutilo) e depois imersas numa solução salina rica em fosfato por 7 dias. Os autores verificaram que houve o depósito de HA por meio da difração de raios X. Foi realizado também um teste da força de adesão substrato-recobrimento sendo a pressão crítica encontrada de  $2,4 \pm 0,1$  GPa.

O depósito de apatita hidrocarbonatada em substrato de Ti6Al4V por meio de eletroforese foi avaliado por Guo et al.<sup>54</sup>. Eles utilizaram uma solução rica em fosfato. Teste *in vitro* revelou aumento da bioatividade após 9 dias de imersão em FCS.

Alguns estudos *in vivo* avaliaram a osseointegração de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético, como o estudo de Yan et al.<sup>134</sup>. Os autores caracterizaram os revestimentos por meio da difração de raios X, MEV e EDS e após 6, 10 e 25 semanas da implantação em tíbias de 8 coelhos foi realizado o exame histológico e o

teste mecânico. Os resultados demonstraram que o método biomimético foi eficiente para a produção de implantes com uma superfície bioativa e aumentou significativamente a união ao tecido ósseo adjacente, sem a interferência de qualquer tecido fibroso o que não foi observado nos implantes sem tratamento da superfície.

Nishiguchi et al.<sup>99</sup> mostraram que implantes de titânio submetidos apenas a tratamento alcalino e térmico proporcionaram união direta ao osso, melhor força de adesão e de ligação óssea. Os autores desenvolveram um estudo em cães, onde investigaram os efeitos da cicatrização óssea em implantes de superfície porosa, submetidos ou não ao tratamento térmico e alcalino. Para a obtenção dos resultados foram realizados o teste mecânico e a análise histológica após 4 e 12 semanas da implantação. Concluíram que apenas no período de 4 semanas houve diferenças significativas quanto ao crescimento ósseo, sendo maior no grupo de implantes que receberam o tratamento.

Rigo et al.<sup>113</sup> analisaram o recobrimento de apatita sobre implantes de titânio submetidos à solução biomimética com a adição de silicato de sódio. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos por 8 semanas. Para avaliar a reparação óssea utilizaram uma seqüência de marcadores ósseos (tetraciclina, alizarina e calceína). Verificaram por meio de microscopia óptica e de fluorescência que os implantes foram integrados principalmente por tecido ósseo, porém um pouco de tecido fibroso foi observado em algumas regiões.

Vasudev et al.<sup>129</sup> analisaram a evolução *in vivo* de implantes com recobrimento de apatita produzido pelo processo biomimético. A caracterização do revestimento foi realizada por meio do MEV, difração de raios X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). O estudo comparou a reparação óssea de implantes com e sem tratamento, inseridos em fêmur de 8 cães. Dois animais foram sacrificados em 6 semanas, 4 em 8 semanas e os 2 últimos em 12 meses. Os autores avaliaram o crescimento ósseo linear, a área de

crescimento e a porcentagem de aposição por meio dos dados histomorfométricos das imagens obtidas pelo MEV e pela análise radiográfica. O experimento demonstrou que sob condições controladas, a apatita do recobrimento dos implantes parece ser absorvida em 8 semanas após a implantação, mas estimula a osseointegração e reduz a formação de tecido fibroso.

Chiesa et al.<sup>23</sup> desenvolveram um tratamento biomimético para melhora da osseointegração de implantes de titânio. Os implantes foram inseridos na cabeça do côndilo do fêmur de 12 carneiros. Os testes *in vitro* confirmaram o potencial biomimético e a análise histomorfométrica indicou uma rápida e boa qualidade de osseointegração.

O baixo custo e efeitos inclusive sobre as irregularidades da superfície dos implantes tornam os processos biomiméticos uma técnica superior ao *plasma spray*. Além disto, notou-se que o tratamento não reduz o espaço da porosidade disponível ao crescimento ósseo, pois causa pouca mudança na morfologia superficial do implante, afetando cerca de 1  $\mu\text{m}$  da superfície<sup>98-99</sup>. O controle da composição e crescimento do filme de apatita por meio de alterações na composição do FCS, a incorporação de proteínas sem alteração de suas funções e sem a necessidade do tratamento térmico, são outras vantagens desta técnica promissora<sup>101</sup>.

## 2.6 Caracterização dos recobrimentos

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para caracterizar a topografia do recobrimento sobre a superfície de materiais após o processo biomimético. Entre elas o MEV para observação das características morfológicas produzidas pelos diversos tipos de tratamento da superfície é o método utilizado em todos os estudos

encontrados<sup>23,25,54,85,110,114,130,137</sup>. Trata-se de um mecanismo de emissão de elétrons, gerado por um filamento aquecido de tungstênio, em ambiente de vácuo, que varre a superfície das amostras gerando imagens características.

A análise química das amostras pode ser feita por meio do EDS (espectroscopia por dispersão de energia). É um método realizado em atmosfera de ultra-vácuo, que impede a contaminação das amostras durante as análises e revela os níveis de energia dos elétrons liberados pelos elementos presentes na superfície dos implantes no momento que fótons de raios X são aplicados sobre as amostras<sup>23,88,110,130,137</sup>.

Outro método utilizado para determinar a cristalinidade da camada de apatita formada sobre o biomaterial é a difração de raios X utilizada por vários autores<sup>11,54,61,137</sup>.

A análise que vem emergindo recentemente é a espectroscopia vibracional Raman e de Infravermelho (IR) utilizada a fim de verificar a fase de fosfato de cálcio formada sobre o biomaterial<sup>57</sup>.

O sistema Raman é uma técnica usada para determinar a estrutura molecular de uma substância. É uma análise rápida, não-destrutiva, sem a necessidade de contato, muito sensível a qualquer alteração na composição química e resolução espacial do material, podendo ser usada na caracterização da camada de hidroxiapatita formada pelo processo biomimético<sup>54, 57,108</sup>.

Quando uma luz incide sobre uma substância qualquer, ela pode ser absorvida ou espalhada elasticamente. Assim há uma troca de energia entre as moléculas, resultante da luz espalhada e da luz incidente o que é denominado de efeito Raman. Em outras palavras, é a transição de uma molécula do seu estado fundamental para um estado vibracional, acompanhada por uma absorção de um fóton incidente simultaneamente a uma emissão de um fóton espalhado. Este é o princípio da espectroscopia Raman.



O efeito Raman pode ocorrer com luz visível (Espectroscopia Raman), por meio de infravermelho (Espectroscopia de infravermelho - IF) ou usando radiação de laser com energia próxima ao infravermelho (Espectroscopia Raman com transformada de Fourier).

A espectroscopia Raman utiliza um aparelho onde a luz Raman espalhada pode ser coletada por um espectrômetro, no qual a intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência, chamada de deslocamento Raman e medida em comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), unidade conveniente para relacionar a mudança de frequência da luz espalhada em relação à frequência de luz incidente<sup>119</sup>.

Visto que cada amostra possui seu conjunto vibracional molecular, o espectro Raman consistirá de uma série de picos, cada um deslocado pela sua frequência vibracional característica da ligação química da molécula presente na amostra, fornecendo assim a sua identificação. Desta forma, a camada de apatita formada após a imersão em FCS pode ser identificada pelo espectro Raman com um pico característico a  $960 \text{ cm}^{-1}$  que é devido à ligação fosfato  $\text{PO}_4^{-3}$  da molécula de hidroxiapatita<sup>53,57,100,108</sup>.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propõe:

- a) avaliar qualitativa e quantitativamente a reparação óssea ao redor de implantes porosos confeccionados com titânio puro grau 2 por meio da metalurgia do pó, submetidos ou não ao tratamento biomimético, e inseridos em tíbias de coelhos;
- b) correlacionar os valores da porcentagem de neoformação óssea com o tipo de implante e o tempo de reparação;
- c) correlacionar os valores obtidos da força de remoção com tipo de implante e o tempo de reparação.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

O estudo foi desenvolvido em 3 etapas: processamento de pós de titânio puro para obtenção dos implantes, processo biomimético e implantação em tíbias de coelhos.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, Protocolo nº 043/2004-PA/CEP. (Anexo A)

### **4.1 Obtenção e caracterização dos implantes**

Por meio da técnica da metalurgia do pó foram confeccionados implantes cilíndricos de titânio puro grau 2, sendo estes com porosidade controlada. Os implantes foram confeccionados na Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE/AMR) no Comando-Geral de Tecnologia Aeroespacial (CTA).

As etapas para o processamento dos implantes porosos foram desenvolvidas da seguinte forma:

- a) mistura dos pós: a proporção de 80% do titânio puro grau 2 com granulometria na faixa de 149-177  $\mu\text{m}$  foi misturada com 20% de aditivo orgânico que consistiu de uréia (J.T. Baker –  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) em grânulos de 250 a 297  $\mu\text{m}$ , obtidos pela técnica de peneiramento, e à mistura, foi adicionado o solvente (éter de petróleo) para melhoria da união (Figura 2a);

- b) preenchimento de moldes: os componentes foram compactados em uma matriz cilíndrica medindo 3 mm x 6 mm (Figuras 2b e 2c), com a utilização de uma prensa hidráulica uniaxial, com pressão de 70 MPa (Figura 2d);
- c) compactação isostática a frio dos implantes com pressão de 200 MPa (Figura 3a);
- d) evaporação do aditivo (uréia) em estufa a 200°C durante 2 horas, aquecendo lentamente, obtendo assim espaços entre os grãos do pó de titânio e tornando a amostra porosa;
- e) sinterização: tratamento que consiste na consolidação física dos implantes colocando-os em forno a vácuo (*Thermal Technology*, modelo ASTRO) a 1200°C durante uma hora com aquecimento de 10°C/minuto e resfriamento lento das mesmas (Figuras 3b, 3c e 3d);
- f) limpeza dos implantes com escova, usando detergente neutro e água destilada, além disto, os mesmos foram colocados em um recipiente contendo 20 mL de água destilada com 10% de detergente neutro e submetidos à ação de ultra-som por 10 minutos, em seguida, os implantes foram imersos novamente numa solução de 50ml de água destilada por mais 10 minutos sob a ação do ultra-som para remover os resíduos de detergente, e foram colocados, por fim, em etanol a 99% por mais 10 minutos em ultra-som.

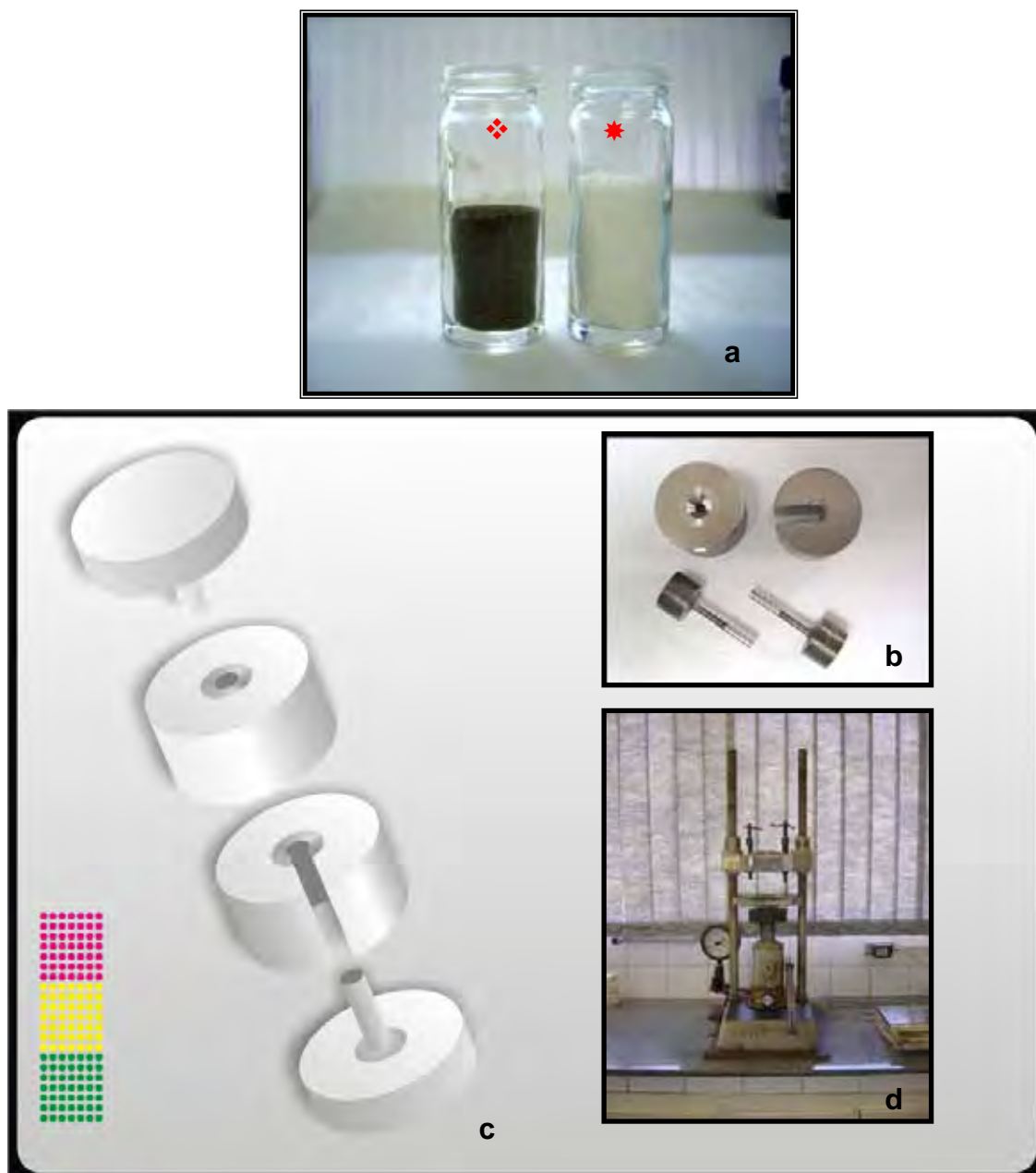


FIGURA 2 – Obtenção dos implantes: a) titânio (♦) e uréia (★); b) componentes da matriz; c) esquema da montagem da matriz; d) prensa hidráulica uniaxial;

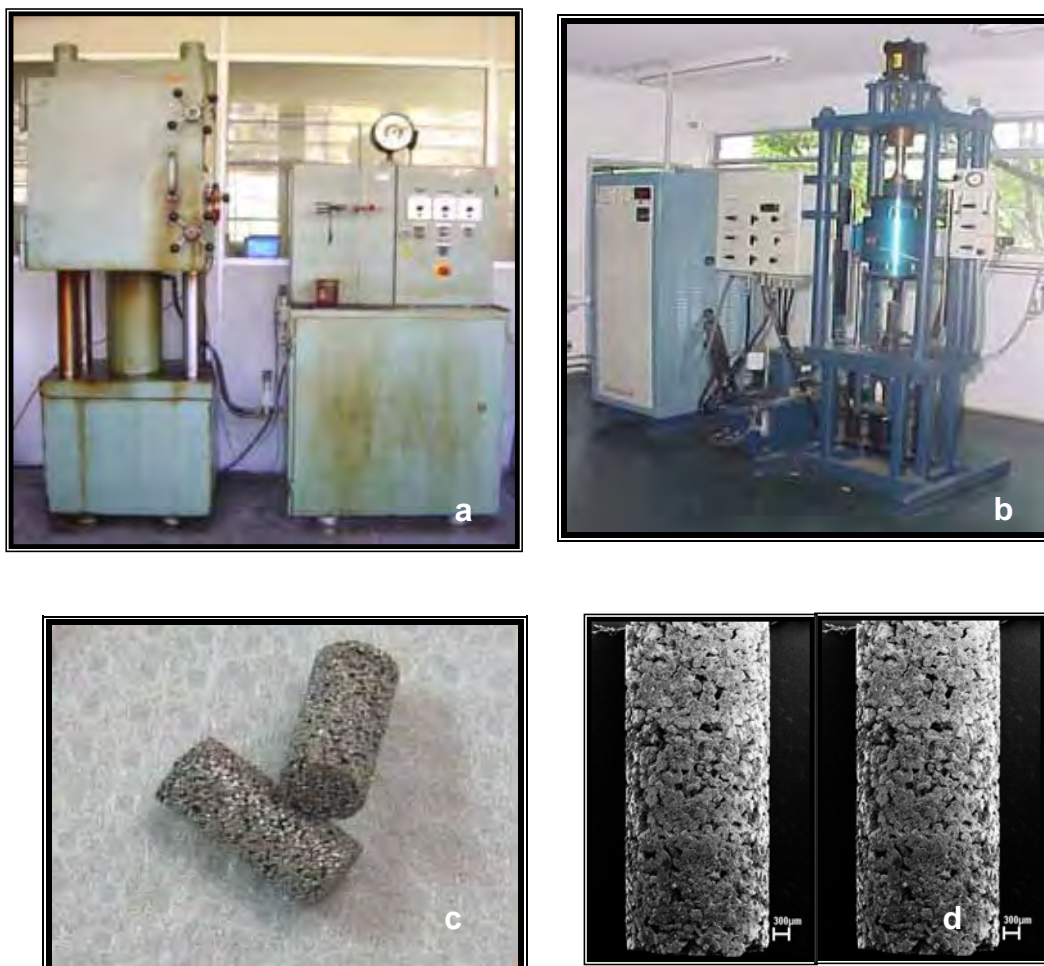


FIGURA 3 – Obtenção dos implantes: Prensa isostática (a); forno a vácuo – Thermal Technology – modelo ASTRO (b); imagem dos implantes sem tratamento, com estrutura porosa observada à luz visível (c) e ao microscópio eletrônico de varredura (d).

Após a confecção, seis implantes foram mensurados utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo) para a obtenção dos valores de diâmetro e comprimento final médio. Foram utilizados seis implantes, que foram mensurados em três pontos, obtendo-se em média 5,3 mm de comprimento, por 2,5 mm de diâmetro.

Os implantes porosos foram submetidos à análise do volume, porcentagem, morfologia e conectividade dos poros.

Para a análise metalográfica foram utilizados 3 implantes que inicialmente foram incluídos em resina poliéster orto cristal T 208 utilizando um molde de silicona. Posteriormente, os implantes foram cortados em seção transversal e os cortes polidos com lixas d'água 800 e 1200. Após o preparo metalográfico foi realizada análise em MEV, com aumento de 100X, para a caracterização microestrutural. Foram obtidas dez seções de cada implante, totalizando 30 imagens. Para a observação das características microtopográficas (morfologia e conectividade) foi utilizado o microscópio de luz e MEV onde foram obtidas as imagens e, utilizando o programa de análise de imagens - Image Pro Plus 4.0, analisou-se a porcentagem dos poros.

## 4.2 Processamento biomimético e análise da superfície

Noventa implantes confeccionados foram submetidos ao tratamento das superfícies, visando obter um revestimento bioativo por meio do processo biomimético.

As etapas listadas a seguir foram desenvolvidas com o apoio do Laboratório de Recobrimentos Biocerâmicos do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PEMM/UFRJ) e do Instituto de Tecnologia do Rio de Janeiro (INT):

- a) tratamento alcalino dos implantes porosos com solução aquosa de NaOH 1M em autoclave vertical – Fanem (São Paulo/SP) à 130° C por 60 minutos, depois secos em temperatura ambiente;
- b) tratamento térmico das amostras em forno tubular EDG 3P-S – 1800 (São Carlos/SP) a 200°C por 1 hora com aquecimento de 10°C/min;
- c) imersão dos implantes em 5 mL de fluido corpóreo simulado modificado (FCSm), a 37°C, trocado a cada 2 dias, retirados após um período de 14 dias. Após a retirada da solução, os implantes foram mantidos em dessecador para evitar contaminação e lavados com água destilada.

A preparação da solução (FCSm) foi realizada através dos procedimentos listados a seguir:

- a) lavagem de todo material utilizado com água destilada. Posteriormente, a solução de HCl 1M foi usada na lavagem e o material enxaguado cinco vezes com



- água deionizada pura. Em seguida, secagem do material em estufa;
- b) dissolução dos reagentes em recipiente de boca larga e usando agitação moderada. Um terço de água deionizada pré-aquecida a 37°C em estufa foi colocada no frasco para dissolução. Os reagentes foram pesados em balança analítica e transferidos ao frasco um a um de acordo com a composição e massa do FCS modificado por Andrade et al.<sup>5</sup> (Quadro 2). A solução então foi agitada por 10 a 15 minutos para homogeneização;
  - c) ajuste de pH fazendo a transferência da solução à 37°C para um béquer sob agitação moderada e adicionando água pré-aquecida até o volume da solução ser de pelo menos três quartos do volume final. O pH da solução ficou na faixa de 7,5 – 8,0 sendo controlado com a adição de sulfato de cálcio;
  - d) aferição do volume final feita após a solução ter sido colocada num balão volumétrico. O volume final de um litro foi completado com água deionizada. Após a aferição, o balão foi tampado e a solução homogeneizada agitando-a por quarenta vezes;
  - e) armazenagem da solução em frasco de polietileno previamente limpo que permaneceu em geladeira.

O FCSm foi utilizado para a obtenção de uma camada de apatita na superfície do implante, seus constituintes e suas concentrações estão listados no Quadro 2 (Andrade et al.<sup>5</sup>, 2002).

Quadro 2 - Tipo e quantidade dos constituintes do FCS modificado

<b>FCS</b>	<b>quantidade (g)</b>
NaCl	7,94
NaHCO <sub>3</sub>	0,353
NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,245
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,3051
KCl	0,372
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,086
CaCl <sub>2</sub>	0,200

Vf = 1000mL

As alterações estruturais na superfície de doze implantes foram caracterizadas após o pré-tratamento térmico-alcálico e subsequente imersão no FCSm, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a um analisador de espectroscopia por espalhamento de energia dispersiva dos raios X (EDS) (Figura 4). O EDS foi realizado para determinar qualitativamente os elementos presentes em três implantes após o processo biomimético.

Os implantes recobertos foram submetidos também à Espectroscopia Raman.



FIGURA 4 - Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) acoplado a um analisador de espectroscopia por espalhamento de energia dispersiva dos raios X (EDS).

### 4.3 Instrumentação Raman

O experimento foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) utilizando um sistema Raman dispersível no visível.

A espectroscopia das amostras foi obtida por meio de um equipamento Raman fabricado pela Renishaw, modelo 2000, equipado com laser de argônio com 514,5 nm de comprimento de onda (Figura 5). As amostras foram estudadas sem qualquer tipo de preparação. Um microscópio com aumento de 500X foi usado para focalizar o laser no ponto desejado e para coletar a radiação espalhada.

O espectrômetro foi calibrado usando amostra de silício (Si) com pico característico a  $520\text{ cm}^{-1}$ .

Como parâmetro para a aquisição dos espectros selecionou-se a região de 300-1200  $\text{cm}^{-1}$ , com 10 acumulações em 30 segundos totalizando 300 segundos de exposição das amostras.



FIGURA 5 - Equipamento Raman fabricado pela Renishaw, modelo 2000, equipado com laser de argônio com 514,5nm de comprimento de onda.

#### 4.4 Procedimento cirúrgico

No desenvolvimento deste estudo foram utilizados trinta coelhos albinos da raça Nova Zelândia com peso variável entre 3,3 kg e 4,65 kg (média 3,9 kg), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Cada animal recebeu, de forma padronizada, três implantes de titânio poroso (grupo controle), implantados na tíbia direita e três implantes de titânio poroso submetidos ao processo biomimético (grupo teste), na tíbia esquerda.

