

UNESP
Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá

Guaratinguetá
2013

LUCIANA MARIA FERREIRA CARVALHO

AVALIAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS DA LIGA EXPERIMENTAL
Ti-30Ta APÓS TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE BIOMIMÉTICO E
IMOBILIZAÇÃO COM BISFOSFONATO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia do Campus de Guaratinguetá,
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende

Guaratinguetá
2013

C331a Carvalho, Luciana Maria Ferreira
Avaliação de implantes dentários da liga experimental Ti-30Ta após tratamento de superfície biomimético e imobilização com bisfosfonato / Luciana Maria Ferreira Carvalho – Guaratinguetá : [s.n], 2013.
69 f : il.
Bibliografia: f. 64-69

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2013.
Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro
Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Cristina Rosifini Alves Rezende

1. Ligas de titânio 2. Implantes dentários I. Título

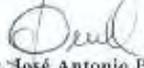
CDU 669.295(043)

LUCIANA MARIA FERREIRA CARVALHO

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
"MESTRE EM CIÊNCIAS"

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. José Antonio Perrella Balestieri
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientador / Unesp-FEG


Prof. Dr. MONICA BEATRIZ MATHOR
IPEN


Prof. Dr. ESTEVÃO TOMOMITSU KIMPARA
Unesp/FOSJC

Abril de 2013

DADOS CURRICULARES

LUCIANA MARIA FERREIRA CARVALHO

NASCIMENTO 30.05.1986 – GUARATINGUETÁ / SP

FILIAÇÃO José Roberto Guimarães Carvalho
Maria Luci Ferreira Carvalho

2007/2010 Curso de Graduação em Odontologia –
Faculdade de Odontologia de Ribeirão
Preto, da Universidade de São Paulo
USP.

DEDICATÓRIA

À memória do meu pai, José Roberto, meu fiel anjo da guarda.

“Lembro-me do teu olhar, do teu sorriso. Dos teus passos, da tua mão amparando-me quando caía, das tuas lágrimas lamentando quando perdia. Mas lembro-me, principalmente, do teu sorriso, do brilho de satisfação que percorria tua face e também do som das tuas palavras aclamando-me quando vencia. Venci. Por mim. Por ti. Hoje não estás aqui para me aplaudir, mas estarás com certeza a cada instante em meu pensamento, sentindo comigo a minha alegria. Terminei mais uma batalha, não a primeira, nem a última, apenas mais uma”.

AGRADECIMENTO(S)

À *Deus*, obrigada senhor, pelo dom precioso da vida. Esta vida que generosamente nos destes e pela qual nos sentimos responsáveis. Obrigada pela saúde, pelos amigos e por, através dos obstáculos, mostrar-me o potencial, a força e a fé existente em mim. Obrigada por essa etapa vencida.

À minha mãe, Maria Luci, por sua imensa dedicação, por viver e dividir comigo todas as minhas angústias, frustrações e alegrias. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos em que o chão me faltou aos pés. Minha eterna gratidão e respeito.

Ao meu irmão, Fábio, de quem muito me orgulha de ser irmã, pelo amor transmitido, pelas palavras de incentivo. Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio.

Ao meu namorado, Leandro, pelos momentos de compreensão, por compartilhar minhas idéias, incentivando-me a prosseguir, não importando os obstáculos. Obrigada por seu amor e carinho.

Ao Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia campus de Guaratinguetá – UNESP, especialmente à minha orientadora Prof. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro, ser mestre é ser instrutor, amigo, guia e companheiro. Receba meu carinho e gratidão a você que além de transmitir seus conhecimentos, transmitiu sua experiência e me apoiou nas minhas dificuldades.

À minha coorientadora Prof. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, da Faculdade de Odontologia campus de Araçatuba – UNESP, pelo carinho transmitido e grande auxílio na manipulação cirúrgica dos animais.

Ao Dr. João Augusto Guedes de Oliveira, pela manipulação cirúrgica dos animais.

Ao Prof. Dr. Luiz Rogério de Oliveira Hein da Faculdade de Engenharia campus de Guaratinguetá – UNESP, pela realização das análises no MEV. E a sua aluna de doutorado Kamila Amato de Campos pela realização das análises no AFM, indispensáveis para este estudo.

Aos funcionários da seção de Pós – Graduação da FEG/UNESP, Regina Célia Galvão Faria Alves, Maria Cristina Silva de Oliva, Sidney Eustáquio Ramos Rabelo, Juliana Casella, pela ajuda nas questões burocráticas exigidas pelo curso.

Aos amigos de Pós-graduação, especialmente, ao Reginaldo pelo grande auxílio nas análises, Ana Lúcia, Marisa, Gilda e Maria Isabel, pelos momentos de convivência, por compartilhar suas experiências, pela amizade e incentivo.

À FAPESP, pelo suporte financeiro na forma de bolsa de mestrado.

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém. Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê".

Arthur Schopenhauer

Este trabalho contou com o apoio da FAPESP processo 2011/05173-5

CARVALHO, L.M.F. Avaliação de implantes dentários da liga experimental Ti-30Ta após tratamento de superfície biomimético e imobilização com bisfosfonato. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2013.

RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a superfície da liga experimental Ti-30Ta após tratamento. A técnica empregada foi o tratamento de superfície biomimético com incorporação de alendronato de sódio. Os lingotes da liga Ti-30Ta foram obtidos em forno a arco voltaico, seguido de tratamento térmico e forjados a frio. O tratamento de superfície foi dividido em duas etapas: primeiramente foi realizado o tratamento de superfície biomimético com imersão em SBF 5x (Simulated Body Fluid) durante 24 horas. Em seguida as amostras foram imersas em solução formada por SBF 5x e alendronato de sódio por uma semana. Difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e ângulo de contato foram utilizados para análise de superfície. Para análise da osseointegração, os implantes foram colocados no fêmur de ratos e a análise histológica realizada após 30 dias. Os resultados mostraram uma melhora na osseointegração devido à incorporação de alendronato de sódio ao revestimento de apatita.

PALAVRAS-CHAVE: ligas de titânio, implantes dentários, alendronato de sódio.

CARVALHO, L.M.F. **Evaluation of dental implants of Ti-30Ta alloy after biomimetic surface treatment and bisphosphonate immobilization.** 2013. Dissertation (Master in Mechanical Engineering) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2013.

ABSTRACT

In this study, the surface of Ti-30Ta experimental alloy was evaluated after treatment. Biomimetic surface treatment with sodium alendronate incorporation was technique employed. Ingots of Ti-30Ta alloy were obtained in arc melting furnace, followed heat treatment and cold work by swaging. Surface treatment was divided into two steps: first was realized Biomimetic surface treatment with immersion in SBF 5x (simulated body fluid) for 24 hours. Followed samples were immersed in solution formed by SBF 5x plus sodium alendronate for one week. X- rays, SEM, AFM and contact angle were used for surface analysis. For analysis of osseointegration, the implants were implanted in the rat's femur and histological analysis was realized after 30 days. The results showed improved of osseointegration due to the incorporation of sodium alendronate in the apatite coating.

KEYWORDS: Titanium alloy, dental implants, sodium alendronate.

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química do pirofosfato e bisfosfonato (Adaptado de FLEISH, 1998).	22
Figura 2	Apresentação esquemática do mecanismo de ação dos bisfosfonatos (Modificado de RODAN e FLEISCH, 1996)	24
Figura 3	Estrutura química do alendronato de sódio comparada ao bisfosfonato, onde ocorre a substituição dos radicais livres R^1 e R^2 (adaptado de BOSE e TARAFDER, 2012).	25
Figura 4	Esquema de revestimento biomimético: a) revestimento biomimético simples de cálcio amorfo deficiente de apatita carbonatada para o SBF, b) co-precipitação biomimética de fármaco/fator de crescimento (adaptado de BOSE e TARAFDER, 2012).	31
Figura 5	Fluxograma da metodologia que foi empregada nesse projeto	33
Figura 6	Sequência empregada para a fusão da liga: a) forno para fusão da liga b) colocação dos materiais no cadinho para fundição c) obtenção do lingote d) amostra após encapsulamento	34
Figura 7	Forno tipo mufla utilizado para o tratamento térmico das amostras após tratamento alcalino. Destaque para amostras dentro do forno	36
Figura 8	Representação esquemática da metodologia empregada para incorporação de medicamento no Grupo I	37
Figura 9	Representação esquemática da metodologia empregada para incorporação de medicamento no Grupo II	38
Figura 10	Microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30 FEG	39
Figura 11	Difratômetro de raios X	41
Figura 12	Sequência empregada para tratamento de superfície dos implantes	43
Figura 13	Representação dos grupos utilizados no trabalho	44

Figura 14	Sequência empregada para instalação dos implantes: A) montagem da mesa cirúrgica; B) motor cirúrgico; C) aplicação do anestésico; D) tricotomia; E) assepsia; F) afastamento do tecido; G) colocação dos implantes no fêmur dos animais; H) implante instalado.	46
Figura 15	Micrografias da superfície da liga Ti-30Ta: (a) controle; (b) após tratamento de superfície alcalino seguido de tratamento térmico a 300°C.	49
Figura 16	Análise por difração de raios X para as condições: controle, NaOH, NaOH + HT.	50
Figura 17	Micrografia da superfície das amostras após imersão por 24 horas em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio.	51
Figura 18	Micrografia da superfície das amostras imersas em solução SBF 5x por 24 horas mais imersão em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio por 7 dias.	52
Figura 19	Análise por difração de raios X para as condições: controle, SBF, Alendronato 7 dias e Alendronato 24horas.	54
Figura 20	Imagens obtidas em microscópio eletrônico de força atômica (AFM) da liga Ti-30Ta: a) Amostra lixada; b) Amostra após tratamento alcalino; c) Amostra após tratamento alcalino e tratamento térmico e d) SBF.	56
Figura 21	Imagens obtidas em microscópio eletrônico de força atômica (AFM) da liga Ti-30Ta: a) Alendronato – 24 horas e b) Alendronato- 7 dias.	57
Figura 22	Interface Osso/implante: (a) grupo controle (sem tratamento de superfície) após trinta dias; (b) Após tratamento de superfície biomimético; (c) Após incorporação de alendronato de sódio por 7 dias	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos biomateriais baseada na sua interação com o meio biológico (GEETHA <i>et al.</i> ; 2009).	19
Quadro 2	Concentrações iônicas do Plasma Humano, SBF-convencional, SBF-A e SBF-B (Habibovic et al. 2002).	27
Quadro 3	Concentrações iônicas de SBFs em comparação com o plasma sanguíneo humano total e dissociado (Oyane et al. 2003).	29
Quadro 4	Composição do SBF 5x (Simulated Body Fluid)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de rugosidade média (Ra)	57
Tabela 2	Valores de ângulos de contato	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5	CONCLUSÕES.....	63
6	REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O sucesso clínico dos implantes dentários está diretamente relacionado com a integração osso-implante. Após inserção do implante duas respostas biológicas podem ocorrer. O primeiro tipo com a formação de uma cápsula de tecido fibroso ao redor do implante, o qual não ira assegurar uma boa fixação mecânica ocasionando a falha da implantação. O segundo tipo está relacionado com o contato direto osso-implante, sem a presença dessa camada de tecido conjuntivo fibroso, denominado osseointegração (LE GUÉHENNE et al., 2007).

O evento quase imediato que ocorre após a implantação é a adsorção de proteínas, provenientes do sangue e de líquidos teciduais do local da ferida e, posteriormente se inicia a atividade óssea celular na região implantada. Uma vez sobre a superfície, as proteínas podem ser retiradas ou permanecer interagindo na interface osso/implante. A resposta do hospedeiro ao implante colocado no osso e o desempenho do material nesse meio serão fatores decisivos para o sucesso da osseointegração (PULEO e NANCI, 1999).

Biomateriais metálicos são empregados na confecção de próteses para o reparo de tecidos duros devido as suas propriedades mecânicas.

O emprego de titânio e suas ligas para aplicações biomédicas foi alvo de diversos estudos nos últimos anos uma vez que comparados a outros materiais metálicos apresentam devido as suas excelentes propriedades como baixo peso, excelente resistência à corrosão e boa relação resistência/peso (ZHENG et al., 2007; BRAMA et al., 2007; EISENBARTH et al., 2004; LIU et al., 2004; OH et al., 2005; RACK et al., 2006; WATANABE et al., 2004; ZHOU et al., 2009). No entanto, esses materiais são considerados bioinertes, ou seja, eles não se unem quimicamente ao tecido vivo e dessa forma sua fixação não é estável por um longo período (FUKUDA et al. 2011).

Dessa forma, como a natureza da superfície do biomaterial esta relacionada com a resposta do hospedeiro, a modificação das propriedades de superfície é uma alternativa viável. Com o tratamento de superfície, é possível modificar as características dos implantes dentários, tais como a composição química, a morfologia, a topografia e a rugosidade (RUPP et al., 2006).

Estudos relatam diferentes modificações na superfície do titânio para obter implantes com maior capacidade de interação óssea. Diversas técnicas, como oxidação anódica, oxidação térmica, tratamento químico, sol-gel, deposição de feixe acrescido de íon (IBED) e tratamento de superfície biomimético foram relatadas como capazes de promover uma melhor resposta dos biomateriais com relação ao tecido hospedeiro (LIN e YEN, 2006).

O emprego de revestimentos bioativos de fosfato de cálcio é uma tendência para essas aplicações por proporcionar melhor resposta biológica devido a sua afinidade com a hidroxiapatita presente no tecido ósseo.

O método biomimético foi preconizado por Habibovic et al. (2002) e associa a técnica de tratamento alcalino desenvolvida na década de 90 por Kim et al. (1996) ao emprego do fluido corpóreo simulado (SBF - Simulated Body Fluid). Por meio dessa técnica é possível a formação de nanocristais de apatita semelhante à biológica sobre a superfície de implantes.

Outra técnica que vem sendo recentemente estudada é o emprego de fármacos osteocondutores na superfície de implantes (ZHOU et al., 2012). Grupos fosfatos possuem forte afinidade com cristais de cálcio tais como hidroxiapatita. Estudos prévios foram realizados pelo nosso grupo com a liga Ti-7,5Mo sendo realizada a incorporação com alendronato de sódio após tratamento de superfície biomimético (ESCADA et al. 2010).

Os bisfosfonatos (BFs) constituem potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Essas drogas são efetivas na redução do cálcio sérico em pacientes com hipercalcemia maligna, assim como também no tratamento da dor óssea, osteoporose e metástases ósseas. *In vivo*, os BFs se ligam fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea e atuam preferencialmente em sítios de grande formação e reabsorção ósseas (VASCONCELOS et al.; 2004)

O alendronato se liga aos cristais de hidroxiapatita presentes no tecido ósseo e se une, preferencialmente, às superfícies ósseas reabsorvidas, em especial aquelas que estão sofrendo atividade de reabsorção osteoclástica (SATO et al.,1991).

A adição de alendronato de sódio em cimentos de fosfato de cálcio pode afetar significativamente a proliferação e diferenciação dos osteoclastos e a diferenciação dos osteoblastos, sendo adequadamente modulada por meio da variação na composição do cimento (PANZAVOLTA et al.; 2010).

Diante do exposto, o uso do alendronato de sódio associado ao revestimento biomimético como técnica de modificação de superfície em ligas de titânio se torna uma alternativa viável no desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas.

1.1 OBJETIVOS

Essa pesquisa tem como objetivo principal associar o tratamento de superfície biomimético com a incorporação de alendronato de sódio para obtenção de superfícies osteocondutoras na liga experimental Ti-30Ta.

A maior meta é estabelecer um protocolo para a fabricação de implantes que possa ser viabilizado e no futuro aplicado à pacientes minimizando o desconforto proporcionado pela demora no processo de osseointegração.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta por cinco capítulos e pelas referências bibliográficas, e seu conteúdo apresenta-se distribuído da seguinte forma:

Capítulo 1- Introdução: expõe aspectos gerais sobre a dissertação, proposta do trabalho, objetivos e a estrutura da dissertação.

Capítulo 2- Revisão da Literatura: considerações gerais, tratamento de superfície- incorporação de alendronato de sódio à superfície de biomateriais.

Capítulo 3- Materiais e Métodos: obtenção das amostras, modificação de superfície, caracterização da superfície, confecção dos implantes, estudo in vivo - cirurgia e instalação dos implantes.

Capítulo 4- Resultados e Discussões: apresentação dos resultados alcançados nos experimentos realizados no trabalho e discussão a partir de pesquisas desenvolvidas por outros autores.

Capítulo 5- Conclusões: são expostas as principais conclusões obtidas através da realização desta pesquisa.

Referências.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O conceito de osseointegração foi estabelecido inicialmente por Brånemark et al. (1969) e é definido como uma ligação estrutural e funcional direta entre o tecido ósseo e a superfície de um implante submetido ao carregamento. Desde então, tem se intensificado as pesquisas para a melhoria das características da interface osso/implante, com o objetivo de acelerar o processo de cicatrização óssea e melhorar a fixação do implante ao osso.

A osseointegração foi considerada como sendo resultado de uma resposta do organismo a um corpo estranho. A perda patológica da osseointegração, chamada de periimplantite, geralmente pode estar associada a quatro fatores: lesões peri-implantar, presença de bactérias agressivas, estresse mecânico excessivo e corrosão. Basta um desses fatores se iniciarem, que desencadeará uma reação em cadeia, promovendo o enfraquecimento da interface osso/implante e o insucesso da osseointegração (MOUYI et al.; 2012).

A forma do implante também é um fator importante a ser considerado para a substituição do tecido duro, pois havendo concentração de tensão, o fenômeno de reabsorção do osso natural pode ocorrer, ocasionando a falha da implantação (RACK e QAZI, 2006).

