

DENNIA PEREZ DE ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* EM AMOSTRAS DENSAS
E POROSAS DE TITÂNIO-35NIÓBIO SUBMETIDAS A
TRATAMENTO BIOMIMÉTICO**



2011

DENNIA PEREZ DE ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* EM AMOSTRAS DENSAS
E POROSAS DE TITÂNIO-35NIÓBIO SUBMETIDAS A
TRATAMENTO BIOMIMÉTICO**

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

Orientador: Profa. Dra. Yasmin Rodarte Carvalho

Co-Orientador: Carlos Alberto Alves Cairo

São José dos Campos – SP

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

A24b Andrade, Dennia Perez de.
Biocompatibilidade In vitro em amostras porosas de titânio-35nióbio
submetidas a tratamento biomimético / Dennia Perez de Andrade . - São
José dos Campos: [s.n.], 2011.
154. f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia
de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Profa. Yasmim Rodarte Carvalho
Co-Orientador: Carlos Alberto Alves Cairo

1. Implantes. 2. Superfície porosa. 3. Osteogênese. 4. Cultura de
células. 5. Titânio. 6. Liga titânio-nióbio. I. Carvalho, Yasmim Rodarte II.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José
dos Campos. III. Título

tD 15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26 de setembro de 2011 .

Assinatura :

E-mail: dennia@terra.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Débora Pallos

Faculdade de Odontologia de Taubaté
UNITAU - Universidade de Taubaté

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Faculdade de Fisioterapia de Cruzeiro
ESC - Escola Superior de Cruzeiro Hamilton Vieira Mendes.

Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP- Univ Estadual Paulista –

São José dos Campos, 29 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Donizete** e **Sônia** pela dedicação, amor e imensurável esforço para permitir que eu alcançasse meus objetivos. Sem esse apoio, nada em minha vida teria sido possível. Agradeço a DEUS por tê-los comigo, por tê-los como exemplo de caráter, honestidade, dignidade e perseverança. Amo vocês!

A minha irmã **Lilian**, minha melhor amiga, minha metade. Obrigada pelo apoio e carinho. Amo você!

A minha filha **Bruna**, pela ternura, pelo amor incondicional. Com certeza você é o estímulo para eu buscar sempre o melhor. Amo você, és minha razão.

A **Juliana**, que esteve ao meu lado ajudando, estimulando e me dando força para não perder o equilíbrio nos momentos de dificuldade. Obrigada pelo carinho e apoio, sem os quais não seria possível superar mais essa etapa. Muito obrigada, querida!

Ao meu querido avô **Eufrásio Justo Perez** exemplo de caráter, ombridade, perseverança e amor. Àquele que me ensinou que não importa a profundidade do rio, o importante é que suas águas sejam límpidas e cristalinas. Muito obrigada! Te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, meu Senhor, agradeço pelo discernimento, pela perseverança, pela força e pela saúde para enfrentar todos os momentos de dificuldade enfrentados no caminho para mais esta conquista.

À Profa. Titular **Yasmin Rodarte Carvalho** por ter me orientado e permitido que eu tivesse liberdade para trabalhar e escolher o tema da pesquisa. Por me dar suporte e incentivo no momento mais difícil do trabalho onde novos rumos foram tomados. Muito obrigada pela paciência, pela amizade e por acreditar em mim. Jamais esquecerei essa história, essa convivência e aprendizados científicos e de vida. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto Cairo** por ter me orientado, incentivado e acreditado em meu potencial. Obrigada por permitir que eu trabalhasse naquilo que eu acreditava e por disponibilizar o material e equipamentos necessários para confecção das amostras. Obrigada pelo inestimável carinho e amizade.

Ao Dr. **Dalcy Roberto dos Santos**, do Departamento de Materiais do Instituto de Ar e Espaço no CTA, por acreditar que esta pesquisa seria possível, por disponibilizar o material necessário para confecção das amostras. Obrigada pelo incentivo, pela amizade e por acreditar em meu potencial.

Ao Prof. Associado **Paulo Tambasco de Oliveira** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, por ter aberto as portas de seu laboratório para que aprendêssemos e aperfeiçoássemos a técnica de cultura de células. Muito obrigada pela inestimável colaboração na confecção deste trabalho, pelo cuidado e pelo carinho com nossa equipe.

À Profa. Dra. **Débora Pallos**, minha querida orientadora de mestrado, agradeço pelo exemplo de pesquisadora, pessoa e amiga que és. Obrigada por ter sempre se mostrado tão disposta a ajudar-me e por me fazer acreditar que seria possível vencer tantas barreiras, mesmo que tão difíceis, jamais esquecerei. Obrigada por acreditar em mim. Muito obrigada!

À Profa. Dra. **Maria Aparecida Neves Jardim** pela lembrança e oportunidade de exercer meu papel de professora bolsista na Clínica Integrada/Área Periodontia no curso de Graduação em Odontologia da FOSJC. Obrigada por acreditar em meu potencial, serei eternamente grata. Muito Obrigada!

À Profa. Adjunta **Rosilene Fernandes da Rocha**, pelo incentivo, sugestões e conhecimentos transmitidos. Obrigada pelo carinho com que sempre me tratou e por acreditar em mim!

À Profa Dra. **Luana Marotta Reis De Vasconcellos**, exemplo de dedicação e competência. Obrigada pela inestimável colaboração na execução deste trabalho.

À aluna de mestrado **Isabel Chaves** por se permitir compartilhar comigo os melhores e mais complicados momentos de meu doutorado. Sem você, amiga, teria sido muito mais difícil vencer tantas barreiras e desafios. Obrigada pela amizade sincera e comprometida!

Ao **Roger R Fernandes** e a **Larissa Moreira Spinola de Castro** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP – pela paciência e disposição em ensinar nossa equipe a trabalhar com cultura de células. Vocês foram importantíssimos na realização desse trabalho. Serei eternamente grata! Muito obrigada!

Ao aluno de mestrado **Daniel de Oliveira Leite** pelo companheirismo, pela disposição em ajudar-me sempre que precisei, pela cumplicidade e amizade inquestionáveis!

À aluna de iniciação científica **Evelyn Luzia Souza Santos** pela colaboração na elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, representada pelo Diretor, Prof. Adjunto José Roberto Rodrigues, por possibilitar a realização deste doutorado.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade de realização do curso.

À Divisão de Materiais do Comando Geral de Tecnologia Aeroespacial, por ter proporcionado as condições necessárias para que a parte experimental referente à metalurgia do pó e caracterização do material fosse ali desenvolvida.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pela colaboração na fase dos experimentos *in vitro*.

Ao Prof. Titular Antônio Olavo Cardoso Jorge, por ceder as instalações do Laboratório de Cultura de Células para realização da pesquisa.

À Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, pela paciência e pelas inúmeras vezes em que sanou minhas dúvidas.

A todos os docentes do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, por todos os ensinamentos transmitidos no decorrer do curso.

Aos funcionários do biotério, Lorival Jacob, Antônio Domingos Barbosa Maia Vasconcelos e Marco, pela colaboração na fase experimental desta pesquisa.

Aos técnicos Sérgio e Domingos pela imensa colaboração nas etapas laboratoriais.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação, Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consíglío de Souza, pela atenção e auxílio.

A todos os funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pelo apoio e convívio durante este período.

Aos pesquisadores do IAE/AMR, em especial à Elizabeth Godoy César Salgado, Rogério Duque de Gonçalves e Ronaldo Rodrigues pelo apoio, auxílio e acolhida neste departamento. Obrigada pela paciência e pelo carinho, vocês foram fundamentais na elaboração desse trabalho.

Aos funcionários Alexandre, Claudemir, Dario, Fábio, Gil, João, João Bernardes, Vavá, Duarte do IAE/AMR, pela disponibilidade, atenção

e ajuda sempre que necessário. Vocês foram indispensáveis na elaboração deste trabalho, muito obrigada!

A todos os funcionários do IAE/AMR, pela atenção e carinho com que me receberam.

Aos pesquisadores Carlos Schwab, Márcia Fogarin Destro e Francklin José Barbosa Neto - Laboratório de Medição de Superfície Óptica (LMSO) do Instituto de Estudos Avançados (IEAv).

À querida amiga Neila de Almeida Braga por todo o apoio e incentivo. Jamais esquecerei as palavras de carinho e amizade. Muito obrigada, amiga!

Aos amigos do Curso de Pós-graduação: Lilibeth, Ana Lourdes, Fernando, Flávio, Luiz Felipe, Tábata, Adriana, Adriana Marchinni e Michele, por terem compartilhado comigo essa etapa inesquecível de nossas vidas.

Às amigas Angelita, Karina e Maria – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, pela ajuda, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis desta longa jornada de estudos. Jamais esquecerei cada palavra, gesto enfim, amizade! Serei eternamente grata!

A todos os meus amigos, pelos momentos de descontração que foram fundamentais nesses anos.

À bibliotecária Ângela de Brito Bellini, pela revisão deste trabalho.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela ajuda sempre que solicitados.

A todos os animais experimentais, meu respeito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram e auxiliaram a realização deste trabalho.

*Para ser grande sê inteiro: nada teu exagera ou
exclui.*

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes.

*Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta
vive.”*

*Citação de Ricardo Reis, escrita em 14 de fevereiro de 1933, no
túmulo de Fernando Pessoa no Mosteiro de Jerônimo - Lisboa*

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Osseointegração.....	23
2.2 Biomateriais e Biocompatibilidade.....	26
2.3 Titânio Poroso Utilizado para Implantes.....	28
2.4 Obtenção do Titânio Poroso por Metalurgia do Pó	31
2.5 Recobrimento de Superfície de Implantes Metálicos	35
2.6 Processo Biomimético.....	38
2.7 Titânio e o Nióbio como Materiais Biológicos	40
2.8 Processo de Cultura de Células.....	45
3 PROPOSIÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODO	50
4.1 Confeccção das amostras.....	50
4.2 Análises metalográfica.....	57
4.3 Análise por Espectrometria por Dispersão de Energia.....	58
(EDS) e Difração de Raio X (DRX).....	
4.4 Análise da rugosidade média.....	58
4.5 Procedimentos de cultura de células.....	59
4.5.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e.....	59

desenvolvimento de cultura primária osteogênica.....	
4.5.2 Adesão celular.....	62
4.5.3 Proliferação e viabilidade celular.....	63
4.5.4 Determinação da viabilidade celular por ensaio.....	63
colorimétrico – MTT.....	
4.5.5 Conteúdo de proteína total.....	65
4.5.6 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	67
4.5.7 Quantificação de formações nodulares de matriz.....	69
mineralizada.....	
4.6 Método de análise dos dados.....	71
5 RESULTADOS.....	73
5.1 Análise metalográfica.....	73
5.1.1 Análise estatística dos dados metalográficos.....	77
5.2 Análise por Espectrometria por Dispersão de Energia.....	79
5.3 Análise por Difração de Raio X.....	81
5.4 Análise da rugosidade média.....	85
5.5 Adesão celular.....	86
5.6 Proliferação e viabilidade celular.....	88
5.7 Viabilidade celular por ensaio colorimétrico MTT.....	97
5.8 Conteúdo de proteína total.....	103
5.9 Atividade de fosfatase alcalina.....	109
5.10 Quantificação de formações nodulares e matriz	114
mineralizada.....	
6 DISCUSSÃO.....	117
7 CONCLUSÃO	135
8 REFERÊNCIAS	136

ANEXO A.....	153
---------------------	------------

Andrade DP. Biocompatibilidade *in vitro* em amostras densas e porosas de titânio-35nióbio submetidas a tratamento biomimético [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Titânio (Ti) é um dos melhores biomateriais para a confecção de implantes cirúrgicos, porém, estudos com novas ligas de Ti e variações da topografia visam otimizar os resultados da osseointegração. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a biocompatibilidade de amostras densas e porosas da liga titânio-35nióbio submetidas ou não ao tratamento biomimético, comparadas a amostras de Ti puro grau 2. As amostras foram divididas em 6 grupos (G): a) G1- Ti denso; b) G2 - Ti poroso; c) G3 – Ti poroso tratado; d) G4 - Ti-35Nb denso; e) G5 - Ti-35Nb poroso; f) G6 - Ti-35Nb poroso tratado. Células osteogênicas obtidas da calvária de ratos recém-nascidos foram plaqueadas sobre as amostras e a adesão celular foi avaliada após 4 e 24 horas, enquanto a proliferação celular foi avaliada em 1, 3, 7 e 10 dias. A viabilidade foi avaliada em 1, 3, 7 e 10 dias. Para os demais testes as células foram cultivadas por 7, 10 e 14 dias. Após 14 dias, as culturas foram coradas com vermelho de Alizarina S para detecção dos nódulos de mineralização. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia por dispersão de energia (EDS), difração de raio X (DRX), análise metalográfica e de rugosidade. Os dados da análise metalográfica foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis e os dados das análises celulares foram comparados pelos testes Kruskal Wallis, Mann-Whitney e T-Student, ($p < 0,05$). O EDS demonstrou a presença de íons sódio, fósforo, magnésio e cálcio nas amostras tratadas de ambos os grupos. O DRX demonstrou a presença dos metais titânio e nióbio na liga teste. A análise metalográfica demonstrou que as amostras porosas apresentavam poros interligados, com morfologia variada e a análise pelo rugosímetro demonstrou maior rugosidade das amostras densas

da liga. Os testes *in vitro* mostraram que a liga Ti-35Nb apresenta biocompatibilidade semelhante ao Ti puro grau 2. A porosidade não interferiu nessa propriedade e, em algumas situações, até melhorou a biocompatibilidade da liga. O tratamento biomimético favoreceu a maior produção de proteína total e matriz de mineralização em amostras da liga em relação ao controle de titânio puro. Concluiu-se que a resposta celular foi favorável frente às amostras densas e porosas da liga de titânio-35nióbio e que o tratamento biomimético favorece a formação de matriz mineralizada. A liga titânio-35nióbio consagra-se, pois, como um material biocompatível, com potencial para ser utilizado em implantes biomédicos.