Os procedimentos que foram realizados até o momento do sacrifício dos animais são detalhados a seguir:

- a) embalagem e esterilização dos implantes por meio de irradiação gama, com cobalto 60 (20 Kgy), pela empresa EMBRARAD (Cotia/SP);
- b) preparação da mesa operatória utilizando álcool 70% e esterilização do material cirúrgico
- c) tratamento pré-cirúrgico: pesagem e anestesia via intramuscular dos animais com uma mistura de 13 mg/kg de sedativo, analgésico e relaxante muscular a base de cloridrato de xilazina (Rompum® a 2% – Bayer) com anestésico geral na dose de 33 mg/kg de cloridrato de ketamina (Dopalen® – Agibrands do Brasil Ltda). Depois foi realizada a tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado dos locais cirúrgicos das tíbias direita e esquerda;
- d) procedimento cirúrgico: os locais cirúrgicos foram anestesiados localmente utilizando 3% de octapressin associado a cloridrato de prilocaína e felipressina (Citanest a 3%® - Dentsply) para que se conseguisse uma hemostasia e anestesia local mais efetiva durante o procedimento cirúrgico. Em seguida foi realizada a incisão com lâmina de bisturi nº15 (Figuras 6a e 6b) na face medial da tíbia em seu terço proximal, em sentido longitudinal à tíbia, divulsão do tecido muscular (Figura 6c) e perióstio para a exposição do tecido ósseo cortical da tíbia (Figura 6d). Neste leito de tecido ósseo foram realizadas três perfurações (Figura 7a) com brocas cilíndricas medindo 2,6mm de diâmetro, utilizando um motor portátil Minimite em regiões eqüidistantes, sob irrigação abundante com cloreto de

sódio a 0,9%, evitando o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso (Figura 7b). As esquirolas ósseas foram removidas com cloreto de sódio a 0,9%. Os implantes foram colocados (Figura 8a), seguindo a padronização citada, com posterior irrigação da ferida, sutura e anti-sepsia do local (Figura 8b);

- e) tratamento pós-cirúrgico: foi administrado aos animais uma dose única de antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000UI (Pentabiótico – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 0,5 mL. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum* e sob monitoramento constante.

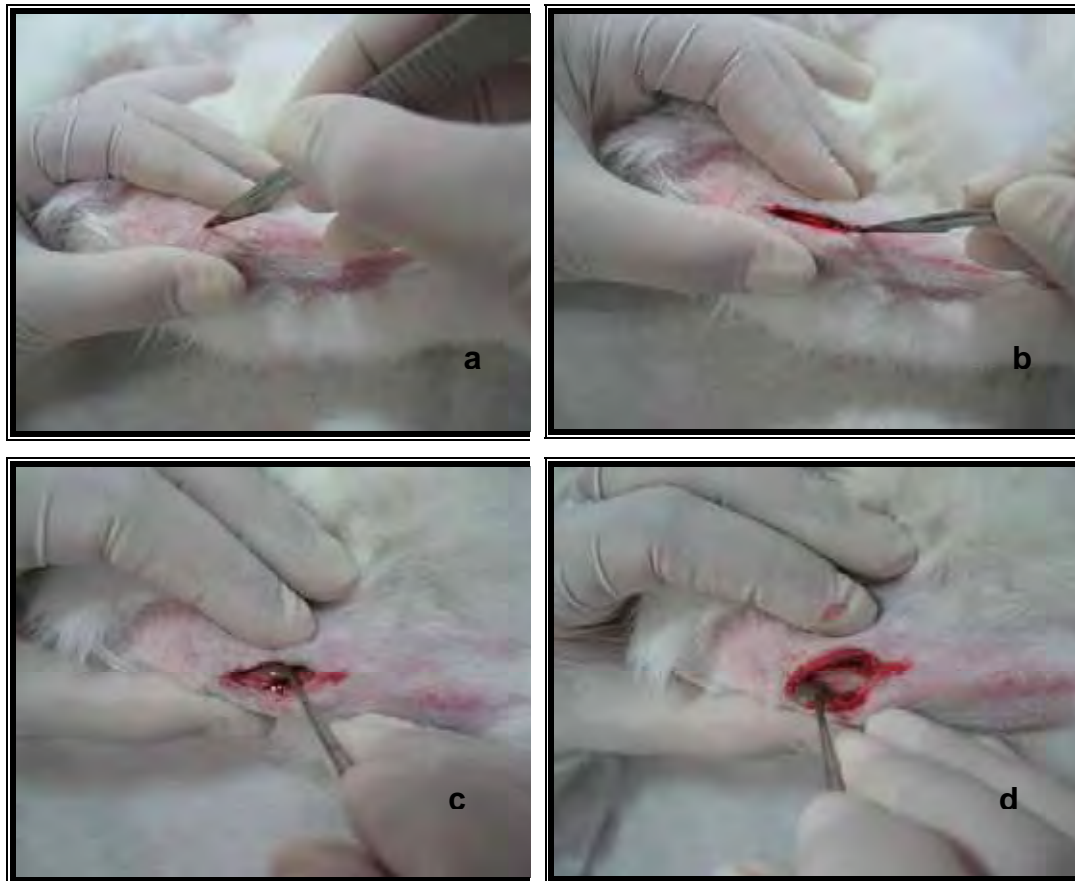


FIGURA 6 - Procedimento cirúrgico nas tíbias dos coelhos: incisão na face medial da tíbia (a) e (b); divulsão do plano muscular (c); afastamento do perióstio (d).

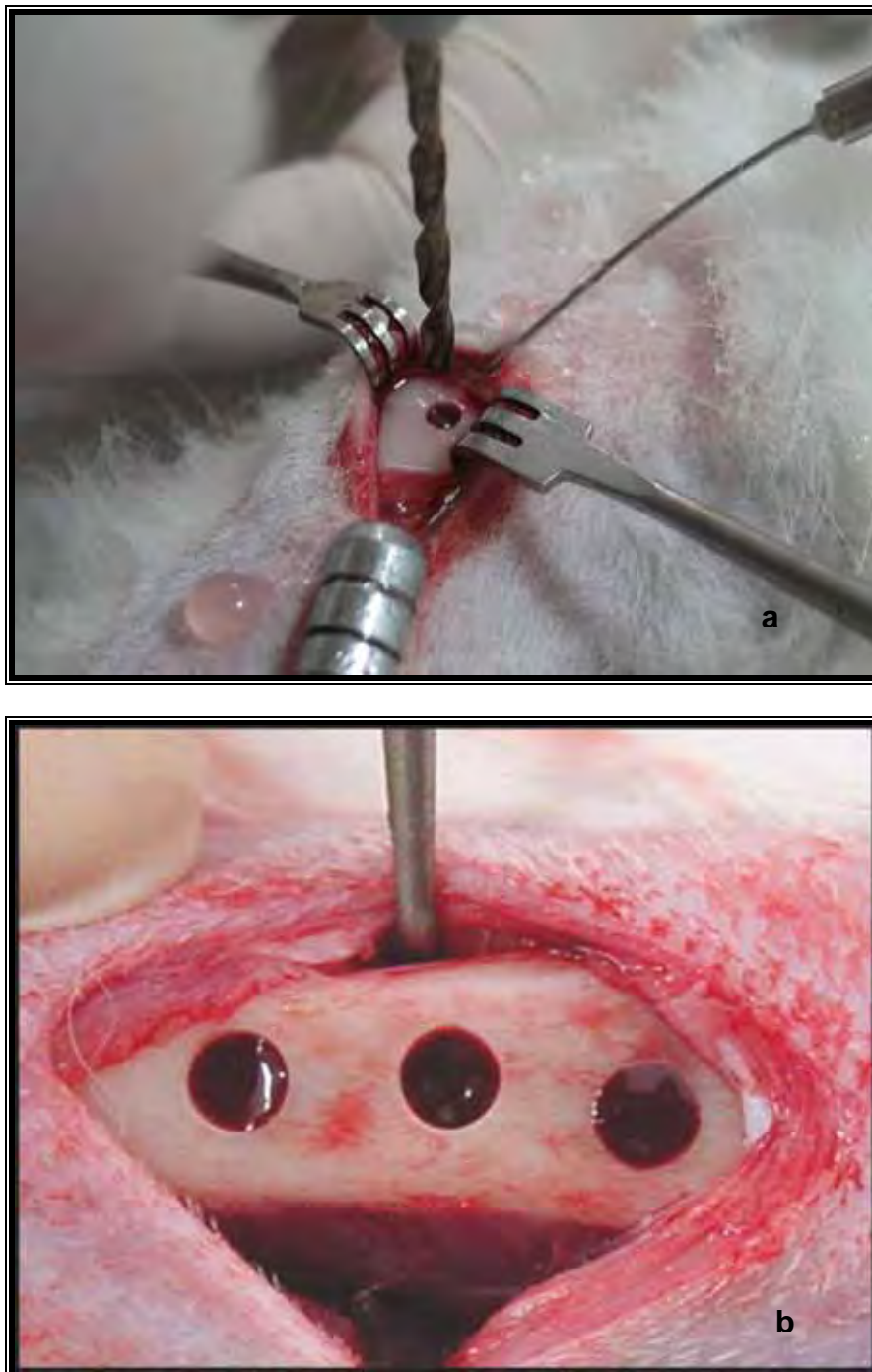


FIGURA 7 - Procedimento cirúrgico: perfuração da tíbia (a); lojas ósseas preparadas para a colocação dos implantes (b).



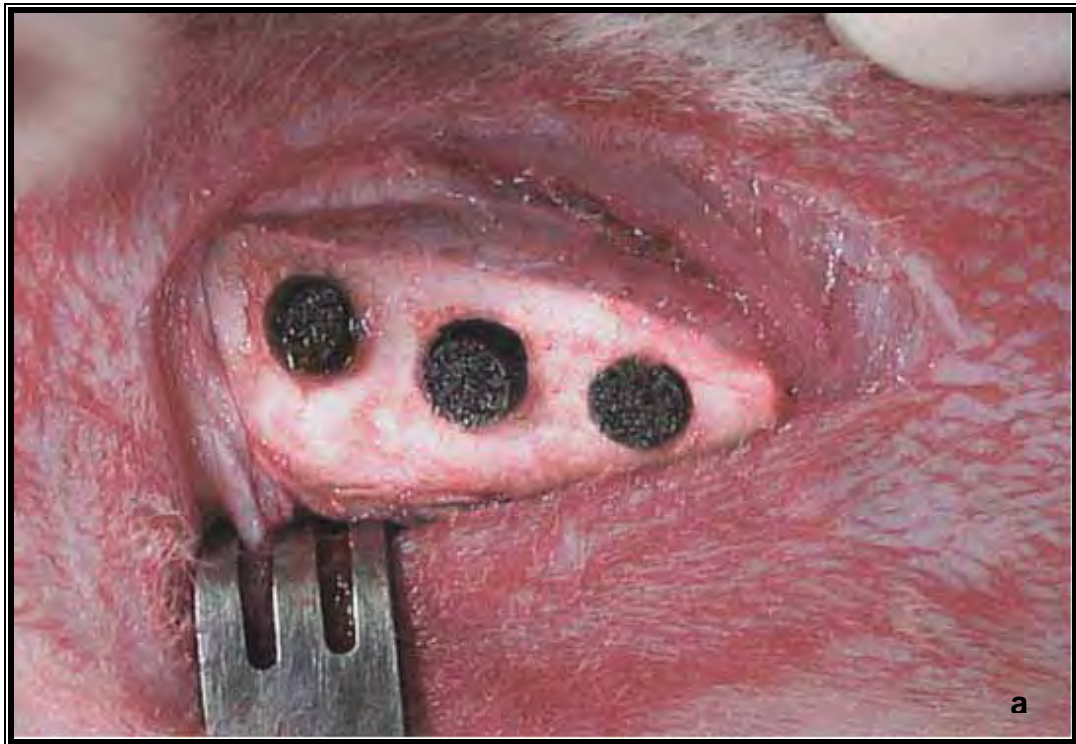


FIGURA 8 - Procedimento cirúrgico: colocação dos implantes (a); sutura (b).

Os animais, em grupos de dez, foram sacrificados de forma aleatória em três tempos, 15, 30 e 45 dias após o procedimento cirúrgico, utilizando-se uma dose excessiva de anestésico cloridrato de ketamina (Dopalen® – Agibrands do Brasil Ltda) de 2 mg/kg de peso corpóreo com administração intramuscular.

A metodologia utilizada com relação ao tempo de sacrifício é mostrada no Quadro 3 a seguir:

Quadro 3 - Divisão dos animais com relação ao tempo de sacrifício no grupo de implantes de titânio poroso (controle) e no grupo de implantes de titânio poroso submetidos ao processo biomimético (teste).

<b>TS* (dias)</b>	<b>N<sup>#</sup></b>	<b>Grupo controle</b>	<b>Grupo teste</b>
15	10	30 implantes	30 implantes
30	10	30 implantes	30 implantes
45	10	30 implantes	30 implantes

\* TS: tempo de sacrifício

<sup>#</sup> N: número de animais

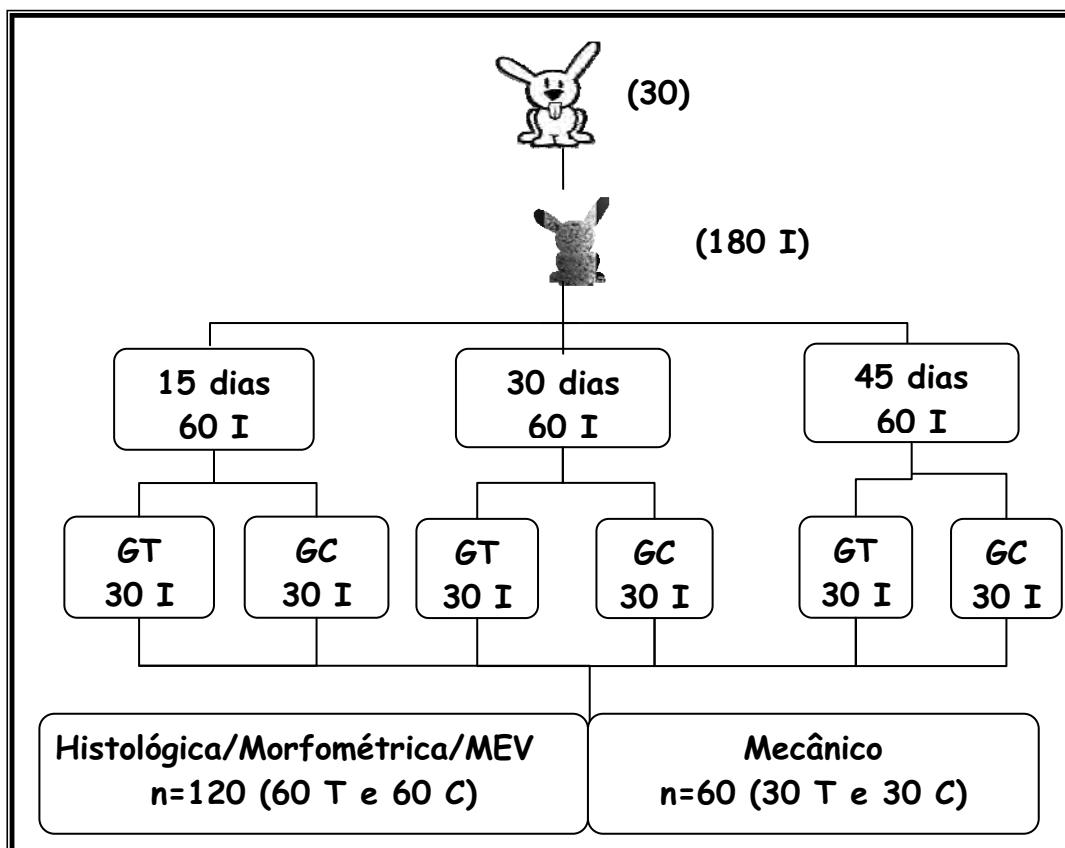
Após o sacrifício, em todas as tíbias removidas (Figura 9a) foi realizada uma incisão através da pele e da camada muscular para a exposição dos implantes e estes testados quanto à mobilidade utilizando uma pinça clínica. Trinta amostras de cada grupo, sendo 10 para cada tempo de sacrifício, foram acondicionados imediatamente em água destilada e colocados em freezer a – 20°C, para o teste mecânico.

As demais amostras (n=120), 60 de cada grupo, sendo 20 para cada tempo de sacrifício, foram fixadas em solução de formol a 10% por no mínimo 48 horas. Após a remoção das estruturas musculares, as peças foram seccionadas com um disco de diamante para processamento para análise histológica e histomorfométrica em MEV e MO (Figuras 9b e 9c).



FIGURA 9 – Etapas para o processamento histológico das amostras: tíbia removida (a); osteotomia e separação dos implantes (b) e (c).

Quadro 4 – Metodologia do experimento



\* TS: tempo de sacrifício; # I: implantes; 'GT: grupo teste;  
''GC grupo controle

#### 4.5 Processamento laboratorial dos implantes para análise histológica e histomorfométrica.

As etapas do preparo histológico foram realizadas utilizando a técnica de desgaste adaptada por Momose<sup>93</sup>, descritas a seguir:

- a) lavagem dos espécimes e imersão em soluções de concentrações crescentes de álcool (60 a 100%) para a desidratação, com tempo de aproximadamente 24 horas para cada concentração;

- b) inclusão das amostras em solução de 20% de monômero de metil-metacrilato com 79% de resina poliéster orto cristal T 208 e 1% de catalisador em um molde de silicone sextavado ou retangulares para fixar e facilitar o corte das amostras (Figuras 10a e 10c);
- c) fixação do material obtido da inclusão na morsa do aparelho de corte Labcut 1010 (EXTEC) (Figura 10 d) para a realização dos cortes com disco diamantado obtendo em média 3 cortes por peça;
- d) reinclusão dos cortes obtidos na mesma resina com os moldes de silicone acima citados para serem desgastados;
- e) desgaste realizado com a politriz Labpol 8-12 (EXTEC) (Figura 10e) usando seqüência crescente de lixas d'água (400, 600 e 1200) ;
- f) coloração das amostras com azul de toluidina (Figura 10b) ;
- g) análise ao microscópio de luz e ao MEV.

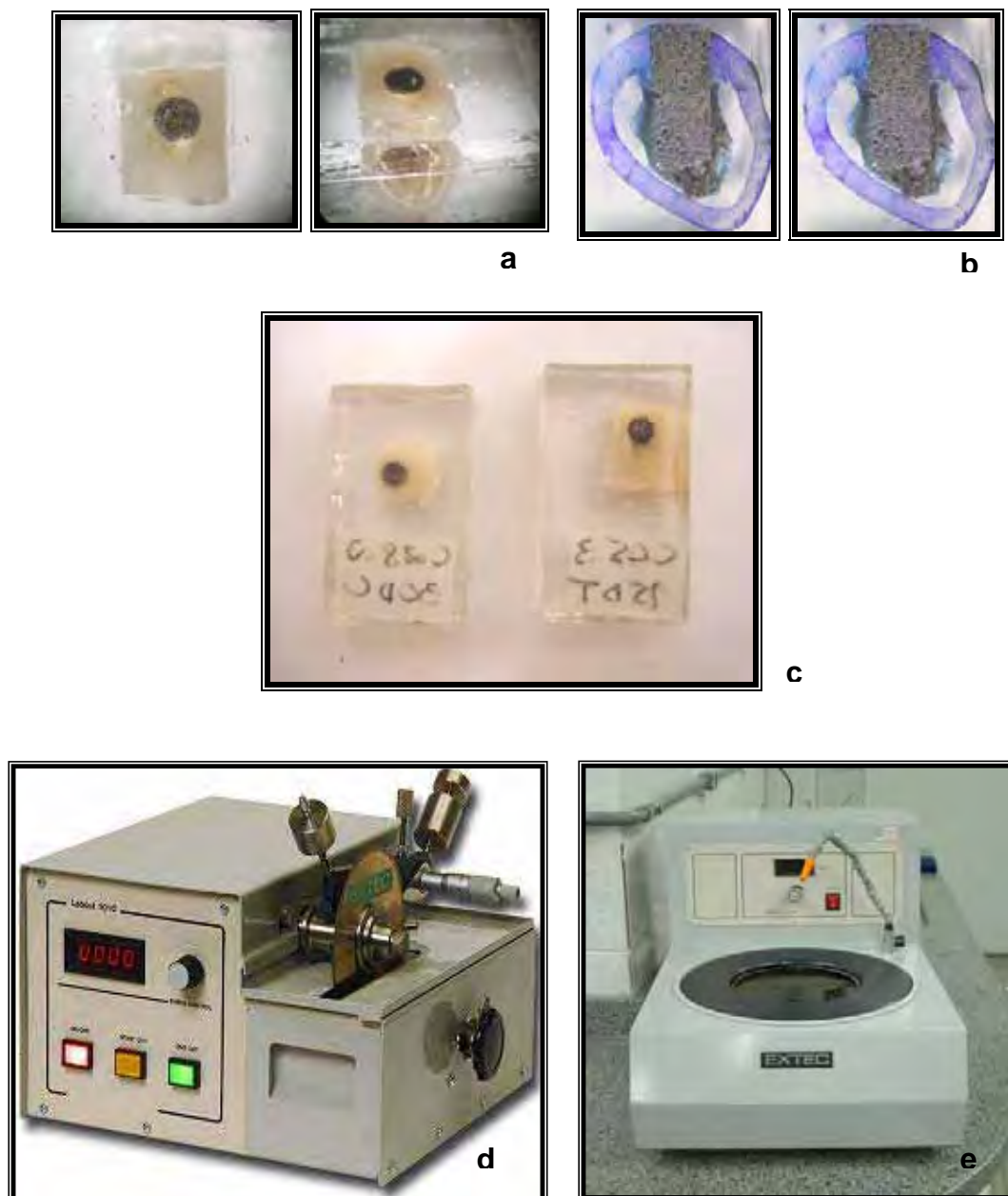


FIGURA 10 - Processamento laboratorial dos implantes: fragmento ósseo com o implante incluído em resina (a e c); cortes realizados, corados com azul de toluidina (b); aparelho de corte Labcut 1010 (EXTEC) (d); politriz Labpol 8-12 (EXTEC) para realização dos desgastes (e).

#### 4.5 Análise histológica e histomorfométrica da neoformação óssea

A análise qualitativa ou morfológica foi realizada por meio do microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e de microscópio eletrônico de varredura (MEV), em que foram observadas a neoformação óssea na interface osso-implante e o seu crescimento para o interior dos poros.

A porcentagem de tecido ósseo neoformado na interface e no interior dos poros dos cortes obtidos dos implantes teste e controle foram analisadas por meio do microscópio de luz com ocular de aumento de 10X e objetivas planapo de 20X, sob um foco fixo. Foram selecionadas imagens da interface osso-implante para a análise quantitativa.

Para padronizar, as imagens foram captadas sempre na mesma posição, com a interface osso-implante posicionada 2cm do monitor do lado direito e 2cm do monitor do lado esquerdo, sendo a área inferior delimitada pela face interna da cortical óssea neoformada.