Ehrenfest et al. (2010), propuseram um sistema de classificação baseado em ferramentas padronizadas de análise e terminologia bem definida, para caracterização de superfície de implantes osseointegrados. Esta abordagem permite melhorar e aprofundar o conhecimento sobre a superfície dos implantes, descrevendo a composição química e as características físicas da superfície, sendo um passo significativo para o estabelecimento de uma ligação clara entre as características de superfície dos implantes e as respostas biológicas.

O desenvolvimento da interface osso/implante depende das interações diretas da matriz óssea e dos osteoblastos (células produtoras de tecido ósseo) com os biomateriais. Um biomaterial é qualquer material, sintético ou natural, que pode ser usado como um sistema ou parte de um sistema que ofereça, aumente, ou substitua

algum tecido, órgão ou função do corpo. Já a biocompatibilidade de um dispositivo médico implantável por longo período compreende a capacidade de o dispositivo cumprir com sua função destinada, com o desejado grau de incorporação no hospedeiro, sem provocar efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis (WILLIAMS, 1999).

De acordo com Geetha et al. (2009) os biomateriais podem ser classificados à partir da resposta do tecido em função do desenvolvimento do tipo de interface implante/osso em: biotolerantes, bioativos e bioreabsorvíveis (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação dos biomateriais baseada na sua interação com o meio biológico (GEETHA *et al.* ; 2009).

CLASSIFICAÇÃO	RESPOSTA	EXEMPLOS	EFEITO
Materiais biotolerantes	Formação de tecido conectivo fino (0,1-10µm) e a cápsula não adere a superfície do implante	Poli-tetrafluoretileno (PTFE); poli-metilmetacrilato (PMMA), Ti, CoCr	Rejeição do implante levando a falha do implante
Materiais Bioativos	Formação de tecido ósseo em torno do implante e fortemente integrado com a superfície do implante	Biovidro, fosfato de cálcio sintético	Aceitação do implante levando ao sucesso da implantação
Materiais bioreabsorvíveis	Substituição por tecido autólogo	Ácido polilático, e poliglicol; enxertos ósseos processados.	Aceitação do implante levando ao sucesso da implantação

Segundo esta classificação, os biomateriais metálicos são considerados biotolerantes. São materiais inorgânicos que possuem arranjos atômicos únicos e características de ligação que conduzem a maiores propriedades mecânicas, térmicas e elétricas. Sua condutividade e resistência mecânica, em especial, propriedades como o suporte de cargas, o tornam ideais para o uso em uma variedade de aplicações médicas,

incluindo próteses para substituição de tecido duro, dispositivos para fixação, ossos artificiais, placas de síntese, aparelhos ortodônticos, parafusos e implantes dentários (BINYAMIN et al.; 2006).

Nos últimos anos, o aumento do uso do titânio e suas ligas como biomateriais devem-se ao seu baixo módulo de elasticidade, superior biocompatibilidade e alta resistência à corrosão quando comparado ao aço inoxidável e ligas a base de cobalto que também possuem aplicações médicas e odontológicas (LIU et al., 2004).

O titânio e suas ligas são utilizados principalmente para substituição de tecidos duros. A ocorrência de fraturas é, portanto, um dos grandes problemas para a utilização segura in vivo. As características de fratura das ligas são afetadas por mudanças na sua microestrutura e o entendimento do efeito do organismo sobre suas propriedades mecânicas é de extrema importância para o sucesso da implantação (NIINOMI, 1998).

O titânio apresenta-se em duas formas alotrópicas: em temperaturas baixa apresenta uma estrutura cristalina tipo hexagonal compacta (HC) conhecida como a fase alfa (α); para temperaturas acima de 883°C a estrutura se transforma em cúbica de corpo centrado (CCC), denominada de fase beta (β). A temperatura de transformação $\alpha - \beta$ pode aumentar ou diminuir em função da adição de elementos de liga (LIU et al., 2004).

Elementos de liga tais como alumínio, oxigênio, nitrogênio estabilizam a fase α (α – estabilizadores) e sua adição aumenta a temperatura de transformação β . Por outro lado, os elementos que estabilizam β como vanádio, tântalo, molibdênio, nióbio (β estabilizadores) reduzem a temperatura de transformação (GEETHA et al.; 2009).

O titânio e algumas de suas ligas são conhecidos como sendo os materiais metálicos mais biocompatíveis devido a algumas de suas características, tais como: elevada resistência, baixo módulo, resistência à corrosão e baixo peso. Os parâmetros de corrosão e dos produtos de corrosão são responsáveis pela limitação da biocompatibilidade dos materiais metálicos, podendo produzir reações indesejáveis nos tecidos adjacentes ou regiões distantes ao implante (MARECI et al.; 2009).

A liga Ti-6Al-4V desenvolvida inicialmente para aplicações aeroespaciais, foi amplamente empregada, no entanto, estudos revelando a citotoxicidade dessas ligas devido ao emprego de alumínio e vanádio na sua composição promoveu a pesquisa de novas ligas com elementos de ligas como molibdênio, zircônio, tântalo, nióbio, dentre outros (PURCEK et al., 2009).

A avaliação do comportamento biológico de elementos metálicos tem demonstrado que a composição dos biomateriais pode ser ajustada para minimizar as

reações teciduais adversas ou alérgicas, resultantes da liberação de íons devido à taxa de corrosão da liga (LONG e RACK, 1998). Apresentando características não tóxicas ao organismo, elementos como Ta, Zr e Nb foram adicionados para o desenvolvimento de ligas de titânio livres de vanádio e de alumínio (MORITA et al.; 2000).

O tântalo é conhecido por suas características atrativas, tais como: excelente resistência à fratura e trabalhabilidade. Na área biomédica é utilizado para suturas e confecção de placas. No entanto, assim como o titânio são considerados materiais bioinertes, ou seja, não podem se unir diretamente ao tecido ósseo após a implantação (MIYAZAKI et al., 2002).

Breme e Waldewitz (1989) avaliaram a resistência a corrosão de ligas de titânio com a adição dos elementos tântalo e nióbio (Ti-30Ta e Ti-40Ta, Ti- 40Nb e Ti-50Nb). Durante o ensaio de corrosão dessas ligas em solução salina a 0,9 %, nenhuma diferença significativa entre elas foi observada. No entanto, com relação às propriedades mecânicas, as ligas do sistema binário Ti-Ta apresentaram resultados superiores, comparado às ligas do sistema Ti-Nb. Em 2009, a resistência à corrosão das ligas do sistema binário Ti-Ta foi avaliada por Mareci et al. (2009). Esses autores compararam ligas com teores de Ta de 30, 40, 50 e 60 %p, com a liga utilizada comercialmente Ti-6Al-7Nb. Esses estudos comprovaram que a resistência a corrosão das ligas do sistema binário Ti-Ta é muitas vezes superior a da liga comercial Ti-6Al-7Nb, sugerindo que as ligas Ti-Ta apresentam excelente potencial para aplicações odontológicas.

2.2. TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE - INCORPORAÇÃO DE ALENDRONATO DE SÓDIO À SUPERFÍCIE DE BIOMATERIAIS

Nos últimos anos, se verifica na literatura que a incorporação de medicamentos à superfície de biomateriais pode trazer uma série de benefícios aos pacientes, o que tem viabilizado essas pesquisas. A liberação de medicamentos capazes de melhorar a osseointegração de superfícies implantadas pode ser uma alternativa viável nesses casos.

Os bisfosfonatos são medicamentos empregados para o tratamento de doenças associadas ao desvio metabólico do cálcio (RUSSEL, 2011). São compostos caracterizados por duas ligações C – P. Se essas duas ligações estiverem localizadas no mesmo átomo de carbono, os compostos são denominados bisfosfonatos geminais e são

análogos ao pirofosfato, que apresenta um átomo de oxigênio, ao invés de um átomo de carbono (Figura 1). Essa estrutura permite uma série de variações a partir da mudança dos radicais localizados na cadeia lateral o que permitiu a comercialização de diversos medicamentos (FLEISH, 1998).

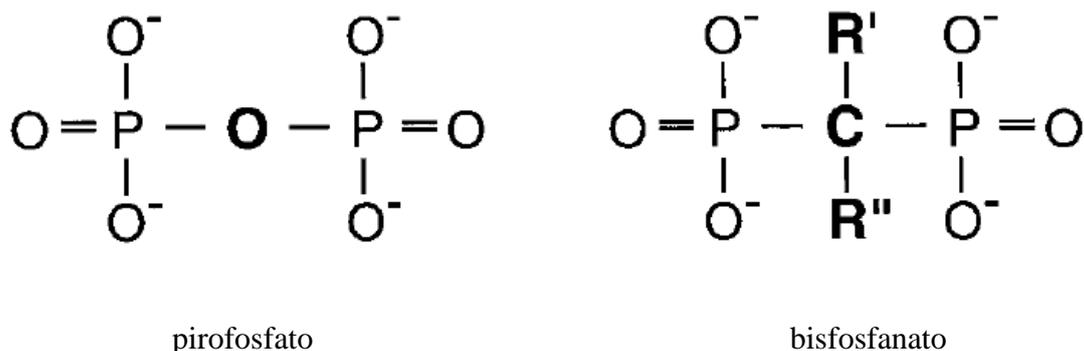


Figura 1 – Estrutura química do pirofosfato e bisfosfonato (adaptado de FLEISH, 1998).

Segundo Rodan e Fleisch (1996), os efeitos dos bisfosfonatos podem ser considerados em três níveis: tecidual, celular e molecular.

- **Nível tecidual:** a ação de todos os tipos de bisfosfonatos nesse nível é semelhante, ocorrendo uma redução na remodelação óssea. A remodelação óssea é um processo no qual ocorre a substituição do osso antigo que sofre reabsorção, por osso neoformado. É um processo constante onde a formação óssea é controlada por diversos fatores (mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos). O estágio inicial da remodelação óssea se caracteriza pelo recrutamento das células precursoras de osteoclastos (responsáveis pela absorção óssea) para o osso. Em seguida ocorre a fase de reversão, onde a superfície óssea é preparada para iniciar a formação óssea, por meio dos osteoblastos, células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização do osso (AMADEI, et al. 2006). A presença dos bisfosfonatos influi nesse processo levando a uma diminuição tanto no processo de reabsorção óssea como na

formação de osso, podendo ser avaliada através de marcadores bioquímicos. Esses medicamentos reduzem os parâmetros de reabsorção óssea, tais como a extensão da área ativa de reabsorção e a profundidade da erosão medida a partir da superfície óssea (RODAN e FLEISCH, 1996).

- **Nível celular:** há um consenso geral de que os bisfosfonatos agem direta ou indiretamente sobre os osteoclastos podendo agir no processo de formação e/ou na sua atividade (Figura 2). Podem reduzir a reabsorção óssea osteoclástica por meio da: 1) inibição da seleção de osteoclastos na superfície; 2) inibição da atividade osteoclástica; 3) encurtamento da vida do osteoclasto. Esses efeitos podem estar relacionados à ação direta sobre os osteoclastos, ou indiretamente, através da ação de células que modulam os osteoclastos.

1) inibição da seleção de osteoclastos na superfície: In vitro, os bisfosfonatos inibem a diferenciação dos osteoclastos na medula óssea. O bisfosfonato é totalmente eficaz neste sistema, quando adicionado imediatamente antes da fusão de células mononucleares precursores de osteoclastos para formação de células multinucleadas. In vivo, percebe-se uma diminuição no número de osteoclastos após administração crônica. A ação dos bisfosfonatos quando avaliada in vitro correlaciona-se com os efeitos in vivo somente quando os sistemas que detectam a mobilização dos osteoclastos são utilizados e não apenas a atividade. O efeito sobre o recrutamento dos osteoclastos pode ser direta e/ou indiretamente. É aceito que a linhagem de células osteoblástica controla o recrutamento e a atividade dos osteoclastos sob condições fisiológicas e patológicas.

2) inibição da atividade osteoclástica: a inibição da atividade dos osteoclastos na superfície óssea, esta relacionada ao fato de alguns bisfosfonatos demonstrarem alterações na morfologia dos osteoclastos, tanto em in vitro, como em animais tratados in vivo. Incluindo alterações no citoesqueleto. Este modo de ação também pode ser suportado pelo fato dos bisfosfonatos, sob certas condições, poderem entrar nas células, especialmente as da linhagem de macrófagos.

3) encurtamento da vida do osteoclasto: o tempo de vida dos núcleos dos osteoclastos pode ser estimado através de estudos histomorfométricos. Entretanto, a estimativa da vida útil do osteoclasto é difícil e imprecisa, uma vez que os núcleos são aderidos e libertados dessas células. Foi proposto que os

bisfosfonatos podem reduzir o número de osteoclastos através de um efeito tóxico, porém acredita-se, que o mecanismo de ação geral dos bisfosfonatos é no aumento da apoptose dos osteoclastos, porém, não se sabe se a apoptose é induzida diretamente pelos bisfosfonatos (RODAN e FLEISCH, 1996).

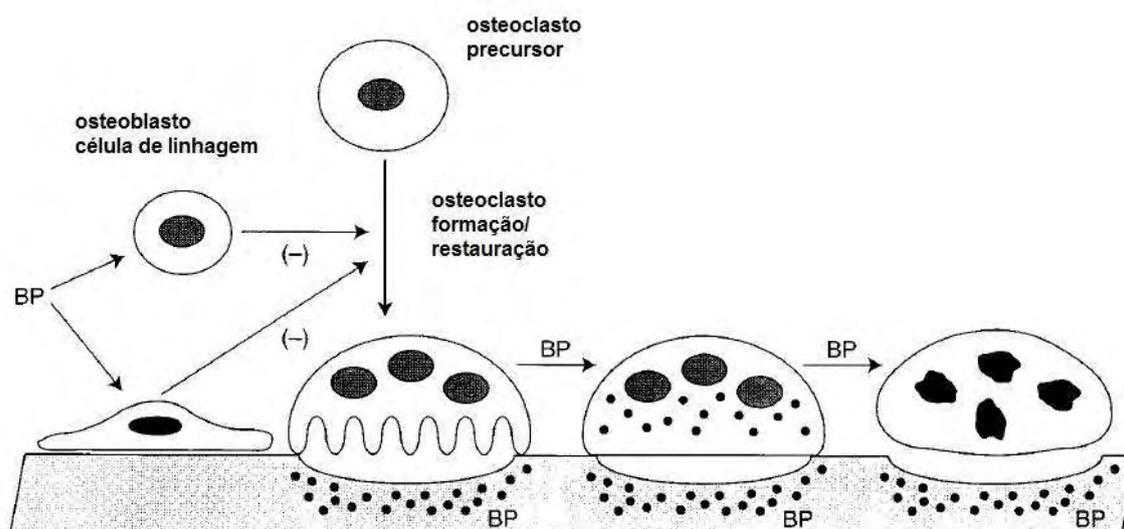


Figura 2- Apresentação esquemática do mecanismo de ação dos bisfosfonatos (Modificado de RODAN e FLEISCH, 1996).

- **Nível molecular:** nesse nível a ação in vivo dos bisfosfonatos ainda não foi bem estabelecida. Porém, idéias sobre a base molecular dos bisfosfonatos e sua ação podem surgir através da identificação de outras moléculas, tais como, receptores, canais, enzimas, ou de sinal de mediadores de transdução, para qual pode ser demonstrado que eles interagem diretamente com os bisfosfonatos em determinadas concentrações farmacológicas e são necessários para o efeito dos bisfosfonatos nas células ósseas. Os bisfosfonatos podem modular a função dos osteoclastos através da interação com receptores celulares na superfície ou enzimas intracelulares. Seu papel é diminuir a ruptura da membrana plasmática mediada pelos osteoclastos no osso, o que pode ser bem estabelecido, através de ensaios clínicos (RUGGIERO, et al. 2004).

Dentre os bisfosfonatos comerciais empregados destaca-se o alendronato de sódio (Figura 3), que consiste em um aminobisfosfonato, com grande afinidade pela matriz óssea, utilizado no tratamento da osteoporose. É um potente inibidor da reabsorção óssea, desencadeando a diminuição de células progenitoras de osteoclastos, a diminuição do recrutamento dos osteoclastos, bem como a promoção de apoptose dos osteoclastos maduros reduzindo, assim, a velocidade da reabsorção e do remodelamento ósseo. O tratamento em longo prazo com essas drogas tem demonstrado uma elevação no número e na atividade de osteoblastos, elevando também a possibilidade de os bisfosfonatos não só reduziram a reabsorção óssea, como também virem a ter um efeito positivo na formação de osso (MANOLAGAS, 2000; ALAKANGAS, 2002).