PALAVRAS-CHAVE: Implantes. Superfície porosa. Osteogênese. Cultura de células. Liga titânio-nióbio. Biocompatibilidade. Tratamento biomimético.

Andrade DP. *In vitro* biocompatibility of dense and porous titanium-35 niobium specimens submitted to biomimetic treatment [thesis]. São José dos Campos: São José dos Campos School of Dentistry, UNESP – São Paulo State University; 2011.

ABSTRACT

Titanium (Ti) is one of the best biomaterials for surgical implants fabrication. Studies with new titanium alloys and varied surface topographies seek for improved osseointegration results. The aim of the present in vitro study was to evaluate dense and porous titanium-35 niobium alloys, submitted or not to biomimetic treatment in comparison to degree 2 pure titanium specimens. Specimens were divided into 6 groups (G): a) G1 – dense Ti; b) G2 – porous Ti; c) G3 – treated porous Ti; d) G4 – dense Ti-35Nb; e) G5 – porous Ti-35Nb and f) G6 – treated porous Ti-35Nb. Osteogenic cells from newborn rats calvarium were plated over the samples and cell adhesion assessed after 4 and 24 hours. Cell proliferation and viability were assessed at 1, 3, 7 and 10 days. Cells were cultured for 7, 10 and 14 days for further testings. Cell cultures were stained with Alizarin Red S after 14 days for mineralization nodules detection. Specimens were characterized by means of Energy Dispersion Spectrophotometry (EDS), X-Ray Diffraction (XRD), metallographic and profilometer analyses. Metallographic data were submitted to Kruskal Wallis, while cell analyses were assessed with Kruskal Wallis, Mann-Whitney and T-Student tests ($P < 0.05$). EDS results detected the presence of sodium, phosphor, magnesium and calcium ions in treated specimens from both groups. XRD showed the presence of titanium and niobium for the test alloy. Metallographic analysis revealed interconnected pores and varied morphology within the porous specimens. Greater rugosity was detected by the profilometer analysis within the dense alloy specimens. In vitro tests revealed similar biocompatibility of Ti-35Nb and degree 2 pure Ti. Porosity did not interfere, but in some

scenarios improved alloy biocompatibility. The biomimetic treatment favor greater production of protein and mineralization matrix in comparison to pure titanium (control). It was concluded the cellular response of dense and porous titanium-35 niobium specimens, was favorable and the biomimetic treatment favors mineralized matrix formation. Titanium-35 niobium alloy render as a biocompatible material with great potential for employment in biomedical implants.

Key-words: Implants. Porous surface. Osteogenesis. Cell culture. Titanium niobium alloy. Biocompatibility. Tratamento biomimético.

1 INTRODUÇÃO

Os implantes têm sido utilizados para substituição de órgãos e tecidos perdidos do corpo humano. Nas últimas décadas, modificações na composição química, forma, tamanho e topografia dos implantes ortopédicos e odontológicos vêm sendo desenvolvidas, com o objetivo de otimizar o processo de osseointegração, viabilizando-os como forma ideal de tratamento.

Devido à excelente biocompatibilidade e resistência à corrosão, o titânio é o biomaterial mais utilizado em aplicações biomédicas, em que confiabilidade e elevado desempenho são necessários. Entretanto, na prática clínica, ortopédica e dentária, observam-se diferenças entre o módulo de elasticidade do implante metálico de titânio e do osso, sendo este um inconveniente (Niinomi, 1998; Song et al., 1999; Dewidar et al., 2006). Ligas de titânio de baixo módulo elástico, adequada resistência à corrosão e não tóxicas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de se reduzir a diferença entre o osso e os biomateriais (Long, Rack, 1998; Niinomi, 1998; Niinomi, 2008; Ning et al., 2010). O nióbio, quando adicionado ao titânio, possui a propriedade de reduzir o módulo de elasticidade deste material, o que permitiria a confecção de implantes com maior vida útil, capazes de proporcionar maior conforto ao paciente (Santos et al., 2008).

A confecção de porosidades nos implantes constitui outra alternativa que visa diminuir a diferença entre o módulo de elasticidade do biomaterial e do osso (Bottino et al., 2009; Laheurte et al., 2010). Assim, espera-se que a utilização de liga de titânio com menor módulo de elasticidade, combinada com a confecção de porosidade, leve a um melhor resultado na performance do sistema osso-implante (Bhattarai et al., 2008).

Além disso, modificações químicas na superfície dos implantes, através de recobrimentos bioativos, têm sido estudadas a fim de melhorar a interação osso-implante (Piattelli et al., 1998; Zhang et al., 2009). O processo biomimético possibilita a formação de recobrimentos de fosfatos de cálcio, como a apatita, sobre a superfície dos implantes de titânio, aumentando sua osseocondutividade e favorecendo a osseointegração (Zaffe, 2005). Tal processo pode ser utilizado em materiais com formas complexas, como por exemplo, implantes porosos (Nishiguchi et al. 2001).

Experimentos com culturas celulares permitem estudar a biocompatibilidade e interações celulares com a superfície de um biomaterial. Processos como adesão, espraiamento, proliferação e diferenciação de células podem ser investigados por meio dessa técnica. A compreensão da interação células - biomateriais é de fundamental importância para que condições adequadas para se obter sucesso de implantes *in vivo*, possam ser desenvolvidas.

A demanda por estudos que possam melhorar o entendimento dos processos de interação células-implante, quando se utiliza novas ligas de titânio, com diferentes topografias e tratamentos

de superfície é crescente. O presente estudo buscou avaliar a biocompatibilidade de uma nova liga de titânio-nióbio (Ti-35Nb) cuja principal característica é possuir menor módulo de elasticidade do que as ligas tradicionais de titânio. Para reduzir ainda mais seu módulo de elasticidade e torná-lo mais próximo ao do osso, confeccionaram-se poros e para aumentar sua bioatividade, foi realizado tratamento biomimético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osseointegração

Em 1969, Branemark et al., sugeriram que o desenvolvimento de um implante com função clínica dependia de uma ancoragem direta ao osso, o que ele denominou osseointegração, termo que mais tarde sofreria algumas alterações em sua definição. Os experimentos realizados em animais no laboratório de Branemark, na Universidade de Goteborg indicaram claramente que a ancoragem do implante ao osso era possível, esses resultados foram documentados por Branemark et al., 1977.

Em 1976, Schroeder na Suíça, foi o primeiro pesquisador a demonstrar a osseointegração empregando técnicas para cortar cuidadosamente osso não descalcificado e o implante sem separação prévia da ancoragem.

Segundo Albrektsson et al. (1981), uma série de fatores devem ser controlados simultaneamente para se alcançar a osseointegração do implante; 1– Biocompatibilidade; 2– Desenho do Implante; 3- Superfície do Implante; 4- Estado do sítio Cirúrgico; 5- Técnica Cirúrgica para Instalação do Implante; 6- Carga sobre o Implante. Portanto iniciou-se uma corrida em busca do material que

pudesse substituir o elemento dentário e o osso perdido sem que reações adversas e comprometedoras ao indivíduo estivessem presentes. Vários materiais têm sido usados para substituir osso, dentre eles estão os metais, polímeros, fosfato de cálcio de origem natural e sintética, hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e outros (Deporter et al., 1996; Yang et al., 2000; Deporter et al., 2001).

Listgarten et al. (1991), afirmaram que o objetivo do implante é a osseointegração, que pode ser caracterizada por uma conexão estrutural e funcional direta entre o osso e a superfície do implante. Segundo Schenk e Buser (1998), essa adesão pode ser comparada com uma regeneração direta, em que o osso é depositado diretamente sobre o tecido de granulação formado na região de fratura, sem a formação de um tecido fibroso ou fibrocartilaginoso intermediário.

O sítio onde o implante dentário é inserido é constituído por um tecido ósseo recoberto por uma mucosa que na maioria das vezes é queratinizada. O osso cortical é recoberto pelo perióstio, ao mesmo tempo em que envolve o osso esponjoso ou trabecular. Para que o implante adquira boas condições de cicatrização, o mesmo necessita de boa estabilidade mecânica, que pode ser alcançada quando a porção apical e/ou marginal do sítio apresenta quantidade suficiente de osso compacto e/ou quando o osso esponjoso (trabecular) contribui com uma quantidade suficiente de trabéculas (Albrektsson et al., 1981).

Segundo Schenk e Buser (1998), a estrutura do osso adjacente ao implante é responsável por modificações na resposta

tecidual aos diferentes tipos de implantes dentários, principalmente no que diz respeito à estabilidade primária. O osso compacto é o que mais contribui para a estabilidade primária, com volume da densidade de aproximadamente 80 a 90%.

Durante a colocação do implante no sítio cirúrgico, uma “pressão de inserção”, isto é, um mínimo deslocamento de tecido ósseo e um íntimo contato é estabelecido entre o implante e a cortical óssea avascular nos dois terços marginais do sítio, ocorre também um colapso do tecido vascular na região cortical com conseqüente necrose em algumas áreas. Por isso ocorre a formação de espaços, porém mesmo assim, a estabilidade ainda permanece. Por meio da remodelação óssea as áreas avasculares são substituídas por tecido ósseo maduro. Em contrapartida, o osso esponjoso que apresenta um volume da densidade da matriz óssea de 20 a 25%, contribui pouco para a estabilidade primária. Por outro lado, uma grande área da superfície do implante fica exposta à medula óssea, na qual existe ampla vascularização e muitas células precursoras de osteoblastos (Schenk, Buser, 1998). Esse dano aos tecidos duros inicia um processo de cicatrização do defeito que por fim permite que o implante se torne anquilosado com o osso, isto é, osseointegrado.

Segundo Schenk e Buser (1998), a osseointegração desenvolve-se através de três estágios programados. Em princípio é depositado tecido ósseo imaturo que se origina do tecido adjacente em direção à superfície do implante; a partir do segundo mês inicia-se o depósito de tecido ósseo lamelar e dentro de um mês, o estágio de remodelação óssea se inicia com eventos simultâneos de reabsorção

óssea pelos osteoclastos e de formação pelos osteoblastos. Os eventos desse último estágio se mantêm ao longo da vida, sendo importantes para longevidade do implante.

2.2 Biomateriais e Biocompatibilidade

Biomateriais são materiais de origem natural ou sintética que são usados para orientar, suplementar ou substituir as funções dos tecidos vivos e que podem ser classificados como:

- a) Biotolerável: aqueles que não são rejeitados quando implantados no tecido vivo, mas são envolvidos por uma cápsula fibrosa;
- b) Bioinertes: aqueles que permitem o íntimo contato com o osso conduzindo a osteogênese;
- c) Bioativos: que permitem formação de novo osso e a troca de íons com o tecido ósseo.