Portanto, foram obtidas 2 imagens de cada corte, digitalizadas por meio da câmera digital Sony (DSC-S85, Cyber-shot) e transferidas para um microcomputador através da conexão USB, para a análise morfométrica das estruturas, utilizando programa *NIH Image-J*. Com este programa as imagens foram selecionadas e foi sobreposto à elas um retículo de 300 pontos de interseção (15 linhas horizontais e 20 verticais), denominado de grade de intersecção, na qual os pontos que recaíam sobre áreas de neoformação óssea, eram contadas para a análise histomorfométrica, o que é denominado de planimetria por contagem de pontos (Figura 11)

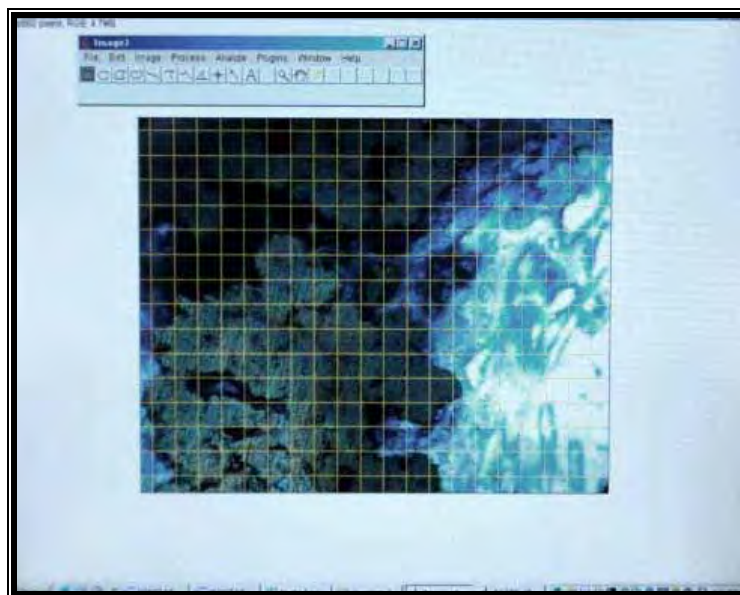


FIGURA 11 – Retículo de 300 pontos sobreposto à imagem histológica

Para cada implante, a média de contagem de pontos foi obtida por meio da contagem dos pontos com neoformação óssea do lado esquerdo e do lado direito, dos 3 cortes, dividida por 6. Como cada tibia possuía 3 implantes a média para cada animal considerando o tipo do implante era a média de três implantes.

Após a obtenção da quantidade de pontos de intersecção a porcentagem de neoformação óssea foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Neoformação óssea (\%)} = \frac{\text{Pontos sobre o tecido ósseo} \times 100}{\text{Total de pontos de intersecção}}$$

por corte histológico

#### 4.6 Teste mecânico – ensaio de cisalhamento

As tibias mantidas em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ , ao todo 10 implantes de cada grupo nos 3 tempos de sacrifício, foram utilizadas,



após cortadas, para o teste mecânico de remoção do implante em temperatura ambiente.

Para a realização deste teste cada espécime de osso contendo o implante foi necessário estar apoiado em um plano paralelo, sem qualquer interferência de tal forma que suporte o osso e permita o deslocamento do implante quando for pressionado.

A seqüência do preparo das tíbias está listada a seguir:

- a) remoção do tecido ósseo cortical oposto àquele que o implante foi inserido, expondo o corpo e a outra extremidade do implante (Figura 14 a);
- b) apreensão do corpo do implante em um mandril fixo garantindo uma posição vertical, necessária para a aplicação da uma força paralela ao longo eixo do implante;
- c) adaptação de uma matriz cilíndrica de silicone, idealizada no AMR/IAE, próxima ao mandril com o implante apreendido e preenchimento desta com resina acrílica ativada quimicamente. Na região central desta matriz foi colocado um pino que coincidia com o diâmetro do implante da cortical e era removido após o tempo de presa da resina com a função de manter um espaço para o deslocamento do implante durante o teste;
- d) remoção da peça obtida da matriz e do mandril obtendo uma peça com posicionamento vertical do implante e via de escape para o mesmo durante a sua remoção da tíbia (Figura 14b).

O ensaio de cisalhamento foi realizado por meio da máquina de ensaios Universal Instron (modelo 2301) (Figura 14c) onde foi aplicada uma força pelo lado medular, paralela ao longo eixo do implante

e com velocidade constante de 0,5mm/min para remoção dos mesmos. Foi obtido a força necessária para deslocar o implante da tibia.

Para se obter a tensão final do deslocamento foi necessário determinar a área ou espessura da cortical óssea que continha o implante, então, as peças das tíbias sem os implantes foram hemisseccionadas no aparelho de corte Labcut 1010 (EXTEC) e observadas em estereoscópio Stemi SV11 (ZEISS) com ocular de aumento de 10X e objetiva de 1,6X. As imagens foram padronizadas, captadas na mesma posição, transferidas para um computador e, para análise morfométrica, foram obtidas quatro medidas lineares, a partir delas calculada a espessura média da cortical óssea utilizando o programa de imagem *Image J*.

Finalmente o valor da força de deslocamento (tensão) desejada foi obtida utilizando as fórmulas subseqüentes (Figura 12 e 13):

$$\text{Área} = 2\pi r^* \times \text{altura média}$$

$r^*$  = raio do implante

FIGURA 12 – Fórmula utilizada para calcular a área da cortical óssea na qual os implantes estavam inseridos

$$\text{Tensão média} = \frac{\text{força (N)}}{\text{Área}}$$

FIGURA 13 – Fórmula utilizada para calcular força de deslocamento (tensão final) para a remoção dos implantes

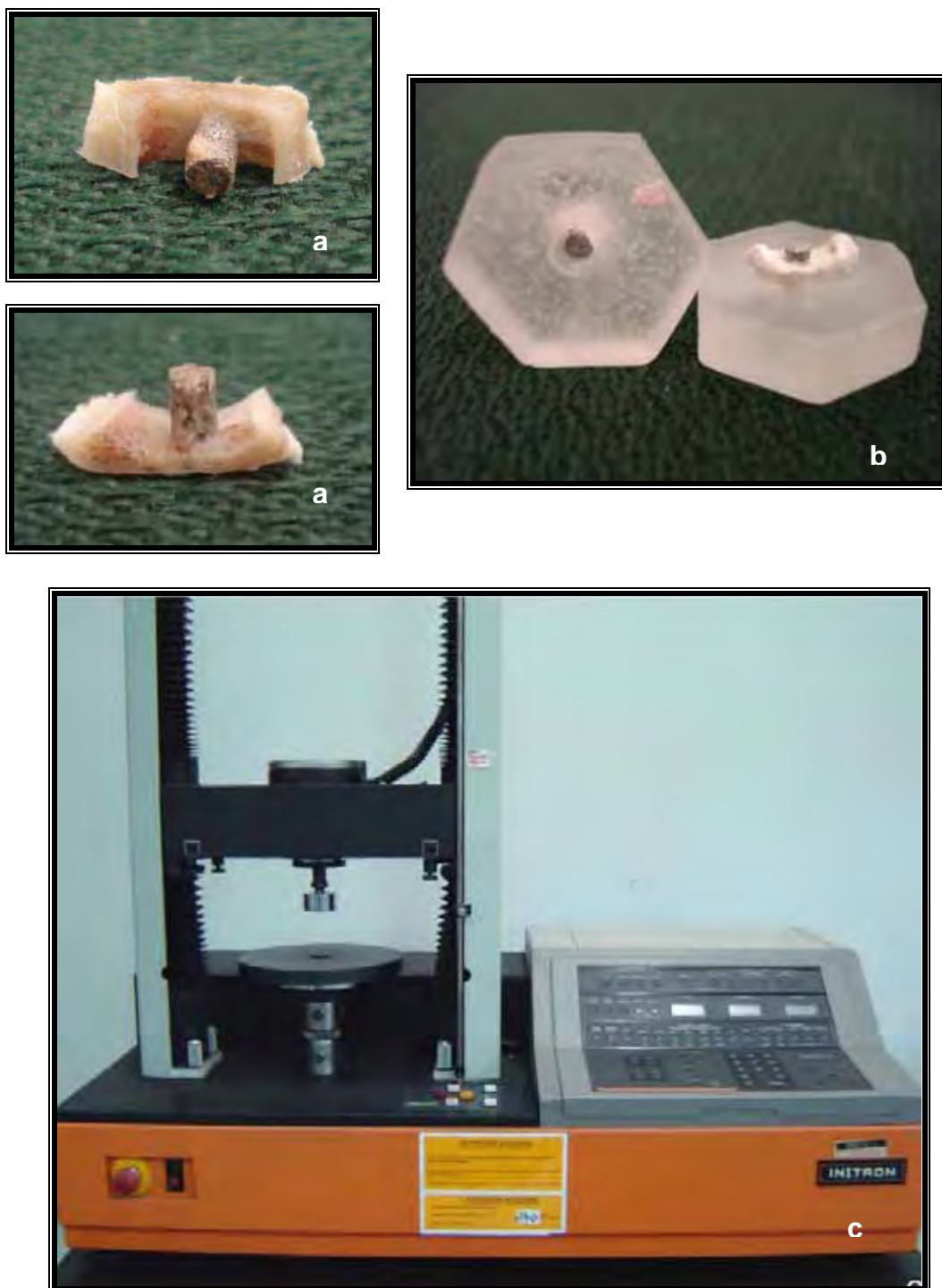


FIGURA 14 - Teste mecânico: preparo da tíbia para embutimento (a); embutimento do implante com a tíbia em resina (b); máquina de ensaios Universal INSTRON modelo 2301 (c).

#### 4.8 Análise estatística

Neste experimento foi analisada a quantidade de neoformação óssea (variável dependente) em duas situações (variáveis independentes): de acordo com os tempos de sacrifício 15, 30 e 45 dias e também de acordo com os 2 tipos de implantes porosos, com e sem tratamento da superfície.

A neoformação óssea foi medida por meio da porcentagem de crescimento ósseo na interface com o osso-implante e no interior dos poros dos implantes, comparando-as nas condições experimentais acima citadas.

Os principais objetivos foram: a) investigar se os implantes com recobrimento da superfície (teste) apresentaram maior o crescimento ósseo quando comparados com implantes sem recobrimento (controle); b) verificar se houve diferenças na neoformação óssea obtida nos 3 tempos de sacrifício.

Para a análise estatística dos valores obtidos no teste mecânico de cisalhamento e histomorfometria foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de *T-Student*. A análise estatística foi realizada por meio do programa NINITAB ® Release 14, sendo o nível de significância assumido no estudo de 5% ( $p \leq 0,05$ ) em todos os testes realizados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos implantes – análise metalográfica

A análise metalográfica dos implantes, realizada por meio do MEV, demonstrou a presença de poros de diferentes formatos e com tamanho variado (Figura 15). Verificou-se também a presença de microporos e macroporos. Os microporos (10 - 40  $\mu\text{m}$ ), poros residuais do processo de sinterização, apresentavam-se isolados, enquanto que os macroporos (200 – 500  $\mu\text{m}$ ) resultantes da remoção da uréia eram abertos e interligados. Esta interligação entre os poros permitiu o crescimento de tecido ósseo nas diversas regiões dos implantes, inclusive nas áreas mais centrais.

A porosidade variou entre 59,9 a 81,5%, os dados obtidos estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Média da fração de poros obtida de 10 secções das amostras porosas do estudo

Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
fotos	Fração de poros	fotos	fração de poros	fotos	Fração de poros
1	73,41	1	71,45	1	80,66
2	77,87	2	66,63	2	74,74
3	78,42	3	62,45	3	75,44
4	81,45	4	66,34	4	74,75
5	75,04	5	67,34	5	78,01
6	72,25	6	71,35	6	75,05
7	72,00	7	71,81	7	73,51
8	66,90	8	59,90	8	74,35
9	70,40	9	61,28	9	71,91
10	77,27	10	68,06	10	77,45
Média	75,01	Média	66,67	Média	75,58

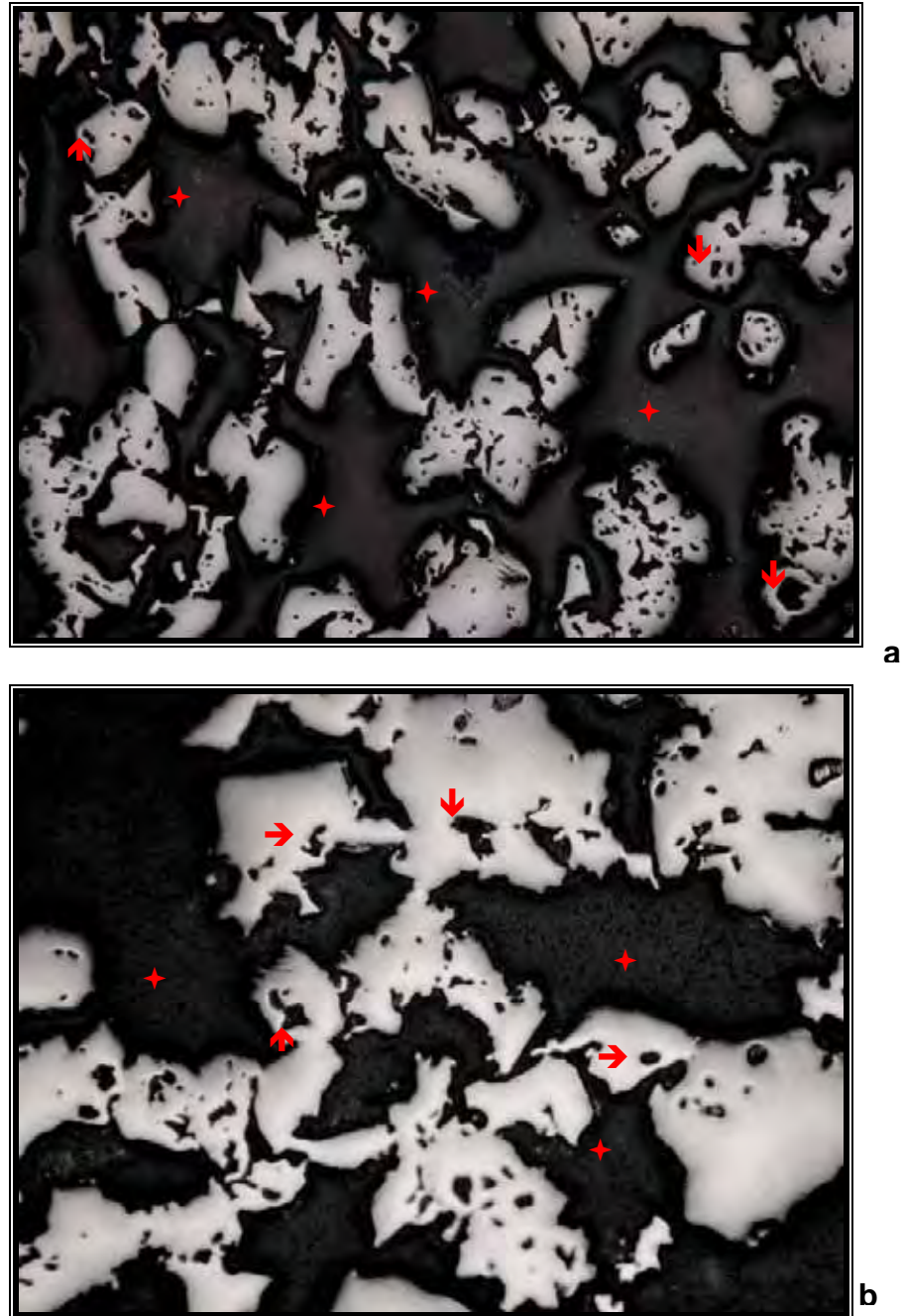


FIGURA 15 – Análise metalográfica dos implantes: aumento de 100X (a) e 200X (b): implante poroso exibindo poros fechados com diâmetro pequeno e isolados (→) e macroporos, abertos e interligados (★)

## 5.2 Caracterização do revestimento – MEV, EDS e Raman

### 5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e EDS

O pré-tratamento térmico e químico possibilitou o recobrimento uniforme da superfície das amostras, anteriormente lisas (Figura 17), com titanato de sódio sob a forma de agulhas (Figura 18). Após a imersão em fluido corpóreo simulado modificado, por 14 dias, as superfícies ficaram recobertas por formações globulares de diversos tamanhos, inclusive no interior dos poros, o que pôde ser visualizado por meio do MEV (Figura 19).

A análise por meio de EDS mostrou, nos três implantes analisados que estas estruturas formadas eram constituídas principalmente por cálcio (Ca) e fósforo (P), além da presença de titânio e oxigênio, como é demonstrado pelo gráfico abaixo (Figura 16).

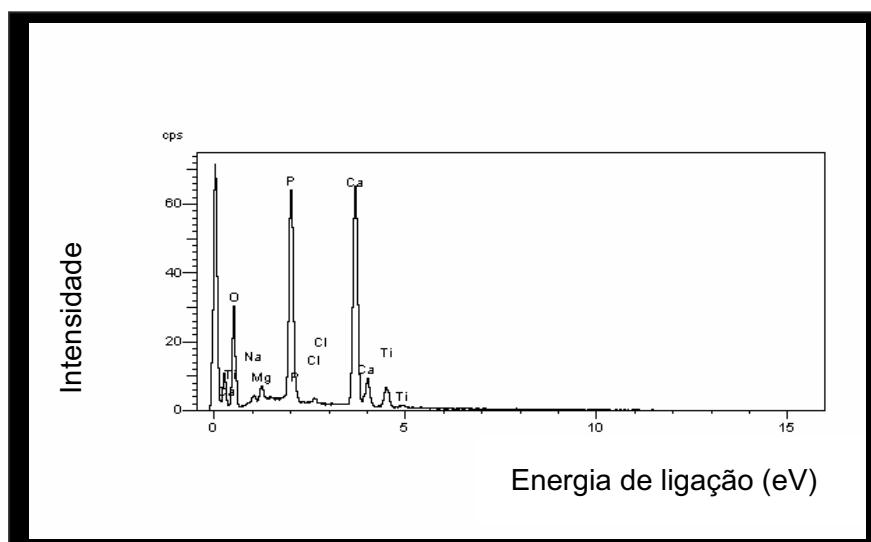


FIGURA 16 – Espectro EDS do implante após tratamento biomimético apresentando picos de energia característicos dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P).

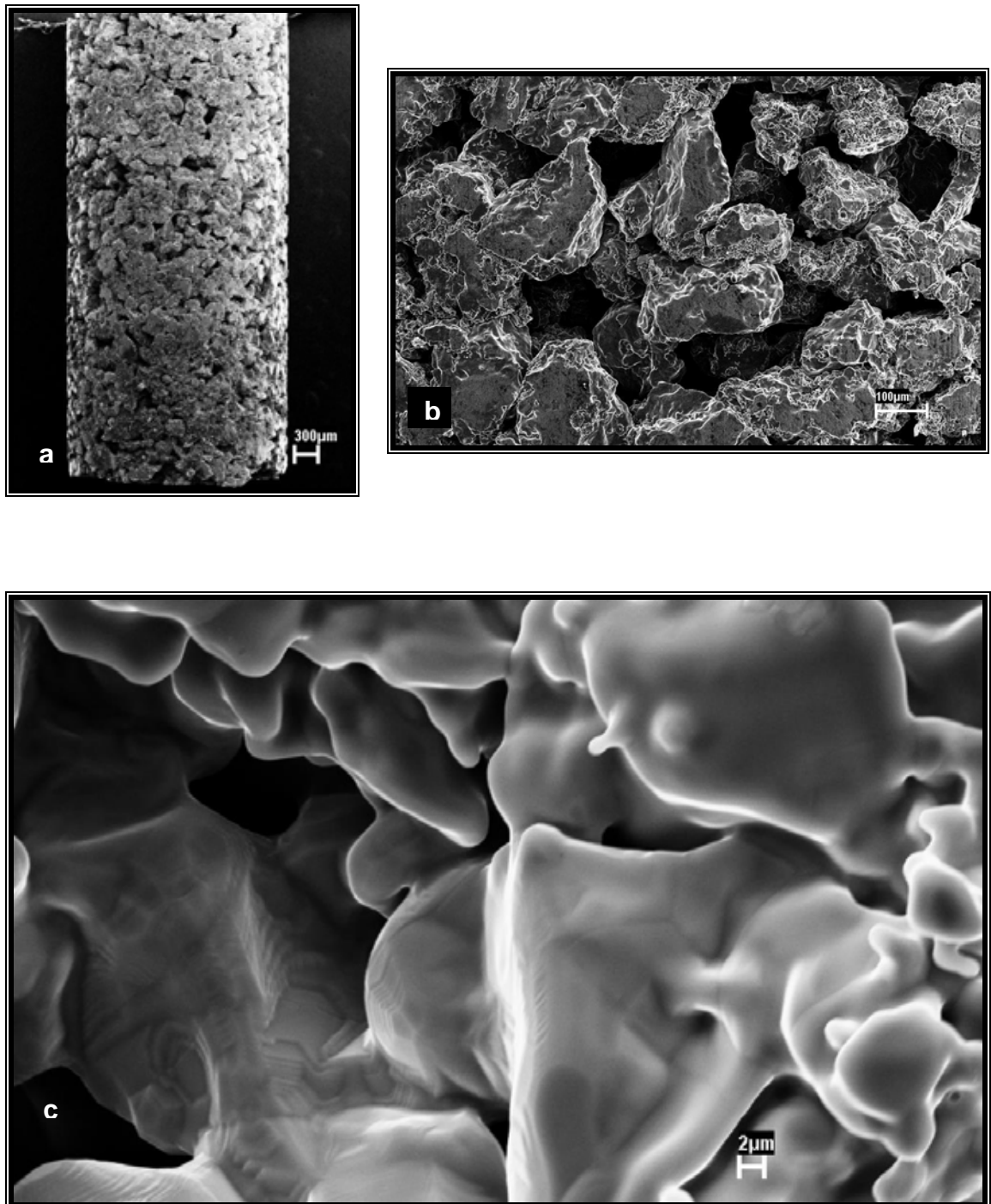


FIGURA 17 – Fotomicrografia do implante sem tratamento obtida por meio de MEV, mostrando a morfologia da superfície isenta de qualquer recobrimento, em aumento de 50X (a), 100X(b) e 200X (c)



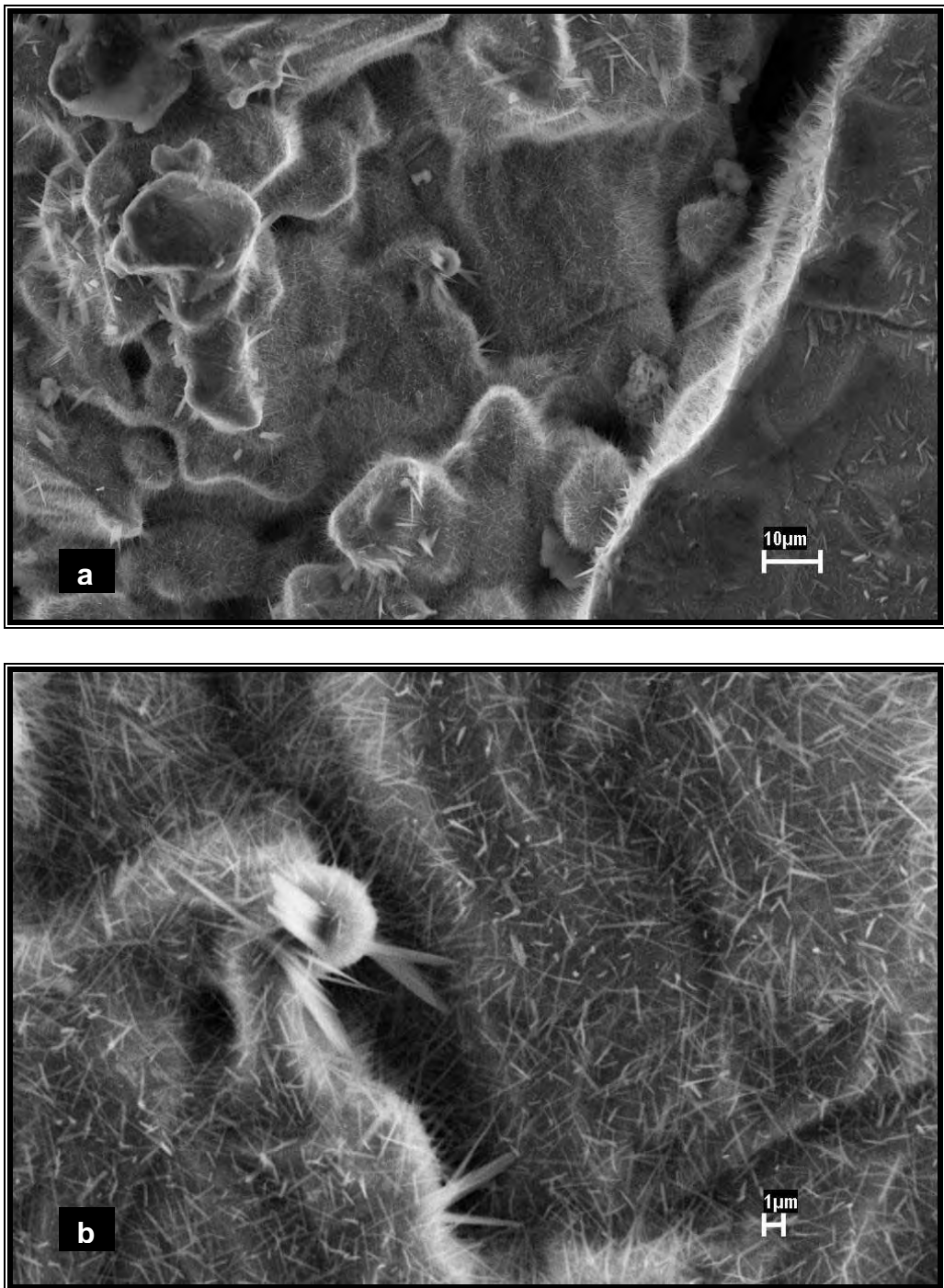


FIGURA 18 – Fotomicrografia, por meio de MEV, do implante após o pré-tratamento térmico-químico, mostrando a morfologia da superfície recoberta por titanato de sódio na forma de agulhas, em aumento de 100X(b) e 200X (c).