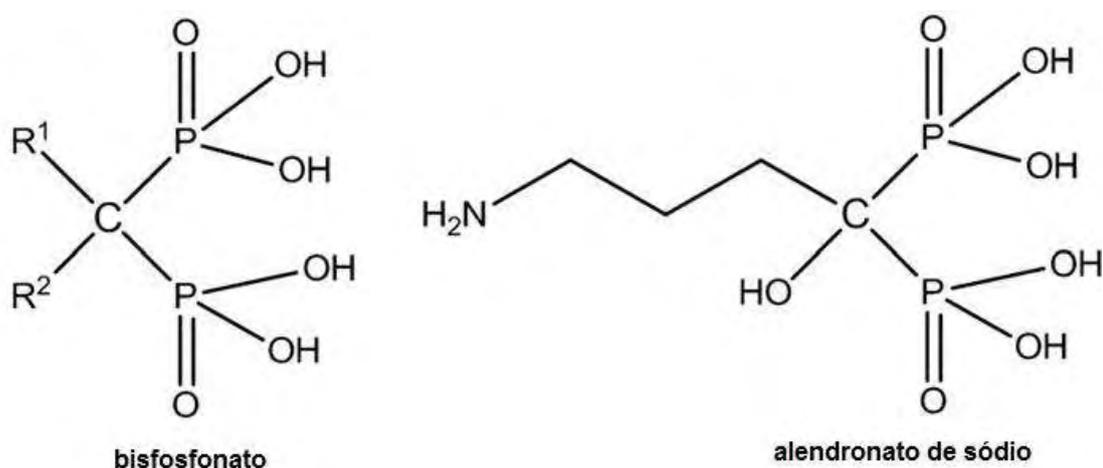


Figura 3 - Estrutura química do alendronato de sódio comparada ao bisfosfonato, onde ocorre a substituição dos radicais livres R1 e R2 (adaptado de BOSE e TARAFDER, 2012).

Na literatura se verifica a realização de estudos *in vivo* em animais para avaliar a ação desse medicamento. Na década de 1990, estudos realizados em cães com doença periodontal comprovaram que a ingestão desse medicamento por via oral (3 mg/kg) poderia levar a uma diminuição na mobilidade dentária e um aumento significativo da densidade da massa óssea dos animais medicados quando comparados aos do grupo controle (não medicado) (REDDY et al., 1995). Em outros estudos os pesquisadores

avaliaram a ação do alendronato de sódio em animais a partir da aplicação de doses intravenosas ou ainda imersão dos implantes em solução contendo o medicamento previamente à cirurgia. No caso da administração intravenosa (1,5 mg/kg) os autores concluíram que o alendronato é efetivo no processo de reabsorção óssea, mas não apresenta significância na fase de formação óssea (YAFFE et al., 2003). Por outro lado, um aumento da densidade da massa óssea foi verificado com o uso sistêmico do alendronato de sódio, ocorrendo um aumento significativo da quantidade de osso formado ao redor dos implantes (MERAW et al., 1999).

As vantagens associadas ao uso de liberação local do medicamento têm levado ao estudo do uso de alendronato de sódio associado a revestimentos de fosfato de cálcio. Diversas técnicas são empregadas para a deposição de revestimentos a base de fosfato de cálcio capaz de induzir a osteogênese, por exemplo, sol-gel, deposição a plasma e tratamento de superfície biomimético.

No tratamento de superfície biomimético uma camada de fosfato de cálcio amorfo é formada a partir da imersão do substrato em uma solução supersaturado (SBF—simulated Body Fluid).

2.2.1 MÉTODO BIOMIMÉTICO

Atualmente tem se intensificado a utilização de soluções que simulam o fluido corpóreo acelular, denominada SBF (simulated body fluid), essas soluções apresentam composição, pH e temperatura similares ao plasma sanguíneo. Abe et al. (1990), apresentaram um novo método para o revestimento de apatita em vários substratos, incluindo metais, cerâmicas e polímeros orgânicos, denominado método biomimético de revestimento, que consiste em colocar um substrato na solução sintética (SBF). Junto ao substrato coloca-se uma placa de vidro bioativa denominada vidro G distante 0,5 mm deste substrato. Após 7 dias imerso à 36,5°C, forma-se uma camada contínua e homogênea de 1µm de espessura composta por cristalitos de hidroxiapatita semelhante à biológica muito finos e de aparência fibrosa e alongada. Em seguida, se realiza uma nova imersão, por mais 7 dias, em uma solução 1,5 vezes mais concentrada do que a primeira, obtém-se um aumento na espessura da camada de até 15 µm. Este procedimento permite recobrir praticamente qualquer substrato com uma camada uniforme de Hidroxiapatita similar à apatita biológica.

Desde então, várias soluções que simulam o fluido corpóreo, que diferem entre si pela composição química, têm sido propostas com finalidade de criar uma camada de hidroxiapatita sobre a superfície de substratos após a imersão nestas soluções.

Em 2002, Habibovic e seus colaboradores, avaliaram a camada de revestimento de fosfato de cálcio (Ca-P) em placas de Ti6Al4V e cilindros de tântalo poroso, utilizando o método biomimético em duas etapas. No primeiro momento os implantes foram imersos em uma solução que era 5 vezes mais concentrada (SBF 5x) que o SBF convencional, proposto por Kokubo et al.(1990) excluindo o tampão Tris, os íons K^+ e os íons SO_4^{2-} , esta solução foi denominada (SBF-A) (Quadro 2). Em seguida os implantes foram imersos em uma solução (SBF-B), no qual continha composição similar ao SBF-A, porém com diminuição do conteúdo de Mg_2^+ e HCO_3^- . Isto resultou no primeiro momento na formação de uma camada fina de fosfato de cálcio amorfo, levando a precipitação de uma camada densa de $30 \pm 10 \mu m$ de espessura de fosfato de cálcio na segunda etapa. A formação do revestimento está fortemente relacionada com os íons Mg_2^+ . O revestimento final se assemelha muito a hidroxiapatita biológica. A aplicação deste revestimento pode aumentar a deposição óssea ao redor do implante, conduzindo a uma melhora no processo de osseointegração.

Quadro 2- Concentrações iônicas do Plasma Humano, SBF-convencional, SBF-A e SBF-B. (Habibovic et al., 2002).

	Concentração iônica/mM							
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HPO_4^{2-}	HCO_3^-	SO_4^{2-}
Plasma Humano	142	5	2,5	1,5	103	1	27	0.5
SBF-convencional	142	5	2,5	1,5	148,8	1	4,2	0,5
SBF-A	714,8		12,5	7,5	732,8	5	21	
SBF-B	704,2		12,5	1,5	711,8	5	10,5	

Em 2002, Li et al., apresentaram um método biomimético simples para cobertura de fosfato de cálcio em substrato de titânio comercialmente puro (Ti cp). Foi utilizado NaH_2PO_4 , para o preparo da solução com alta concentração de íons fosfato e íons

cálcio. Esta solução se tornou uma solução supersaturada de cálcio (SCS) com a adição de NaHCO_3 . Com a adição de NaHCO_3 foi possível elevar o valor do pH de forma gradual e constante. Então, se formou uma camada de revestimento de fosfato de cálcio homogênea com cerca de 40 μm de espessura no substrato após 24 horas de imersão.

Kim e seus colaboradores (1996) criaram um método químico simples para induzir a bioatividade do titânio e suas ligas. Titânio comercialmente puro (Ti cp), Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-Ta e Ti-15Mo-5Zr-3Al foram tratados com uma solução de NaOH (10 M) e subsequentemente submetidas a um tratamento térmico a 600°C, onde se formou na superfície uma fina camada de titanato de sódio. Em seguida os substratos tratados foram imersos em simulated body fluid (SBF), formando uma camada densa de apatita na sua superfície. Isto indica que o tratamento alcalino com NaOH e o tratamento térmico tornaram a superfície do metal termodinamicamente estável, proporcionando uma forte união da camada de apatita com o substrato.

No trabalho de Ma et al. (2003), foi utilizado o método biomimético para a formação de nanocristais de apatita sobre a superfície de placas de titânio comercialmente puro (Ti cp). A princípio foi realizado um tratamento alcalino com NaOH e em seguida as amostras foram imersas em solução de SBF 1,5x. A análise do revestimento do filme formado, através de DRX e MEV, mostrou que a camada de apatita formada apresenta nanoestrutura e tem estequiometria semelhante à do osso natural. A aderência da camada de apatita sobre o substrato de titânio foi confirmada por um ensaio de cisalhamento, demonstrando um valor médio de 9,5 MPa. Também foi realizada cultura de célula demonstrando que essa camada de apatita apresenta excelente bioatividade. Portanto, os compósitos preparados através desse método podem ser utilizados para a substituição óssea artificial, além de outras aplicações biológicas, devido a sua bioatividade, excelente adesão, espessura uniforme e baixo custo de produção.

O fluido corpóreo simulado (SBF) apresenta concentrações de íons aproximadamente iguais às do plasma humano e tem sido amplamente utilizado para avaliação *in vitro* da formação de revestimento de hidroxiapatita na superfície de vários substratos. Em 2003, Oyane et al., propuseram uma revisão da solução SBF convencional (c-SBF), para o preparo de novas soluções de SBFs (r-SbF, i-SBF, m-SBF) com concentrações equivalentes ou maiores que às do plasma sanguíneo (Quadro 3). Durante o processo de armazenamento o r e i-SBF não apresentaram nenhuma alteração nas concentrações de íons, por um período de até 4 semanas, à 5°C e até 2

semanas à 36,5°C, mas depois desse período diminuíram a concentração de HCO_3^- e aumento no pH. Sob as mesmas condições o c-SBF e m-SBF não mostraram nenhuma alteração na concentração de íons e pH em até 8 semanas. Portanto, concluíram que o r-SBF, i-SBF são menos estáveis que o c-SBF e m-SBF em relação às alterações nas concentrações de íons no processo de armazenamento. E com relação à estabilidade e similaridade com o plasma sanguíneo o m-SBF apresenta ótimas concentrações de íons para análise *in vitro* da produção de apatita.

Quadro 3- Concentrações iônicas de SBFs em comparação com o plasma sanguíneo humano total e dissociado (Oyane et al., 2003).

Íons	Concentração iônica/mM					
	Plasma humano		c-SBF	r-SBF	i-SBF	m-SBF
	Total	Dissociado				
Na^+	142,0	142,0	142,0	142,0	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,0	1,5	1,5	1,0	1,5
Ca^{2+}	2,5	1,3	2,5	2,5	1,6	2,5
Cl^-	103,0	103,0	147,8	103,0	103,0	103,0
HCO_3^-	27,0	27,0	4,2	27,0	27,0	10,0
HPO_4^{2-}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Em Kokubo et al. (2006), os autores apresentam a correlação da capacidade de formar apatita em vários materiais imersos em SBF (simulated body fluid), prevendo seu comportamento *in vivo*, a partir do emprego de teste *in vitro*. Os autores concluíram que a análise da formação de apatita sobre um material imerso em SBF é útil para prever a atividade óssea *in vivo*.

Barrere et al. (2002), utilizaram o simulated body fluid (SBF) 5 vezes concentrado (SBF 5x) com o uso de CO_2 para a realização do revestimento biomimético de fosfato de cálcio (Ca-P). Este processo permitiu a deposição do revestimento de fosfato de cálcio uniforme em apenas 24 horas. A formação e fixação deste revestimento está fortemente relacionada com o conteúdo do Mg_2^+ , sendo este um fator

chave para a formação do revestimento de fosfato de cálcio, a partir da solução SBF 5x. Esta concentração relativamente elevada na interface revestimento/substrato inibe a precipitação da solução e favorece a formação do revestimento de Ca-P.

Qu e Wei (2008), estudaram o efeito dos valores iniciais do pH e da temperatura na formação do revestimento biomimético de hidroxiapatita. Neste estudo, foram utilizadas três temperaturas diferentes: 24°C (temperatura ambiente), 40°C e 60°C. Para cada temperatura foram escolhidos três pHs iniciais diferentes: baixo, médio, alto. Verificou-se que a temperatura do SBF tem grande efeito sobre a taxa de decomposição dos íons bicarbonato (HCO_3^-). Os íons bicarbonato tendem a se decompor mais rapidamente quando a temperatura aumenta, resultando num aumento no valor do pH. Com pHs iniciais diferentes é necessário a decomposição de diferentes quantidades de íons bicarbonato para que seja atingido o valor de pH crítico para que ocorra a formação do revestimento biomimético de hidroxiapatita. Com quantidades diferentes de íons bicarbonato no SBF a morfologia de superfície do revestimento é alterada. Portanto, o pH inicial da solução SBF desempenha um papel muito importante no controle da morfologia de superfície do revestimento.

Na figura 4 é possível observar uma representação esquemática da co-precipitação do medicamento em um substrato.

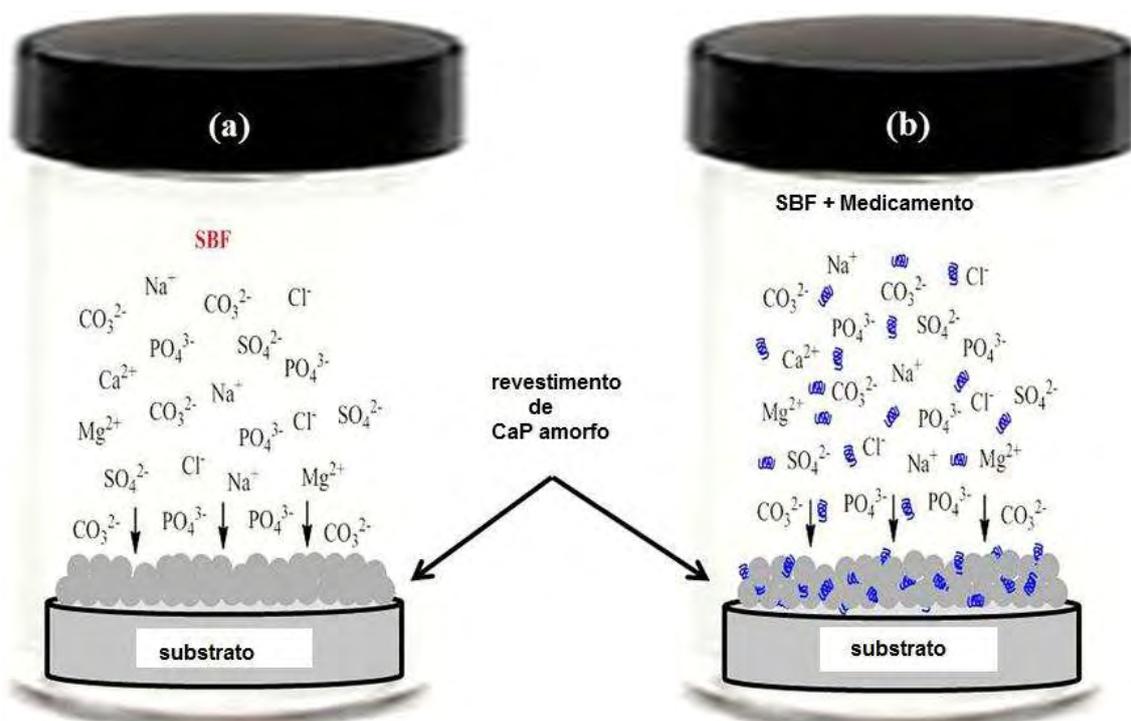


Figura 4 – Esquema de revestimento biomimético: a) revestimento biomimético simples de cálcio amorfo deficiente de apatita carbonatada para o SBF, b) co-precipitação biomimética de fármaco/fator de crescimento (adaptado de BOSE e TARAFDER, 2012).

Garbuz et al (2008) avaliaram a formação óssea ao redor de cilindros de tântalo poroso contendo revestimento de Ca-P associado à imobilização de alendronato de sódio com imersão em PBS. Os resultados mostraram um aumento significativo do volume de preenchimento ósseo grupo do revestidos com fosfato de cálcio e alendronato de sódio em comparação com o grupo não revestido (grupo controle). Concluíram que a adição de alendronato de sódio na superfície de revestimentos pode promover melhora no processo de cicatrização óssea.

Zhou et al. (2012) utilizaram revestimentos carbonatados de cálcio deficientes de hidroxiapatita (CDHA) na liga Ti-6Al-4V, desenvolvido através do método biomimético, para avaliar a bi-funcionalidade desses revestimentos. A bi-funcionalidade foi conseguida através da incorporação de alendronato de sódio nesses revestimentos. Foram testados três métodos de incorporação. Os resultados foram avaliados através de testes in vitro e indicam que o alendronato de sódio contido nas

camadas internas dos revestimentos (CDHA) desempenha um papel significativo na proliferação de células osteoblásticas.

Verificamos, através desse levantamento bibliográfico, que ainda há muita controvérsia sobre a ação dos bisfosfonatos, em especial do alendronato de sódio, no processo de reparação óssea. Havendo poucos trabalhos que relatam realmente a ação do alendronato sódico como agente formador de tecido ósseo, bem como com relação à sua forma de ação quando associados com outros materiais como a Hidroxiapatita.

CAPÍTULO 3

MATERIAS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desse trabalho foi realizado um estudo *in vitro* que consiste na obtenção e caracterização do filme biocerâmico formado na superfície das amostras, e um estudo *in vivo* para análise da osseointegração de implantes após a deposição dos filmes, conforme pode ser observado no fluxograma da Figura 5.