Os materiais bioinertes e bioativos, uma vez que permitem o crescimento ósseo em sua superfície são também chamados de osteocondutivos (Sykaras et al., 2000).

Segundo Ilan e Ladd (2003), osteocondutividade é o processo pelo qual o material se comporta como um arcabouço onde se dá o crescimento ósseo, sem atuar na neoformação óssea. É a

propriedade do material de suportar o crescimento do tecido ósseo e o desenvolvimento das células osteogênitoras, facilitar e orientar a neoformação vascular e a criação de novos sistemas harvesianos para ocorrer neoformação óssea. A osseoindução é a habilidade de um material estimular ou promover a formação óssea no local do implante. É um mecanismo que não só recruta como também induz células mesenquimais a se diferenciarem em células osteoblásticas que darão origem a neoformação óssea (Ilan, Ladd, 2003). Os biomateriais podem ser osteocondutores na presença adicional de agentes como as proteínas ósseas morfogênicas e fatores de crescimento (Fujibayashi et al., 2004).

A biocompatibilidade dos materiais é evidenciada pelo comportamento das células quando em contato com a superfície do implante e pela adesão celular a estes. A adesão e o espalhamento pertencem à primeira fase da interação célula/material e a qualidade desta interação influenciará a capacidade celular de se proliferar e se diferenciar quando em contato com o implante (Anselme, 2000). Segundo Bowers et al. (1992), a osseointegração dos implantes dentais depende, em parte, da adesão e espalhamento de células semelhantes a osteoblastos na superfície do implante.

O titânio (Ti) é um material que reage com o ar (Kasemo, 1983; Boyan et al., 1996; Steinemann, 1998; Scharnweber et al., 2002), formando espontaneamente um denso filme de óxido de titânio na sua superfície, que é uma importante barreira contra a dissolução do metal (Dallant et al., 1987; Steinemann, 1998; Scharnweber et al., 2002). A propriedade de oxidação dos implantes

de titânio desempenha um papel fundamental na dinâmica do processo de osseointegração (Steinemann, 1998; Sul et al., 2001; Feng et al., 2002; Scharnweber et al., 2002; Sul et al., 2002), uma vez que o seu alto grau de biocompatibilidade resulta, em parte, da camada oxidada estável e protetora (Machnee et al., 1993; Sista et al., 2011). Além disso, essa camada parece também auxiliar na ligação da matriz extracelular à superfície do implante (Kasemo, 1983). Segundo Kanagaraja et al. (2001), parece que nas superfícies de Ti, a espessura da camada de óxido associada à rugosidade da superfície, desempenham um importante papel na adesão e proliferação celular sobre as superfícies.

2.3 Titânio Poroso Utilizado para Implantes

Estudos têm relatado que a resposta celular e tecidual nos implantes não é afetada apenas pela sua propriedade química, mas também pela topografia ou rugosidade da superfície dos mesmos (Bobynt et al., 1987; Attaia, Fuerstenau, 1988; Bagno, Bello, 2004). Boyan et al. (1996) e Brunski (1999) afirmaram que quatro propriedades das superfícies controlam os eventos na interface osso-implante: composição, energia, rugosidade e topografia. Logo, existe grande interesse dos pesquisadores em modificar a superfície dos implantes de titânio, visando melhorar a resposta celular (Deporter et al., 1986; Brunski et al., 1999; Aparício et al., 2002).

Inicialmente os implantes preconizados por Branemark seguiam a geometria de roscas, a qual permitia interação imediata com o osso (Deporter et al., 1986). Atualmente diversas topografias de implantes têm sido preconizadas e empregadas com o objetivo de aumentar a fixação desse osso, embora detalhes da resposta osteogênica ainda permaneçam obscuros (Svehla et al., 2000; Zinger et al., 2005). Diversos estudos demonstraram aumento da fixação do osso ao implante de superfície rugosa ou porosa em comparação à amostras de superfície lisa (Bowers et al., 1992; Fergusson, 1999; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008a). De acordo com Liu et al. (2004) diversos métodos são utilizados para modificação da superfície dos implantes, como polimento, usinagem, pulverização, jateamento entre outros. O objetivo é obter diferentes topografias e rugosidades superficiais, remover contaminação e melhorar a fixação do material e a resposta osteogênica.

Os maiores benefícios do titânio poroso e ligas de titânio poroso em comparação com outros biomateriais incluem boa resistência mecânica com módulo elástico próximo ao do osso, estrutura porosa que permite fixação biológica e boa biocompatibilidade (Lopes-Heredia et al., 2008).

A osseointegração obtida com a utilização da superfície porosa é dada por meio do crescimento de osso para o interior dos poros denominado *bone ingrowth* (Bobyne et al., 1987; Deporter et al., 1990; Cook, Rust-Dawicki, 1995; Deporter et al., 1996; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001, Deporter et al.,

2002) melhorando o embricamento mecânico, a interdigitação do tecido ósseo ao implante, evitando sua mobilidade (Steinemann, 1998). A presença de poros acelera o processo de osseointegração, além de aumentar significativamente a área de contato osso-implante (Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003). O tempo para fixação mecânica neste caso é reduzido assim como o período de imobilização da área reabilitada (Kim et al., 2000; Scharnweber et al., 2002).

O tamanho mínimo dos poros necessários para o crescimento ósseo deve ser suficiente para evitar a formação de tecidos moles entre o implante e o tecido ósseo e a interconectividade entre os poros deve permitir a penetração óssea e a sua vascularização. Assim sendo, a qualidade do tecido ósseo formado no interior dos poros está diretamente relacionada com o tamanho dos poros interligados (Boyan et al., 1996; Steinemann, 1998; Brunski et al., 2000). De acordo com Frosch et al. (2002) células semelhantes a osteoblastos são capazes de cruzar distâncias de até 600 μ m, através da formação de pontes celulares. Nos poros de 300 μ m de diâmetro, as células cruzam o lúmen por meio de filopodia, formando um padrão estrelário no poro.

Segundo Fergusson (1999), o crescimento ósseo pode ocorrer dentro de poros bastante pequenos, com 30 micrômetros de diâmetro, mas o recomendável é que o diâmetro esteja aproximadamente em 100 micrômetros para que um forte entrelaçamento entre o implante e o osso com expressivo crescimento ósseo possa ocorrer. Pilliar et al. (1991) indicam poros com diâmetro

de 50 a 400 micrômetros e Kusakabe et al. (2004) consideram o diâmetro adequado dos poros entre 500 e 1000 μm .

Steinemann (1998) e Guo (2007) afirmaram que um material poroso deve ser composto por meso e microporos para promover adesão e adsorção de metabólitos biológicos e macroporos que permitam acesso para o crescimento ósseo interno e fornecimento de nutrientes que possibilitem a regeneração tecidual nas regiões mais internas. Segundo Vasconcellos et al. (2008a) a alta porosidade e a presença de poros amplos são propriedades morfológicas importantes para a reparação óssea, pois contribuem para a proliferação e osseointegração do implante; há ainda uma redução na diferença do módulo de elasticidade entre o titânio e o osso, diminuindo o estresse na interface.

Em 2010, Vasconcelos et al. avaliaram a reparação óssea ao redor de implantes de titânio puro grau 2, poroso e denso, confeccionados a partir da metalurgia do pó. Os implantes foram inseridos em tíbia de coelhos, e após 4 e 8 semanas os animais foram eutanasiados. Os resultados foram obtidos por meio de análise histológica, histomorfométrica e pelo ensaio de cisalhamento, concluindo-se que os implantes porosos apresentaram maior contato na área de interface osso-implante e maior adesão ao osso, melhorando a osseointegração.

2.4 Obtenção do Titânio Poroso por Metalurgia do Pó

A metalurgia do pó é uma técnica utilizada para produzir compostos metálicos ou cerâmicos através da produção do pó e sua consolidação pela aplicação de pressão e calor em temperaturas abaixo do ponto de fusão do constituinte majoritário. A metalurgia do pó tem experimentado nos últimos anos um grande desenvolvimento e seu futuro, a curto e médio prazo, é muito promissor. Uma das grandes vantagens desse processo é poder obter produtos acabados com uma homogeneidade e precisão dimensional superiores as conseguidas por outras técnicas. Além disso, o fator custo é favorável devido principalmente a economia de matérias-primas, energia e usinagem (Froes, Eylon, 2000; Wen et al., 2001; Santos, 2006; Santos et al., 2008; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b) .

As etapas de processamento de um material metálico, por esta técnica, envolvem entre outras, a obtenção e a moagem do pó, bem como a conformação do pó por prensagem e posterior sinterização do mesmo. Os dois tipos básicos de prensagem são a uniaxial e a isostática. Na prensagem uniaxial, a compactação do pó se realiza em uma matriz rígida, por aplicação de pressão na direção axial, através de punções rígidos. Na prensagem isostática, a compactação do pó se dá no interior de uma matriz flexível, sobre o qual atua um fluido pressurizado. Este procedimento assegura uma distribuição homogênea da pressão sobre a superfície da matriz. A compactação é uma etapa importantíssima na técnica da Metalurgia do Pó, contudo a etapa seguinte, a sinterização, é determinante das propriedades do material, uma vez que é através desta que é determinada a microestrutura deste (Froes, Eylon, 2000).

A sinterização é um processo de consolidação por queima (na presença ou não de oxigênio), onde as partículas do pó são unidas formando agregados de alta resistência mecânica. Isto leva a um controle da porosidade da peça e aumento da densificação. Como consequência, tem-se o controle das propriedades mecânicas das peças, o que é muito importante para materiais cuja aplicação exige exposição a esforços cíclicos, como na indústria aeronáutica e na produção de implantes cirúrgicos (Froes, Eylon, 2000).

Como o titânio puro e suas ligas são geralmente pouco dúcteis e por este motivo não podem ser transformados em pó por cominuição (moagem), é necessária uma alternativa para reduzir o tamanho das partículas do pó. Uma vez que este reage com hidrogênio para formar hidretos os quais são frágeis, tornando a cominuição fácil, pode-se hidrogenar o metal num processo conhecido como Hidretação-Desidretação (Froes, Eylon, 2000). A hidrogenação requer equipamentos especiais, uma vez que a reação é extremamente exotérmica. Após a hidrogenação o titânio fica fragilizado, facilitando o processo de moagem controlada. O pó fragilizado pode ser moído, a fim de se selecionar por peneiração as faixas granulométricas com as quais se deseja trabalhar. Uma vez obtido o pó, os métodos de obtenção do titânio poroso por metalurgia do pó, diferem entre si em detalhes de processamento.

Algumas substâncias podem ser usadas na técnica da metalurgia do pó como aditivos orgânicos. Bram et al. (2000) produziram amostras de titânio, ligas de níquel (Ni) e aço inoxidável com alta porosidade a partir da utilização do aditivo orgânico de

carbamida (uréia). O primeiro passo para a confecção foi selecionar partículas esféricas do aditivo orgânico que tivessem diâmetro entre 0,8mm a 6mm. A quantidade desse elemento variava de acordo com porcentagem de porosidade (60, 70 ou 80%) exigida após a sinterização. Em seguida o pó do metal era adicionado ao aditivo orgânico e a mistura era compactada em um recipiente cilíndrico em uma prensa uniaxial e posteriormente realizava-se a prensagem isostática com 166 MPa. O material aditivo orgânico era removido a uma temperatura de 200°C e o processamento era finalizado com sinterização de 1200°C no forno à vácuo. As amostras foram avaliadas em microscópio óptico (MO) e microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados demonstraram taxa de porosidade de 60 a 80% e poros com diâmetro que variavam de 0,1 a 2,5mm, com distribuição homogênea. Os autores concluíram que a técnica de metalurgia do pó produziu porosidade adequada, quando associada a um aditivo orgânico (Bram et al., 2000).

Em 2001, Wen et al. utilizaram partículas de carboreto de hidrogênio amônia e de carbamida como aditivos orgânicos e prensagem isostática de 100MPa para confeccionarem com a técnica da metalurgia do pó, amostras de titânio (Ti) e magnésio (Mg) com poros medindo entre 200µm e 500 µm. A porosidade final da amostra de titânio foi de 78% e da amostra de Magnésio (Mg) foi de 50%, sendo que ambos resistiram à implantação e à aplicação *in vivo*.