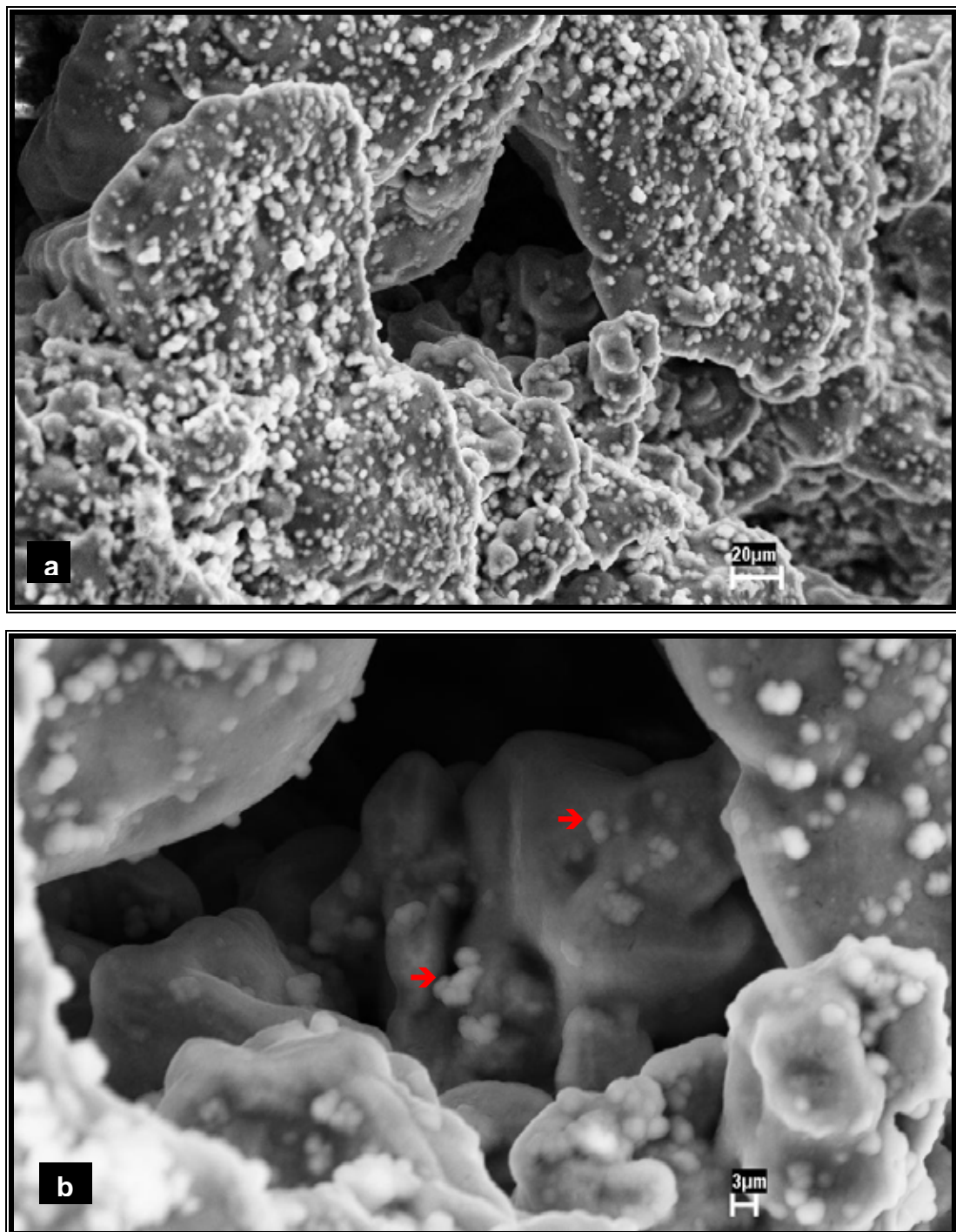


FIGURA 19 – Fotomicrografia, por meio de MEV, do implante após o tratamento biomimético. mostrando a morfologia da superfície recoberta por formações globulares (a), inclusive no interior dos poros →(b), em aumento de 100X e 200X respectivamente.

## 5.2.2 Espectroscopia Raman

Para a identificação das estruturas formadas sobre a superfície da amostra com tratamento biomimético foi usada a espectroscopia Raman.

A Figura 20 mostra o comportamento do material ao ser submetido à espectroscopia Raman. Seus pontos foram obtidos com a deconvolução dos espectros, utilizando Lorentzianas, com auxílio do programa Microcal Origin 5.0.

A análise dos espectros permitiu observar a presença nítida e de grande magnitude do pico de hidroxiapatita, aproximadamente a  $960\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo funcional fosfato ( $\text{PO}_3^{-4}$ ).

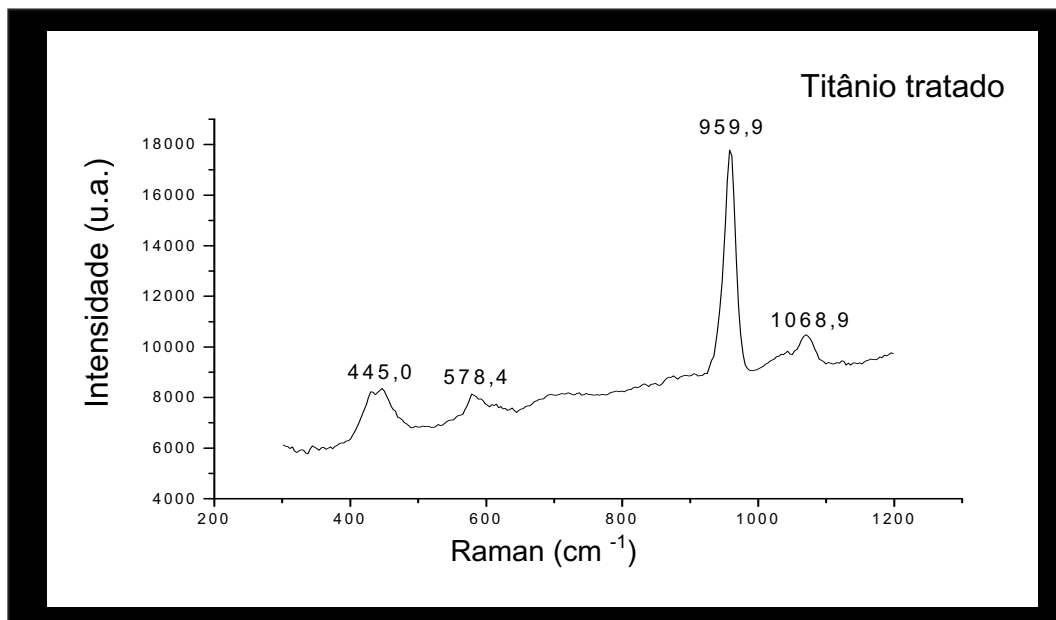


FIGURA 20 – Espectroscopia Raman dos implantes após imersão em FCSm por 14 dias apresentando pico característico e de grande magnitude a  $960\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a hidroxiapatita.

### 5.3 Análise qualitativa da neoformação óssea – MEV e MO

Os animais apresentaram resultados pós-operatórios satisfatórios, sem qualquer evidência de inflamação ou infecção no sítio cirúrgico. Porém, um animal, previsto para ser sacrificado após 45 dias, apresentou reação adversa antes do tempo de sacrifício, sendo incluído no grupo de animais sacrificados em 15 dias após o procedimento cirúrgico.

Na avaliação clínica realizada por meio de pinça clínica, nenhum implante apresentou mobilidade.

Macroscopicamente todos os implantes, nos 3 tempos de sacrifício, exibiram crescimento ósseo ao redor de toda sua superfície em contato com a cortical da tíbia, muitas vezes até mesmo acima da sua parte superior exposta. Foi observada também a neoformação óssea na região inferior de diversos implantes que estavam em contato com a cortical oposta. Além disto, em alguns implantes, em áreas sem qualquer contato, também foi possível verificar neoformação óssea, na região da medula óssea, partindo da face interna da cortical lateral e/ou inferior da tíbia em direção ao implante, formando uma trave de tecido ósseo (Figura 21).



FIGURA 21 – Fotografias de tíbias seccionadas contendo o implante onde se observa neoformação óssea na região medular

A tibia foi seccionada para o processamento histológico e pôde-se observar remanescentes do tecido medular bem como espaços vazios devido à sua remoção.

As imagens ao MEV (Figuras 22 a 27) demonstraram neoformação óssea na superfície da interface osso-implante, nos dois grupos estudados e nos três tempos de sacrifício. O crescimento ósseo foi observado também para o interior dos poros de diversos tamanhos, tanto periféricos quanto centrais. Observou-se ainda neoformação óssea a partir da região do endóstio da cortical da tibia em direção ao implante. Por fim, a presença de poros vazios completa as características analisadas ao MEV.

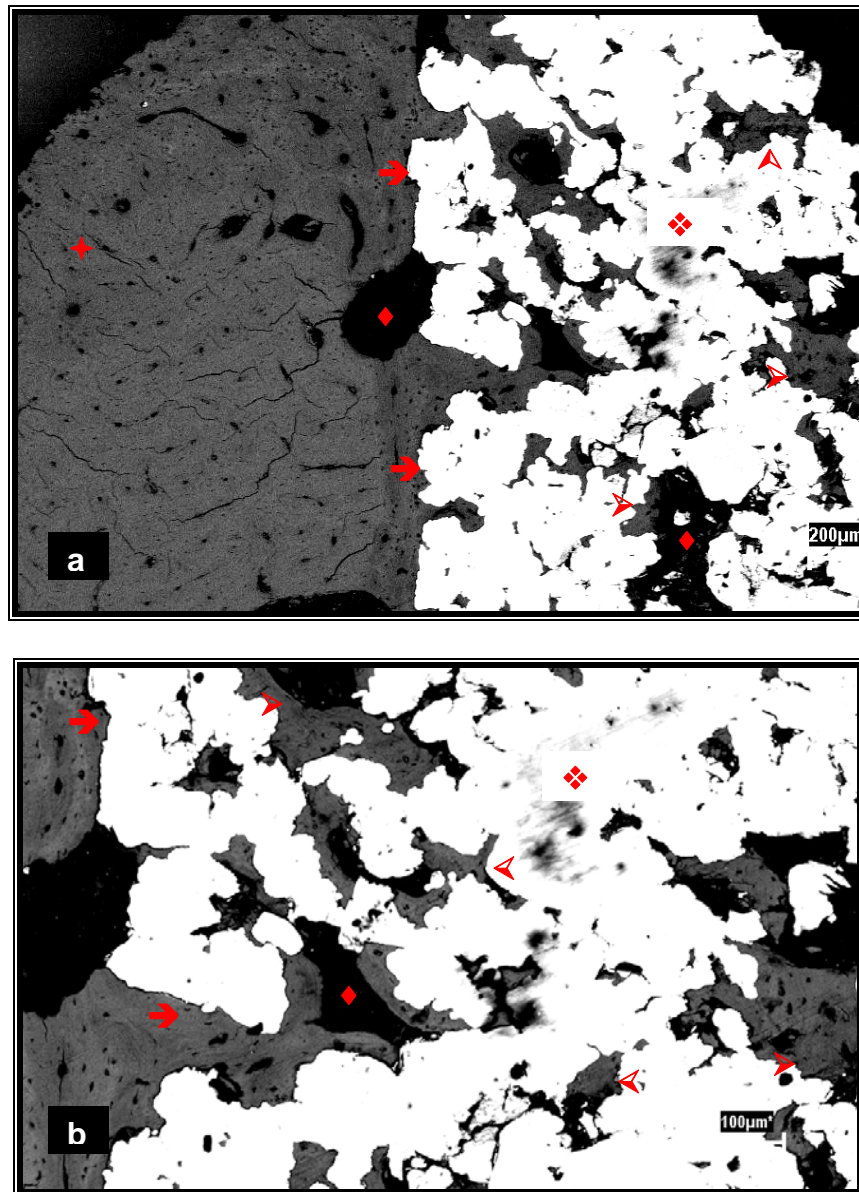


FIGURA 22 – Imagem ao MEV da interface osso(+) /implante(♦) - grupo controle (15 dias) em aumento de 20X (a) e 30X (b). Observa-se depósito de tecido ósseo (→) diretamente sobre a superfície do implante e no interior dos poros (↗) além de áreas sem tecido ósseo, preenchidas com resina (♦)

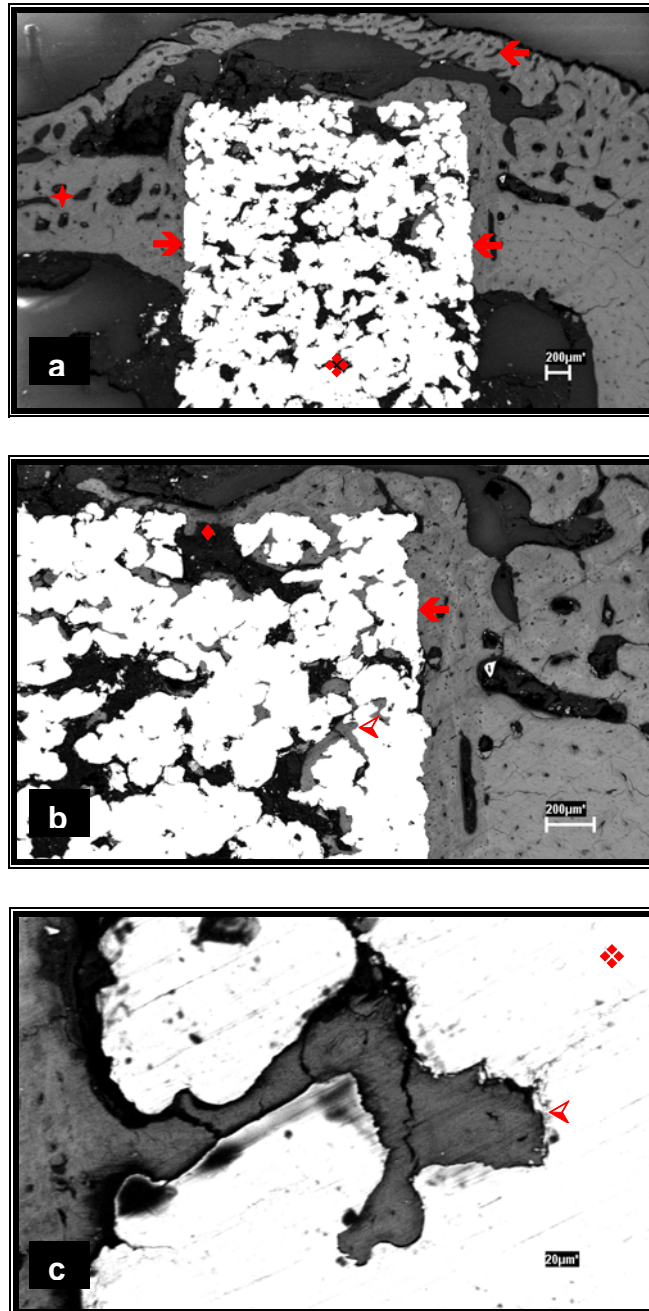


FIGURA 23 – Imagem ao MEV da interface osso(+) /implante(◇) - grupo teste (15 dias) em aumento de 10X (a), 20X (b) e 30X (c). Observa-se depósito de tecido ósseo (→) diretamente sobre a superfície lateral e superior do implante e no interior dos poros (▷) bem como poros vazios (◇)

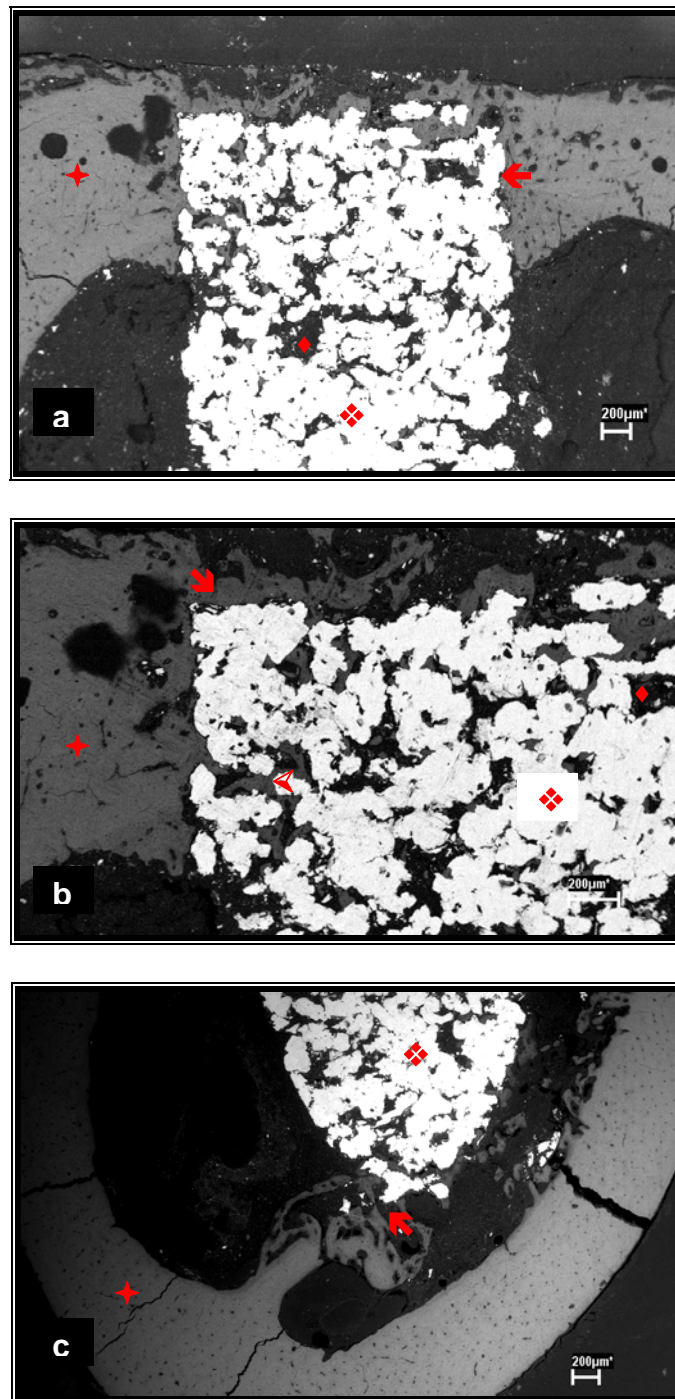


FIGURA 24 – Imagem ao MEV do corte da tíbia - grupo controle (30 dias) em aumento de 10X (a), 20X (b) e 10X (c). Visão panorâmica do implante(❖) na tíbia(★). Neoformação óssea (➔) diretamente sobre a superfície lateral e superior (a e b) e inferior do implante (c). Crescimento ósseo para o interior dos poros (➤) e presença de poros vazios(❖) completam o quadro



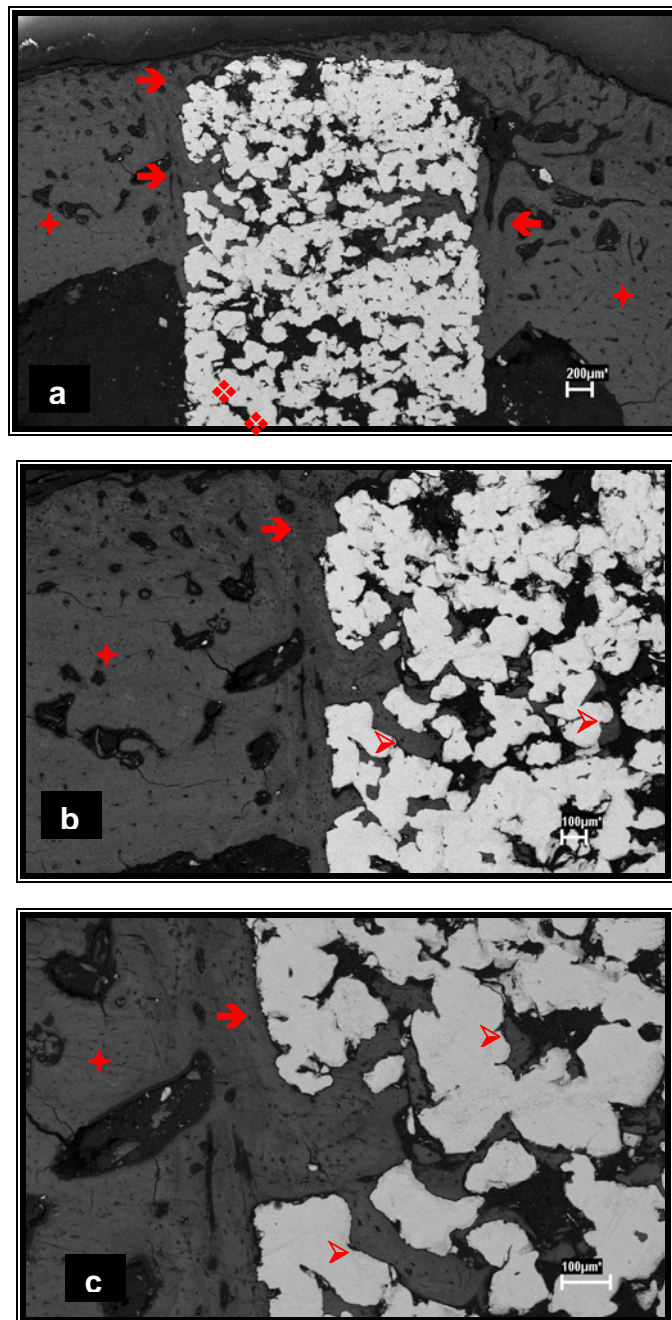


FIGURA 25 – Imagem ao MEV da interface osso(+)–implante(◆) - grupo teste (30 dias) em aumento de 10X (a), 20X (b) e 30X (c). Observa-se depósito de tecido ósseo (→) diretamente sobre a superfície lateral e superior do implante e no interior dos poros (➤) e também poros vazios (◆)