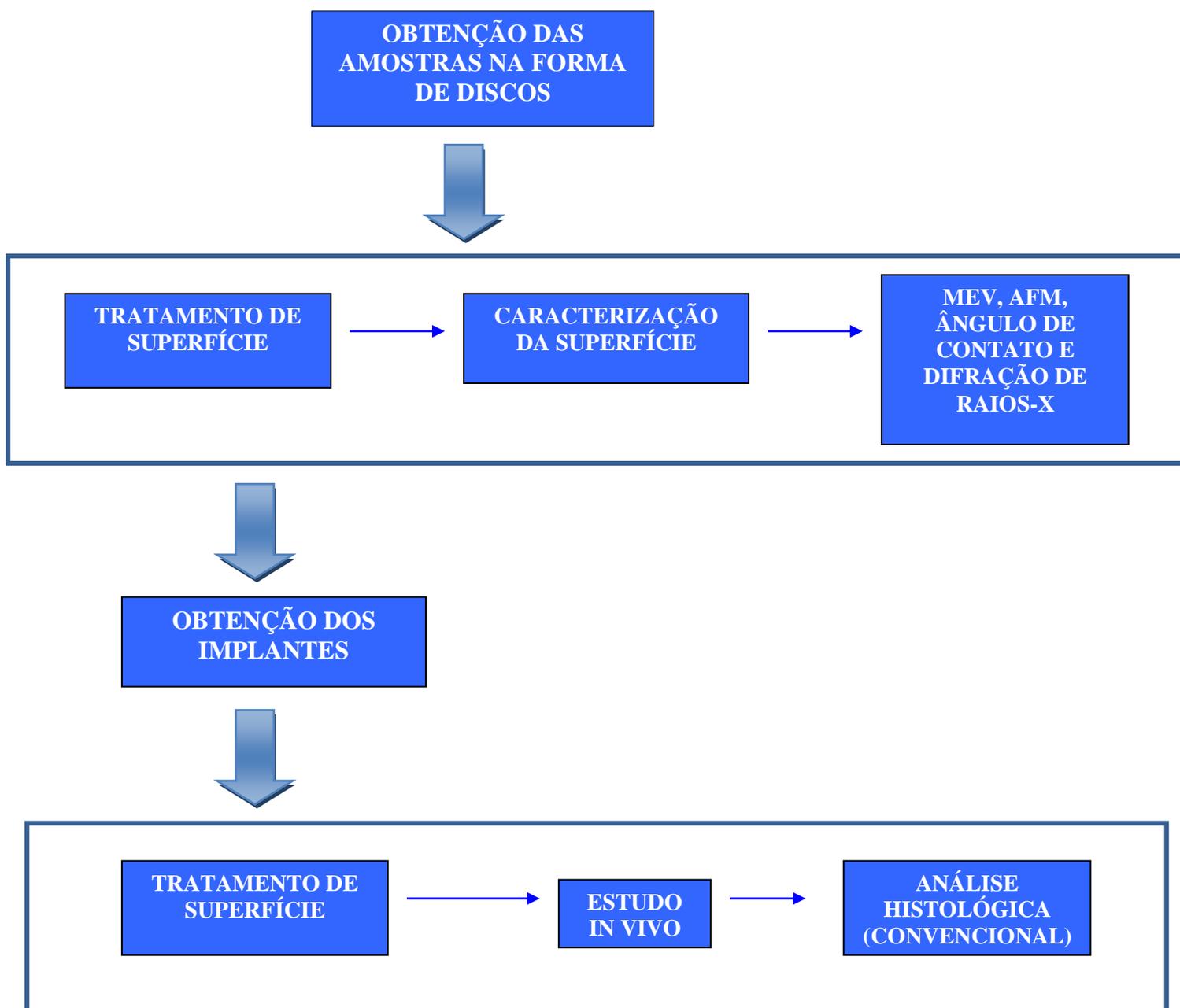


Figura 5 – Fluxograma da metodologia que foi empregada nesse projeto.

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Inicialmente foram fundidos lingotes da liga Ti-30Ta a partir dos elementos puros titânio e tântalo, de acordo com a seguinte seqüência: limpeza dos materiais, pesagem e fusão (ALVES, 1998).

A limpeza dos metais foi realizada utilizando uma solução preparada com reagentes de grau analítico (P.A. Merck) formada por 50 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 20 ml de ácido fluorídrico (HF), 20 ml de ácido nítrico (HNO_3) e 10 ml de água destilada. A pesagem dos elementos de acordo com a composição escolhida para o estudo (Ti-30%Ta) foi realizada em uma balança analítica. A fusão dos elementos foi realizada em um forno a arco voltaico com atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado com água. A fusão foi realizada pelo menos cinco vezes de cada lado do lingote para garantir a homogeneidade da amostra. Após a fusão, os lingotes foram submetidos ao tratamento térmico de homogeneização à $1000^{\circ}C$ durante 24h. Na figura 6 é possível observar a seqüência empregada no preparo das amostras.



Figura 6 – Sequência empregada para a fusão da liga: a) forno para fusão da liga b) colocação dos materiais no cadinho para fundição c) obtenção do lingote d) amostra após encapsulamento.

Em seguida, foi realizado o forjamento a frio em prensa rotativa dos lingotes de tal forma que tarugos com 13 mm e 4 mm fossem confeccionados para obtenção dos discos e dos implantes, respectivamente. Em uma forja rotativa utilizando matrizes 6F (2^2 até $3/8^2$) e 3F ($1/2^2$ até $1/8^2$), com potência de aproximadamente 30 CV (HP) e velocidade de 1700 rpm, pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais, EEL, USP. Alguns lingotes foram seccionados na forma de discos (13mmx3mm) com auxílio de cortadeira de precisão para caracterização da superfície antes da usinagem dos implantes.

3.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE

Inicialmente, as amostras foram divididas em 2 grupos para a escolha do melhor método de incorporação do medicamento:

Grupo 1- Tratamento alcalino + imersão em solução SBF 5x + Alendronato de sódio por 24 horas.

Grupo 2- Tratamento biomimético + imersão em solução SBF 5x + Alendronato de sódio por 7 dias.

Para o tratamento alcalino, as amostras foram imersas em uma solução aquosa de NaOH (1,5 M) em banho termostaticado (Tecnal) a 60°C, por 24 horas. Após esse período foram lavadas abundantemente em água destilada e secas em estufa (Quimis) a 40°C por 24 horas. Em seguida foram tratadas termicamente em forno tipo mufla (EDG) com aquecimento por resistência elétrica, a 300°C por 24 horas, com taxa de aquecimento de 5°C/min e resfriamento dentro do forno até a temperatura ambiente (Figura 7).



Figura 7 - Forno tipo mufla utilizado para o tratamento térmico das amostras após tratamento alcalino. Destaque para amostras dentro do forno.

Após o tratamento alcalino e térmico foi realizado a incorporação do medicamento de acordo com a metodologia empregada para cada grupo:

Grupo 1: 4 gramas de alendronato de sódio foram diluídos diretamente em 1000 ml de SBF 5x. A composição escolhida para o SBF foi a proposta por Barrère et al. (2002) cuja concentração dos componentes é cinco vezes maior que a solução original proposta por Kokubo (1990) e tem como objetivo diminuir o tempo de imersão nesta. Na Tabela 1 é possível verificar as quantidades que foram empregadas.

Quadro 4- Composição do SBF 5x (Simulated Body Fluid)

COMPOSIÇÃO SBF 5x	
Componente	Quantidade (g/l)
NaCl	40,0
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,52
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,84
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	0.89
NaHCO ₃	1,76

Para preparo do SBF 5x, inicialmente os reagentes foram dissolvidos em água destilada (900 ml), mantida a 36,5°C com auxílio de uma mesa aquecedora, com agitação magnética. A solução foi colocada em um balão volumétrico e seu volume completado com água destilada até 1000 ml. Um fluxo constante de CO₂ foi empregado para o ajuste do pH (7,4), sendo mantido por 20 minutos, até que a solução ficasse translúcida. Cada amostra foi imersa em 30 ml em tubo de fundo cônico, com a superfície lixada paralela ao fundo do tubo. Os tubos foram colocados em uma mesa agitadora (Quimis) a 36,5 °C com rotação de 175 rpm durante 24 horas. Após esse período as amostras foram retiradas, lavadas com água destilada e secas em estufa a 50°C por 24 horas (Figura 8).

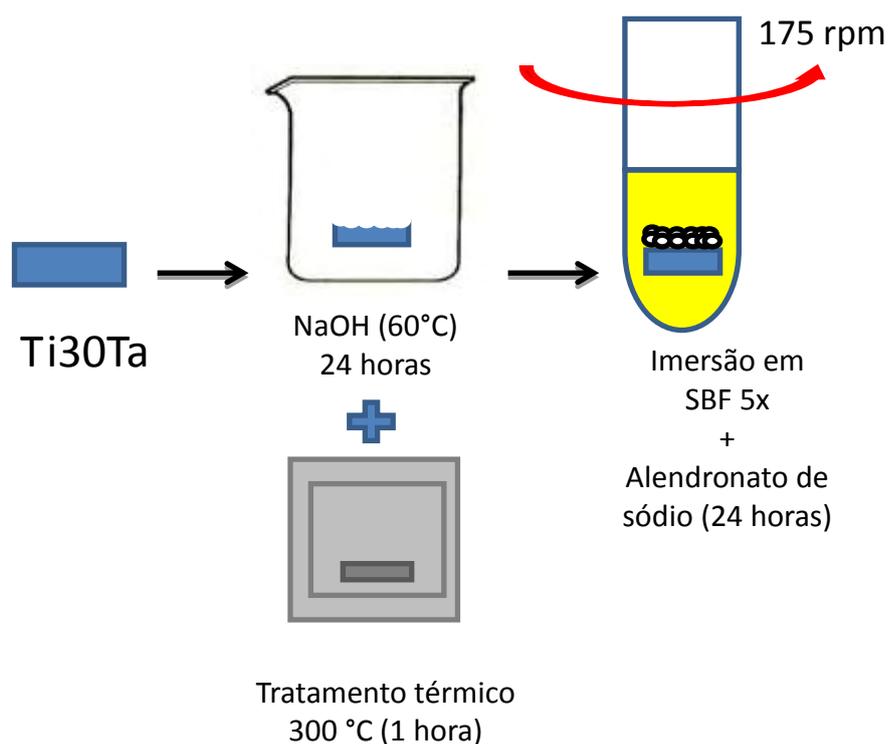


Figura 8 - Representação esquemática da metodologia empregada para incorporação de medicamento no Grupo I.

Grupo 2: Cada amostra foi imersa em 30 ml de solução SBF 5x, em tubo de fundo cônico, com a superfície lixada paralela ao fundo do tubo. Os tubos foram colocados em uma mesa agitadora (Quimis) a 36,5 °C com rotação de 175 rpm durante 24 horas. Após esse período as amostras foram retiradas, lavadas com água destilada e secas em estufa a 50°C por 24 horas. Em seguida foi diluído 4g de alendronato de sódio em 1000 ml de SBF 5x, cada amostra foi imersa em 30 ml dessa solução, em tubo de fundo cônico, também com a superfície lixada paralela ao fundo do tubo. Os tubos foram colocados na estufa (Quimis) a 37°C e ficaram sem agitação durante 7 dias, realizando troca da solução de 48/48 horas (Figura 9).

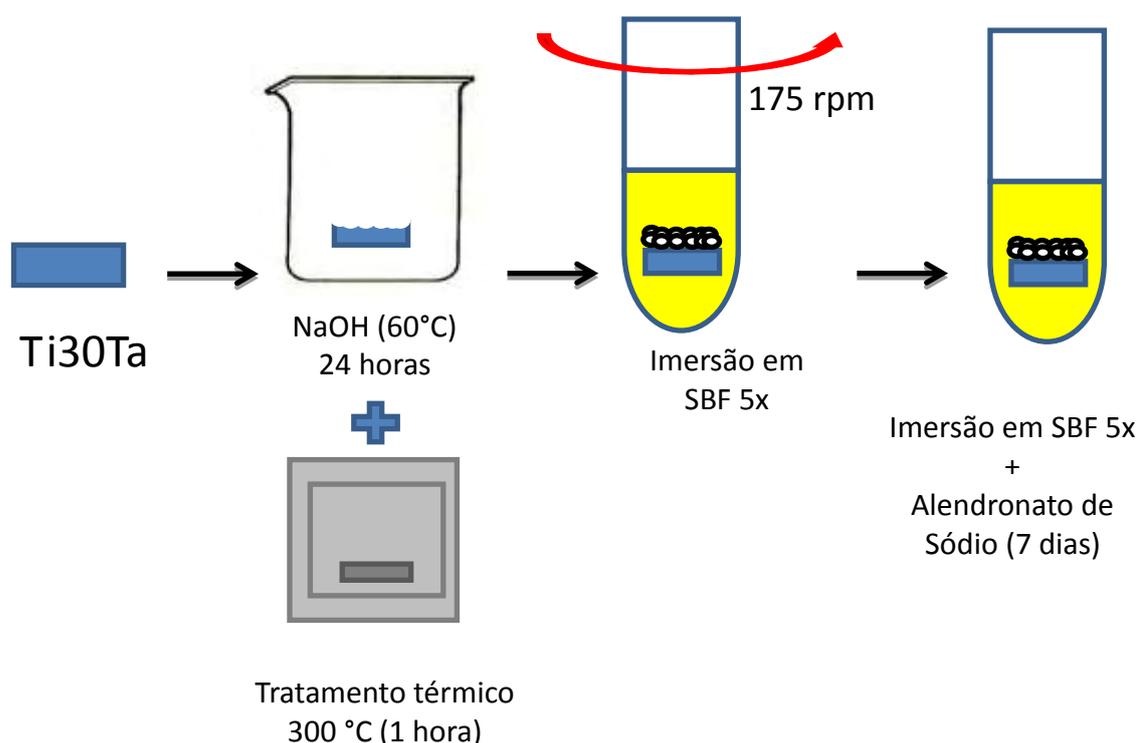


Figura 9- Representação esquemática da metodologia empregada para incorporação de medicamento no Grupo II.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliar a morfologia da superfície das amostradas foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Marca Philips, Modelo XL 30 FEG, com filamento Field emission gun (FEG), do laboratório de Caracterização Estrutural – LCE, da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar como mostra a figura 10. Também foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV- Leo - 1450 VP), do departamento de Engenharia de Guaratinguetá, UNESP. A composição química foi avaliada em um analisador do EDS (espectrômetro por energia dispersiva) Oxford, Inca Energy, acoplado ao MEV.

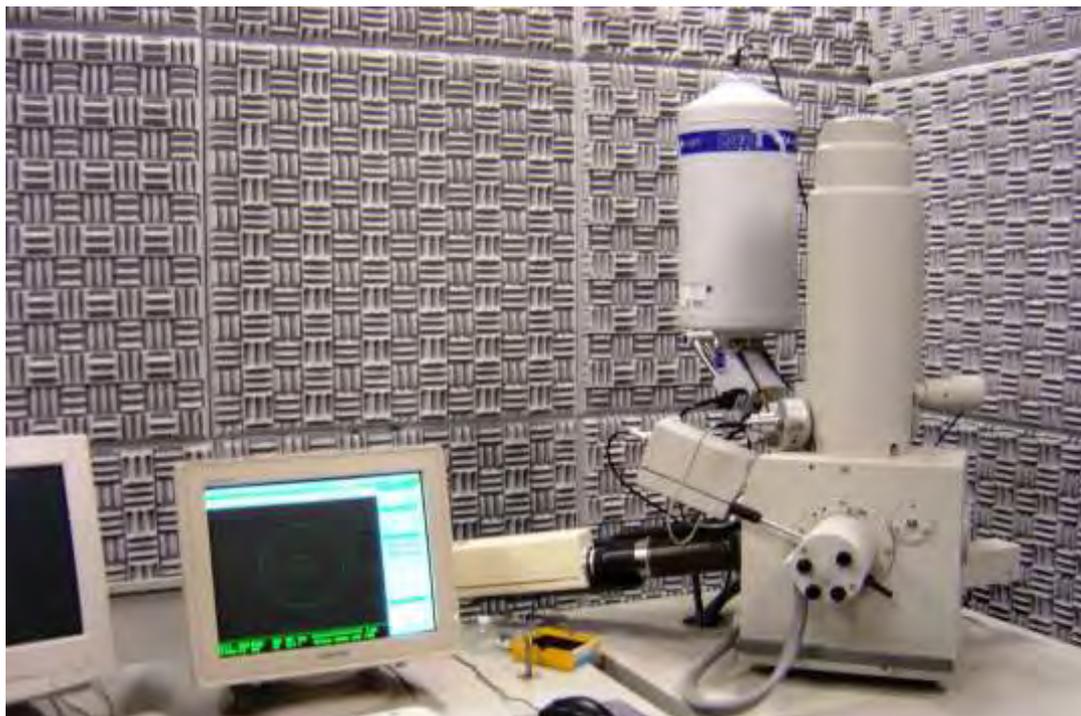


Figura 10- Microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30 FEG.

3.3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica foi realizada no Laboratório de Imagens de Materiais-Laboratório de Análise de Superfície (LAIMAt-LAS), da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG/UNESP) utilizando um microscópio de força atômica, marca Shimadzu, modelo SPM-9600. A varredura foi realizada em modo intermitente, com frequência de 0,5 Hz, em área de 2,0 x 2,0 μm . A microscopia de força atômica também foi utilizada para obter a rugosidade da superfície de cada amostra.

3.3.3 MEDIÇÕES DE ÂNGULO DE CONTATO

Estudos do ângulo de contato (θ) foram realizados no Laboratório de Imagens de Materiais- Laboratório de Análise de Superfície (LAIMAt-LAS), da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG/UNESP) utilizando um goniômetro (marca KRUSS-modelo DSA100). Onde se fez o emprego de uma seringa para liberar volumes iguais (2,0 μl) do líquido (água deionizada) na superfície das amostras. O equipamento possui uma câmera, que captura a imagem da gota sendo depositada sobre a amostra. O perfil dessa gota é determinado por um programa de computador que calcula o ângulo de contato das superfícies. Quando esse ângulo é menor que 90°, diz-se que o material possui uma característica hidrofílica; quando é maior que 90°, esse possui uma característica hidrofóbica. Essa propriedade é denominada molhabilidade do material, e está ligada com a energia de superfície do material.

3.3.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Este método faz uso de raios X de comprimento de onda conhecidos para determinar os espaçamentos dos planos cristalinos desconhecidos. Os raios X são ondas eletromagnéticas de alta energia e pequeno comprimento de onda. Quando o feixe de raios X atinge os átomos do material a ser analisado, seus elétrons são acelerados e passam a reemitir radiação com a mesma energia (mesmo comprimento de onda), porém em todas as direções. Se os átomos estiverem num arranjo periódico, as ondas

sofrerão interferência, ou seja, ocorre uma reflexão apenas em certos ângulos de incidência e reflexão.