A metalurgia do pó é uma técnica que permite a fabricação de superfícies de formatos complexos, que podem assumir características similares ao formato de rede, ou seja, com poros

interconectados. Fatores importantes e fundamentais para um bom desempenho do implante como o diâmetro, configuração e quantidade de poros, podem ser controlados pela técnica de metalurgia do pó (Bram et al., 2000; Wen et al., 2001; Vasconcellos et al., 2008a, Vasconcellos et al., 2008b; Vasconcellos et al., 2010).

2.5 Recobrimento de Superfície de Implantes Metálicos

Por promover a formação precoce de coágulo de fibrina e ativação plaquetária (Ducheyne, Cuckler, 1987; Bruijn et al., 1999), criar um meio tri-dimensional que favorece a formação óssea (Denissen et al., 2000), aumentar a produção de fatores de crescimento relacionados com tecido ósseo (Bowers et al., 1992) e diminuir a atividade osteoclástica (Cornell, Lane, 1998), a microtopografia de implantes dentais e ortopédicos pode alterar eventos biológicos durante cicatrização.

A topografia da superfície do biomaterial determinará a adsorção das biomoléculas e a sua orientação na superfície tem conseqüências diretas no recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação celular (Anselme, 2000; Bowers et al., 1992; Ning et al., 2010; Sista et al., 2011).

Apesar de ser um material bioinerte, o titânio e suas ligas não se aderem quimicamente ao osso, logo não apresentam biocondutividade como os revestimentos bioativos (fosfato de cálcio,

hidroxiapatita- HA), podendo ocorrer formação de tecido fibroso ao redor do implante. Dentro deste contexto, torna-se de grande interesse o desenvolvimento de metais revestidos com fosfato de cálcio. O resultado destes produtos é um arcabouço metálico com boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, devido ao substrato metálico e ao revestimento, respectivamente (Andrade et al., 2000).

Segundo Kokubo (1996) o objetivo do revestimento de fosfato de cálcio nos implantes de titânio é torná-lo bioativo, associando-se a sua resistência à fratura a um baixo módulo de elasticidade.

Liu et al. (2004) afirmaram que os métodos físicos para tratamento do titânio e suas ligas, onde não ocorrem reações químicas, produzem recobrimento da superfície por meio de energia térmica, cinética e elétrica. Entre eles inclui o spray térmico (plasma spray) e deposição física de vapor (processo de evaporação e implantação de íons). Os métodos químicos incluem reações químicas e/ou eletroquímicas entre o substrato e uma solução ácida, alcalina ou peróxido de hidrogênio. De acordo com Aparício et al. (2002) e Nguyen et al. (2004) a estrutura química da superfície influencia na adsorção de proteínas que promoverão aderência e ativação de células osteoprogenitoras.

Andrade et al. (2002) e Wen (2002) afirmaram que apesar das desvantagens no controle da composição e estrutura do fosfato de cálcio formado sobre o metal, o revestimento do plasma spray é a mais usada comercialmente. Segundo Zaffe (2005) não há uniformidade da espessura da camada depositada e, além disso, não há

controle sobre a integridade estrutural e cristalinidade do revestimento, o que poderia afetar negativamente a adesão de osteoblastos (Baker et al., 2006).

Yan et al. (1997), Nishiguchi et al. (1999) e Kim et al. (2000) demonstraram que a técnica do “plasma spray”, em implantes porosos leva à redução do volume disponível do poro para o crescimento de tecido ósseo, devido à presença do revestimento; além disso, há dificuldade em recobrir materiais com superfícies irregulares, resultando na degradação do recobrimento. Por fim, os autores mostraram que *in vivo* a hidroxiapatita se desprende do substrato, mesmo no período inicial de implantação, e o tecido fibroso pode se estender para baixo dessa camada. Nishiguchi et al. (1999) afirmaram que quando o revestimento de hidroxiapatita está completamente degradado, a interface entre o osso e a superfície do implante fica instável. Segundo Zaffe (2005), não há uniformidade da espessura da camada depositada sobre o metal, além disso, as altas temperaturas utilizadas na deposição por plasma spray afetam a morfologia e a estrutura cristalina do filme depositado, o que pode afetar negativamente a adesão de osteoblastos. Adicionalmente, o custo da técnica “plasma spray” é relativamente alto, o que têm levado ao seu desuso na prática clínica (Liang et al., 2003; Coelho et al., 2010).

Svehla et al. (2000), para avaliar a modificação da resposta osteogênica em contato com a superfície de titânio, compararam amostras porosas, rugosas, lisas e recobertas com hidroxiapatita com espessura de 50 μm . Os autores implantaram as

amostras em tíbia de cabras que foram sacrificadas nos períodos de 4, 8 e 12 semanas. Os melhores resultados de cicatrização óssea, bem como de fixação mecânica, foram encontrados entre os implantes com superfície porosa e porosa recoberta com hidroxiapatita.

Com intuito de melhorar a biocompatibilidade dos implantes de titânio, além do recobrimento com hidroxiapatita e fluorapatita, métodos alternativos como ionização da superfície, estimulação térmica e alcalina (Nishiguchi et al., 1999) e a deposição eletroquímica de fosfato de octacálcio (Habibovic et al., 2004) também foram propostos.

2.6 Processo Biomimético

O tratamento de superfícies dos implantes de titânio com a utilização de soluções que contenham diversos íons capazes de precipitar heterogeneamente fosfatos de cálcio em substratos metálicos é conhecido como processo biomimético (Kokubo et al., 1996; Nishiguchi et al., 1999; Kim et al., 2000; Baker et al., 2006). Este tratamento visa obter uma camada de apatita na superfície dos implantes de titânio aumentando sua osseocondutividade e trazendo benefícios para a osseointegração (Zaffe, 2005).

Kokubo et al. (1996) estudaram um método de revestimento biomimético de hidroxiapatita através de Fluido Corpóreo Simulado (FCS) para a produção de revestimentos bioativos

em implantes metálicos, conhecido como processo biomimético. A solução de nome FCS proposta por Kokubo et al. (1996) contém concentrações de íons semelhantes aos dos fluidos extracelulares sem a presença de células ou proteínas.

Andrade et al. (2000, 2002) afirmaram que o processo biomimético de revestimento de hidroxiapatita sobre o titânio baseia-se na nucleação e crescimento do fosfato de cálcio em FCS a 37°C associando-se ainda o pré tratamento térmico-químico da amostra metálica para aumentar a adesão química da apatita nucleada e crescida na superfície de titânio. Este método estimula o crescimento ósseo na superfície de implantes de titânio por meio do revestimento do fosfato de cálcio (Machado, 2007; Ohtsuki et al., 2007).

Segundo Habibovic et al. (2004) as vantagens do processo biomimético em relação a outros são: as baixas temperaturas utilizadas as quais permite a utilização do método em materiais sensíveis ao calor, a formação de cristais de apatita semelhantes ao osso com alta bioatividade, a boa adesão ao substrato e a possibilidade de crescimento do osso dentro e sobre os poros em implantes com geometria mais complexa, além da incorporação de fatores estimulantes de crescimento ósseo.

O processo de formação de precipitados sólidos a partir de FCS possui três etapas: interação química da superfície do implante com a solução e formação heterogênea de núcleos de sólido amorfo; lenta transformação dos núcleos em apatita cristalina e crescimento do cristal de apatita (Attaia, Fuerstenau, 1988).

Diversas modificações foram propostas e vários pré-tratamentos foram usados desde a primeira composição de FCS criada por Kokubo et al. (1996) com o objetivo de acelerar o recobrimento de hidroxiapatita sobre implantes de titânio e melhorar a bioatividade (Forsgren et al., 2007). Chou et al. (2004) conseguiram acelerar o processo biomimético clássico de 7-14 dias para 01 dia por meio da imersão do substrato em FCS supersaturado (5xFCS).

Segundo Nishiguchi et al. (1999, 2001), o baixo custo e efeitos inclusive sobre as irregularidades dos implantes tornam o processo biomimético uma técnica superior ao plasma spray. Além disso, esses autores notaram que o tratamento não reduz o espaço da porosidade disponível ao crescimento ósseo, pois causa pouca mudança na morfologia superficial do implante, afetando cerca de 1 μm da superfície. O controle da composição e crescimento do filme de apatita por meio de alterações na composição do FCS, a incorporação de proteínas sem alteração de suas funções e sem a necessidade do tratamento térmico, são outras vantagens desta técnica promissora (Habibovic et al., 2004; Ohtsuki et al., 2007).

2.7 Titânio e Nióbio como Materiais Biológicos

Com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas e de biocompatibilidade do titânio, alguns elementos químicos foram adicionados ao mesmo, formando as ligas de titânio.

A liga Ti-6Al-4V é a liga mais utilizada até os dias de hoje para confecção de implantes (Ning et al., 2010). No entanto, estudos têm demonstrado certa toxicidade neurológica associada ao alumínio (mal de Alzheimer), e ao vanádio, presentes na liga Ti-6Al-4V. Há formação de óxido de vanádio na superfície da liga, que segundo algumas pesquisas podem irritar o sistema respiratório, chegando até mesmo a comprometer o funcionamento dos pulmões (Kuroda et al., 1998; Long et al., 1998). Embora o módulo elástico da liga Ti-6Al-4V - 110 a 114 GPa - seja muito inferior ao do aço inoxidável como ligas de cromo-cobalto ainda é bem mais elevado que o módulo elástico do osso - 10 a 35GPa (Niinomi, 1998; Song et al., 1999; Dewidar et al., 2006). Segundo Wang et al. (2009) no intuito de desenvolverem biomateriais que minimizassem os efeitos adversos causados por alguns elementos químicos como alumínio (Al), vanádio (V), níquel (Ni), ferro (Fe) e cromo (Cr) houve aumento em pesquisas de ligas de titânio usando metais não-tóxicos como nióbio (Nb), zircônio (Zr) e tântalo (Ta) como elementos constituintes da liga. Segundo esses pesquisadores novas gerações de ligas porosas que combinem alta resistência mecânica e excelente biocompatibilidade deveriam ser pesquisadas.

O maior módulo de elasticidade dos implantes artificiais pode resultar em uma ineficiência na transferência de carga do implante para o osso adjacente, causando o fenômeno chamado “escudo de tensão” ou “blindagem” levando a uma potencial reabsorção óssea ao redor do implante e eventual falha, logo o material para reposição óssea, ou seja, o implante deve ser não

somente biocompatível, mas também mecanicamente compatível (Sumner et al., 1992; Long, Rack, 1998; Ning et al., 2010). Assim sendo, ligas de baixo módulo elástico, resistência à corrosão e nenhum potencial tóxico vêm sendo amplamente desenvolvidas desde o início dos anos 90 (Long, Rack, 1998; Niinomi, 2008).

Uma das características mais interessantes do titânio está associada às transformações alotrópicas. O titânio puro exibe estrutura cristalina do tipo hexagonal compacta (hc) até 882,5°C e, em tal faixa de temperatura, essa estrutura é denominada fase α . Em 882,5°C o titânio sofre transformação alotrópica e passa a apresentar estrutura cúbica de corpo centrado (ccc), conhecida como fase β , (Figura 1) (Stephen, Froes, 1988).

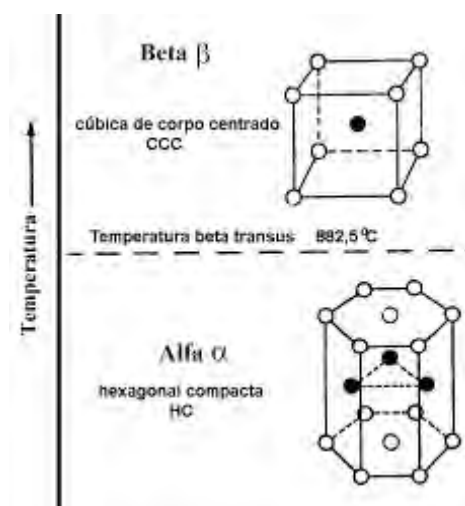


Figura 1 – Estrutura cristalina e transformações de fase do titânio puro (Stephen, Froes, 1988).

O principal objetivo da adição de elementos de liga ao titânio está associado à estabilização preferencial das fases α e β . Por

meio de tratamentos térmicos ou termomecânicos, podem se obter grandes variações microestruturais, alterando-se significativamente as propriedades das ligas resultantes. A adição de alguns elementos ao titânio puro altera a temperatura e a estabilidade das formas alotrópicas desse elemento. Alguns elementos estabilizam a fase α , aumentando a temperatura de transformação alotrópica, enquanto outros estabilizam a fase β , diminuindo a temperatura dessa transformação (Donachie, 1988).