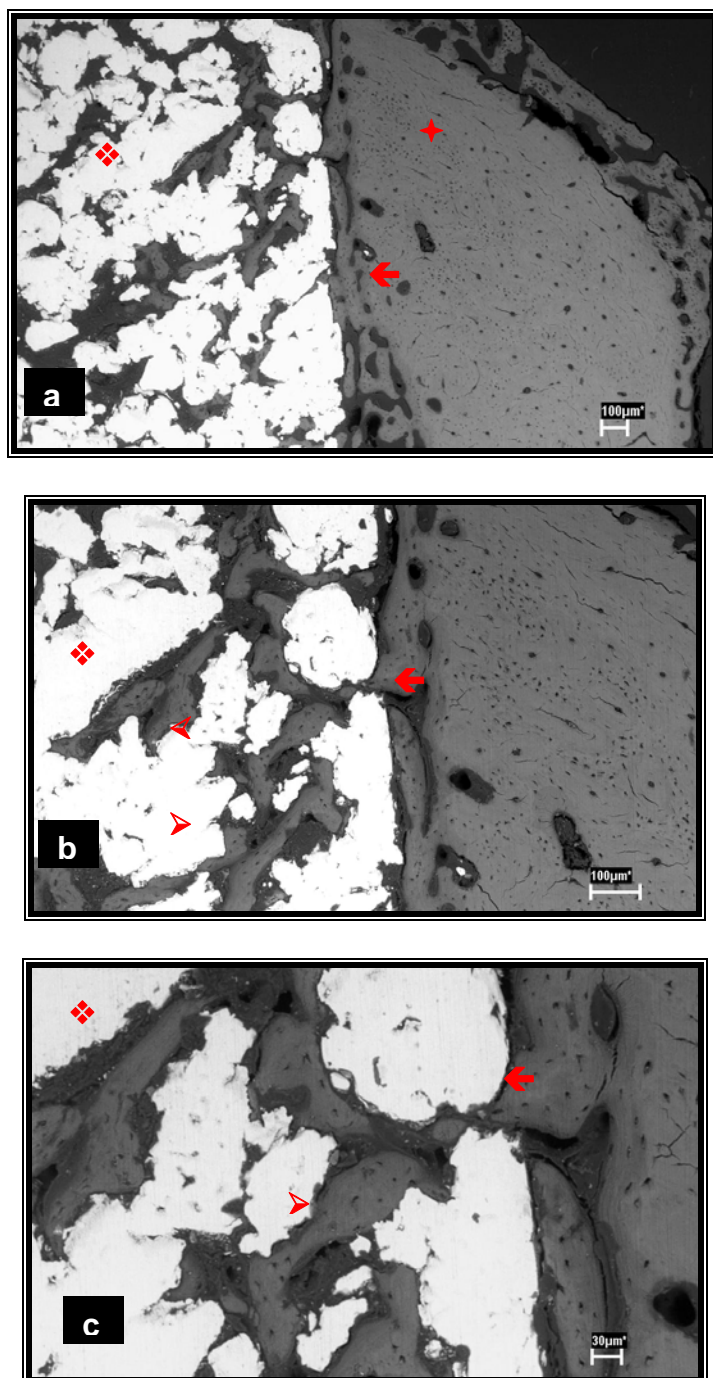


FIGURA 26 – Imagem ao MEV da interface osso (➔)–implante (◆) - grupo controle (45 dias) em aumento de 10X (a), 20X (b) e 30X (c). Observa-se depósito de tecido ósseo (➔) diretamente sobre a superfície do implante e preenchimento parcial por tecido ósseo no interior dos poros (➤)

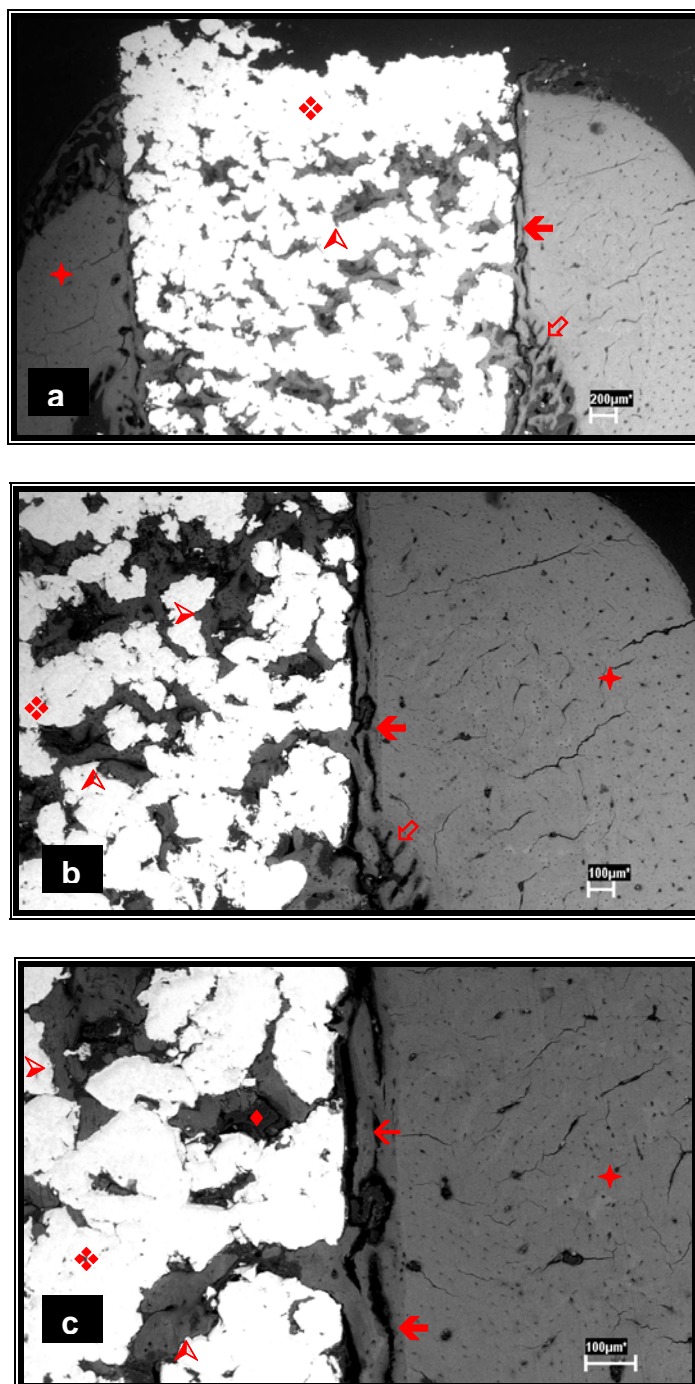


FIGURA 27 – Imagem ao MEV da interface osso(+)-implante(◆) - grupo teste (45 dias) em aumento de 10X (a), 20X (b) e 30X (c). Observa-se neofomação óssea (→) na superfície, em direção apical (⇨) e no interior dos poros superficiais e mais centrais (➤), nota-se o limite entre o osso preexistente e o neofomado (→), bem como poros vazios (◆)

Microscopicamente, os espécimes avaliados eram constituídos por osso compacto que formava as paredes da tíbia onde foram posicionados os implantes (Figuras 28 a e 28 b). O osso cortical pré-existente apresentou-se com aspecto compacto com numerosos sistemas de Havers com lamelas concêntricas e matriz óssea de coloração uniforme (Figura 31 b). Estas lamelas continham lacunas de osteócitos, também dispostas em anéis concêntricos.

Nas tíbias dos animais, independente do tipo de implante avaliado e o tempo de sacrifício, foi observada neoformação óssea na interface osso-implante e para o interior dos poros superficiais (Figuras 29 a, 29 b, 30 a, 30 b, 30 c, 32 a e 32 b), bem como nos mais centrais (Figura 31c). Em alguns cortes, principalmente dos animais sacrificados após 15 dias, o osso neoformado era imaturo e continha áreas com preenchimento parcial de resina, mas mesmo assim exibia crescimento para o interior dos poros (Figura 32).

O limite entre o osso cortical pré-existente e o osso neoformado era nítido e apresentou diferença na coloração de suas matrizes ósseas (Figura 31 a).

Notou-se ainda, áreas de trabéculas delicadas, formadas por material de aspecto osteóide (Figura 32).

A partir da região do endóstio, foi observada a presença de tecido ósseo neoformado (Figura 28 b) com crescimento em direção apical do implante. Na região inferior do implante observou-se algumas áreas de formação óssea, constituindo pontes ósseas a partir da região cortical em direção ao implante. Os poros presentes nesta área também foram preenchidos por tecido ósseo.

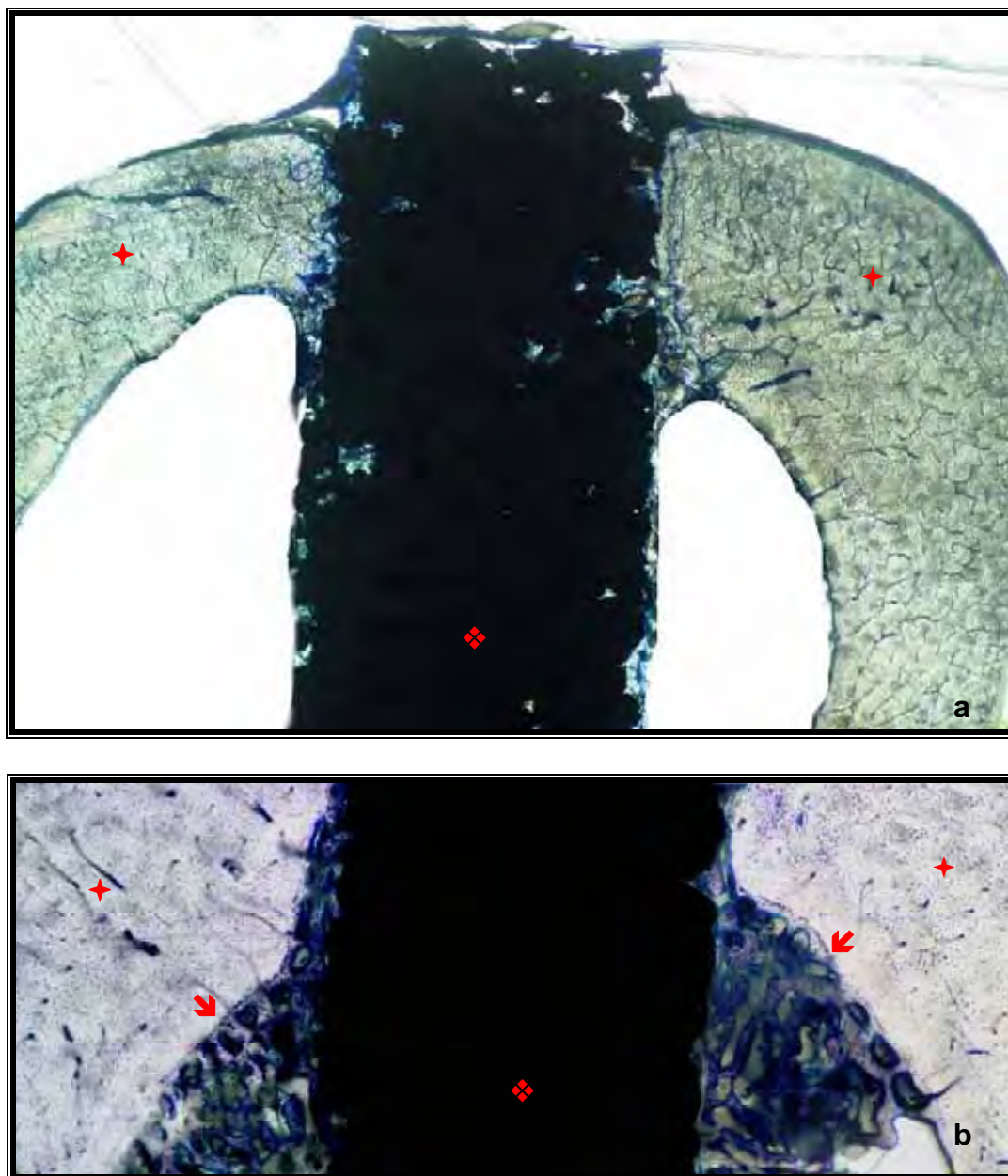


FIGURA 28 – Tíbias dos coelhos do grupo tratado no período de 30 dias, observados em MO: visão panorâmica do implante poroso, inserido na tíbia do coelho (✦) (a); interface cortical óssea com o implante demonstrando a neoformação óssea (➔) no limite inferior da cortical em direção ao implante (b).

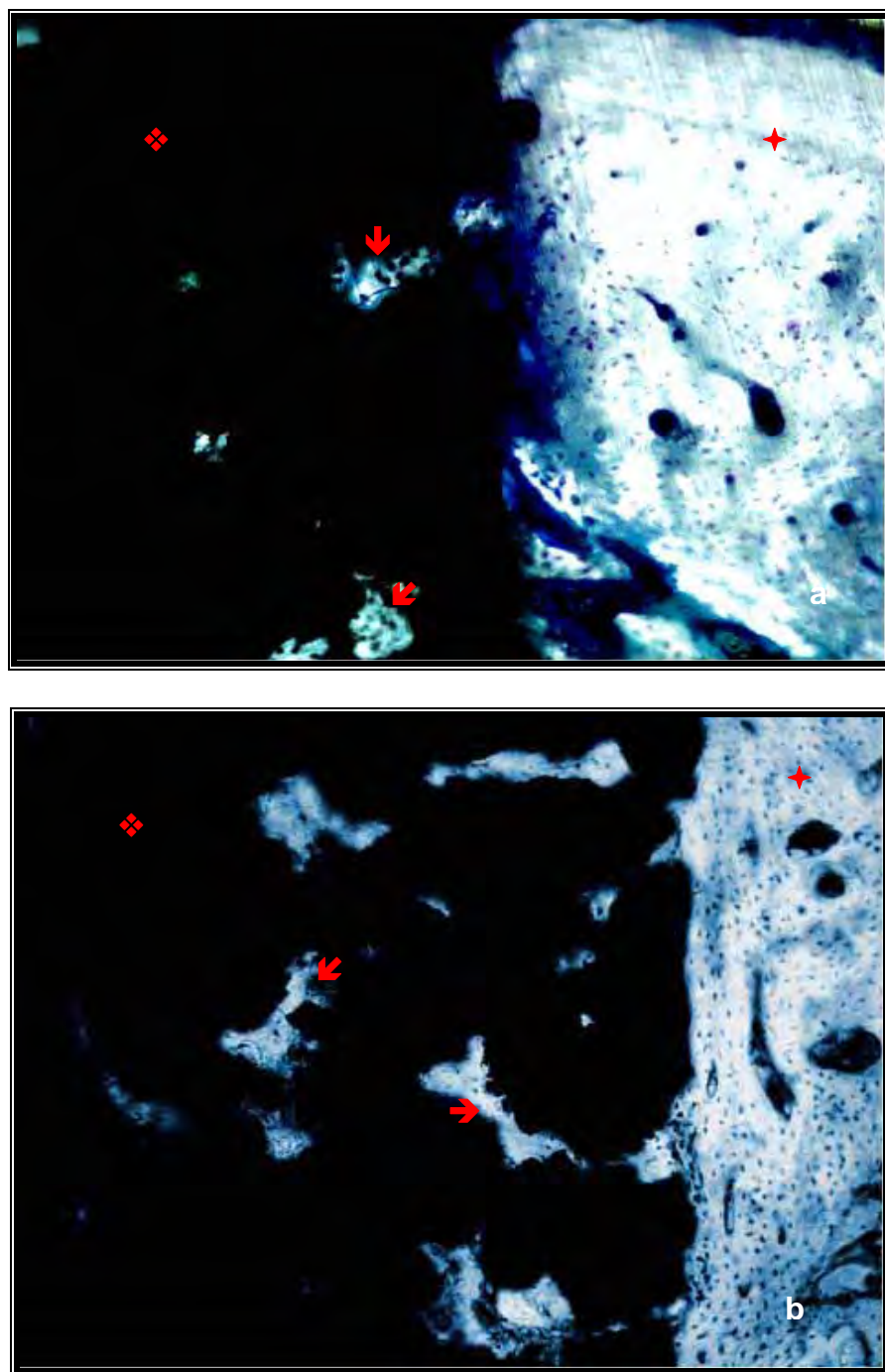


FIGURA 29 – Coloração de azul de toluidina de implantes sem tratamento (período de 30 dias): íntimo contato na interface osso (+) – implante (◇) e a presença de poros preenchidos por tecido ósseo (→).

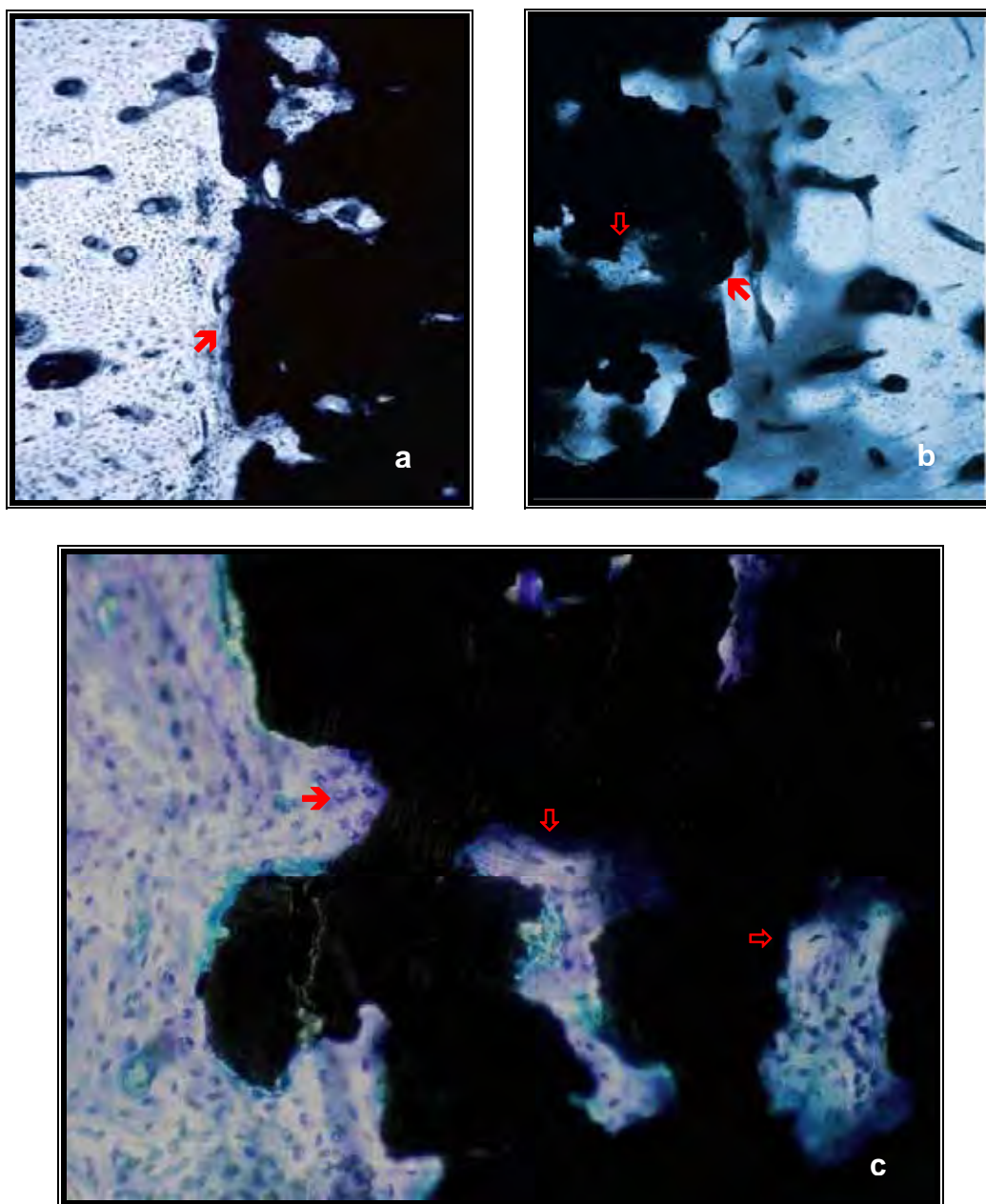


FIGURA 30 – Coloração de azul de toluidina de implantes tratados (período de 30 dias) íntimo contato na interface osso-implante (→) (a, b e c), detalhe da neoformação óssea no interior de poros (⇨) (c).

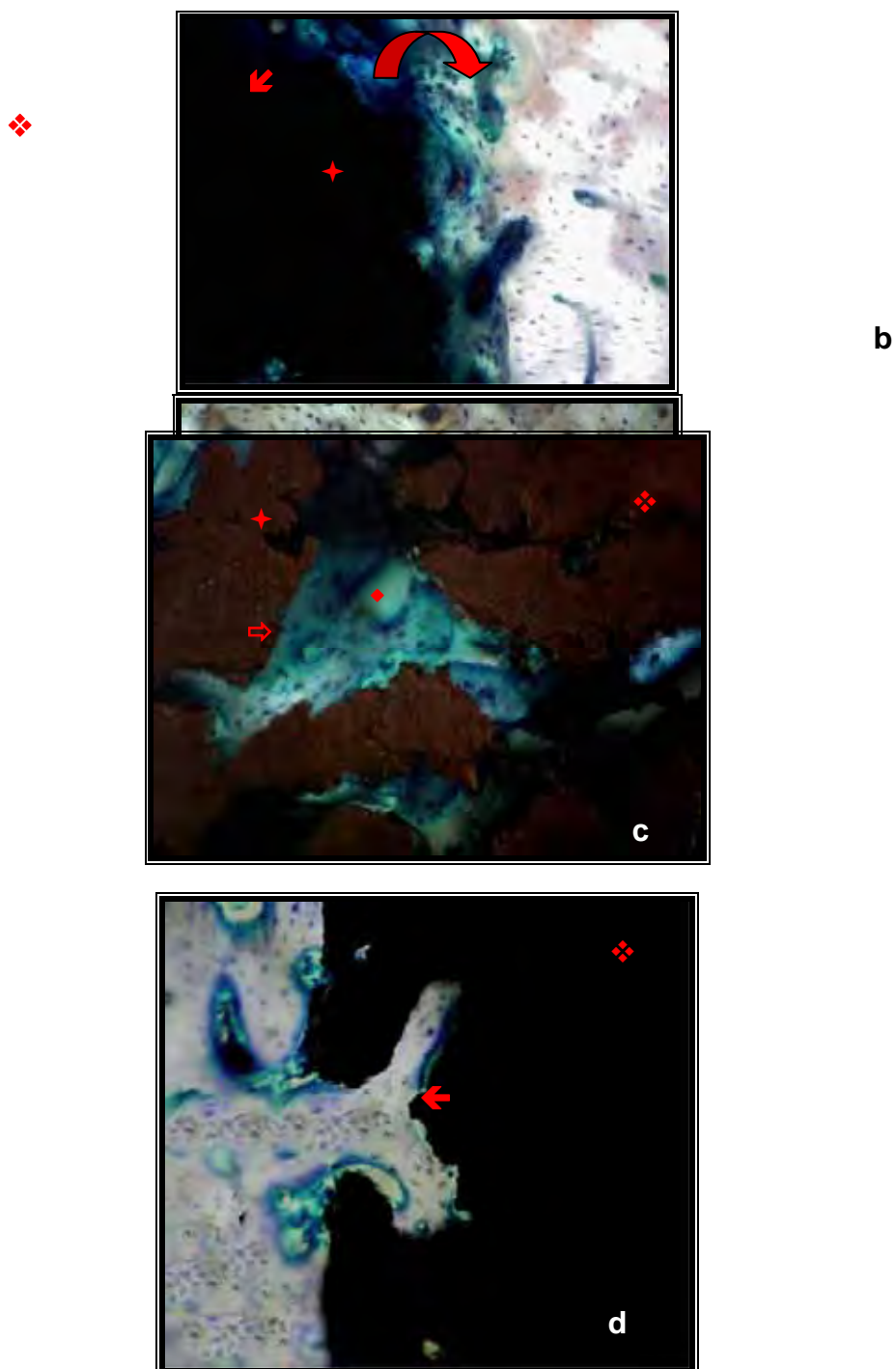


FIGURA 31 – Limite entre osso cortical pré-existente (★), osso neoformado na interface (→) e implante (◆) (a e d). Detalhe do osso da tíbia: aspecto compacto com poucas lacunas, numerosos sistemas de Havers e lamelas concêntricas (b), Neoformação óssea (⇒) no interior de um poro central, parcialmente preenchido com resina (◆) (c).