Para a identificação das fases presentes na liga Ti-30Ta e das fases formadas após a reação da liga com NaOH , imersão em SBF e imersão em SBF seguida de incorporação de alendronato de sódio foi utilizado o Equipamento Siemens D5005 pertencente ao laboratório de Caracterização Estrutural – LCE, da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar como mostra a figura 11.



Figura 11- Difratorômetro de raios X.

3.4 CONFECCÃO DOS IMPLANTES

A usinagem dos implantes (2,0 mm de diâmetro e 2,5 mm de comprimento) foi realizada em uma oficina mecânica terceirizada a qual possui equipamentos necessários para a usinagem de peças pequenas. Essas medidas foram preconizadas por (OLIVEIRA, 2012). Brevemente, essas medidas foram escolhidas porque foi observado em estudos prévios que os implantes do mercado possuem espessura mínima de 3,3 mm

e 8,0 mm de altura, e o fêmur do rato possui uma espessura média uniforme de 4,0 mm, sendo necessária a fabricação de implantes sob medida. Devido à dificuldade no manuseio dos implantes durante a fase cirúrgica, foi confeccionado um montador específico em Teflon® com diâmetro de 5,0 mm e 10,0 mm de comprimento em torno convencional, com o cuidado de usinar uma ponta ativa com diâmetro de 0,9 mm sendo esta a espessura de hexágono interno do implante. Os implantes obtidos foram submetidos ao tratamento de superfície similar aos discos do Grupo 2, pois foram observados melhores resultados na caracterização de superfície dos discos nesse grupo.

3.4.1 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DOS IMPLANTES

Os implantes foram divididos em três grupos com 5 implantes cada, o primeiro grupo sem tratamento (grupo controle), o segundo grupo com tratamento biomimético e o terceiro grupo com tratamento biomimético seguida de incorporação de alendronato de sódio por 7 dias.

Cada implante foi imerso em 30 ml de solução SBF 5x, em tubo de fundo cônico. Os tubos foram colocados em uma mesa agitadora (Quimis) a 36,5 °C com rotação de 175 rpm durante 24 horas. Após esse período os implantes foram retirados, lavados com água destilada e secos em estufa a 50°C por 24 horas. Em seguida foi diluído 4g de alendronato de sódio em 1000 ml de SBF 5x, cada implante foi imerso em 30 ml dessa solução, em tubo de fundo cônico. Os tubos foram colocados na estufa (Quimis) a 37°C e ficaram sem agitação durante 7 dias, realizando troca da solução de 48/48 horas. Na Figura 12 é possível observar a sequência empregada para tratamento de superfície dos implantes.

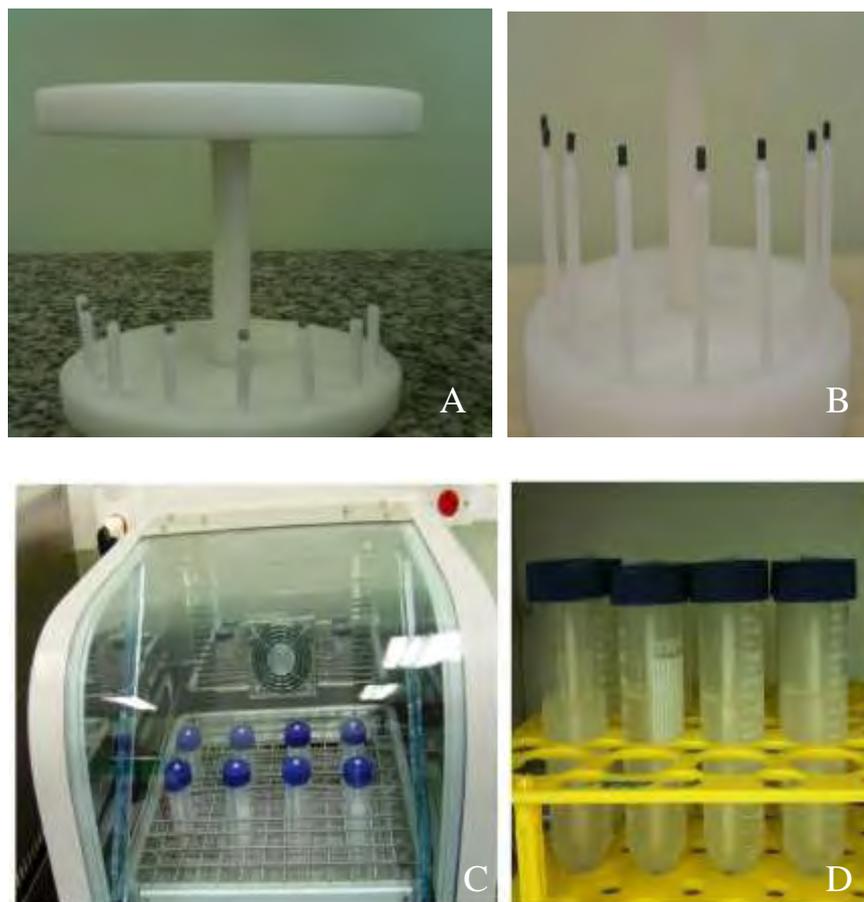


Figura 12 – Sequência empregada para tratamento de superfície dos implantes: a) implantes no montador confeccionado para auxílio da técnica; b) implantes após o tratamento alcalino; c) montagem dos tubos de fundo cônico em uma mesa agitadora (Quimis) para imersão em SBF 5x; d) Implantes durante o procedimento de incorporação de alendronato de sódio.

Após o tratamento de superfície cada montador foi acoplado a um implante e o conjunto montador/implante armazenado em envelopes para posterior esterilização com radiação gama (IPEN-CNEN/SP).

3.4 ESTUDO IN VIVO – CIRURGIA E INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Inicialmente, o projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Bioética Animal da Faculdade de Odontologia campus de Araçatuba (UNESP) com registro sob Processo nº 2012-00265.

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), fêmeas, com 45 dias de vida e peso aproximado entre 250-300 gramas. Durante todo o experimento, os animais

foram mantidos no biotério da UNESP campus da Araçatuba onde foram separados por grupo experimental em mini-isoladores e colocados em estante tipo rack. Para alimentação foi utilizada ração para ratos (Produtor S/A) e água à vontade. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tratamento de superfície realizado, conforme esquematizado na Figura 13.

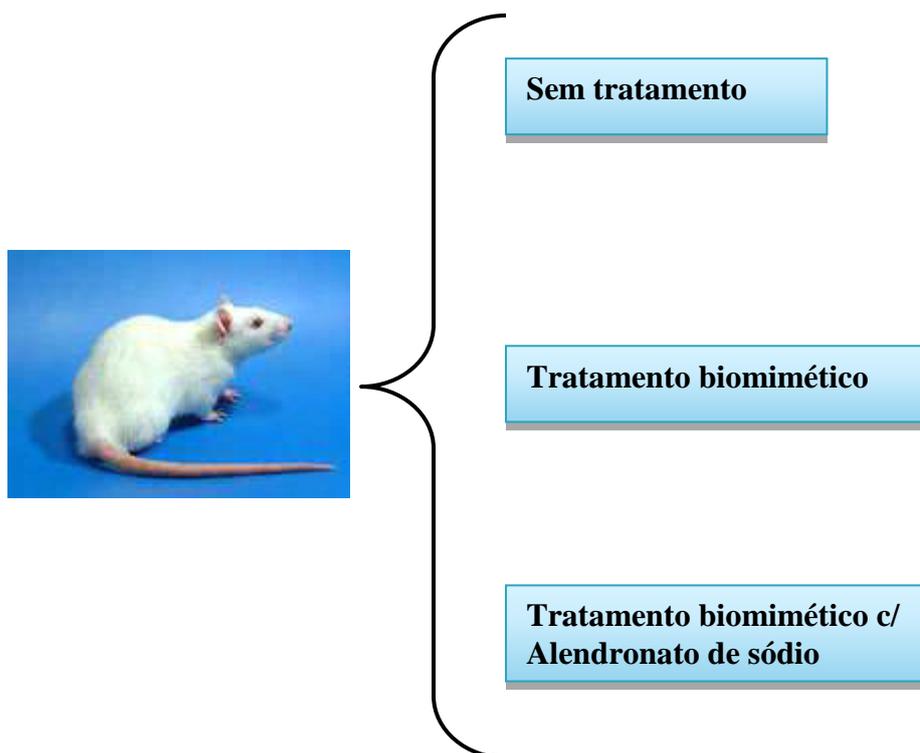


Figura 13- Representação dos grupos utilizados no trabalho.

Foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: conjuntos individualizados e estéreis compostos por cabo de bisturi Bard-Parker nº3, lâmina para bisturi de aço inoxidável descartável nº11, fio de seda montado nº4 descartável, porta-agulha Mayo Eger de 12 cm, pinça anatômica de Halsted, pinça de Adson Braum, tesoura para corte de fio de sutura, tesoura de Metzemaum curva de ponta romba, pinça hemostática, régua em aço inoxidável milimetrada, contra ângulo 16/1 NSK e compressas de gaze. Todo material, foi esterilizado em autoclave sob pressão de 1 atm a uma temperatura de 121°C, durante vinte minutos (CARDOSO et al.,1993 in OLIVEIRA, 2012).

Doze horas antes da intervenção cirúrgica os animais foram submetidos á dieta zero. Todos os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de Xilazina/Cetamina nas concentrações de 75-100 mg/kg 10 mg/kg de peso corporal para a Cetamina e Xilazina, respectivamente. Após tricotomia e assepsia do local da cirurgia com PVPI (Polvidine), foi feito o acesso cirúrgico, com bisturi de Lâmina 11 e divulsão dos tecidos com afastador de Volkmann e preparo do leito para receber os implantes.

A técnica de implantação realizada foi por meio de um motor cirúrgico (Adiel-Ribeirão Preto-SP) e um contra ângulo com redução de 16/1(NSK), sob irrigação. Primeiramente, foi realizada uma perfuração com uma broca helicoidal de 2,0mm de diâmetro (Neodent), sempre sob irrigação indireta realizada com soro fisiológico para evitar aquecimento do leito ósseo. A colocação do implante foi então realizada seguindo o protocolo de Branemark (1998) com montador especificamente confeccionado para a pesquisa. Na figura 14 é possível observar a sequência empregada para instalação dos implantes.

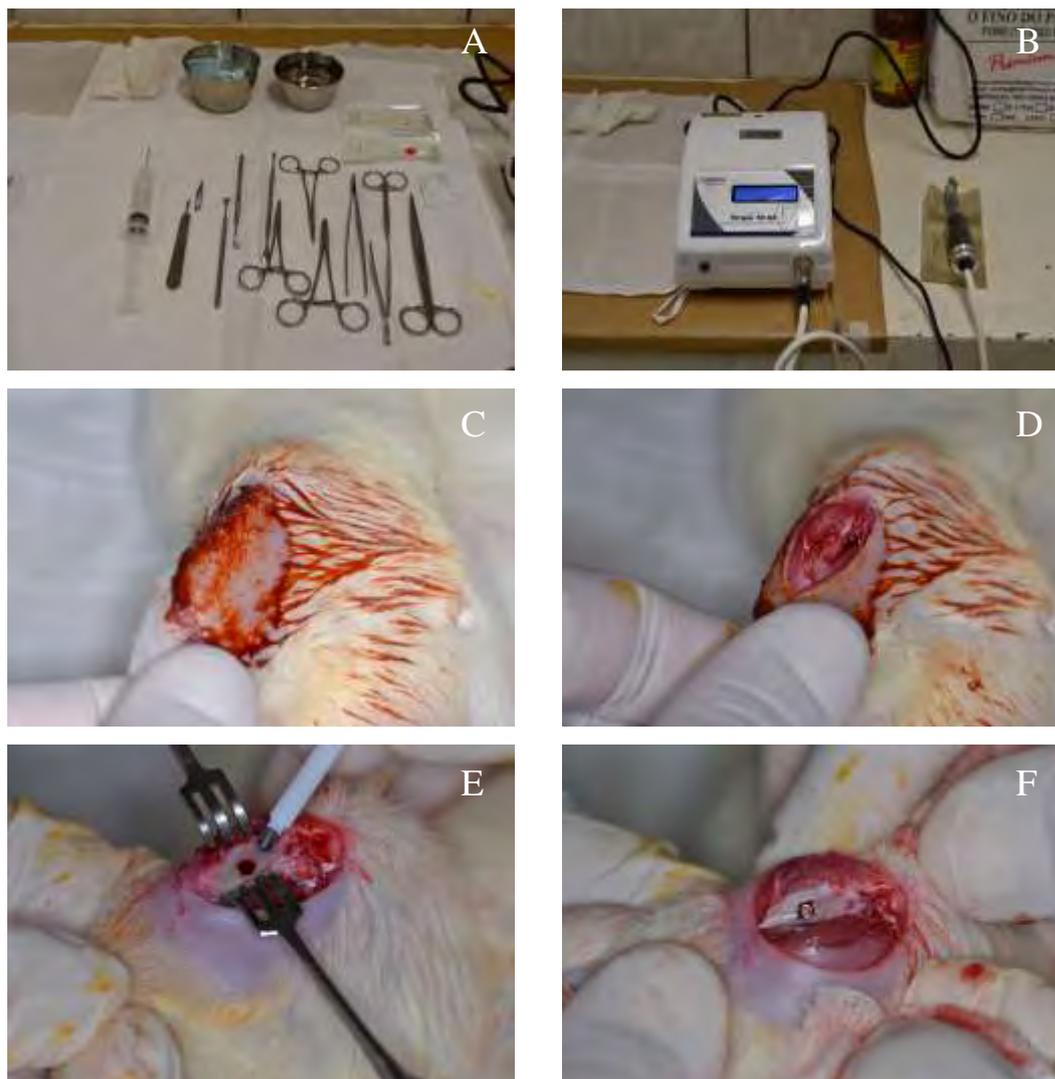


Figura 14- Sequência empregada para instalação dos implantes: A) montagem da mesa cirúrgica; B) motor cirúrgico; C) assepsia; D) afastamento do tecido; E) colocação dos implantes no fêmur dos animais; F) implante instalado.

Após a instalação dos implantes, foi realizado o fechamento dos tecidos com porta agulha e fio de sutura de seda 4,0. Seguindo o cronograma previamente estabelecido foi realizada a eutanásia dos animais.

3.4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As áreas de interesse foram incisadas, dissecadas e as peças operatórias foram armazenadas em formalina 10%. Após armazenagem a fixação em formol, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas com álcool, tratadas com

acetona 100% (para desengordurar), embebidas em resina poliéster e após a cura da resina cortadas em fatias finas em uma cortadora de precisão (Isomet). Após o corte as fatias foram fixadas em lâminas de plástico transparentes com cola cianocrilato e lixadas com lixas de carbeto de silício em uma politriz até atingirem uma espessura de 20 μm . As amostras foram avaliadas em microscópio óptico no Departamento de Materiais, Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, UNESP.

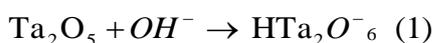
CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

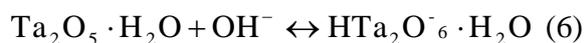
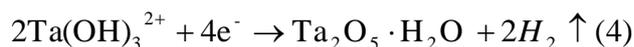
Nesse estudo inicialmente foram avaliados dois grupos para a liga Ti30Ta em função do tratamento de superfície realizado: Grupo 1 (G1) onde foi realizado o tratamento alcalino seguido de tratamento térmico com a incorporação do medicamento simultânea a imersão em SBF por 24 horas e Grupo 2 (G2) as amostras foram submetidas ao tratamento biomimético e só então foram imersas em solução contendo SBF e alendronato de sódio (7 dias). Foi realizada a caracterização da superfície nas amostras em todas as etapas do tratamento, ou seja, após tratamento alcalino, tratamento alcalino e térmico, imersão em SBF, imersão em alendronato (G1) e imersão em alendronato (G2).

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

O tratamento alcalino seguido de tratamento térmico foi realizado para os dois grupos avaliados. De acordo com Zhou et al. (2005) ligas com composição igual ou superior a 30%p de tântalo exibem a formação de óxido de tântalo em sua superfície (Ta_2O_5). Dessa forma, devido a formação preferencial dessa camada de óxido, quando a liga a liga Ti30Ta for imersa em NaOH exibirá o mesmo comportamento apresentado por tântalo comercialmente puro. Brevemente, a camada passiva de óxido de tântalo reage primeiro com a solução de NaOH.



Em seguida o substrato metálico de tântalo reage com o NaOH como segue:



Formando tantalato hidratado carregado negativamente que incorpora íons Na^+ para manter a neutralidade elétrica. Como resultado é formada uma camada de tantalato de sódio na sua superfície. Que assume a forma de uma fase amorfa em concentrações

baixas de NaOH e fases cristalinas em concentrações elevadas de NaOH (MIYAZAKI et al, 2000).

Na Figura 15 é possível observar as micrografias das amostras após a realização do tratamento alcalino seguido de tratamento térmico (300 °C) (Fig. 15b) comparadas as amostras do grupo controle (apenas lixadas) (Fig. 15a). Com a realização do tratamento alcalino houve a formação de uma camada porosa de tantalato de sódio hidrogel amorfa que se manteve após tratamento térmico conforme verificado na análise por difração de raios-X (Fig. 16).