A temperatura de transformação de α para β é conhecida como temperatura “ β transus”. A β transus é definida como a mais baixa temperatura de equilíbrio na qual todo material é 100 % β e é de fundamental importância nos processos de deformação e de tratamento térmico. Abaixo da temperatura β transus, o titânio constitui-se em uma mistura de $\alpha+\beta$ se o material contiver elementos estabilizadores de β . Por outro lado, ele será todo α se não possuir estabilizador de β . A importância da temperatura β transus reside no fato de que o processamento e o tratamento térmico das ligas de titânio são frequentemente realizados a temperaturas acima ou abaixo da β transus (Donachie, 1988). As ligas β de titânio são adequadas para trabalho a frio, com alta conformabilidade, endurecem por tratamento térmico e são preferidas quando se necessita de resistência elevada em temperaturas relativamente baixas. São relativamente pouco estáveis a temperaturas acima de 350 °C e frágeis em temperaturas criogênicas (Boyer, 1994).

Em 1996, foi desenvolvida a liga Ti-13Zr-13Nb (Henriques et al., 2005), com elevada biocompatibilidade, mas, ainda

apresentando módulo de elasticidade relativamente alto e, mais tarde, a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta que tem módulo de elasticidade relativamente baixo (55GPa), no entanto com baixa resistência à tração (Qazi et al., 2005; Ning et al., 2010). Estas ligas utilizam a propriedade do nióbio para a redução do módulo de elasticidade e estabilização da fase β do titânio (Davidson, Kovacs, 1994; Kuroda et al., 1998; Wang, 1996; Song et al., 1999).

O nióbio é, entre os metais considerados inertes, o principal estabilizador da fase β do titânio e quando ligado a este na faixa entre 10 e 20 %, em % de peso ou numa faixa alternativa entre 35 e 50%, produz ligas de baixo módulo de elasticidade (abaixo de 85 GPa) (Davidson, Kovacs, 1994; Khan et al., 1999; Shneider, 2001). Acredita-se que a estabilização preferencial de uma estrutura cúbica de corpo centrado, proporciona uma maior quantidade de planos de deslizamento, logo a adição do nióbio, como estabilizador de fase β , atua decisivamente na redução do módulo de elasticidade (Davidson, Kovacs, 1994; Kuroda et al., 1996; Wang, 1996).

Santos (2006) obtiveram a liga Ti-35Nb pela mistura dos componetes na forma de hidretos, oriundos do processo de hidrogenação-desidrogenação e processados pela rota da metalurgia do pó, apresentando uma microestrutura bifásica com predominância de fase β . Foram realizados ensaios de flexão e tração onde se obteve valores do módulo elástico na faixa de 80 GPa e da resistência a tração de 600MPa, caracterizando a liga como material potencial para aplicações biomédicas, onde se requer além das propriedades citadas, uma alta biocompatibilidade conseguida pela utilização dos elementos

Ti e Nb. Concluíram que o nióbio age para estabilizar a fase β e na diminuição do módulo de elasticidade alcançando uma redução de, aproximadamente, 30% em relação às ligas tradicionais Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb utilizadas como implantes biomédicos.

Segundo Xiong et al. (2010) as ligas de TiNb poderiam ser mais biocompatíveis, apresentando menor citotoxicidade do que o titânio puro e ligas de titânio e níquel, apresentaram melhores efeitos anti-corrosivos e mostraram superelasticidade sugerindo que as ligas de TiNb poderiam ser biomateriais promissores.

2.8 Processo de Cultura de Células

A biocompatibilidade de um material pode ser avaliada através do comportamento das células, quando em contato com este, especialmente pela adesão celular à sua superfície. A compreensão das interações na interface material - células (*in vitro*) oferece meios para que se possam criar condições ideais para o sucesso do implante *in vivo*, assim tão importante como a compreensão das propriedades físico-químicas do material é a resposta celular a este (Sista et al., 2011). As propriedades da superfície de um material, tais como sua composição, rugosidade, topografia e energia de superfície desempenham um papel significativo nos processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (Sista et al., 2011). A primeira fase da interação célula/material corresponde à adesão e ao

espalhamento celular, sendo que a qualidade das etapas iniciais influenciará a proliferação e a diferenciação celular na superfície do implante (Anselme, 2000; Bowers et al., 1992; Ning et al., 2010; Sista et al., 2011).

Experimentos com culturas celulares providenciam uma ferramenta de sucesso para pesquisas, uma vez que as interações células e matriz com a superfície do biomaterial podem ser avaliadas detalhadamente. Processos tais como adesão, proliferação e diferenciação de células, bem como a biossíntese de proteínas podem ser investigados. Os modelos de cultura permitem condições mais controladas, especialmente em nível celular (Bächle, Ralf, 2004).

Segundo Beloti e Rosa (2005) para se obter cultura de células de osteoblastos com características bem definidas, os procedimentos experimentais devem ser bem selecionados, pois há muitos fatores que podem influenciar a expressão fenotípica de osteoblastos na cultura como: fonte das células, tempo de cultura e a presença de compostos que podem influenciar a proliferação e diferenciação celular.

No que tange ao crescimento celular e expressão fenotípica durante a diferenciação de osteoblastos observou-se que há uma relação direta entre a diminuição da proliferação e a subsequente indução de diferenciação celular em cultura de calvária de ratos (Owen et al., 1990; Beloti, Rosa, 2005).

Os osteoblastos são células capazes de produzir a fosfatase alcalina, enzima presente em sua superfície externa, local onde exerce sua atividade (Mödder, Klosla, 2008). A fosfatase

alcalina e o conteúdo de colágeno são importantes marcadores de diferenciação osteoblástica (Franco et al, 2009). A relação entre a atividade de fosfatase alcalina e produção de matriz mineralizada pôde ser observada por alguns autores (Sugawara et al., 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Hoemann et al., 2009). A maturação e a mineralização da matriz extracelular indicam maior diferenciação celular, conseqüentemente menor proliferação das células (Rosa, Beloti, 2005). Em culturas de células derivadas de calvária a mineralização deverá ocorrer em períodos superiores a 2-3 semanas (Hoemann et al., 2009).

Estudos demonstram que osteoblastos produzem mais osteocalcina, prostaglandina E₂ e TGF- β em superfícies de titânio rugoso do que em superfícies lisas, já que a superfície rugosa aumenta significativamente a atividade e a proliferação de osteoblastos, além da mineralização do tecido (Piattelli et al., 1998). Oliveira e Nanci (2004) demonstraram que a presença de nanotopografia em amostras de titânio promove efeitos biológicos significantes em cultura de células osteogênicas, como a super-expressão de osteopontina e sialoproteína óssea. A expressão aumentada destas duas proteínas multifuncionais pode influenciar a adesão e a migração das células osteoblásticas.

Wang et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade e hemocompatibilidade do Ti-Nb (titânio-nióbio), Ti-Nb-Zr (titânio-nióbio-zircônia) e Ti-Nb-Hf (titânio-nióbio-háfênio) em amostras com propriedades de memória de forma (stent vascular, fio ortodôntico) utilizando células L-929 de camundongos. Concluíram que tais ligas são altamente biocompatíveis e que os materiais testados satisfazem

os requisitos de hemocompatibilidade necessários aos implantes biomédicos.

Segundo Xiong et al. (2010) a morfologia dos nanomateriais pode afetar suas propriedades físico-químicas e biológicas. Esses autores recobriram discos de Ti-26Nb, confeccionados pela técnica da metalurgia do pó, com nanopartículas de Hidroxiapatita através de processo hidrotérmico. Neste estudo a proliferação celular foi maior no grupo de discos cobertos com hidroxiapatita. Houve adesão, espreadimento e proliferação celular sobre a hidroxiapatita indicando boa bioatividade e biocompatibilidade *in vitro* da nano-hidroxiapatita como recobrimentos de ligas de TiNb. Concluíram que a energia de superfície foi o parâmetro determinante na proliferação celular e não a cristalinidade ou micro-rugosidade da superfície.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de amostras densas e porosas da liga titânio-35nióbio, submetidas ou não ao tratamento biomimético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de titânio poroso e densas, confeccionadas com titânio puro grau 2 e liga de titânio-35nióbio pela técnica da metalurgia do pó e amostras porosas com tratamento biomimético foram submetidas à cultura de células. O comportamento celular baseado na adesão, proliferação e viabilidade celular, no conteúdo de proteína total, na atividade de fosfatase alcalina e na quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada foram analisados.

Para caracterização das amostras metálicas foram realizadas análises metalográficas para a quantificação e avaliação da morfologia da porosidade, espectrometria por dispersão de energia – EDS, difração de raios X – DRX e análise de rugosidade.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP - Protocolo n° 027/2008-PA/CEP alterado pelo ofício n° 012/11-CEP.

4.1 Confeção das amostras

Para realização deste estudo amostras densas e porosas, na forma de discos de 12mm de diâmetro por 2mm de altura, com a liga de titânio-35nióbio – Ti-35Nb (teste) e com titânio puro grau 2 (controle) foram confeccionadas por meio da técnica da metalurgia do pó no Departamento de Ciências e Tecnologia Aeroespacial (DCTA) – Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (IAE) sob orientação do pesquisador Professor Doutor Carlos Alberto Alves Cairo.

Os materiais utilizados para a confecção das amostras de titânio poroso foram pó de titânio puro grau 2 com tamanho médio de partículas de 8 μ m, obtido pela técnica de hidrogenação/desidrogenação (HDH) a partir de finos de esponja de titânio e uréia – aditivo orgânico utilizado como espaçador, mantendo o espaço entre os grânulos do pó de titânio até o término do processamento do material, tornando a amostra porosa. A uréia foi triturada e seus grânulos separados numa faixa granulométrica de 177 a 250 μ m pela técnica do peneiramento. Para a confecção do titânio denso foi utilizado somente o pó de titânio puro grau 2. Para confecção das amostras porosas da liga Ti-35Nb a uréia também foi utilizada.

As amostras da liga Ti-35Nb foram obtidas pela técnica de mistura de pós-elementares, como preconizado por Santos (2006). Os pós de titânio e nióbio foram utilizados no estado hidrogenado visando ativar a sinterização, pela presença do hidrogênio durante o processo, e a redução dos custos, uma vez que a etapa de desidrogenação é muito demorada. Foi efetuada, primeiramente, a

pesagem dos pós-precursos na estequiometria da liga, em balança analítica. O tempo de mistura utilizado foi de 30 minutos em misturador mecânico rotativo revestido por placas de titânio e bolas de titânio.

O processo de conformação das amostras porosas, tanto de titânio puro grau 2 quanto da liga Ti-35Nb, foi iniciado pela mistura manual destes com a uréia. Em seguida, a mistura de uréia com o pó de titânio foi colocado em um misturador Y (Treu S.A. 4/2L) onde permaneceu girando por 50 minutos até que uma mistura homogênea fosse obtida. Logo após, 1g dessa mistura de uréia com o pó de titânio foi inserido em uma matriz metálica cilíndrica medindo 12 mm x 30 mm e o conjunto conduzido para a compactação uniaxial com pressão de 70 MPa na prensa uniaxial (Marconi – MA 0981-C) seguida pela compactação isostática a frio com pressão de 200MPa em prensa isostática (Paul Weber – Type Kip 100e). Previamente à sinterização, todas as amostras porosas passaram por um processo de raspagem com espátula Lecron (Duflex) para que a uréia fosse exposta e logo depois removida em estufa (Fanem- Orion® - Modelo C-HT 515) a 200°C por 2 horas. A sinterização das amostras de titânio puro e da liga Ti-35Nb foi realizada em vácuo de 10^{-7} toneladas, com taxa de aquecimento de 10°C/min com patamar de 1 hora na temperatura de 1200°C em forno a vácuo Termal Technology, modelo ASTRO (Figura 2).



Figura 2 – Procedimento de confecção das amostras: a) pó de titânio e uréia em grânulos; b-c) matriz idealizada para confecção das amostras; d) misturador Y; e) prensa uniaxial; f) prensa isostática; g) forno à vácuo; h) amostras de titânio.