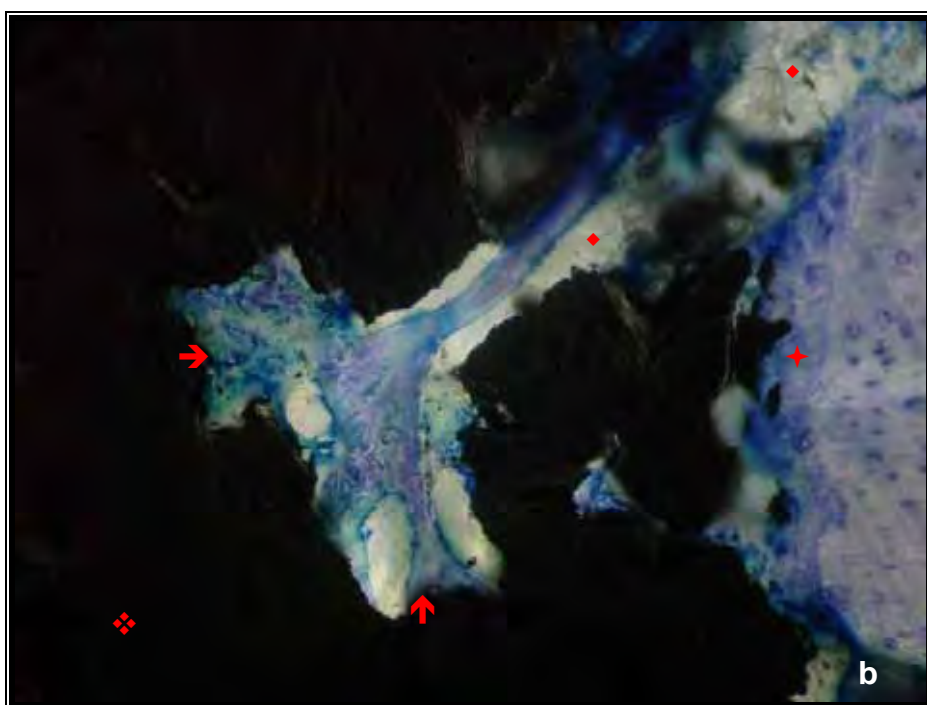
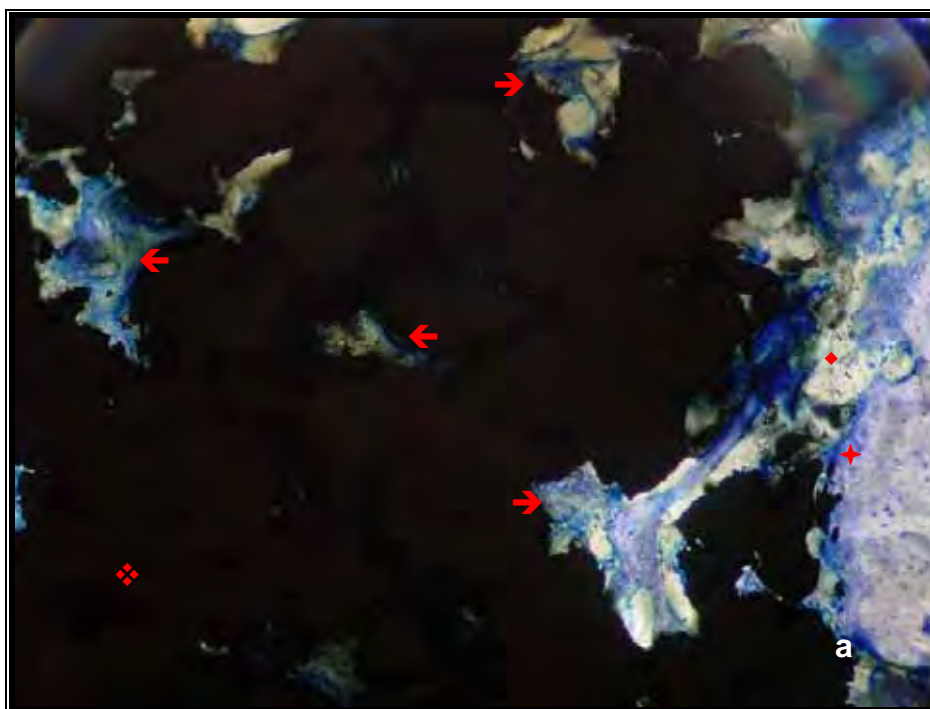


FIGURA 32 - Osso neoformado (+) na interface e no interior dos poros (→) de implante (❖) sem tratamento (período de 15 dias), áreas com preenchimento parcial de resina (♦) (a e b)

#### 5.4 Análise quantitativa da neoformação óssea – MO

Para a análise foram utilizadas médias de apenas 18 coelhos, devido à perda de um coelho. Para os grupos não ficarem numericamente diferentes, excluiu-se um coelho de 15 e outro de 30 dias.

A porcentagem de neoformação óssea de implantes, nos três tempos de sacrifício, está descrita no Quadro 5 do Apêndice A. A análise descritiva dos resultados de acordo o tipo de implante e com o tempo pode ser verificada na Tabela 2, representada pelas Figuras 33 e 34.

Os dados obtidos permitem concluir que os valores médios de neoformação óssea dos implantes tratados (37,45%; 37,91%; 38,37%) nos tempos de sacrifício de 15, 30 e 45 dias, respectivamente são superiores aos valores obtidos naqueles do grupo controle (32,26%; 37,13%; 37,18% respectivamente), porém, esta diferença é mais expressiva entre os grupos de implantes com tempo de 15 dias.

Foi efetuada a comparação entre dois grupos em cada tempo de sacrifício, por meio do teste *T-Student* de amostras pareadas. A análise revelou que no tempo de 15 dias houve diferença estatisticamente significativa, ou seja, o grupo teste superou a porcentagem de formação óssea do grupo controle ( $p=0.004$ ).

Tabela 2 – Análise descritiva dos valores de neoformação óssea (%) obtidos em 18 coelhos nos dois grupos de estudo e nos três tempos de sacrifício.

Sumário da % de neoformação óssea dos coelhos					
Tempo	N	Grupo teste		Grupo controle	
		Min-max	Me±DP	Min-max	Me±DP
15	6	35,41-40,58	<b>37,45 ±2,26*</b>	28,33-38,00	<b>32,26 ±3,18*</b>
30	6	29,94-46,66	37,91±5,44	33,20-43,24	37,13±3,57
45	6	32,16-48,20	38,37±6,32	31,25-45,8	37,18±6,05

\*Médias diferentes entre si pela análise *T Student* ( $p < 0,05$ )

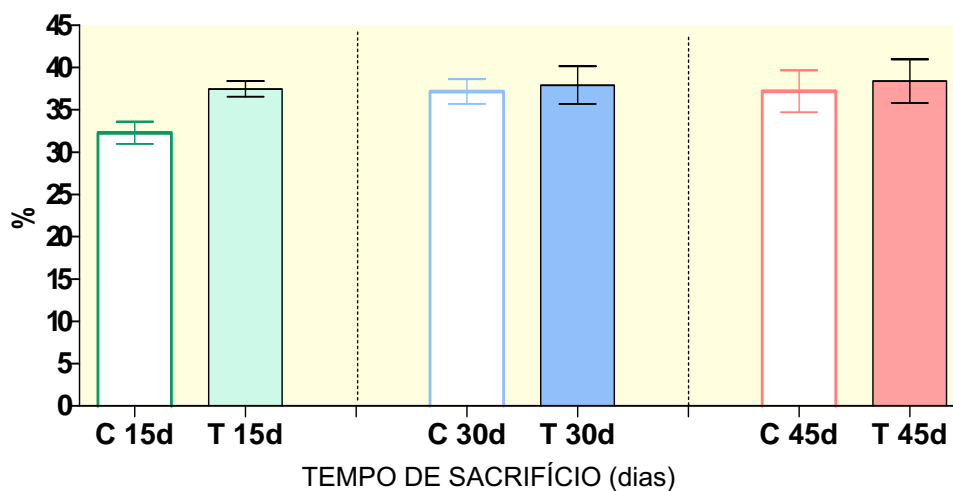


FIGURA 33 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos valores médios de % de neoformação óssea obtidos nos coelhos (N=18) segundo as condições experimentais (C: controle;T: teste).

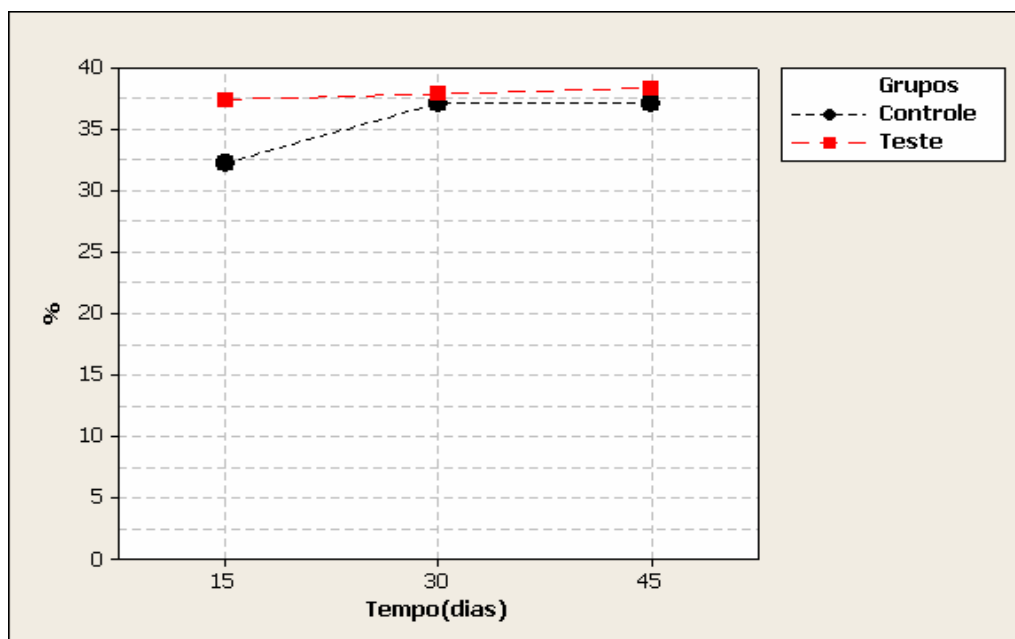


FIGURA 34 - Gráfico de linhas dos valores de % de neoformação óssea obtidos nos coelhos (N=18) ao longo dos três tempos de sacrifício e segundo as condições experimentais (C: controle;T: teste).

A análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) foi aplicada para determinar a influência das variáveis: tipo de implante e tempo de sacrifício, levando em consideração a porcentagem de tecido ósseo neoformado nos coelhos. Verificou-se que não houve influência dessas duas variáveis principais, tipo de implante e tempo, isoladamente, e da interação delas sobre a formação óssea entre os grupos pesquisados. Os valores de  $p$  estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise estatística (ANOVA) para os valores médios de neoformação óssea (%) obtidos em 18 coelhos nos dois grupos de estudo e nos três tempos de sacrifício.

<b>Fator de variação</b>	<b>DS</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tempo	2	0.00627	0.00313	1.08	<b>0.3662</b>
Grupos	1	0.00512	0.00512	3.29	<b>0.0899</b>
TempoXGrupos	2	0.00357	0.00178	1.15	<b>0.3444</b>

DS = grau de liberdade; SS=soma do quadrado; MS= quadrado médio; F=razão F.

### 5.5 Ensaio mecânico de cisalhamento

Devido à perda de implantes durante o processamento das amostras, para a análise foram utilizadas as médias de 36 implantes.

Os dados da tensão final obtida pelo teste de cisalhamento de 36 implantes nos três tempos de sacrifício estão apresentados no Quadro 6 do Apêndice B. A análise descritiva dos resultados de acordo o tipo de implantes e com o tempo pode ser verificada na Tabela 4, representada pela Figura 35.

A análise descritiva revelou que os valores de resistência à remoção dos implantes porosos tratados (7,30 MPa, 19,24 MPa, 19,48 MPa) nos tempos de sacrifício de 15, 30 e 45 dias, respectivamente, superaram os do grupo controle (6,36 MPa, 12,88 MPa, 15,65 MPa, respectivamente).

Foi efetuada a comparação dos grupos em cada tempo por meio do teste *T-Student* de amostras pareadas. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi observada nos períodos de 30 e 45 dias.

Tabela 4 – Análise descritiva dos valores da força de remoção (MPa) obtidos em 36 implantes nos dois grupos de estudo e nos três tempos de sacrifício.

<b>Sumário da tensão (MPa) do ensaio de cisalhamento dos implantes</b>					
Tempo	N	Grupo teste		Grupo controle	
		Min-max	Me±DP	Min-max	Me±DP
15	6	5,1-9,19	7,3 ±1,63	2,7-11,74	6,36 ±3,48
30	6	15,97-22,59	<b>19,24±2,89*</b>	9,7-15,27	<b>12,88±2,51*</b>
45	6	15,74-25,21	<b>19,48±3,35*</b>	7,72-22,7	<b>15,65±3,32*</b>

\*Médias diferentes entre si pela análise *T Student* ( $p < 0,05$ )

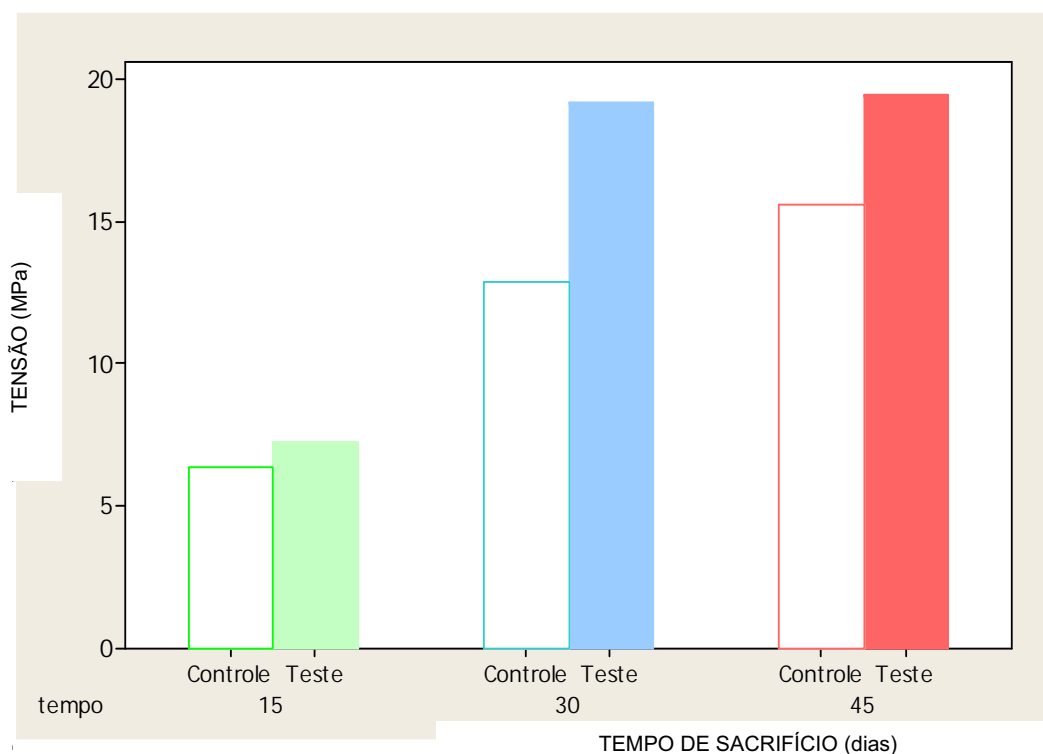


FIGURA 35 - Média dos valores da força de remoção dos implantes nos três tempos de sacrifício, segundo as condições experimentais.

A análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) foi aplicada para determinar a influência das variáveis: tipo de implante e tempo de sacrifício levando em consideração a tensão de remoção. Verificou-se que houve influência dessas duas variáveis principais, tipo de implante e tempo, isoladamente, e não da interação delas sobre a força de remoção entre os grupos pesquisados. Os valores de **p** estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise estatística (ANOVA) para os valores médios da força de remoção (MPa) obtidos em 36 implantes nos dois grupos de estudo e nos três tempos de sacrifício

	DS	SS	MS	F	<b>p</b>
Tempo	2	810,71	405,36	32,25	<b>0.000</b>
Grupos	1	123,58	123,58	8,82	<b>0.009</b>
TempoXGrupos	2	44,07	22,04	1.70	<b>0.216</b>

DS = grau de liberdade; SS=soma do quadrado; MS= quadrado médio; F=razão F

## 6 DISCUSSÃO

A utilização dos implantes como forma de reabilitação de perdas ósseas apresentou notáveis avanços nos últimos anos. Entretanto, os pesquisadores ainda tentam elucidar e, ao mesmo tempo, aprimorar os sistemas de implantes buscando otimização de suas características para que possam obter a melhor resposta possível do tecido ósseo na integração osso-implante, bem como uma formação óssea cada vez mais intensa. Atualmente, o alvo principal dos estudos é o desenvolvimento de um modelo de implante com superfície bioativa e osseocondutora e até mesmo osseoindutora, a fim de promover adaptação e condução de células ósseas com mais rapidez.

Como a fixação biológica é influenciada por características da superfície, como a composição química, energia, topografia, condições da interface osso-implante, além da estabilidade inicial, presença de espaços e carga<sup>79,124</sup>, o desenvolvimento de implantes com superfícies porosas e modificadas quimicamente tem sido um dos fatores mais intensamente pesquisados<sup>8,43,52,54,55,87,98,99,110,130</sup>.

Entretanto, pesquisas básicas devem continuar na busca de implantes que proporcionem, por meio de tratamentos adequados e simplificados, uma reparação óssea mais rápida e eficiente.

O titânio comercialmente puro, metal reativo que apresenta alto grau de biocompatibilidade, permite a reparação óssea sem a ocorrência de cápsula fibrosa, ou seja, o contato direto com o osso, processo chamado de osseointegração<sup>41,71,102,123</sup>. Por outro lado, o tratamento biomimético da superfície do implante tem potencial de produzir recobrimentos de fosfato de cálcio sobre o titânio<sup>8,53,114</sup>. Por fim, as diversas teorias sobre que tipo de superfície modificada quimicamente



pode promover melhor e mais rápida osseointegração pelo tecido ósseo adjacente, pode ser avaliada por meio de estudos *in vivo* em animais como ratos, coelhos, cabras, ovelhas, cães entre outros<sup>23,43,56,65,67,79,99,124,132</sup>.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente e quantitativamente o tecido ósseo neoformado na interface osso-implante e no interior dos poros de implantes cilíndricos porosos de titânio puro grau 2, submetidos ao tratamento biomimético, assim como identificar e caracterizar a composição química e a topografia presentes, decorrentes do tratamento da superfície empregado.

No presente estudo os implantes de titânio foram colocados bilateralmente na tíbia de 30 coelhos. Os animais foram sacrificados no tempo de 15, 30 e 45 dias. Observou-se que a porcentagem média de neoformação óssea nos implantes tratados nos três tempos de sacrifício foi maior (37,45%; 37,91%; 38,37% respectivamente) do que nos implantes não tratados (32,26%; 37,13%; 37,18% respectivamente).

O titânio e suas ligas são materiais usados com freqüência na implantodontia. As excelentes propriedades físicas e mecânicas como: baixa densidade, alta resistência à corrosão, boa resistência mecânica<sup>69,102</sup>, além da sua natureza inerte, fazem deste um material com características adequadas para estabelecer a integridade estrutural do tecido ósseo perdido<sup>9</sup>. Este material não induz resposta imunológica, apresenta pouca incidência de toxicidade e rejeição<sup>39,87</sup>.

Diversos fatores relacionados à superfície dos implantes, sua topografia e composição química estão sendo estudados por diversos autores com o objetivo de favorecer a osseointegração<sup>6,8,43,52,69,71,98,99,111,130</sup>. Com relação a superfície do titânio, a camada de óxido de titânio, que se forma sobre a sua superfície em análise ultra-estrutural é coberta por um leito de substância amorfa representada por macromoléculas de proteoglicanas e

glicosaminoglicanas aderidas ao ácido hialurônico. As proteoglicanas formam uma “cola” biológica responsável pela adesão entre células, fibrilas e outras estruturas. Esta estrutura é aparentemente responsável pela união estreita entre tecido ósseo e superfície metálica<sup>2</sup>.

Nos últimos anos, têm surgido evidências cada vez mais claras que o processo de osseointegração é facilitado pela interação entre uma superfície rugosa e o tecido ósseo em reparação. Por isso, diversos sistemas de implantes utilizam de metodologias variadas para que uma superfície constituída por sulcos ou poros seja obtida<sup>17,56,65,67,81,142</sup>.

Trabalhos recentes apresentados na literatura demonstram que a maior rugosidade superficial leva à ocorrência de uma maior osseointegração ao redor dos implantes. Tal fato pode ser observado quando implantes com várias configurações e diferentes rugosidades foram implantados em animais<sup>56,67</sup>. A importância de se confeccionar implantes com superfície rugosa reside no aumento da área de contato com o tecido ósseo, favorecendo a adesão e aposição tecidual e promovendo a osseointegração com mais rapidez. Este fato tem sido afirmado por vários autores nos diversos trabalhos de pesquisa que visam o conhecimento do complexo processo da osseointegração<sup>6,17,39,56,65,67,81,115,142</sup>.

Em contrapartida, a superfície porosa está ainda mais apta a estabelecer uma ligação biomecânica mais forte com o tecido ósseo adjacente do que um implante de superfície polida ou rugosa. Diversos trabalhos indicam que sistema de implantes com superfície porosa podem ter melhores resultados para a integração osso-implante<sup>45,46,65,71,124,131,141,142</sup>.