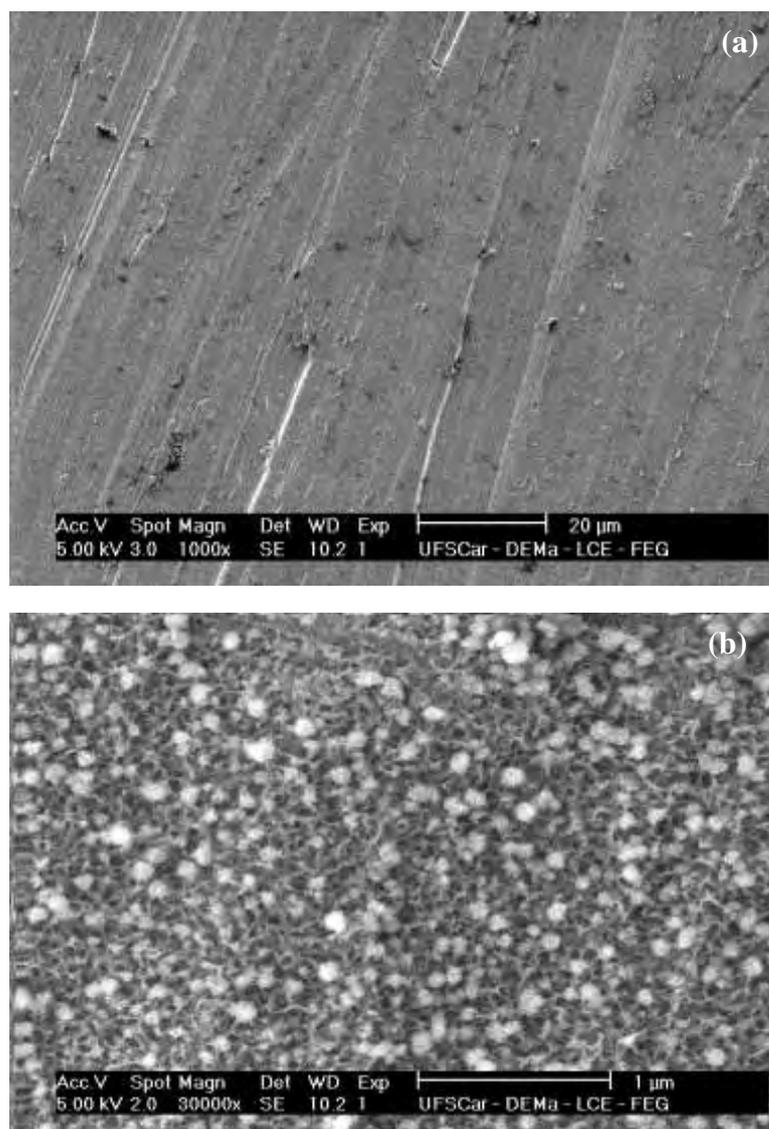


Figura 15 – Micrografias da superfície da liga Ti-30Ta: (a) controle; (b) após tratamento de superfície alcalino seguido de tratamento térmico a 300°C.

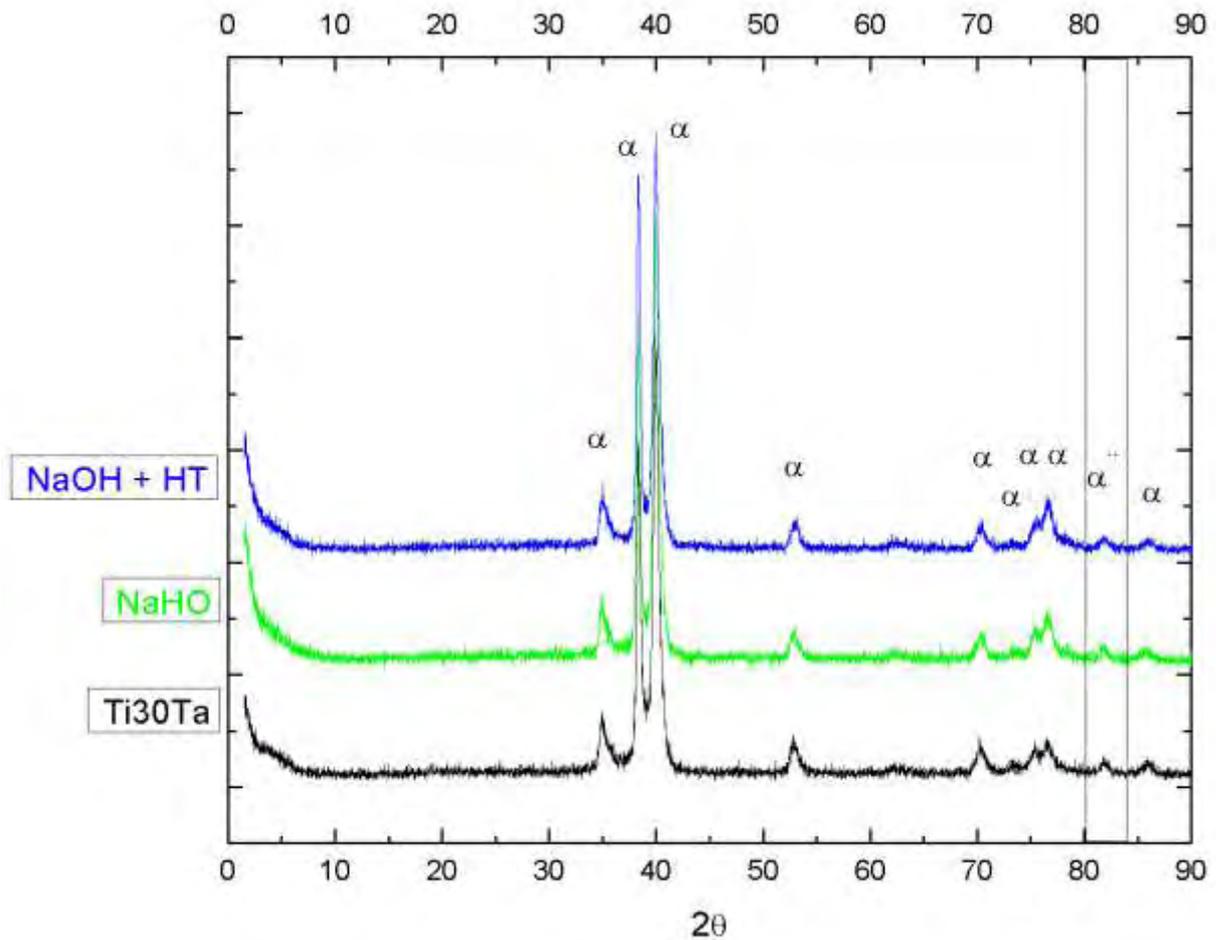


Figura 16 - Análise por difração de raios X para as condições: controle, NaOH, NaOH + HT.

O mesmo comportamento verificado para a liga Ti-30Ta foi observado para o tântalo puro por Miyazaki et al. (2000). A calcinação das amostras não possibilitou a cristalização do tântalato de sódio porém uma superfície extremamente porosa e responsável pela biotividade da liga foi formada.

Conforme a metodologia adotada após a realização do tratamento alcalino as amostras foram divididas em dois grupos para incorporação do alendronato de sódio. Na Figura 17 é possível observar a micrografia da superfície da amostra após imersão por 24 horas em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio. A superfície das amostras do grupo 2, ou seja, amostras imersas em solução SBF 5x por 24 horas mais imersão em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio por 7 dias, pode ser observada na Figura 18.

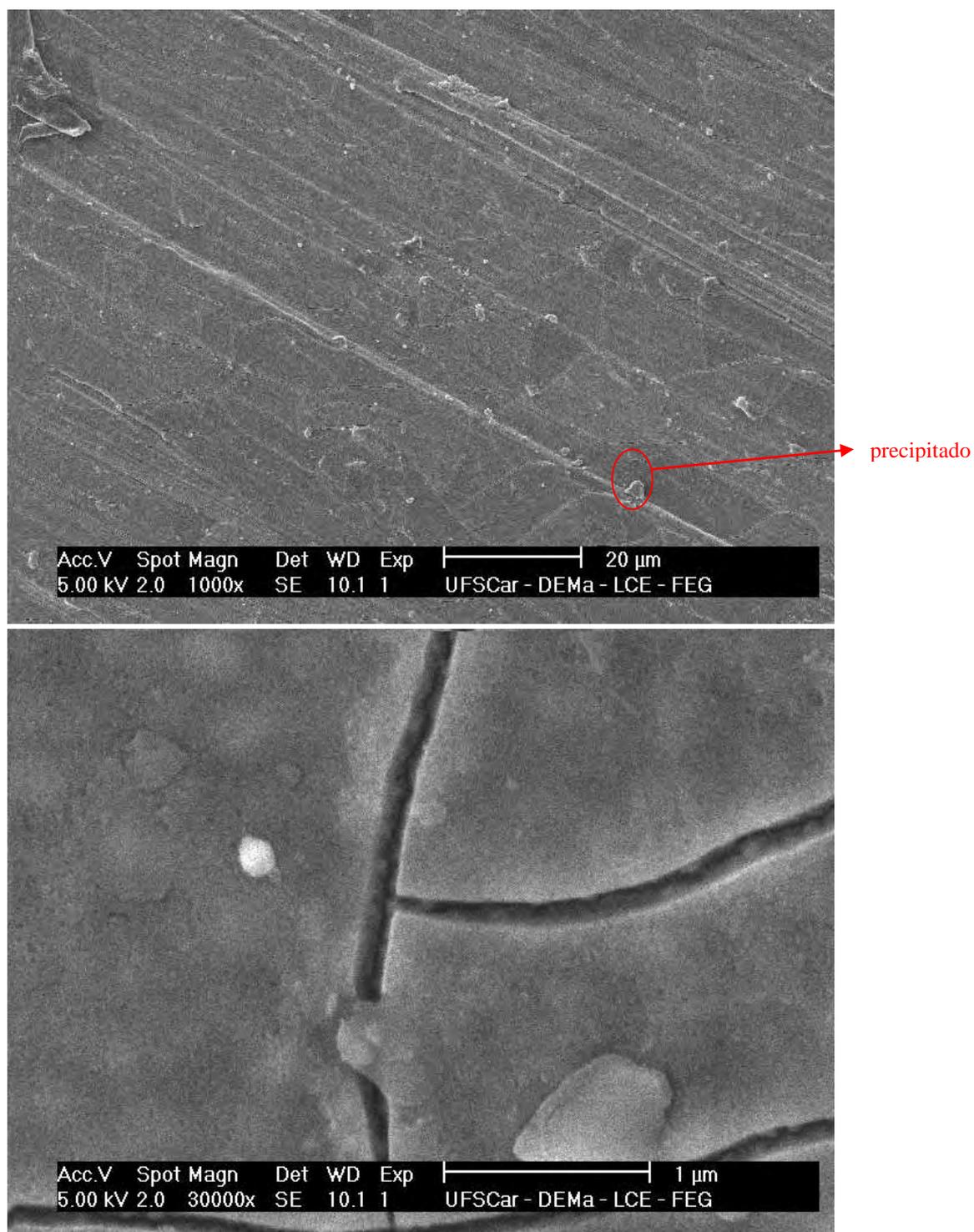


Figura 17 - Micrografia da superfície das amostras após imersão por 24 horas em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio.

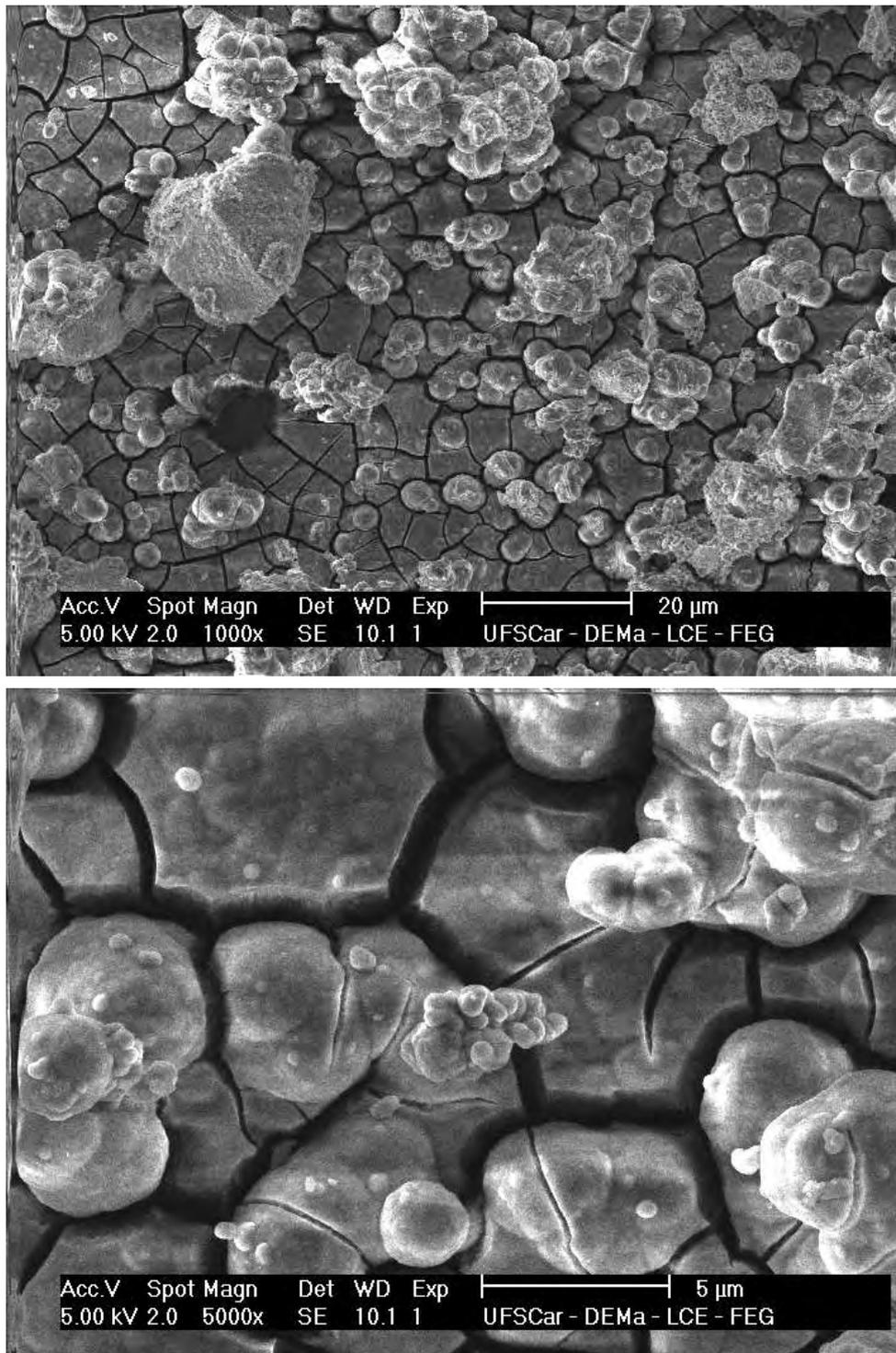


Figura 18- Micrografia da superfície das amostras imersas em solução SBF 5x por 24 horas mais imersão em solução SBF 5x contendo alendronato de sódio por 7 dias.

Nas imagens se verifica que após a imersão das amostras em solução SBF 5x com alendronato de sódio por um período de 24 horas ocorreu a formação de algumas regiões contendo precipitados formados por apatita e alendronato de sódio e não uma camada uniforme, como foi observado para as amostras do Grupo 2, submetidas a imersão em SBF 5x por 24 horas e por sete dias em solução contendo alendronato de sódio. Essa diferença nos resultados encontrados de acordo com as metodologias de incorporação empregadas pode ser atribuída à dissolução da camada de apatita devido à presença do alendronato de sódio na solução. Oliveira et al. (2009) verificaram a dissolução parcial na superfície da camada CaP na presença de soluções contendo elevadas concentrações de bisfosfonatos e além disso a recipitação sob essas novas condições, que diferem daquelas apresentadas em SBF (composição, resistência iônica e tampão). Por outro lado, devido a essa elevada afinidade com os compostos Ca a incorporação da droga dentro da estrutura CaP leva a rearranjos dimensionais.

Na literatura estudos sobre incorporação de medicamentos associados ao uso de tratamento alcalino e biomimético foram realizados por Stiegter et al. (2004) visando a incorporação de antibióticos sendo que recentemente a incorporação de alendronato foi avaliada por Zhou et al. (2012).

4.1.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A análise por difração de raios X para as etapas realizadas é mostrada na figura 19. Observamos picos de apatita nas amostras imersas em SBF 5x e nas amostras imersas em SBF 5x seguida de incorporação de alendronato de sódio por 7 dias. Já nas amostras imersas em SBF juntamente com alendronato de sódio por 24 horas, não foi observado a presença do pico de apatita, confirmando que não houve formação do filme nas amostras desse grupo, o que pode ser observado nas imagens da figura 17, justificando a hipótese de que o alendronato interage com as moléculas do SBF removendo o filme biocerâmico da superfície da amostra.