Para limpeza, as amostras foram escovadas com escova dental macia e detergente neutro, sendo enxaguadas com água destilada. Posteriormente, foram submetidas a banhos sucessivos em cubas de ultrassom (Cristófoli Biossegurança 2,5L), por 10 minutos, na seguinte seqüência: água destilada e detergente enzimático, acetona pura e água destilada.

Foram confeccionadas 390 amostras em forma de disco, com 12mm de diâmetro por 2mm de altura, sendo 195 de titânio puro e 195 de titânio-35nióbio. Trinta amostras foram submetidas à análise metalográfica, espectrometria por energia dispersiva – EDS, difração de raios X – DRX e análise da rugosidade. Para os procedimentos *in vitro*, 60 amostras eram de titânio puro denso, 60 de titânio puro poroso e 60 de titânio puro poroso submetido a tratamento biomimético, 60 de titânio-35nióbio denso, 60 de titânio-35nióbio poroso e 60 de titânio-35nióbio poroso submetido a tratamento biomimético.

Sessenta amostras porosas de titânio-35nióbio e 60 de titânio puro foram submetidas ao tratamento biomimético de superfície. As etapas deste tratamento estão descritas a seguir:

- a) tratamento alcalino das amostras, com solução de NaOH em autoclave vertical - Fanem (São Paulo - SP) a 130°C por 60 minutos.
- b) tratamento térmico em forno tubular EDG 3P-S-1800 (São Carlos - SP) a 200°C por 60 minutos;

c) imersão das amostras em solução de fluido corpóreo simulado modificado (FCSm) (Andrade et al., 2000), trocado a cada 2 dias, retirados após período de 14 dias. Após a retirada da solução, as amostras foram secas em papel filtro mantidas em dessecador para evitar contaminação.

O preparo da solução FCSm foi realizado da seguinte maneira. Todo o material foi lavado em água destilada. Posteriormente, a solução de HCl foi usada para lavagem, o material foi enxaguado por 5 vezes com água deionizada pura e a secagem realizada em estufa. Os reagentes (Quadro 1) foram dissolvidos sob agitação moderada, utilizando um terço da água deionizada pré-aquecida a 37°C em estufa. A solução foi agitada por 10 a 15 minutos, visando sua homogeneização. Em seguida, realizado o ajuste do pH na faixa de 7,5 a 8,0, sendo controlado com a adição de ácido clorídrico. A aferição do volume final em balão volumétrico foi realizada e após esta, o balão foi tampado e a solução homogeneizada por 40 agitações. A solução foi armazenada em frasco de polietileno, mantido em geladeira.

No quadro 1 estão descritos os constituintes e suas quantidades no FCSm proposto por Andrade et al.(2000).

Quadro 1 - Constituintes e suas concentrações no FCSm proposto por Andrade et al. 2000

CONSTITUINTES	QUANTIDADE (g)
NaCl	7,94
NaHCO ₃	0,353
NaHPO ₄ .7H ₂ O	0,245
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
KCl	0,372
CaSO ₄ .2 H ₂ O	0,086
CaCl ₂	0,200

Vf = 1000mL

Finalmente, para os testes *in vitro* foram constituídos 6 grupos, contendo 60 amostras cada, conforme descrito a seguir:

- a) Grupo 1 – titânio puro denso
- b) Grupo 2 – titânio puro poroso
- c) Grupo 3 – titânio puro poroso tratado
- d) Grupo 4 – titânio-35nióbio denso
- e) Grupo 5 – titânio-35nióbio poroso
- f) Grupo 6 – titânio-35nióbio poroso tratado

As amostras foram acondicionadas e enviadas para a Empresa Brasileira de Radiações Ltda – EMBRARAD onde foram submetidas a 20 KGY de radiação para esterilização. Todos os testes foram realizados em triplicata e para realização dos mesmos, cinco amostras de cada grupo foram utilizadas.

4.2 Análise metalográfica

Cinco amostras de cada grupo foram avaliadas quanto à quantidade, área, morfologia e interligação dos poros por meio de análise metalográfica. As amostras foram embutidas em baquerite, cortadas em disco diamantado, lixadas e polidas em politriz (Pantek – Polipan 2). Após preparo foi realizada a colagem das amostras na plataforma para análise em microscópio eletrônico de varredura – MEV (Microscópio-Leica. S430i), para a caracterização da microtopografia, com aumento de 100x. A morfologia e a interligação dos poros foram demonstradas nas imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura - MEV (Figura 3). Para análise estatística do tamanho e porcentagem em área de poros foram realizadas 3 imagens de cada amostra em microscópio óptico (Microscópio Zeiss – Axio-Imager/A2m), com aumento de 50x. O programa de imagem utilizado foi o *Image J* (versão Windows 3.0).



Figura 3 - Microscópio Eletrônico de Varredura – LEICA-S430 i

4.3 Análise por Espectrometria por Dispersão de Energia (EDS) e Difração de Raio X (DRX)

As amostras de titânio denso, titânio poroso e titânio-35nióbio denso, titânio-35nióbio poroso submetidas ou não ao tratamento biomimético foram avaliados por espectrometria por dispersão de energia – EDS (Oxford com Detector Modelo – 7059), visando determinar as fases cristalinas presentes na superfície das amostras. Com o objetivo de determinar os elementos presentes nas amostras e a interação entre eles caso esta ocorresse (formação de compostos) as amostras de titânio denso, titânio poroso e titânio-35nióbio denso, titânio-35nióbio poroso não tratadas foram submetidas a avaliação por difração de raios X – DRX (Philips Panalytical Modelo – X’Pert Pro),

4.4 Análise da Rugosidade Média

Cinco amostras do grupo 1 e 4 (amostras densas) foram avaliadas quanto a sua rugosidade média (R_a) de superfície em rugosímetro (Taylor-Hobson Modelo - PGI 1000).

A R_a é o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média dentro do comprimento de

medição, sendo o valor considerado como a média de rugosidade da superfície presente nas amostras densas.

As amostras porosas não foram submetidas ao teste de rugosidade de superfície, uma vez que a agulha do aparelho que afere o nível de rugosidade poderia ficar presa nos poros podendo ser danificada.

4.5 Procedimento de cultura de células

4.5.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Células osteogênicas foram isoladas por digestão enzimática seqüencial de fragmentos de calvária de ratos Wistar recém-nascidos (2 a 4 dias), com solução de tripsina a 0,25% e colagenase tipo II a 0,1% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), como descrito previamente (Oliveira, Nanci, 2004; Oliveira et al., 2007). As células foram plaqueadas sobre as amostras de titânio contidas em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 20.000 células/poço. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 14 dias em Meio Essencial Mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7mM de beta-

glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Sigma) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco, Invitrogen), à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) em culturas crescidas sobre poços de poliestireno contendo apenas células cultivadas, isto é, sem as amostras de titânio (Figura 4-5).



Figura 4 - Isolamento de células osteogênicas. a) animais com três dias de vida; b) eutanásia por decapitação; c) calvária sendo removida; d) banhos seqüenciais.

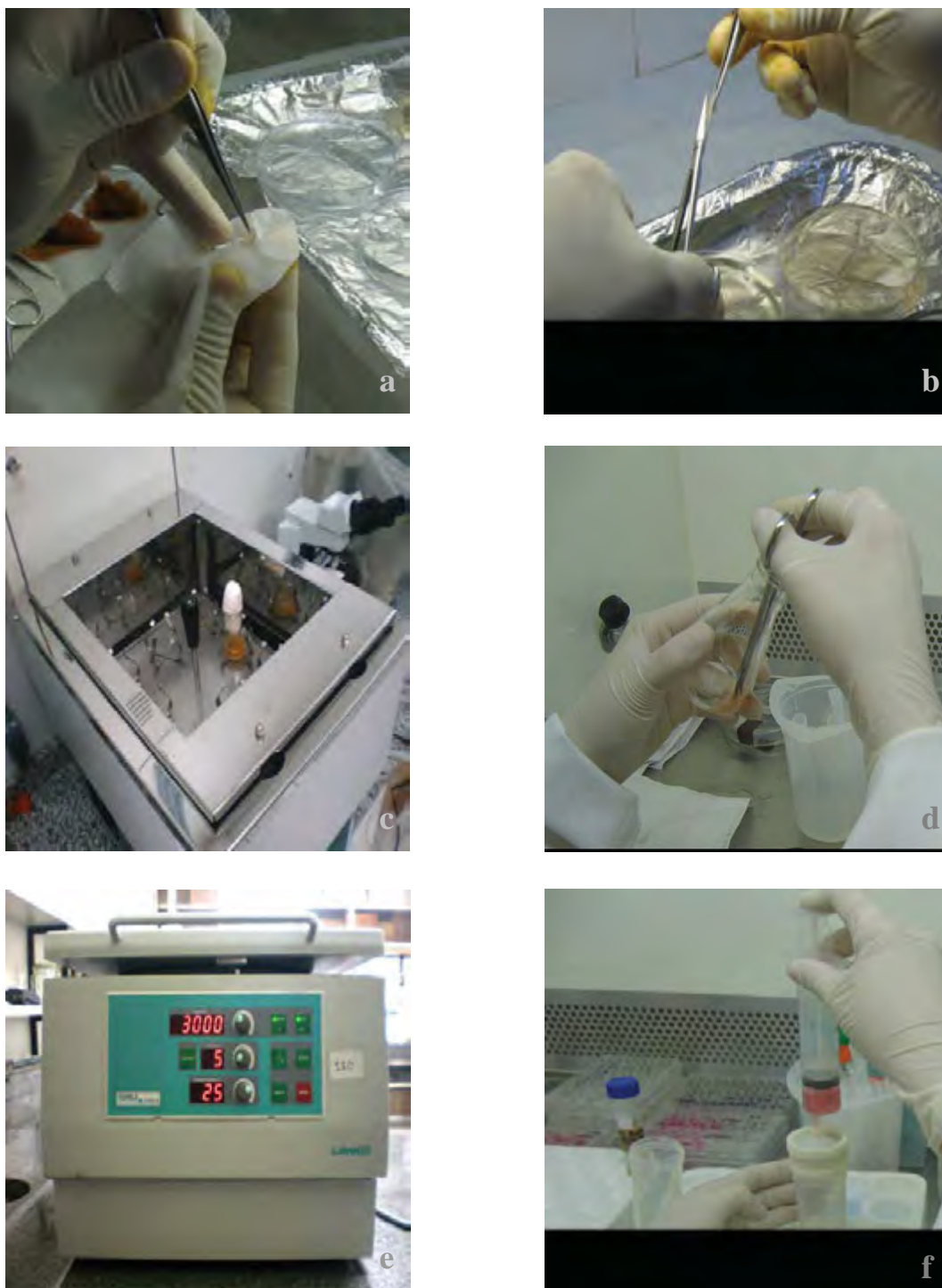


Figura 5 - Isolamento de células osteogênicas. a) remoção de tecidos moles; b) remoção das suturas; c) banho maria sob agitação; d) fragmentação manual das calvárias; e) centrifugação; f) filtragem das células osteogênicas para cultura.

4.5.2 Adesão celular

Para a avaliação da adesão celular, as células foram cultivadas por 4h e 24h nas amostras. O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes, com solução salina em tampão fosfato (PBS) a 37°C, para remoção de células não aderidas. No período de 4h as células aderidas foram enzimaticamente removidas das amostras com a utilização de 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Invitrogen) e 0,25% de tripsina (Gibco, Invitrogen) para contagem das células na câmara de Neubauer (Optik Labor). No período de 24h as células aderidas foram removidas como descrito anteriormente para o período de 4h, coradas com azul de Tripán 0,4% (Gibco, Invitrogen) e contadas na câmara de Neubauer em microscópio de fase invertida. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem do número total de células aderidas por poço (Figura 6).



Figura 6 - Adesão celular. a) corante azul de Trypan 0,4%; b) câmara de Neubauer; c) microscópio usado para contagem das células na câmara de Neubauer.

4.5.3 Proliferação e viabilidade celular

Para a avaliação da proliferação celular, as células foram cultivadas nas amostras por períodos de 1, 3, 7 e 10 dias. Em cada um desses períodos o meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes, com PBS a 37 °C, para remoção de células não aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas das amostras com a utilização de 1mM de EDTA e 0,25% de tripsina (Gibco, Invitrogen). As células foram coradas com azul de Tripán 0,4% e contadas na câmara de Neubauer em microscópio de fase invertida. Os valores obtidos para proliferação celular foram expressos em número total de células aderidas por poço e a viabilidade celular foi expressa em porcentagem do número total de células por poço.