Uma superfície porosa ou rugosa pode ser produzida por diversos tratamentos como *plasma spray*<sup>8,139</sup>, oxidação anódica da superfície<sup>141</sup>, sistema APS<sup>71</sup>, ataque ácido<sup>29</sup>, entre outros.

Além da superfície porosa usada em vários trabalhos, topografias mais complexas, com estrutura totalmente porosa e poros

interligados vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de promover uma união ainda mais forte na interface osso-implante e maior resistência mecânica à remoção. Estudos prévios *in vitro* e *in vivo* demonstram melhora com o uso destes implantes no processo da osseointegração<sup>17,27,65,96,123,138,141</sup>.

Este modelo de implante não só aumenta a área de contato, mas também possibilita o crescimento do tecido ósseo para o interior dos poros, produzindo uma rede tridimensional, aumentando o imbricamento mecânico e a interdigitação do tecido ósseo com o implante<sup>102,103,131</sup>. Tal característica foi observada no presente estudo, onde as imagens obtidas ao MEV e ao MO revelaram neoformação óssea na superfície da interface osso-implante e no interior dos poros tanto periféricos quanto centrais.

Uma das técnicas para se confeccionar implantes com estrutura porosa é a metalurgia do pó, utilizada no presente estudo. É uma técnica capaz de produzir amostras complexas com formato de rede, com interligação dos poros. Apresenta diversas vantagens, entre elas: permite o controle da composição química, otimiza as propriedades mecânicas das amostras, economiza matéria-prima, diminui o custo de fabricação e reduz as etapas de confecção<sup>103,111,131</sup>.

Além disto, esta técnica permite o controle da porosidade produzida nas amostras, produzindo um modelo mais apropriado quanto ao diâmetro, configuração e porcentagem de poros. Os poros interligados são produzidos pela adição de materiais, que funcionam como espaçadores, os quais uma vez removidos tornam a amostra porosa<sup>18,86,102,111,131,136</sup>.

Na técnica da metalurgia do pó, as amostras são obtidas pela mistura de pós que posteriormente é compactada. Neste trabalho foi utilizado o pó de titânio puro grau 2 com 149-177  $\mu\text{m}$ , associado com grânulos de uréia. A metodologia empregada para a fabricação dos implantes foi a metalurgia do pó, baseada nos melhores resultados

prévios obtidos pelo estudo de Oliveira et al.<sup>102,103</sup> e Vasconcelos<sup>131</sup>. De acordo com os estudos citados, o aditivo orgânico utilizado foi a uréia com granulometria entre 250-297  $\mu\text{m}$ , na porcentagem de 20% por ser um material que não reage com o metal, facilmente removido pelo calor e que, nesta granulometria e porcentagem, produziu poros de diâmetros adequados e distribuição homogênea.

Para a compactação da mistura, a pressão isostática a frio utilizada foi de 200 MPa que promoveu, de acordo com o estudo de Oliveira et al.<sup>104</sup> o desenvolvimento de uma amostra com porosidade alta e distribuição adequada dos poros.

Tamanho e fração de poros adequados permitem boa maturação óssea, além de trabéculas ósseas no interior dos poros com adequada espessura e comprimento. Também auxiliam na prevenção da obstrução dos poros pelo recobrimento com apatita<sup>79</sup>. A estrutura porosa ideal deve ser composta por meso e microporos para promover adesão celular, adsorção de metabólitos biológicos e reabsorção controlada e macroporos para crescimento ósseo e adequado fornecimento de nutrientes<sup>54,60,118</sup>.

A metodologia utilizada produziu implantes com poros de diâmetro entre 200 a 500  $\mu\text{m}$  e 60 a 80% de porosidade.

Os estudos neste sentido são controversos, a maioria relatou que o diâmetro ideal dos poros varia entre 100  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ <sup>27,34,66,99,111,124</sup>. Por outro lado, os estudos de Nguyen et al.<sup>96</sup>, Frosch et al.<sup>46</sup> e Kusakabe et al.<sup>79</sup> demonstraram que tanto poros pequenos (45  $\mu\text{m}$ ) quanto macroporos de 1000  $\mu\text{m}$  promovem um bom crescimento ósseo para o seu interior.

Quanto à fração de poros, os estudos relataram que a porosidade ideal deve variar entre 25 a 66%<sup>27,66,78,86,99,104</sup>. Por outro lado, o estudo de Wen et al.<sup>132</sup> demonstrou que a porosidade pequena (5%) promoveu bons resultados quanto ao crescimento ósseo, resultado também observado por Kim et al.<sup>71</sup> utilizando amostras com porosidade

elevada (80%). A alta porosidade seria um fator benéfico por permitir adequado espaço para a adesão e proliferação do osso neoformado<sup>90,136</sup>. Este aspecto foi confirmado no presente estudo, onde os implantes com alta porosidade apresentaram neoformação óssea em grande parte dos poros, periféricos e centrais.

Sem dúvida, para melhoria dos resultados clínicos, especialmente em áreas de pouca densidade óssea, a chave para maiores índices de sucesso talvez seja a busca de tratamentos da superfície que permitam melhora na neoformação de tecido ósseo, inclusive em áreas de qualidade óssea deficiente.

Neste sentido, diferentes técnicas de recobrimento da superfície de implantes têm sido empregadas devido à importância de se promover interações da composição química dos recobrimentos obtidos com os tecidos biológicos<sup>38,42,54,61,99,113,130,138,139</sup>. A hidroxiapatita tem sido o revestimento ideal para implantes metálicos pela sua excelente biocompatibilidade, bioatividade, bioafinidade, osseocondução e dissolução lenta permitindo a sua substituição por tecido ósseo. Além disto, o osso neoformado é resultado da adesão direta de osteoblastos, sem a presença de nenhum tecido fibroso entre o osso e o recobrimento com HA<sup>79</sup>.

O recobrimento com HA em contato com os tecidos leva à liberação de íons Ca e P, seguida pela precipitação da camada de apatita que desencadeia a diferenciação celular e conseqüente formação óssea (apatita + osteoblastos), isto pode explicar porque implantes recobertos com HA tendem a exibir uma osseointegração mais rápida do que implantes sem recobrimento<sup>29</sup>.

Dentre os métodos para obter revestimentos de HA incluem-se: deposição por vapor, precipitação por eletrólise, precipitação por eletroforese, recobrimento sol-gel, *plasma spray*, entre outras<sup>25,38,43,49,66,79,113,130,138,139</sup>.

A técnica conhecida como tratamento biomimético

promove o recobrimento do metal por hidroxiapatita simplesmente pela sua imersão em FCS com Ca e P. O processo biomimético é um método simples e econômico, que apresenta efetividade mesmo em implantes com estrutura porosa, não reduz a porosidade porque causa pequena alteração morfológica dos poros. É um método viável comercialmente em substituição à técnica por *plasma spray* mais utilizada<sup>9</sup>, mas que apresenta diversas desvantagens como a produção de recobrimentos não homogêneos, alteração da morfologia e da estrutura do filme depositado, por ser executado em altas temperaturas, podendo afetar a adesão de osteoblastos<sup>76,87</sup>.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram o recobrimento de materiais com uma substância bioativa por meio do processo biomimético<sup>4,5,9,23,25,29,41,49,55,61,63,100,114,130,133,137</sup>.

Neste sentido, este trabalho avaliou implantes endósseos de titânio com estrutura porosa, recobertos com hidroxiapatita por meio do processo biomimético.

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do processo biomimético deste trabalho foi baseada nos estudos prévios de Andrade et al.<sup>4</sup>. O pré-tratamento químico com NaOH 1M foi realizado em autoclave a 130<sup>0</sup>C/1 hora. Com este tratamento, o óxido de titânio da superfície é transformado em hidrogel de titanato de sódio. Após isto, foi feito o tratamento térmico a 200<sup>0</sup>C por mais uma hora, desta forma o gel foi desidratado e estabilizado sob a forma de titanato de sódio cristalino e rutilo. O objetivo do pré-tratamento foi produzir sobre a camada passiva do óxido de titânio uma superfície mais favorável e ativa para induzir a precipitação de apatita. Posteriormente as amostras foram imersas em FCSm por 14 dias onde ocorreu a nucleação e crescimento de uma camada de fosfato de Ca<sup>+2</sup> densa e homogênea, pelo consumo de Ca e P da solução.

Quanto aos métodos de análise foi empregado neste estudo o MEV, EDS e a espectroscopia Raman, para caracterização do

recobrimento obtido após o tratamento biomimético proposto.

O método de análise química utilizado neste estudo foi similar aos de outros trabalhos<sup>4,5,25,87</sup> que utilizaram o EDS como método de escolha para identificação dos elementos presentes na superfície dos implantes. Os espectros EDS do presente estudo revelaram picos de Ca, P e Ti, confirmando a presença de fosfato de cálcio na superfície do substrato.

O MEV foi o método escolhido para caracterizar a topografia da superfície dos implantes deste trabalho, por ser considerado um método de visualização direta das características de superfície das amostras, tendo-se a opção de se escolher o aumento mais adequado para cada imagem gerada. Este método tem sido utilizado pelos autores com a mesma finalidade<sup>4,5,9,23,25,41,44,56,87,130,133</sup>.

Os espectros Ramam detalhados mostram que o recobrimento da superfície do implante de titânio é composta por hidroxiapatita, identificada pelo maior pico de energia a  $960\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao modo de vibração simétrica do grupo P-O ( $\nu_1$ ), que também pôde ser verificado em outros estudos. A camada de apatita formada sobre as amostras após imersão em FCS pode ser identificada por outras três frequências diferentes correspondentes aos outros modos de ligações do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ): os picos que aparecem em torno de  $430 - 450\text{ cm}^{-1}$  que correspondem a união simétrica O-P-O ( $\nu_1$ ), os picos a  $580 - 630\text{ cm}^{-1}$  são da união assimétrica O-P-O ( $\nu_4$ ) e, por fim, o modo  $\nu_3$  observado em torno de  $1050\text{ cm}^{-1}$ , visíveis na camada de apatita formada *in vivo* ou *in vitro*<sup>100,108</sup>.

Neste estudo foram observados os picos de  $445,0\text{ cm}^{-1}$  e  $959,9\text{ cm}^{-1}$ , situados nos intervalos acima, e dois picos de  $579,4\text{ cm}^{-1}$  e  $1068,9\text{ cm}^{-1}$  muito próximos destes intervalos.

Gu et al.<sup>53</sup> encontrou os mesmos espectros em ligas de NiTi submetida ao tratamento térmico de  $600^\circ\text{C}$  e imersas em FCS por 28 dias.

O estudo de Notingher et al.<sup>100</sup> comparou por meio da espectroscopia Raman os picos de energia no interior dos poros e na superfície de amostras de vidro 58S imersas por 3 dias em FCS. Os espectros demonstraram que a HA não se desenvolveu uniformemente, sendo uma reação mais rápida na superfície externa e mais lenta na parede dos poros. Os autores também concluíram que a quantidade de hidroxiapatita em uma amostra pode ser estimada usando o pico característico a  $960\text{ cm}^{-1}$ .

A espectroscopia Raman provou, no presente estudo, ser uma técnica sensível para caracterização *in vitro* do recobrimento de HA em implantes com estruturas porosas, o que está de acordo com outros estudos<sup>100,108</sup>.

A caracterização do recobrimento pela espectroscopia Raman e EDS indicou que a camada de apatita formada com o tratamento biomimético foi similar ao osso natural em termos de composição química. Portanto, o tratamento biomimético proporcionou o recobrimento com uma camada de apatita semelhante à hidroxiapatita biológica.

Neste trabalho, todos os implantes inseridos osseointegraram, como se atestou pela força necessária para remoção dos implantes no ensaio de cisalhamento e pelo fato de que ao redor destes implantes, histologicamente, pôde ser observado contato direto do tecido ósseo na interface osso-implante e crescimento para o interior dos poros.

Por meio de microscopia de luz, foi visto tecido ósseo neoformado em contato direto com os implantes e no interior dos poros nos dois grupos e nos três tempos de sacrifício após a implantação na tibia dos coelhos. O resultado histológico indica boas respostas teciduais, pois houve o estabelecimento, na grande maioria dos cortes observados, do contato ósseo direto. Ainda, a neoformação óssea ocorreu para o interior dos poros e inclusive, em algumas lâminas, na superfície do



implante na região medular. Um outro resultado interessante é que também houve, em alguns casos, formação óssea cobrindo toda a região superior do implante, na região periosteal avaliada.

Neste estudo, implantes de titânio cilíndricos, sinterizados com estrutura porosa, obtida via metalurgia do pó, foram colocados bilateralmente na tíbia de coelhos (n=30), sendo implantes tratados na tíbia esquerda e não tratados na direita. Os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30 e 45 dias. A fração de neoformação óssea de acordo com os 3 tempos foi maior nos implantes tratados (37,45%; 37,91%; 38,37%, respectivamente) do que nos implantes não tratados (32,26%; 37,13%; 37,18%, respectivamente), dados estes avaliados pela análise histomorfométrica. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas entre os grupos teste e controle no período de 15 dias.

Houve aposição óssea na interface osso-implante e no interior dos poros de ambos os tipos de implantes. No entanto, verificou-se uma pequena tendência dos implantes do grupo teste de formarem maior quantidade de tecido ósseo, mas sem apresentar diferença estatisticamente significativa. Além disto, estes implantes teste resistiram com mais sucesso às forças de cisalhamento quando comparados aos implantes controle.

Concluimos que os resultados preliminares sugerem um aumento na osseointegração por meio do tratamento biomimético, principalmente em períodos curtos, o que abre a possibilidade da aplicação desse tratamento sobre implantes de titânio em geral inclusive com estrutura porosa.

A comparação com outros resultados, no entanto, é limitada pelo fato dos implantes de outros estudos aqui descritos não utilizarem a mesma metodologia, tanto para a confecção dos implantes quanto para o tratamento biomimético. Os trabalhos também diferem quanto ao modelo animal e ao período experimental.

Os poucos estudos *in vivo* que avaliaram a osseointegração de implantes porosos com recobrimento obtido por tratamento biomimético, apresentam resultados variados, semelhantes aos nossos, bem como resultados divergentes.

Chiesa et al.<sup>23</sup> desenvolveram um experimento com metodologia diferente, mas concluíram que o recobrimento obtido proporcionou maior crescimento ósseo e união osso-implante em períodos pós operatórios curtos do que em períodos longos, nos quais onde não foi observada diferença significativa, concordando com nossos resultados.

Com o uso de implantes comerciais recobertos pelo método biomimético e inseridos em tibia de 8 coelhos, Yan<sup>134</sup> avaliou a neoformação óssea nos períodos de 6, 10 e 25 semanas e observou diferenças significativas com relação ao teste mecânico e à porcentagem de neoformação óssea, sendo melhores no grupo com recobrimento, independente do intervalo de tempo.

Yang et al.<sup>135</sup> utilizaram implantes com superfície porosa com e sem recobrimento de fosfato de cálcio, porém, este foi obtido por meio de sol-gel. Os implantes foram inseridos em 16 coelhos, sacrificados após 2 semanas. Os autores encontraram diferenças significativas entre os grupos, com maior crescimento ósseo em determinadas regiões dos implantes com recobrimento.

Rigo et al.<sup>113</sup> utilizaram implantes de titânio em 8 coelhos por 8 semanas. Os implantes não foram detalhados quanto à topografia, mas foram submetidos ao tratamento biomimético modificado. Este estudo determinou apenas as características químicas da superfície e morfológicas da neoformação óssea, demonstrando que os implantes tratados foram recobertos por tecido ósseo, com poucas áreas de tecido fibroso.

Vasudev et al.<sup>129</sup> utilizaram um sistema de implante com diversos canais e com recobrimento obtido pelo processo biomimético,

comparando com aqueles sem recobrimento e inseridos no fêmur de 8 cães. Eles demonstraram que a porcentagem de crescimento e aposição óssea foi significativamente maior nos dispositivos tratados nos 3 tempos de sacrifício (6,8,12 semanas), concluindo que o recobrimento de apatita por meio do processo biomimético pode estimular o crescimento ósseo precoce e otimizar a fixação do implante ao osso.

Contrariando outros estudos, Costa<sup>29</sup> et al. demonstraram que os implantes recobertos com hidroxiapatita, obtida por meio de eletroforese e inseridos em tíbias de 8 coelhos, apresentaram resultados melhores e significativos em relação a implantes sem recobrimento, apenas na porcentagem de contato ósseo. Por outro lado, comparando a quantidade de osso formado não houve diferenças significativas entre os grupos, e ainda neste estudo os valores de porcentagem do grupo de implantes sem recobrimento foram numericamente maiores. Os autores sugerem que a eficácia do recobrimento com HA é restrita à área do implante em contato com o tecido sem qualquer efeito a longa distância.

O resultado histomorfométrico deste estudo foi melhor, em ambos os períodos avaliados, para os implantes submetidos ao tratamento biomimético. Apesar de melhores resultados para esta superfície, estatisticamente não houve diferenças na interação dos dois tipos de superfície e o tempo avaliado. Isto pode ser entendido, ao nosso ver, pelo fato de que algumas características da superfície do implante tais como composição e topografia são fundamentais e torna-se difícil diferenciar os efeitos individuais de cada fator. Inicialmente todos estes fatores influenciarão a reparação, determinando quais proteínas serão adsorvidas sobre a superfície do implante, assim como as células que sofrerão ou não adesão.

Neste sentido a presença de estrutura porosa, com poros interligados, por si só, parece ser osseocondutora, isto é, promove a migração de células osteoprogenitoras para sua superfície e aceleração da osteogênese, um fator decisivo para a osseointegração, com influência

pouco significativa do recobrimento.

O estudo de Carlsson et al.<sup>27</sup> comparou implantes com topografias semelhantes, mas quimicamente diferentes. Eles não encontraram diferença significativa na reação tecidual e na força de fixação entre implantes com e sem recobrimento e implantados em joelhos de humanos com artrite. Estes resultados confirmam a teoria que a topografia do implante pode ser mais importante para a osseointegração do que a composição química. Os resultados do estudo de Hacking et al.<sup>56</sup> que compara implantes rugosos com e sem recobrimento também reforça a hipótese que a topografia é fator dominante.

Outro questionamento sobre o recobrimento foi em relação a sua degradação demonstrada por alguns estudos *in vivo*, tornando a superfície osso-implante instável<sup>99</sup>. Como a estrutura porosa promoveu um verdadeiro efeito de ancoragem pelas interdigitações do tecido ósseo para o interior dos poros, a forte fixação manteve-se, mesmo com a dissolução do revestimento de hidroxiapatita, o que pode ter ocorrido no decorrer do estudo.

Apesar de ocorrer aumento na neoformação óssea ao longo do tempo, tanto no grupo tratado quando no grupo não tratado, a análise estatística intra-grupos experimentais mostrou que este aumento não foi estatisticamente significativo.

Os resultados histomorfométricos mostraram que nos implantes tratados a porcentagem média de tecido ósseo formado foi maior do que nos implantes não tratados. Houve maior quantidade de tecido ósseo na interface osso-implante e no interior dos poros dos implantes tratados, no período de 15 dias, com significância estatística em relação ao grupo de implantes não tratados no mesmo período. A análise estatística entre os grupos experimentais revela que a fração de tecido ósseo neoformado nos períodos de 30 e 45 dias permaneceu constante, sem diferença estatisticamente significativa.

Este resultado foi interessante devido à possibilidade de

existir uma redução do tempo de reparação quando o tratamento biomimético é empregado.

O teste mecânico de remoção por cisalhamento realizado neste estudo mostrou que implantes porosos tratados, nos três tempos experimentais 15, 30 e 45 dias, apresentaram valores médios da tensão de remoção de 7,3 MPa, 19,2 MPa e 19,48 MPa, respectivamente. Estes resultados foram maiores do que os dos implantes não tratados, cujos resultados foram, respectivamente, 6,36 MPa, 12,88 MPa e 15,65 MPa. Foi possível observar que houve um aumento da tensão de acordo com o tempo nos dois grupos, evidente entre os períodos de 30 e 45 dias, em ambos os tipos de implante.

Quanto ao tipo de implante foi observado que houve diferença estatisticamente significativa nos períodos de 30 e 45 dias, nos quais o grupo teste apresentou melhores resultados. Outros trabalhos na literatura também observaram valores similares aos deste estudo, uma vez que a resistência ao deslocamento foi maior nos implantes com recobrimento<sup>29,132,137,138</sup>.

É importante salientar que os resultados da neoformação óssea são influenciados pela anatomia do osso adjacente ao implante. Neste modelo usado – tíbia de coelho – o embricamento mecânico se deu pela colocação e estabilização dos implantes em tecido cortical. Nestas regiões, o contato direto favoreceu a neoformação óssea. O tratamento superficial, como o recobrimento com hidroxiapatita pelo tratamento biomimético proposto, pôde tornar o implante capaz de gerar estímulo à atividade óssea, ou seja, promoveu a proliferação celular na superfície do implante na região medular a partir do endóstio, que pôde ser observado em alguns cortes histológicos.

Os achados deste estudo levam à conclusão que os implantes com recobrimento tiveram melhor desempenho em relação à porcentagem de neoformação óssea que os implantes sem recobrimento. O processo biomimético parece ser uma alternativa simples e viável para

se obter recobrimentos osseocondutivos, como a hidroxiapatita, sobre superfícies porosas de titânio.

Em relação à porcentagem de neoformação óssea, nas condições experimentais deste estudo e com o tipo de implante utilizado evidenciou que houve diferença significativa apenas no período mais curto avaliado.

Finalmente, podemos concluir que a geometria da superfície é um importante fator para o processo osseocondutivo. O recobrimento influenciou a osseointegração apenas no período curto de tempo, na metodologia apresentada. Contudo, o recobrimento dos implantes parece ter influenciado de maneira significativa a força necessária para a remoção dos implantes, observada no ensaio mecânico de remoção.

## 7 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais empregadas, foi possível concluir que:

- a) independente do tipo de implante, com ou sem tratamento da superfície, houve osseointegração nos três tempos de sacrifício (15, 30 e 45 dias);
- b) no período de 15 dias, o grupo de implantes com superfície tratada apresentou os melhores resultados de neoformação óssea, estatisticamente diferentes, quando comparados aos implantes sem tratamento.
- c) implantes submetidos ao tratamento biomimético apresentaram maior resistência ao deslocamento do tecido ósseo do que os implantes apenas sinterizados, quando avaliados pelo ensaio mecânico de cisalhamento, independente do tempo de sacrifício.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- 1 Abe Y, Kobubo T, Yamamuro, T. Apatite coatings on ceramics, metals and polymers utilising a biological process. *J Mater Sci Mater Med*. 1990 Nov;1(4):233-8.
- 2 Albrektsson T, Hansson HA. An ultra structural characterization o the interface between bone and sputtered titanium o stainless steel surfaces. *Biomaterials*. 1986 May;(7):201-5.
- 3 Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
- 4 Andrade MC, Filgueiras MRT, Ogasawara T. Hydrothermal Nucleation of Hydroxyapatite on Titanium Surface. *J Eur Ceramic Soc*. 2002;22:505-10.
- 5 Andrade MC, Sader MS, Filgueiras MRT, Ogasawara T. Microstructure of ceramic coating on titanium surface as a tesult of hydrothermal treatment. *J Scien Mat Med*. 2000;11:751-5.
- 6 Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr.; 21(7):667-81.
- 7 Attaia YA, Fuerstenau DW. The equilibrium composition of hydroxiapatite and fluorapatite-water Interfaces. *Colloids and Surfaces*. 1988; 34(3):271-85.