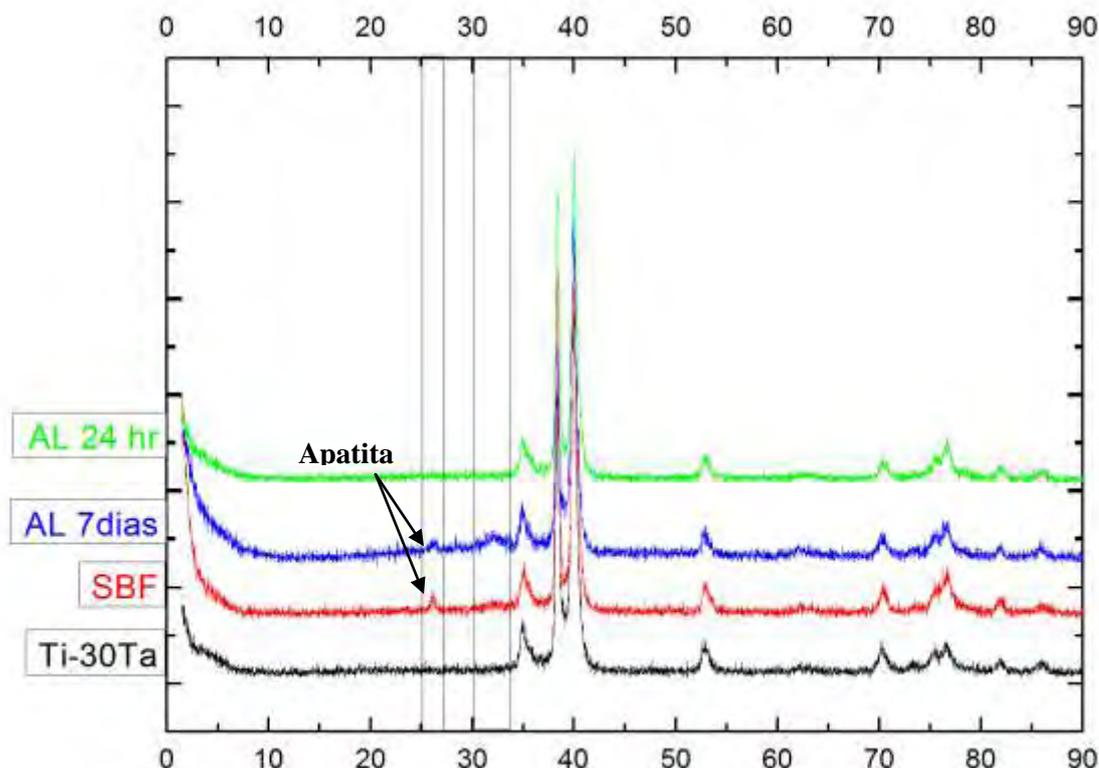


Figura 19- Análise por difração de raios X para as condições: controle, SBF, Alendronato 7 dias e Alendronato 24horas.

Os picos característicos correlacionados com a hidroxiapatita (PDF 9-432) existente em todos os materiais foi proposto por Segvich et al. (2009), estando por volta 2θ (plano cristalográfico familiar) = 25.9° (200), 31.8° (211), 34.0° (202), 39.8° (310), 46.7° (222), 49.4° (213), e 53.1° (401, 303).

No trabalho de Zhou et al. (2012), duas características principais na análise por difração de raios X são observadas. Em primeiro lugar picos proeminentes pertencentes ao revestimento de CDHA foram observadas em todas as amostras de Ti6Al4V com a presença de alendronato de sódio em 1,5x t-SBF. Em segundo lugar, foi possível observar um alargamento do pico CDHA em função do conteúdo de alendronato de sódio.

Fazendo uma comparação nos perfis de difração de raios-X é possível observar um ligeiro aumento do alargamento do pico em função do teor de alendronato, o que sugere que a adsorção de alendronato provoca um pequeno aumento na desordem dos picos (Boanini et al. 2007).

4.1.3. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A topografia da superfície foi observada empregando-se a microscopia de força atômica (AFM), sendo os dados processados com o software Shimadzu SPM (Scanning Probe Microscopy) off-line V.3.31. As amostras lixadas apresentaram uma superfície plana sendo que ocorreu uma diferença na topografia após tratamento alcalino (Fig. 20b). O tratamento biomimético levou a formação de uma camada de apatita em toda a extensão da amostra após imersão em SBF (Simulated Body Fluid) com o crescimento de aglomerados em algumas regiões, o que foi confirmado após análise em microscópio de força atômica (Fig. 20d). O mesmo foi verificado para as amostras após imersão em alendronato (Figura 21).

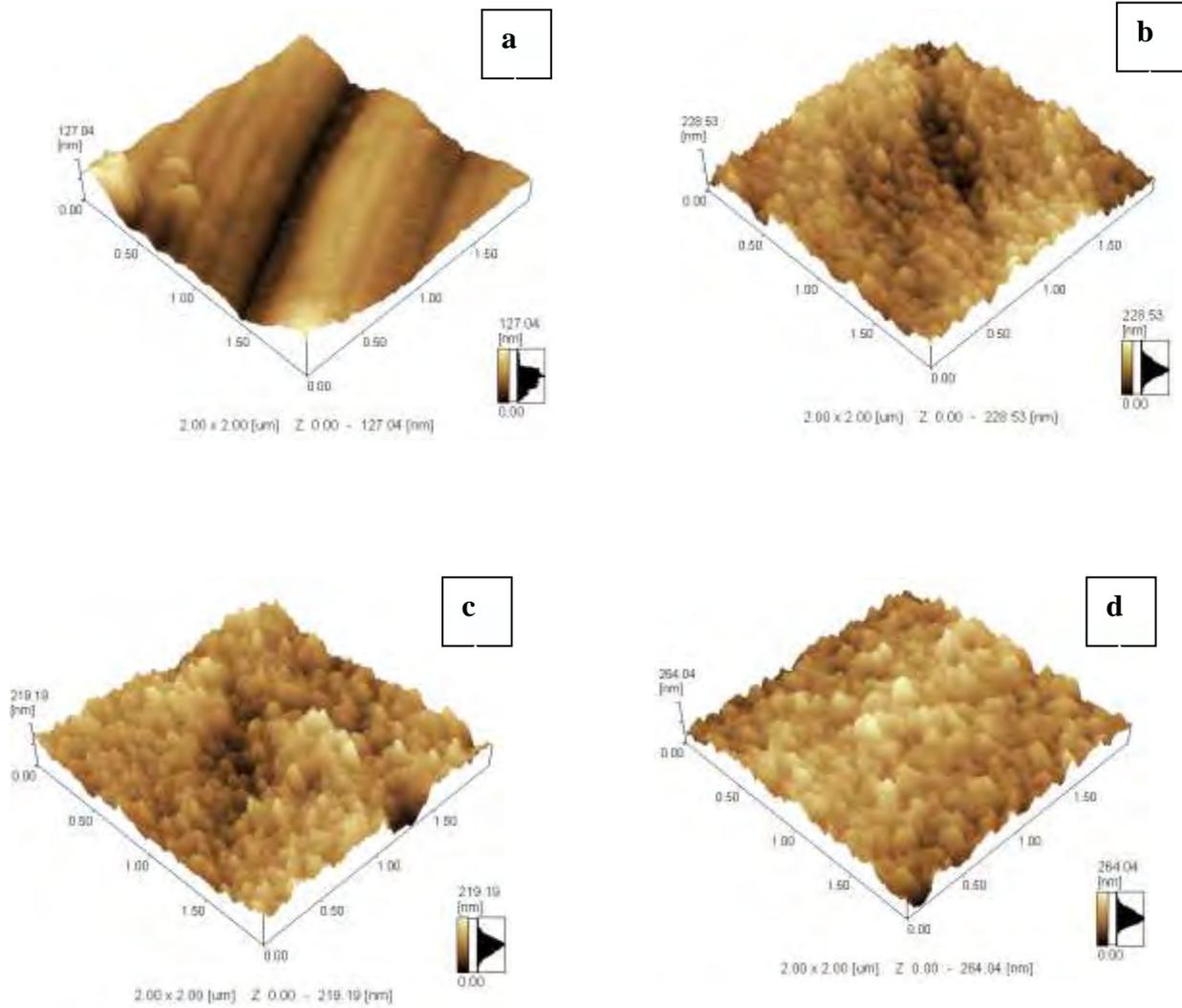


Figura 20 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de força atômica (AFM) da liga Ti-30Ta: a) Amostra lixada; b) Amostra após tratamento alcalino; c) Amostra após tratamento alcalino e tratamento térmico e d) SBF.

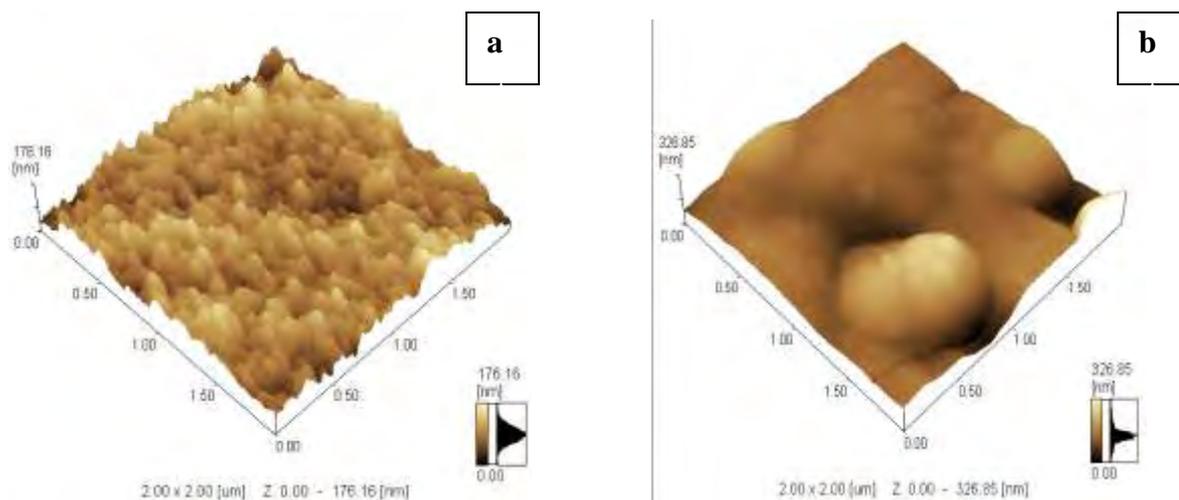


Figura 21 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de força atômica (AFM) da liga Ti-30Ta: a) Alendronato – 24 horas e b) Alendronato- 7 dias.

Os valores de rugosidade média (R_a), obtidos após análise das amostras em AFM, são apresentados na Tabela 1. Observa-se a proximidade dos valores para as amostras submetidas ao tratamento alcalino (59,49 nm) comparadas com o tratamento com alendronato 24 horas (54 nm). Esses resultados confirmam a teoria da retirada da apatita da superfície uma vez que após a imersão em SBF os valores de rugosidade foram de 22,34 nm.

Tabela 1- Valores de rugosidade média (R_a).

Amostras	Valores de rugosidade média (R_a) (nm)
Lixada	19,19
NaOH	59,49
NaOH + Tratamento térmico	25,25
SBF	22,34
Alendronato- 24 horas	54,00
Alendronato- 7 dias	31,27

4.1.4. MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO

Medidas de ângulo de contato foram avaliadas buscando relacionar esses valores com a hidrofiliabilidade proporcionada pela topografia de superfície. A hidrofiliabilidade é importante em aplicações biomédicas, pois superfícies hidrofílicas promovem melhor interação celular. A molhabilidade mede a energia das superfícies através do ângulo de contato de líquidos com a superfície. Os valores do ângulo de contato indicam se a superfície é hidrofílica ou hidrofóbica. A molhabilidade de uma superfície é amplamente dependente da energia de superfície e influencia o grau de contato com o meio fisiológico; aumentando a molhabilidade, aumenta a interação entre a superfície do implante e o meio biológico. Portanto, com baixo ângulo de contato (maior a molhabilidade), a taxa de ligação celular será alta, enquanto que com menos ligação celular, o ângulo de contato é alto e, conseqüentemente a molhabilidade será menor (LIM e OSHIDA, 2001).

Para caracterizar a molhabilidade das amostras determinou-se o ângulo de contato das superfícies dos discos de Ti-30Ta com água deionizada das amostras submetidas aos tratamentos superficiais com NaOH, NaOH + Tratamento térmico, SBF, SBF + Alendronato de sódio (24 horas) e SBF + Alendronato de sódio (7 dias). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.

De acordo com esses resultados verifica-se que as superfícies tratadas com SBF+ Alendronato de Sódio – 24 horas e com SBF+ Alendronato de Sódio – 7 dias indicaram ser menos hidrofílicas que as amostras com NaOH, NaOH + Tratamento térmico e SBF, ou seja, possuem menor molhabilidade. Dentre os valores encontrados, a superfície com maior molhabilidade foi a NaOH, que pode ser associada à presença das porosidades que absorveram líquido.

Tabela 2 – Valores de ângulos de contato

Condição da amostra	Medida do ângulo (°)	Aspecto da gota (água deionizada)
NaOH	14,8	
NaOH + Tratamento térmico	20,1	
SBF	24,4	
SBF+ Alendronato de Sódio – 24 horas	37,0	
SBF+ Alendronato de Sódio – 7 dias	32,3	

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O revestimento biomimético é uma técnica de tratamento de superfície que pode diminuir o tempo de osseointegração, diminuir a possibilidade de inflamação (diminuindo a infiltração de macrófagos) e impedir o encapsulamento de tecido fibroso o que ocasiona o insucesso de implantes (VASUDEVA et al. 2004).

Aplicando revestimentos biomiméticos de fosfato de cálcio (Ca-P) sobre a liga Ti6Al4V e tântalo poroso Barrère et al. (2003), encontraram como resultado que o contato osso-implante foi sempre mais elevado para os implantes revestidos com hidroxiapatita do que os implantes sem a cobertura.

Na figura 22 é possível observar a análise histológica dos implantes após trinta dias de inserção nos animais, esta bem definida a interface osso implante conhecida como BIC (Bone Interface Contact). Para os dois grupos avaliados ocorreu a osseointegração. No entanto, a partir da análise das imagens obtidas foi possível constatar que com o tratamento de superfície biomimético (Figura 22b) e a incorporação de alendronato de sódio por 7 dias (Figura 22c) ocorreu a formação de tecido ósseo (vermelho) ao longo de quase toda a rosca. Por outro lado, nos implantes sem tratamento de superfície observou-se a formação de regiões de tecido ósseo e de tecido conjuntivo.

Em estudos anteriores do nosso grupo, a interação osso/implante após tratamento biomimético foi avaliada para a liga Ti-7,5Mo (OLIVEIRA, 2012). Verificou-se também maior quantidade de tecido ósseo formado na interface após tratamento de superfície biomimético. Essa melhor interação devido ao tratamento foi abordada por Faeda et al. (2012) em seus estudos. De acordo com esses autores a presença de apatita na superfície do implante leva a formação de uma matriz para absorção, armazenagem, controle e liberação de BMP endogenamente produzidas o que leva a formação óssea local, permitindo uma ligação mais estável na interface osso/implante.

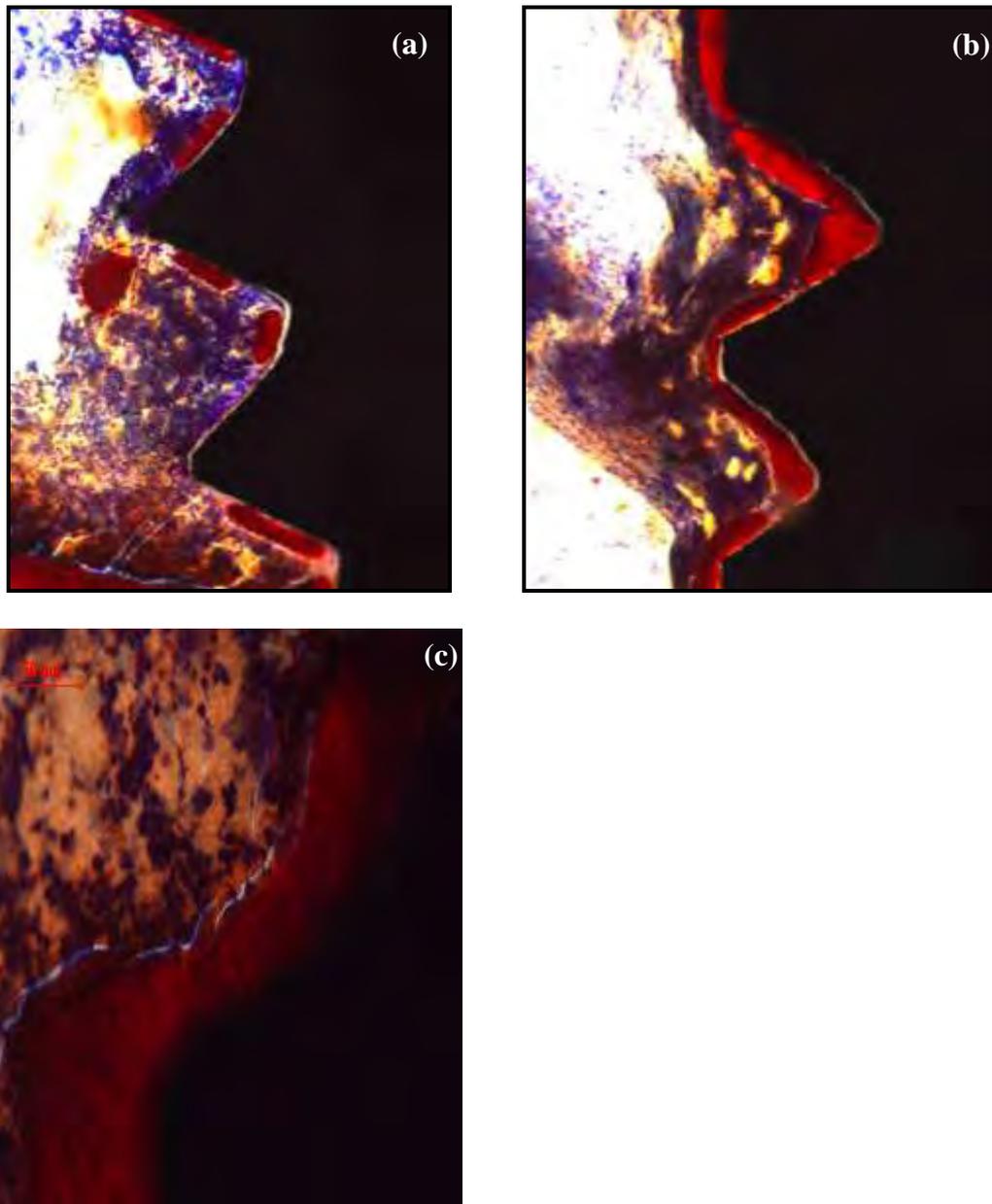


Figura 22- Interface Osso/implante: (a) grupo controle (sem tratamento de superfície) após trinta dias; (b) Após tratamento de superfície biomimético; (c) Após incorporação de alendronato de sódio por 7 dias.