4.5.4 Determinação da viabilidade celular por ensaio colorimétrico-MTT

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nas amostras e avaliadas em três períodos: três, sete e 10 dias. A análise foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT [(brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliol] (Sigma), o qual é um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. Alíquotas de MTT a 5mg/mL em PBS

foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV) das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1mL de PBS aquecido a 37 °C. Em seguida, o PBS foi removido e adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido (100mL de isopropanol e 134µL de HCl) em cada poço sob agitação (Mesa Agitadora Orbital Solab) por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU) no comprimento de onda 570 nm com correção para 650nm e os dados expressos como absorbância (Figura 7).

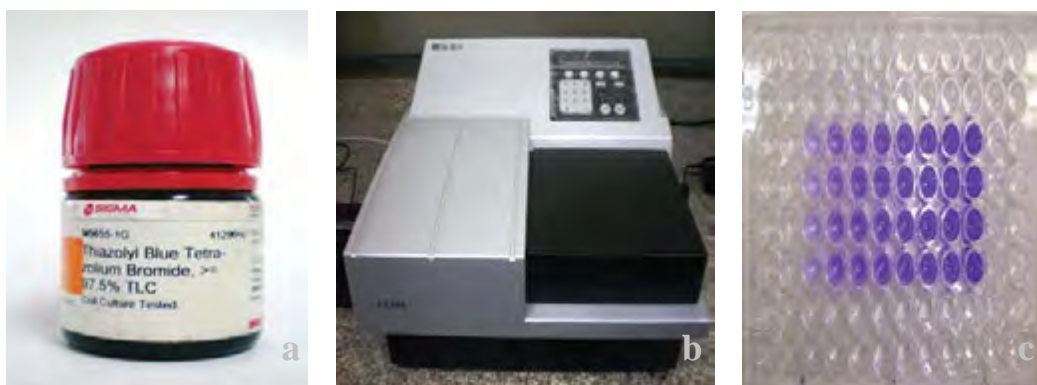


Figura 7 – Viabilidade Celular. a) sal MTT; b) espectrofotômetro Biotek EL808; c) placa de 96 poços contendo as alíquotas para leitura.

4.5.5 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 7, 10 e 14 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al, 1951. As proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1%. Após 30 minutos, 1mL da solução de cada poço foi misturado a 1mL da solução de Lowry (Sigma) e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680nm em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva padrão determinada a partir de albumina bovina e os valores expressos em $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8).



Figura 8 - Conteúdo de proteína total. a) poços preenchidos com lauril sulfato de sódio; b) tubos de ensaio recebendo reagente de Lowry; c) reagente de Folin e Ciocalteu; d) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas das amostras; e) espectrofotômetro (Shimadzu UV-1203).

4.5.6 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial (Labtest) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5mL de tampão dietanolamina a 0,3M, pH 10,1, por 2 minutos a 37°C. À solução foi então acrescentada alíquota de 50 μ L dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2mL de Na₂CO₃ a 0,09M e NaOH a 0,25M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) utilizando comprimento de onda de 590nm e a atividade de fosfatase alcalina, calculada seguindo os procedimentos de cálculos preconizados na bula do Kit comercial (Labtest). Os dados foram expressos como atividade de fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total, para culturas primárias nos tempos de 7, 10 e 14 dias e os valores expressos em μ mol de timolftaleína/hora/ μ g de proteína/ml (Figura 9).



Figura 9 - Atividade de fosfatase alcalina. a) lisados celulares; b) kit comercial Labtest; c) tubos de ensaio com reagentes recebendo alíquotas das amostras; d) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas das amostras; e) espectrofotômetro para leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 590 nm.

4.5.7 Quantificação de formações nodulares de matriz mineralizada

Após cultura de 14 dias, as culturas primárias crescidas sobre as amostras de titânio puro e titânio-35nióbio foram lavadas em 1mL de solução de Hank's a 37°C por duas vezes e fixadas em 2mL de álcool 70 por 1h em geladeira. Após 1h o álcool foi retirado e as amostras foram lavadas com 1mL PBS gelado por duas vezes. Em seguida, o PBS foi retirado e as amostras lavadas com água deionizada por duas vezes e coradas com vermelho de Alizarina S a 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 minutos à temperatura ambiente, para detecção macro e microscópica de acúmulos de cálcio. Os espécimes foram fotografados com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels). A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 560µL de ácido acético 10% foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, cada uma das amostras foi raspada com auxílio de uma ponteira, para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga de 1,5 mL, e agitados em vórtex (Vertex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA- 095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 85 °C sendo posteriormente, transferidos a um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) por

20 minutos e 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para placa de 96 poços. Neste foram acrescentados 40 μ L de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU), sob o comprimento de onda de 405nm (Figura 10-11).



Figura 10 - Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada. a) sal de Hank's; b) corante vermelho Alizarina S; c) formações nodulares coradas com vermelho Alizarina S; d) reagentes hidróxido de amônia e ácido acético.



Figura 11 - Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada. a) centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA; b) espectrofotômetro (para leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 405 nm).

4.6 Método de análise dos resultados

Para análise metalográfica foram obtidos três cortes de cada uma das cinco amostras de cada grupo para avaliação do tamanho e porcentagem em área de poros presentes nestas amostras, utilizando o programa de imagens *Image J*. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis e com nível de significância de 5%.

Para análise dos dados da cultura de células foram utilizados testes estatísticos não paramétricos, pois condições para utilização de testes paramétricos como a normalidade, não foram encontradas neste conjunto de dados. Ambos os testes foram definidos com um nível de significância de 5%. Logo, todos os intervalos de confiança, apresentados ao longo do trabalho, foram construídos com

95% de confiança estatística. O número de amostras (n=15) refere-se a três culturas primárias distintas para cada avaliação.

Os dados foram analisados inicialmente de forma descritiva. Para estabelecer comparações entre os grupos experimentais em cada um dos períodos de avaliação foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Entretanto, para que se pudesse determinar com precisão entre quais grupos ocorreu a diferença o teste estatístico utilizado foi o teste de Mann-Whitney. Para calcular a variação da porcentagem de células aderidas, no teste de adesão celular, utilizou-se ainda, o teste de T-Student para comparar os tempos de 4 e 24 horas em cada grupo, pois comparamos as médias em relação ao um parâmetro fixo, ou seja, em relação a 100%.

5. RESULTADOS

5.1 Análise metalográfica

Na análise metalográfica, realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), pôde-se observar que as amostras de titânio e titânio-35nióbio exibiam superfície porosa com poros apresentando área e formatos variados. As amostras demonstram dois diferentes tamanhos de poros: os microporos e os macroporos. Os microporos eram pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização, enquanto que os macroporos eram abertos e interligados, oriundos da porosidade confeccionada pela adição da fase orgânica (uréia). Esta interligação entre os poros é a responsável pelo crescimento ósseo para o interior dos poros mais centrais (Figura 12 e 13).

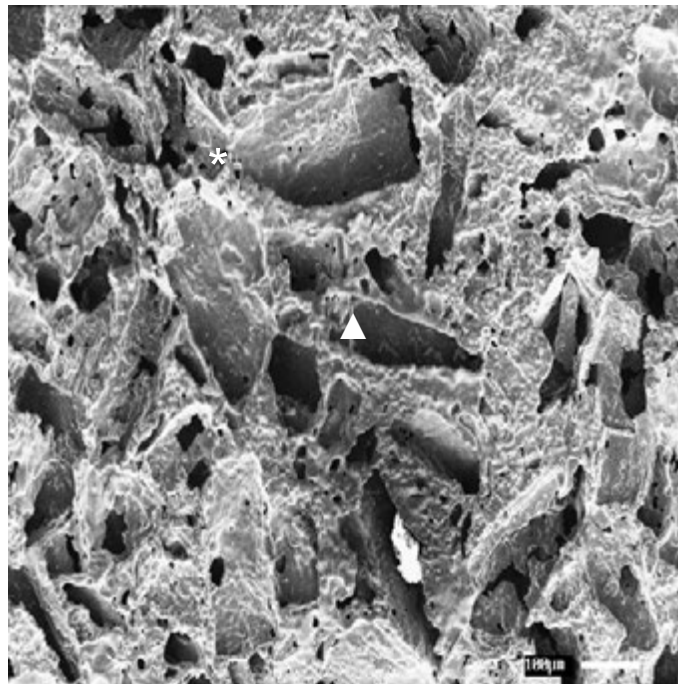


Figura 12 – Fotomicrografia de MEV com aumento de 100X da superfície das amostras porosa Grupo 2: (*) microporos e (▲)macroporos.

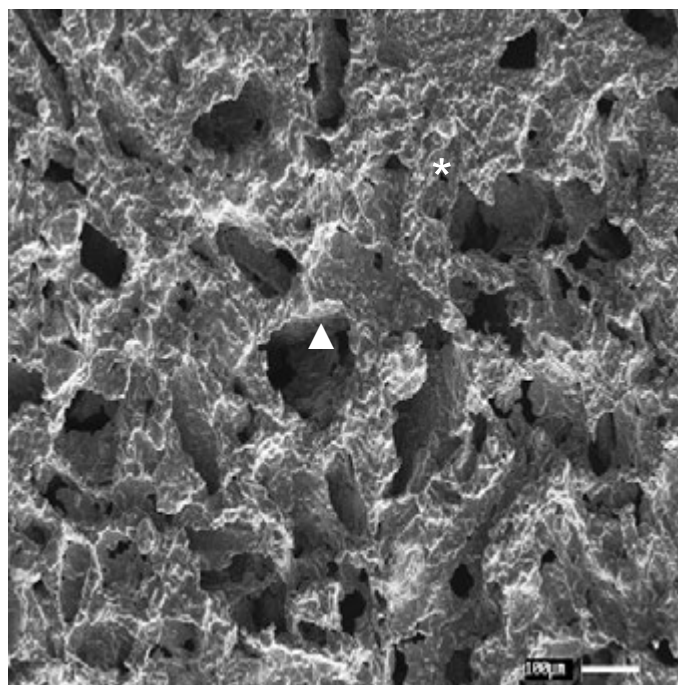


Figura 13 – Fotomicrografia de MEV com aumento de 100X da superfície das amostras porosas Grupo 5: (*) microporos e (▲)macroporos.

Nas amostras do Grupo 1 e Grupo 4 (amostras densas) foram observados apenas os microporos, pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização (Figura 14).

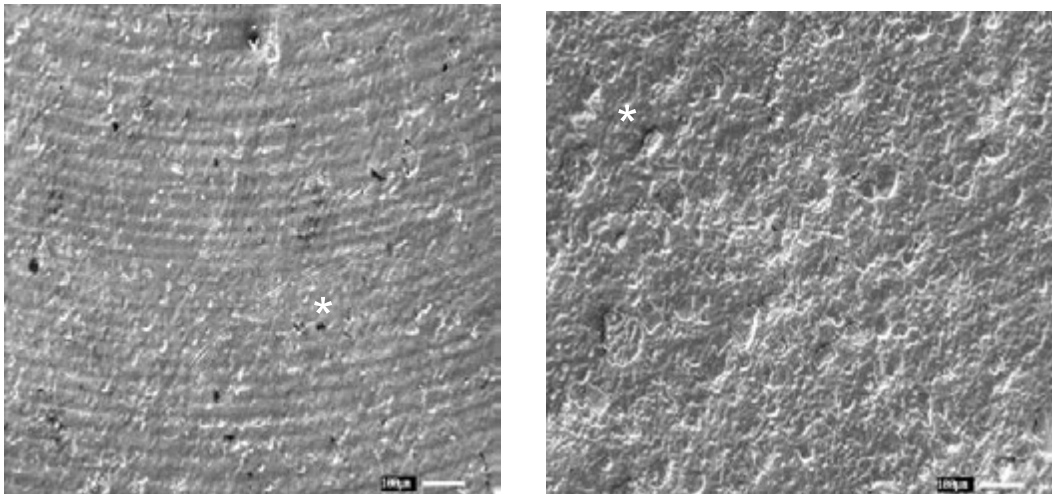


Figura 14 - Fotomicrografia de MEV com aumento de 100X da superfície das amostras densas: a) amostra densa Grupo 1; b) amostra densa Grupo 4. (*) microporos isolados.