---

\*Baseado em:

Internacional Comitê of medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requeriments for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar] Disponível em : [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requeriments.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requeriments.html)



- 8 Bagnò A, Bello CD. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:935-49.
- 9 Baker KC, Anderson MA, Oehlke SA, Astashikina AI, Haikio DC, Drelich J et al. Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata. *Mater Sci Eng.* 2006 Sept.;26:1351-60.
- 10 Barrabés M, Sevilla P, Planell JA, Gil FJ Mechanical properties of nickel-titanium foams for reconstructive orthopaedics. *Mater Sci Eng.* 2007 Jan.;28(1):23-7.
- 11 Barrère F, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2001 June;12(6):529-34.
- 12 Bobyn JD, Engh CA, Pilliar RM. Histological comparison of biological fixation and bone modeling with canine and human porous coated hip prostheses. In: American Society for Testing Materials: ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM, 1987. p.185-206.
- 13 Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone tissue. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 July-Aug; (150): 263 – 70.
- 14 Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992 Fall; 7(3):302-10.
- 15 Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 1996 Jan.;17(4):137-46.

- 16 Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco O. Osteoconduction on large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: Evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*. 1999 June; 24(6):579–89.
- 17 Braceras I, Alava JI, Onate JI, Brizuela M, Garcia-Luis A, Garagorri N et al. Improved osseointegration in ion implantation-treated dental implants. *Surf Coatings Technol*. 2002;158(9):28-32.
- 18 Bram M, Stiller C, Buchkremer HP, Stöver D, Baur H. High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts. *Adv Eng Mater*. 2000;2(4):196-9.
- 19 Bränemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sept.;50(3):399-410.
- 20 Brentel AS, Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLAG, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YR. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Oral Appl*. 2006;14(3):213-8.
- 21 Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988 winter; 3(4): 231-46.
- 22 Brunsky JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Jan/Feb.; 15(1):15-46.
- 23 Chiesa R, Giavaresi G, Fini M, Sandrini E, Giordano C, Bianchi A et al. In vitro and in vivo performance of a novel surface treatment to enhance osseointegration of endosseous implants. *Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103:745-56.
- 24 Cho AS, Jung SK. The removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*. 2003; 24:4859-63.

- 25 Chosa N, Taira M, Saitoh S, Sato N, Araki Y. Characterization of apatite formed on alkaline-heat-treated Ti, research reports. *J Dent Res*. 2004 June.; 83(6):465-9.
- 26 Chou YF, Chiou WA, Xu Y, Dunn JC, Wu BM. The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite. *Biomaterials*. 2004 Oct.; 25(22):5323-31.
- 27 Cook SD, Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL. The effect of demineralized bone matrix gel on bone ingrowth and fixation of porous implants. *J Arthroplasty*. 2002;17(4):402-8.
- 28 Cook SD, Rust-Dawicki AM. *In vivo* evaluation of a CSTi dental implant: a healing time course study. *Int J Oral Implantol*.1995; 21(3):182-90.
- 29 Costa CA, Sena LA, Pinto M, Muller CA, Cavalcanti JH. *In vivo* characterization of titanium implants coated with synthetic hydroxyapatite by electrophoresis. *Braz Dent J*. 2005;16:75-81.
- 30 Cranin AN, Tobin GP, Gelbman J. Application of hydroxyapatite in oral and maxillofacial surgery. Part II: Ridge augmentation and repair of major oral defects. *Compendium*. 1987 May;8(5):334–5.
- 31 Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and application. *J Appl Biomater*. 1991 Fall;2(3):187–208.
- 32 Denissen H, Montanari C, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A. Alveolar bone response to submerged biphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. *J Periodontol*. 2000 Feb.;71(2):279-86.
- 33 Denissen H, Martinetti R ,van Lingen A , Van den Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerger highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontal*. 2000 Feb.;71(2):272-8.
- 34 Deporter DA, Todescan R, Riley N. Porous-surfaced dental implants in the partially edentulous maxilla: assessment for subclinical mobility. *Int J Periodontics Restor Dent*. 2002 Apr;22(2):184-92.

- 35 Deporter D, Pilliar RM, Todescan R, Watson P, Pharoah M. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Sept/Oct.;16(5):653-8.
- 36 Deporter DA, Todescan R, Nardini K. Use of a tapered, porous-surfaced dental implant in combination with osteotomes to restore edentulism in the difficult maxilla. *Implant Dent*. 1999;8(3):2333-40.
- 37 Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J et al. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Dent Res*. 1986 Aug.;65(8):1064-70.
- 38 Eisenbarth E, Velten D, Breme J. Biomimetic implant coatings. *Biomol Eng*. 2007;24:27-32.
- 39 Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontology* 2000. 1998 Jun.;17:36-46.
- 40 Eriksson C, Börner K, Nygren H, Ohlson K, Bexell U, Billerdahl N, Johansson M. Studies by imaging TOF-SIMS of bone mineralization on porous titanium implants after 1 week in bone. *Appl Surf Sci*. 2006;252(19):6757-60.
- 41 Feng B, Chen JY, Qi SK, He L, Zhao JZ, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13:457-64.
- 42 Fergusson R. Use of a porous-surfaced implant system. *Dent Implantol Update*. 1999 Jan.;10(1):1-5.
- 43 Fini M, Savarino L, Aldini NN, Martini L, Giavaresi G, Rizzi G, et al. Biomechanical and histomorphometric investigations on two morphologically differing titanium surfaces with and without fluorhydroxyapatite coating: an experimental study in sheep tibiae. *Biomaterials*. 2003 Aug.;24:3183-92.

- 44 Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomater.* 2007;3:980-84.
- 45 Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res.* 2003 Mar.;21(2):213-23.
- 46 Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J al. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cell in porous titanium implants. *Cells Tis Org.* 2002;170(4):214-27.
- 47 Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials.* 2004 Feb.;25(3):443-50.
- 48 Garcia B J, Pérez P, Garcéz G, Adeva P. Microstructure and mechanical properties of Ni<sub>3</sub>Al base alloy reinforced with Cr particles produced by powder metallurgy. *Intermetallics.* 2006;14:456-63.
- 49 García C, Ceré S, Durán A. Bioactive coatings deposited on titanium alloys. *J Non-Crys Sol.* 2006; 352: 3488-95.
- 50 German RM. *Powder Metallurgy Science*, 2nd ed. Princeton: MPIF, 1994.
- 51 Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005 Nov.;36(Suppl 3): 520-27.
- 52 Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials.* 2003;24:1583-94.
- 53 Gu YW, Tay BY, Lim CS, Yong MS. Biomimetic deposition of apatite coating on surface-modified NITI alloy. *Biomaterials.* 2005;26:6916-23.

- 54 Guo, Y, Zhou Y, Jia D. Fabrication of hydroxycarbonate apatite coatings with hierarchically porous structures. *Acta Biomater.* 2008 Mar; 4(2):334-42.
- 55 Habibovic P, Van der Valk CM, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(4):373-80
- 56 Hacking SA, Tanzer M, Harvey EJ, Krygier JJ, Bobyn JD et al. Relative contributions of chemistry and topography to the osseointegration of hydroxyapatite coatings. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;405:24-38.
- 57 Hadrich A, Lautié A, Mhiri T. Vibrational study and fluorescence in the FT-Raman spectra of  $\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  compounds. *Spectrochimica Acta.* 2001; 57:1673-81.
- 58 Hallgren C, Reimers H, Gold J, Wennerberg A. The importance of surface texture for bone integration of screw shaped implants: an *in vivo* study of implants patterned by photolithography. *J Biomed Mater Res.* 2001 Dec.;57(4):485-96.
- 59 Helsen JA Retrieval Analysis. In: Helsen J A, Breme HJ. *Metals as biomaterials.* New York: John Wiley & Sons; 1998. cap.15. p.
- 60 Hench L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceramics Soc.* 1994;74:1487–1510.
- 61 Hu K, Yang X, Cai Y, Cui Z, Wei Q. Preparation of bone-like composite coating using a modified simulated body fluid with high Ca and P concentrations. *Surf Coat Technol.* 2006.
- 62 Ilan DI, Ladd A L. Bone Graft Substitutes. *Oper Techn Plastic Recons Surg.* 2003; 9(4):151-60.
- 63 Jonášová L, Máller FA, Helebrant A, Strnad J, Greil P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials.* 2004 Mar./Apr.;25(7-8):1187-94.

- 64 Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surg Sci Rep.* 2001May;42(3-5):75-205.
- 65 Knabe C, Klar F, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. *In vitro* investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surfaces using a rat bone marrow stromal cell culture system. *Biomaterials.* 2002 August; 23(15):3235-45.
- 66 Karabatsos B, Myerthall SL, Fornasier VL, Binnington A, Maistrelli GL. Osseointegration of hydroxyapatite porous-coated femoral implants in a canine model. *Clin Orthop.* 2001 Nov.;1(393):442-9.
- 67 Karabuda C, Sandalli P, Yalcin S, Steflik DE, Parr GR. Histologic and histomorphometric comparison of immediately placed hydroxyapatite-coated and titanium plasma-sprayed implants: a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 July/Aug.;14(4):510-5.
- 68 Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988 Winter; 3(4):247-59.
- 69 Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent.* 1983 June;49(6):832-7.
- 70 Keller JC, Young Junior FA. Histomorphometric analysis of bone ingrowth into porous-coated dental implants. In: American Society for Testing Materials: ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987. p.219-32.
- 71 Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec.;52(3):553-7.
- 72 Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. *Biomaterials.* 2006;27:2907-15.
- 73 Kokubo T. Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Mater Sci Eng.* 2005 Apr.;25(2):97-104.

- 74 Kokubo T, Kim H-M, Miyaji F, Takadama H, Miyazaki T. Ceramic–metal and ceramic–polymer composites prepared by a biomimetic process. *Composites Part A: Appl Sci Manufacturing*. 1999 April; 30(4):405-9.
- 75 Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater*. 1998 April;46(7):2519-27.
- 76 Kokubo T, Miyaji F, Kim HM. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. *J Am Ceram Soc*. 1996;79(4):1127-9.
- 77 Kokubo T. Bioactive glass cerâmíc: properties and applications. *Biomaterials*. 1991;12(2):155-63.
- 78 Kujala S, Ryhanen J, Danilov A, Tuukkanen J. Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials*. 2003 Nov.;24(25):4691-7.
- 79 Kusakabe H, Sakamaki T, Nihei K, Oyama Y, Yanagimoto S, Ichimiya M, et al. Osseointegration of a hidroxyapatite-coated multilayered mesh stem. *Biomaterials*. 2004 July;25(15):2957-69.
- 80 Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg*. 1984 June; 73(6):933–8.
- 81 Lee TM, Tsai RS, Chang E, Yang CY, Yang MR. The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma-sprayed HA coating: Effect of surface roughness and serum contents. *J Mater Sci Mater Med*. 2002; 13:341-50.
- 82 LeGeros, RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*. 2002 Feb.;395:81-98.
- 83 LeGeros RZ. CaP in plasma-sprayed HA coatings. *Ceramic Trans*. 1995;48:173–89.



- 84 Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*. 2004 June; 25(14):2867-75
- 85 Li F, Feng QL, Cui HD, Schubert H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surf Coat Tech*. 2002;154:88-93.
- 86 Li Y, Rong L, Li Y. Pore characteristics of porous NiTi alloy fabricated by combustion synthesis. *J Alloy Comp*. 2001 July; 325(1-2):259-62.
- 87 Liang F, Zhou L, Wang K. Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment. *Surf Coat Tech*. 2003 Sept.; 165:133-9.
- 88 Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clin Oral Impl Res*. 1999;2:1-19.
- 89 Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng*. 2004 Jan.;47:49-121.
- 90 Liu YL, Schoenaers J, De Groot K, De Wijn JR, Schepers E. Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep. *J Mater Sci Mater Med*. 2000 Nov.; 11:711-7.
- 91 Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16(5):627-36.
- 92 Machnee CH, Wagner WC, Jaarda MJ, Lang BR. Identification of oxide layers of commercially pure titanium in response to cleaning procedures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(4):529-33.
- 93 Momose DR Estudo da biocompatibilidade da liga Ti-6Al-7Nb e titânio de grau 2 em tibia de coelhos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2003.
- 94 Montanaro L, Arciola CR, Campoccia D, Cervellati M. *In vitro* effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-

- differing fluorohydroxyapatite coated titanium alloys. *Biomaterials*. 2002 Sept.;23(7):3651-9.
- 95 Moroni A, Faldini C, Chil AV, Rocca M, Stea S, Giannini S. The effect of surface material and roughness on bone screw stability. *J Orthop Trauma*. 1999 Sept./Oct.;13(7):477-82.
- 96 Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. *Biomaterials*. 2004 Feb.;25(5):865-76.
- 97 Ninomi, M. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metal Mater Trans*. 2002;33:447-85.
- 98 Nishiguchi S, Kato H, Neo M, Oka M, Kim HM, Kokubo T. Alkali and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res*. 2001 Feb.;54(2):198-208.
- 99 Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*. 1999 Mar.;20(5):491-500.
- 100 Nothinger I, Boccaccini AR, Jones J, Marquet V, Hench LL. Application of Raman microspectroscopy to the characterization of bioactive materials. *Mater Character*. 2003;49:255-60
- 101 Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyasaki T. Coatings bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:33-8.
- 102 Oliveira M.V. Desenvolvimento de revestimento poroso de titânio para implantes cirúrgicos [tese] Rio de Janeiro: Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2003.
- 103 Oliveira MV, Pereira LC, Cairo CAA. Porous structure characterization in titanium coating for surgical implants. *Mater Res*. 2002;5(3):269-73.
- 104 Oliveira MV, Pereira LC, Cairo CAA. Titanium porous coating for surgical implants processes by powder metallurgy. *Anais do Int*

- Conference on adv in mater and processing technol; 2001. Madrid v.3 p.1457-62.
- 105 Ong JL, Lucas LC. Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*. 1998 Mar.;19(4-5):455-64.
  - 106 Osborn JF, Newesely H. The material science of CaP ceramic. *Biomaterials*. 1980 Apr.;1(2):108–11.
  - 107 Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2006 Dec.;27(35):5892-900.
  - 108 Penel G, Delfosse C, Descamps M, Lemy G. Composition of bone apatite biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone*. 2005;36:893-901.
  - 109 Peng P, Kumar S, Voelcker NH, Szili E, Smart RS, Griesser HJ Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid. *J Biomed Mater Res*. 2006;76(A):347-55.
  - 110 Pilliar, D A. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implants Dent*. 1998;7(4):305-12.
  - 111 Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Pharoah M, Chipman M, Valiquette N. The effect of partial coating with hydroxyapatite on bone remodeling in relation to porous-coated titanium-alloy dental implants in dog. *J Dent Res*. 1991 Oct.;70(10):1338-45.
  - 112 Piveteau LD, Girona MI, Schlapbach L. Thin films of calcium phosphate and titanium dioxide by a sol gel route: a new method for coating medical implanes. *J Mater Sci Mater Med*. 1999;10:161-7.

- 113 Rigo ECS, Boschi, AO, Yoshimoto M, Allegrini Jr, Konig Jr, Carbonari MJ. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Mater Sci Eng.* 2004; 24:647-51.
- 114 Scharnweber D, Beutner R, Rassler S, Worch H. Electrochemical behavior of titanium-based materials – are there relations to biocompatibility? *J Mater Sci Mater Med.* 2002;13:1215-20.
- 115 Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000,1998 June;17:22-35.
- 116 Schroeder A. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with plasma-sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg.* 1981 Feb.;9(1):15-25.
- 117 Sepulveda P, Bressiani AH, Bressiani JC, Meseguer L, Kanig B Jr *In vivo* evaluation of hydroxyapatite foams. *J Biomed Mater Res.* 2002 Dec.;62(4):587-92.
- 118 Steinemann, SG. Titanium: the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 June;17:7-21.
- 119 Stoch A, Jastrzebski A, Stoch J, Szaraniec J, Trybalska B, Kmita G. FTIR absorption-reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. *J Molecular Structure.* 2006 Jan.;555:375-82.
- 120 Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials.* 2002 Jan.;23(2):491-501.
- 121 Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh WR. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res.* 2000 July;51(1):15-22.
- 122 Sykaras N., Yakopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implants materials, designs and surface topographies: their effect on

- osseointegration: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000. sept./Oct;15(5):675-90.
- 123 Takemoto M, Fujibayashy S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Akamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous biactive titanium. *Biomaterials*. 2005;26:6014-23.
- 124 Tavares MG, Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Impl Res*. 2007;18:452-8.
- 125 Thelen S, Barthelat F, Brinson LC. Mechanics considerations for microporous titanium as an orthopedic implant material. *J Biomed Mater Res*. 2004 Apr.;69(A):601-10.
- 126 Uchida M, Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nakamura T. Effect of water treatment on the apatite-forming ability induced by NaOH treatment. *J Biomed Mater Res*. 2002;63:522-30.
- 127 Vanzillotta PS, Sader MS, Bastos IN, Soares GA. Improvement of *in vitro* titanium bioactivity by three different surface treatments. *Dental Materials*. 2006;22:275-82.
- 128 Vasconcellos LMR. Implantes de titânio puro grau 2: osseointegração em tíbias de coelhos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.
- 129 Vasudev DV, Ricci JL, Sabatino C, Li P, Parsons JR *In vivo* evaluation of a biomimetic apatite coating grown on titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2004;69:629-36.
- 130 Vercik LCO, Assis CM, Fook MV, Santos ML, Guastaldi AC. Recobrimento de apatitas *in vitro* sobre titânio – influência do tratamento térmico. *Ect Quim*. 2003;28(1):25-31.
- 131 Vidigal Júnior GM, Aragonés LC, Campos Júnior A, Groisman M Histomorphometric analyses of hidroxyapatite-coated and uncoated

- titanium dental implants in rabbits cortical bone. *Implant Dent.* 1999; 8(3):295-302.
- 132 Wen CE, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scripta Materialia.* 2001;45(10):1147-53
- 133 Wen HB, Wolke JGC, Wijn JR, Liu Q, Cui FZ. Fast precipitation on calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. *Biomaterials.* 1997;18:1471-8.
- 134 Yan WQ, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T Bonding of chemically treated titanium implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 1997 Nov.;37(2):267-75.
- 135 Yang C. Effect of calcium phosphate surface coating on bone ingrowth onto porous-surfaced titanium alloy implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:422-5.
- 136 Yang YZ, Tian JM, Tian JT, Chen ZQ, Deng XJ, Zhang DH. Preparation of graded porous titanium coatings on titanium implant materials by plasma spraying. *J Biomed Mater Res.* 2000;52:333-7.
- 137 Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron.* 2005 Sept.;36(7-8):583-92.
- 138 Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron-and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs.* 2004;178(1):13-22.
- 139 Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials.* 2005 May;26:1837-47.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.

## Apêndice A - Dados da porcentagem de neofomação óssea

Quadro 5 – Valores médios da porcentagem de neofomação óssea em 18 coelhos, de acordo com os grupos (teste e controle) para cada período de sacrifício.

<b>Quantidade</b>	<b>Dados</b>	<b>Tempo(dias)</b>	<b>Grupos</b>
1	35.52	15	Teste
2	35.47	15	Teste
3	35.41	15	Teste
4	39.00	15	Teste
5	40.58	15	Teste
6	38.74	15	Teste
7	31.42	15	Controle
8	31.02	15	Controle
9	28.33	15	Controle
10	38.00	15	Controle
11	32.34	15	Controle
12	32.47	15	Controle
13	39.49	30	Teste
14	29.94	30	Teste
15	35.80	30	Teste
16	37.02	30	Teste
17	38.53	30	Teste
18	46.66	30	Teste
19	35.83	30	Controle
20	43.24	30	Controle
21	34.40	30	Controle
22	37.80	30	Controle
23	33.20	30	Controle
24	38.33	30	Controle
25	34.16	45	Teste
26	32.16	45	Teste
27	33.24	45	Teste
28	39.88	45	Teste
29	48.20	45	Teste
30	42.60	45	Teste
31	31.41	45	Controle
32	41.50	45	Controle
33	31.25	45	Controle
34	33.33	45	Controle
35	45.80	45	Controle
36	39.80	45	Controle



## Apêndice B - Dados do ensaio de cisalhamento

Quadro 6 – Valores médios da tensão (MPa) em 18 implantes, de acordo com os grupos (teste e controle) para cada período de sacrifício

<b>Quantidade</b>	<b>Dados</b>	<b>Tempo(dias)</b>	<b>Grupos</b>
1	8,95	15	Teste
2	7,66	15	Teste
3	9,19	15	Teste
4	5,1	15	Teste
5	5,91	15	Teste
6	6,99	15	Teste
7	5,42	15	Controle
8	9,03	15	Controle
9	6,13	15	Controle
10	11,74	15	Controle
11	3,15	15	Controle
12	2,7	15	Controle
13	22,59	30	Teste
14	21,6	30	Teste
15	17,16	30	Teste
16	16,84	30	Teste
17	21,27	30	Teste
18	15,97	30	Teste
19	9,7	30	Controle
20	15,27	30	Controle
21	11,91	30	Controle
22	15,11	30	Controle
23	14,84	30	Controle
24	10,47	30	Controle
25	18,8	45	Teste
26	16,86	45	Teste
27	25,21	45	Teste
28	15,74	45	Teste
29	20,14	45	Teste
30	20,11	45	Teste
31	22,7	45	Controle
32	21,8	45	Controle
33	14,8	45	Controle
34	7,72	45	Controle
35	10,3	45	Controle
36	16,6	45	Controle

MACHADO, ACP. In vivo biocompatibility of titanium implants submitted to biomimetic process [thesis] – São José dos Campos: São José dos Campos Dental School, São Paulo State University; 2008.

### **ABSTRACT**

*The purpose of this study is to define the coating on porous titanium implants submitted to modified biomimetic process and to evaluate bone neoformation inside the porous and around these implants when inserted in tibiae of rabbits. One hundred and eighty pure titanium implants, fabricated by powder metallurgy, were made. Ninety implants were pretreated with NaOH solution at 130°C/1h and submitted to the temperature of 200°C/1h and immersed in modified simulated body fluid for 14 days. The implants were inserted in 30 rabbits; each rabbit received 3 treated implants in the left tibia and 3 untreated implants in the right tibia. The animals were sacrificed after 15, 30, and 45 days of surgery and the tibia fragments containing the implants were submitted to histological and histomorphometric analyses and shear strength test. The microstructure analysis of the samples was performed by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive spectrometry (EDS) and Raman spectroscopy; the bone neoformation was evaluated by light microscopy (MO) and SEM comparing only sinterized implants with those submitted to biomimetic treatment. The EDS indicated that the implant surface after biomimetic treatment contained mainly calcium (Ca) and phosphorous (P) in addition to the presence of titanium. The Raman spectroscopy of the titanium implant, after biomimetic treatment, indicated the formation of a hydroxyapatite layer due to the characteristic peak and of great magnitude at  $960\text{cm}^{-1}$ . The MO and SEM images showed bone neoformation on the interface bone-implant and inside the porous, including the most internal ones. It was observed that the mean percentage of bone neoformation in the treated implants for the three sacrifice periods were higher than the untreated implants, statistically significant for the 15-day period. The mechanical test showed that the coated implants were dislodged with higher tension than the implants without coatings, this difference was significant. Therefore, it can be concluded that the biomimetic treatment induced the formation of hydroxyapatite on the implant surfaces and in relation to osseointegration, they presented better performance than the implants without coating.*

*Key-words: titanium implant; porosity; biomimetic coatings; osseointegration.*