Os bisfosfonatos, em especial o alendronato de sódio, tem sido amplamente utilizado no tratamento de doenças que alteram o metabolismo ósseo, apresentando resultados satisfatórios (MIGLIORATI et al., 2005). Entretanto, podem estar associados a efeitos adversos, dentre os quais se destaca a osteonecrose dos maxilares (MARX et al., 2005).

Em estudo prévio *in vivo*, ratos tratados com alendronato e submetidos à exodontias não desenvolveram osteonecrose, enquanto os tratados com ácido zoledrônico desenvolveram a lesão (MAAHS et al., 2011). Em nosso estudo não foi observada região de osso necrótico ao redor do implante, sendo esses imersos em alendronato de sódio por período de 7 dias.

Os efeitos dos bisfosfonatos na osseointegração de implantes foram avaliados por Duarte et al. (2005), os autores avaliaram se o alendronato pode influenciar o processo de cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em ratas ovariectomizadas. Os resultados desse estudo mostraram que o tratamento com alendronato e estradiol apresentaram efeitos positivos sobre a osseointegração. Eles concluíram que o alendronato pode impedir a influência negativa causada pela deficiência de estrogênio na cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em ratas ovariectomizadas.

Os resultados do nosso estudo mostraram os efeitos positivos e uma melhora na osseointegração devido à incorporação de alendronato de sódio ao revestimento biomimético na liga experimental Ti-30Ta. Isto pode ser explicado pelo potente efeito inibidor da reabsorção óssea relacionado ao alendronato de sódio.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos a partir da caracterização da superfície da liga e o estudo *in vivo* em ratos dos implantes foi possível concluir que:

- a) A incorporação do medicamento empregando solução SBF 5x e alendronato de sódio por 24 horas inibiu a formação da camada de apatita. O alendronato de sódio quando em contato com o SBF, reage com suas moléculas e não forma filme biocerâmico na superfície da liga.
- b) Nesse estudo o método mais indicado para a formação de superfícies osteocontutoras na liga experimental Ti-30Ta é realizar primeiramente o tratamento de superfície biomimético e em seguida a imersão em alendronato de sódio por 7 dias.
- c) A associação do alendronato de sódio ao revestimento biomimético foi eficaz para o tratamento de superfície de implantes dentários confeccionados a partir da liga experimental Ti-30Ta, melhorando o processo de osseointegração, sem a formação de tecido conjuntivo fibroso ao redor dos implantes.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of Mater Science: Materials in Medicine**. V.1, p. 233-238, 1990.
- ALAKANGAS, A. et al. Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. **Calcif. Tiss. Int.** v.70, n.1, p.40-7, 2002.
- ALVES, A. P. R. Preparação de materiais compósitos in situ a partir de ligas eutéticas nos sistemas Nb-Al-Ti e Nb-Al-Cr. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. **Tese de doutorado**, 1998.
- AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Brás Patol Med Lab**.V. 42, n.1, p. 5-12, 2006.
- BARRERE, F. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. **Biomaterials**. v. 23. p. 1921-1930. 2002.
- BARRÈRE, F.; VAN DER VALK, C.M.; MEIJER, G.; DALMEIJER, R.A.J.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Osteointegration of Biomimetic Apatite Coating Applied onto Dense and Porous Metal Implants in Femurs of Goats. **Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**.V. 67B, p. 655–665, 2003.
- BINYAMIN, G.; SHAFI, B.M.; MERY, C.M. Biomaterials: A primer for surgeons. **Seminars in Pediatric Surgery**. V. 15, p. 276-283, 2006.
- BOANINI, E.; GAZZANO, M.; RUBINI, K.; BIGI, A. Composite Nanocrystals Provide New Insight on Alendronate Interaction with Hydroxyapatite Structure. **Adv. Mater**. V.19,p. 2499–2502, 2007.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**.V.8, p.1401–1421, 2012.
- BRAMA, M. ; RHODES, N.; HUNT, J.;RICCI, A.; TEGHIL, R.;MIGLIACCIO, S.; DELLA ROCCA, C.; LECCIOTTI, S.;LIOI, A.; SCANDURRA, M.; DE MARI, G.; FERRO, D.;PU, F.; PANZINI, G.;POLITI, L.;SCANDURRA, R. Effect of titanium carbide coating on the osseointegration response in vitro and in vivo. **Biomaterials**,v. 28, n.4, p. 595-608, 2007.
- BRANEMARK , P. L. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. L. Experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg**. v.3, p.81-100, 1969.
- BREME, J.; WADEWITZ, V. Comparison of titanium- tantalum and titanium- niobium alloys for application as dental implants. **The international Journal of Oral e Maxillofacial implants**. V. 4, n.2, p.113-118, 1989.

CARDOSO, A. et al. Manual sobre manifestações bucais e controle de infecção. **Caderno de Saúde Bucal** 3. Rede CEDROS, São Paulo, 1993.

DUAN, K., WANG, R. Surface modifications of bone implants through wet chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 2309-2321, 2006.

DUARTE, P.M.; GURGEL, B.C.V.; SALLUM, A.W.; FILHO, G.R.N.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F.H.J. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. **J Periodontol**. V. 76, p.107-114, 2005.

EHRENFEST, D.M.D.; COELHO, P.G.; KANG, B.S.; SUL, Y.T.; ALBREKTSSON, T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in Biotechnology**.V. 28, n.4, p.198-206, 2010.

EISENBARTH, E. et al. Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**. V 25, p. 5705-5713, 2004.

ESCADA, A.L.A.; OLIVEIRA, J.A.G.; SCHNEIDER, S.G.; MATHOR, M.B.; REZENDE, M.C. R.A.; CLARO, A.P.R A. Bone response to calcium phosphate-coated and alendronate sodium immobilized titanium implants. **Anais The 6th Latin American Congress of artificial organs and Biomaterials**.2010.

FAEDA, R.S.; SPIN-NETO, R.; MARCANTONIO, E.; GUASTALDI, A. C.; MARCANTONIO JR, E. Laser Ablation in Titanium Implants Followed by Biomimetic Hydroxyapatite Coating: Histomorphometric Study in Rabbits. **Microscopy Research and Technique**.V. 75, p.940-948, 2012.

FLEISCH, H. Bisphosphonates:mechanism of action.**Endocr Rev**.v.19, n.1,p.80-100,1998.

FUKUDA, A. et al. Bone bonding bioactivity of Ti metal and Ti–Zr–Nb–Ta alloys with Ca ions incorporated on their surfaces by simple chemical and heat treatments. **Acta Biomaterialia**.V. 7 , p.1379–1386, 2011.

GARBUZ, D.S. et al. Enhanced gap filling and osteoconduction associated with alendronate- calcium phosphate- coated porous tantalum. **J Bone Joint Surg Am**.V. 90, p.1090-1100, 2008

GEETHA, M., SINGH, A.K., ASOKAMANI, R., GOGIA, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review.**Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397 - 425, 2009.

HABIBOVIC, P., BARRÉRE, F., VAN BLITTERSWIJK, C.A., GROOT, K., LAYROLLE, P. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. **Journal of the American Ceramic Society**, Holanda, v.85, n.3, p.517-522, mar., 2002.

JALOTA, S.; BADURI, S. B.; TAS, A.C. Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** .V. 17, n. 8 , p. 697-707, 2006.

KIM, H.M., MIYAJI, F., KOKUBO, T., NAKAMURA, T. Preparation of Bioactive Ti and its Alloys via Simple Chemical Surface Treatment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, p. 409-417, 1996.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMRO, T. Solutions Able to Reproduce *In Vivo* Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramics A-W3. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 24, p.721-34, 1990.

KOKUBO, T., TAKADAMAN, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. **Biomaterials**. Bruxelles, v.27, n.15, p.2907-2915, jan., 2006.

LE GUÉHENNE, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**. V. 23,p. 844-854, 2007.

LI, F.; FENG, Q. L.; CUI, F.Z.; LI, H.D.; SCHUBERT, H. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. **Surface and coating Technology**.V.154, p. 88-93, 2002.

LIM, Y. J.; OSHIDA, Y. Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials. **Biomedical materials and engineering**. p.1-17, 2001.

LIN, C. YEN, S. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. **Materials Science and Engineering**. v. 26. p. 54-64. 2006.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties.**Bone**.v. 18, n.2, p. 75-85, 1996.

LIU, X., CHU, P.K.,DING,C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering R**, Nova York, v.47, n.3-4, p. 49-121, dez. 2004.

LONG, M.; RACK, H.J.Titanium alloys in total joint replacement a materials science perspective. **Biomaterials**. Bruxelles, v.19, n.18, p.1621-1639, set., 1998.

MA, J.; WONG, H.; RONG, L.B.; PENG, K.W. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. **Nanotechnology**. V. 14, p. 619-623, 2003.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basis regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev**. v. 21, p.115-37, 2000.

MARECI, D.; CHELARIU, R.; GORDIN, D-M; UNGUREANU, G.; GLORIAN, T. Comparative corrosion study of Ti-Ta alloys for dental applications. **Act Biomaterialia**. V. 5, p. 3625-3639, 2009.

MERAW,S.; REEVE, C.M.; WOLLAN, P.C. Use of alendronate in peri-implant defect regeneration.**J. Periodontal**.v.70,n.2, p.151-8, 1999.

MAAHS, M.P.; AZAMBUJA, A.A.; CAMPOS, M.M.; SALUM, F.G.; CHERUBINI, K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in wistar rats. **Head Neck** .V. 33, n.2, p.199-207, 2011.

MARX, R.E. et al. Bisphosphonate induced exposed ONMABe (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factoris, recognition, prevention and treatment. **J.Oral Maxillofac.Surg.** Philadelphia. V.63, n.11, p. 1567-1575, 2005.

MIGLIORATI, C.; CASIGLIA, J.; EPSTEIN, J.; JACOBSEN, P.; SIEGEL, M.; WOO, S. Managing the care of patients with bisphosphonate associated osteonecrosis. **Jada**.V. 136, p.1658-1668, 2005.

MIYAZAKI, T.; KIM, H.M.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T.; OHTSUKI, C.; KATO, H.; NAKAMURA, T. Bioactive tantalum metal prepared by NaOH treatment. **Journal of Biomedical Materials Research**.v.50, p.35-42, april, 2000.

MIYAZAKI, T.; KIM, H.M.; KOKUBO, T.; OHTSUKI,C.; KATO, H.; NAKAMURA, T. Enhancement of bonding strength by graded structure at interface between apatite layer and bioactive tantalum metal. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. V13, p.651-5, 2002.

MORITA, A.; FUKUI, H.; TADANO, H.; HAYASHI, S.; HASEGAWA, J.; NIOMI, M. Alloying titanium and tantalum by cold levitation melting (CCLM) furnace. **Mater Sci and Eng**.V. 280, p. 208-213, 2000.

MOUHYI, J.; EHRENFEST, D.M.D.; ALBREKTSSON, T. The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, microstructure, and physicochemical aspects. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**.V. 4, n.2, p. 170-183, 2012.

NIINOMI, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloy. **Materials Science and Engineering**. V. 243, p. 231- 236, 1998.

OH, K; SHIM, H; KIM, K. Properties of titanium- siliver alloys for dental applications. **J. Biomed. Mater Res Parte B: Appl Biomater** .v.74B, p.649-658, 2005.

OLIVEIRA, A.L.; PEDRO, A.J.; ARROYO SAIZ, C.; MANO, J.F.; RODRIGUEZ, G.; ROMAN SAN, J.; REIS, R.L. Biomimetic Ca-P Coatings Incorporating Bisphosphonates Produced on Starch-Based Degradable Biomaterials. **Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**.V.92B, p.55-67, 2009.

OLIVEIRA, J.A.G. Efeito do tratamento de superfície na Osseointegração de Implantes dentários da liga Ti-7,5Mo.Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, **Tese de doutorado**. 2012.

OYANE, A.; KIM, H.M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **J Biomed Mater Res Part. A**. V. 65, n.2, p. 189-195, 2003.

PANZAVOLTA, S.; TORRICELLI, P.; BRACCI,B.; FENI, M.; BIGI, A. Functionalization of biomimetic calcium phosphate bone cements with alendronate. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 104, p. 1095-1106, 2010.

PULEO, D. A.; NANCI, A. Understanding and controlling the bone implant interface. **Biomaterials**. V. 20, p. 2311-2321, 1999.

PURCEK, G.; SARAY, O.; KUL, O.; KARAMAN, I.; YAPICI, G.G.; HAOUAOUI, M.; MAIER, H.J. Mechanical and wear properties of ultrafine-grained pure Ti produced by multi-pass equal-channel angular extrusion. **Materials Science and Engineering**, v. 517, n1-2, p.97-104, ago, 2009.

QU, H.; WEI, M. The effect of temperature and initial pH on biomimetic apatite coating. **Journal of Biomed Mater Res Parte B: Appl. Biomater**. V. 87, n.1, p.204-212, October, 2008.

RACK H.J., QAZI J.I. Titanium alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**. v. 26, p.1269-77, 2006.

REDDY, M.S.; WEATHERFORD, T.W.; SMITH, C.A.; WES, B.D.; JEFFCOAT, M.K.; JACKS, T.M. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. **J Periodontol**. v. 66, p. 211-7, 1995.

RODAN, G.A.; FLEISH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J. Clin. Invest**. V. 97, n. 12, p. 2692-2696, 1996.

RUGGIERO, S.L.; MEBROTRA, B.; ROSENBERG, T.J.; ENGROFF, S.L. Osteonecrosis of the Jaws associated with the use of Bisphosphonates: A review of 63 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg**. V. 62, p.527-534, 2004.

RUPP, F.; SCHEIDELER, L.; OLSHANSKA, N.; DEWLD, M.; WIELAND, M.; GEIS-GESTTORFER, J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through modification of microstructured titanium implant surface. **J. Biomed Mater. Res.**, v.79, n.3, p. 752-54, 2006.

RUSSEL, R.G.G. Bisphosphonates: the first 40 years. Review. **Bone**. V. 49, p.2-19, 2011.

SATO, M.; GRASSER, W.; ENDO, N.; AKINS, R.; SIMMONS, H.; THOMPSON, D.D. Bisphosphonates Action: Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. **J. Clin. Invest**. v.88, n.6. p. 2095-2105, 1991.

SEGVICH, S.J.; SMITH, H.C.; KOHN, D.H. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. **Biomaterials**. V.30, p.1287-1298, 2009.

SKOGLUND, B.; HOLMERTZ, J.; ASPENBERG, P. Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. **J Orthop Res**. n.22, v.5, p.1108-13, 2004.

STIGTER, M.; BEZEMER, J.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. **Journal of Controlled Release**. V.99, p.127-137, 2004.

VASCONCELOS, D. V.; DUARTE, M.E., MAIA, R.C. Efeito anti- tumoral dos bisfosfonatos: uma nova perspectiva terapêutica. **Rev. Bras. Cancer.**v. 50, n.1, p.45-54, 2004.

VASUDEV, V. D.; RICCI, J.L.; SABATINO, C.; LI, P.; PARSONS, J.R. In vivo evaluation of a biomimetic apatite coating grown on titanium surfaces. **Inc. J Biomed Mater Res.** V. 69A, p.629–636, 2004.

VITTÉ, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**.n.6, v. 137, p. 2324-2333, 1996.

WATANABE, I.; TOPHAM, D.S. Tension Strength and elongation of laser – Welded Ti and Ti-6Al-7Nb. **J Biomed Mater Res. Part B: Appl Biomater.** v.71B, p46-51, 2004.

WILLIAMS, D. F. The Williams dictionary of biomaterials. **Liverpool University Press.**1999.

YAFFE, A.; KOLLERMAN, R.;BAHAR, H.; BINDERMAN,I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in rat ectopic bone development model. **J.Periodontal.**v.74, p. 44-50, 2003.

ZHENG, C.Y.; et al. Calcium phosphate coating of Ti–Nb–Zr–Sn titanium alloy. **Materials Science and Engineering C.V.** 27, p. 824-831, 2007.

ZHOU, H.; LAWRENCE, J.G.; AHMED, H.T.; BHADURI, S. B. Biomimetic coating of biphosphonate incorporated CDHA on Ti6Al4V. **J Mater Sci: Mater Med.** V. 23, p. 365-374, 2012.

ZHOU, Y.L.; NIINOMI, M; AKAHORI, T.; FUKUI, H.; TODA, H. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti–Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering A.** v.398, p.28–36, 2005.

ZHOU, Y.L.; NIINOMI, M. Ti-25Ta alloy with the best mechanical compatibility in Ti–Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C.** v.29, p.1061-5, 2009.