Na análise da superfície interna das amostras em microscópio óptico (MO) foi possível observar a presença de grande quantidade de poros e a interligação entre os mesmos tanto nas amostras de titânio puro quanto nas de titânio-35nióbio (Figura 15 e 16).



Figura 15 – Fotomicrografia de microscópio óptico da superfície interna das amostras do Grupo 2 (aumento de 50x), poros(*).

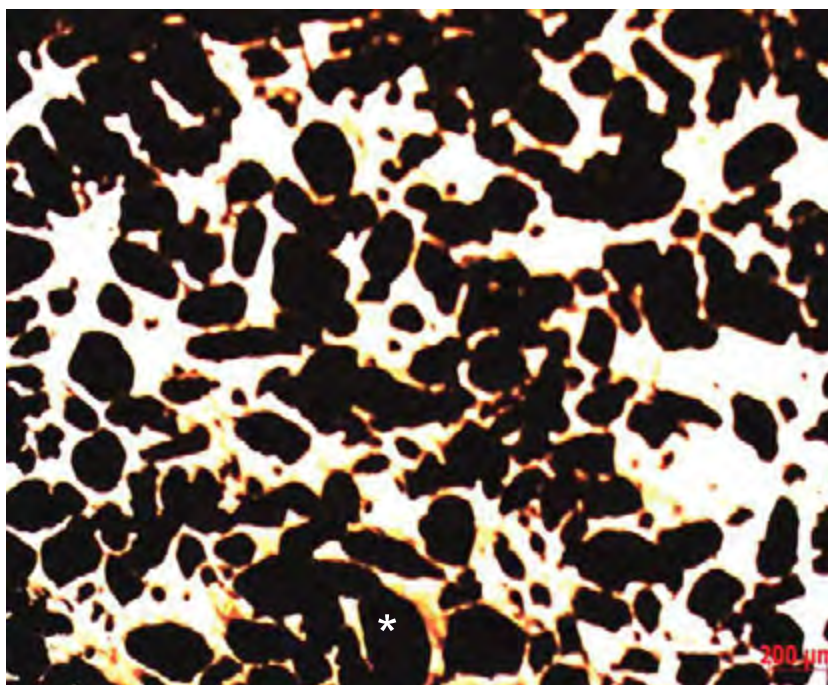


Figura 16 – Fotomicrografia de microscópio óptico da superfície interna das amostras do Grupo 5 (aumento de 50x), poros(*).

5.1.1 Análise estatística dos dados metalográficos

Os dados obtidos da análise metalográfica das três secções das 5 amostras de cada grupo, foram avaliadas por meio do programa de computador *Image J* (versão Windows 3.0) para a realização do cálculo do tamanho dos poros (μm^2) e porcentagem em área de poros.

Os dois grupos submetidos à análise estatística foram os Grupos 2 e 5 sendo que os Grupos 3 e 6 apresentam respectivamente as mesmas condições de porosidade, porém adicionados do tratamento biomimético. Os Grupos 1 e 4 não foram submetidos a estatística porque são amostras densas, isto é, não apresentam porosidade.

As amostras do Grupo 2 – titânio puro porosa com 40% de uréia apresentavam poros de tamanho médio de $150,09\mu\text{m}^2$ e porcentagem em área de poros de 70,5% o mesmo ocorreu com o Grupo 3 enquanto as amostras do Grupo 5 – titânio-35nióbio porosa com 40% de uréia apresentavam poros de tamanho médio de $138,99\mu\text{m}^2$ e porcentagem em área de poros de 61,73 % o mesmo ocorreu com o Grupo 6. As estatísticas descritivas das áreas representativas dos poros estão descritas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Média (\pm desvio padrão) e mediana dos dados do tamanho de poros (μm^2) obtidos nas 5 amostras de cada grupo de porosidade

Amostra	N*	Média (μm^2)	Desvio padrão	Mediana
Grupo 2	5	150,09	$\pm 18,14$	155,25
Grupo 5	5	138,99	$\pm 35,21$	139,79

* número de amostras

Tabela 2 Média (\pm desvio padrão) e mediana dos dados da porcentagem em área de poros obtidos nas 5 amostras de cada grupo de porosidade

Amostra	N*	Média (%)	Desvio padrão	Mediana
Grupo 2	5	70,5	$\pm 5,92$	71,1
Grupo 5	5	61,73	$\pm 3,05$	62,5

* número de amostras

Para melhor interpretação dos dados metalográficos nos dois tipos de amostras porosas, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, que mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos 2 e 5 em relação ao tamanho dos poros ($k_w = 0,2308$; $gl = 1$; $p = 0,6533$). Em relação à porcentagem de poros o teste indicou que houve diferença estatística entre dois grupos ($k_w = 6,564$; $gl = 1$; $p = 0,0032$).

5.2 Análise por Espectrometria por Dispersão de Energia - EDS

As amostras dos Grupos 1 e 2 (Figura 17 e 18) quando avaliadas por EDS exibiram apenas o titânio como elemento principal, as amostras dos Grupos 4 e 5 (Figura 20 e 21) exibiram o titânio e nióbio como elementos principais. Enquanto as amostras do Grupo 3 submetidas ao tratamento biomimético quando avaliadas por EDS exibiram taxas de cálcio, fósforo, magnésio, cloro, sódio e titânio e as amostras do Grupo 6 submetidas ao mesmo tratamento demonstraram taxas de cálcio, fósforo, magnésio, cloro, sódio, titânio e o nióbio como elementos presentes (Figura 19 e 22).

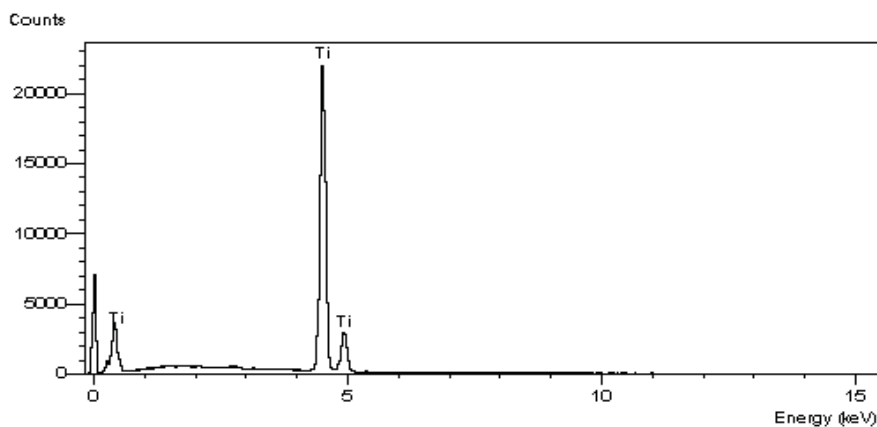


Figura 17 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 1.

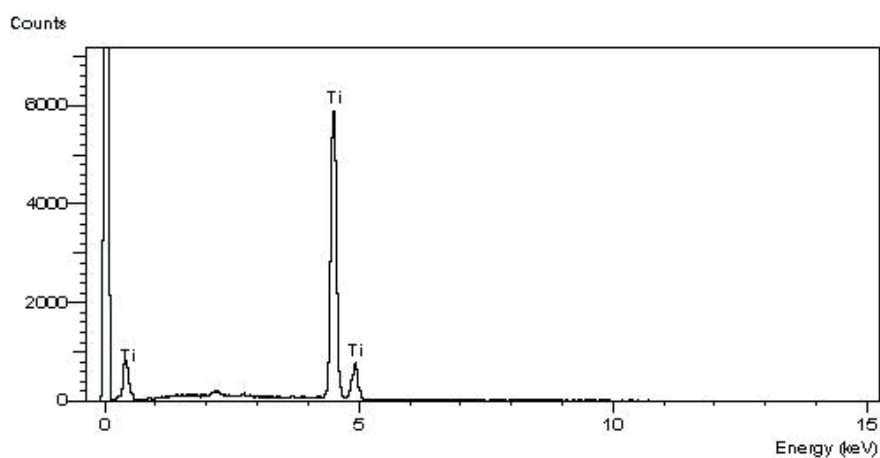


Figura 18 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 2 .

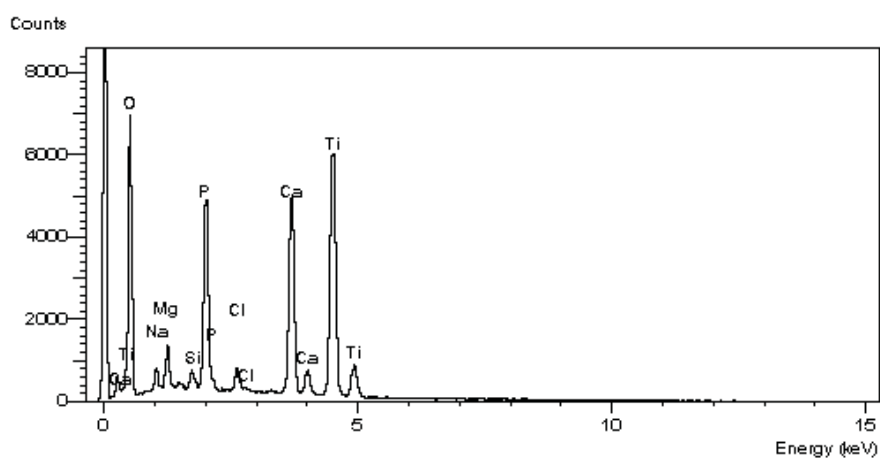


Figura 19 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 3 submetida ao tratamento biomimético.

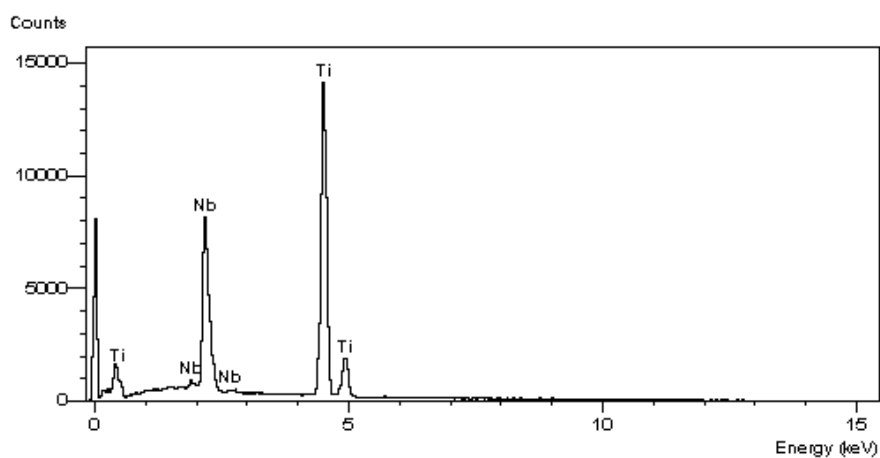


Figura 20 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 4.

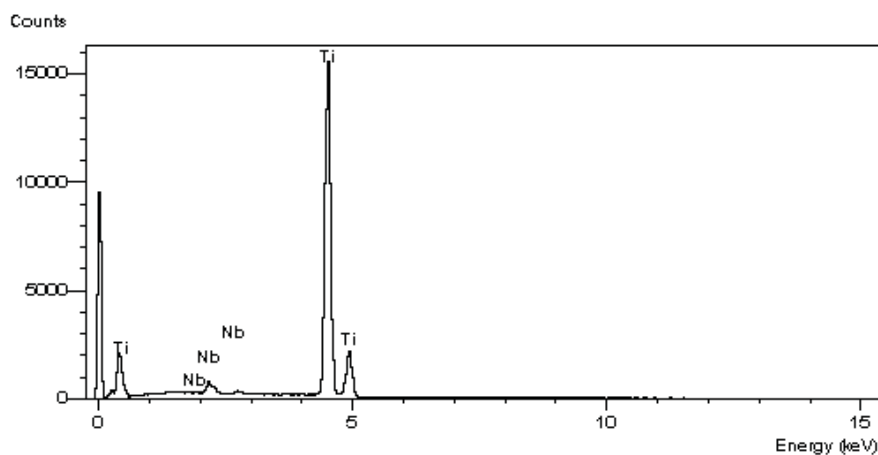


Figura 21 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 5.

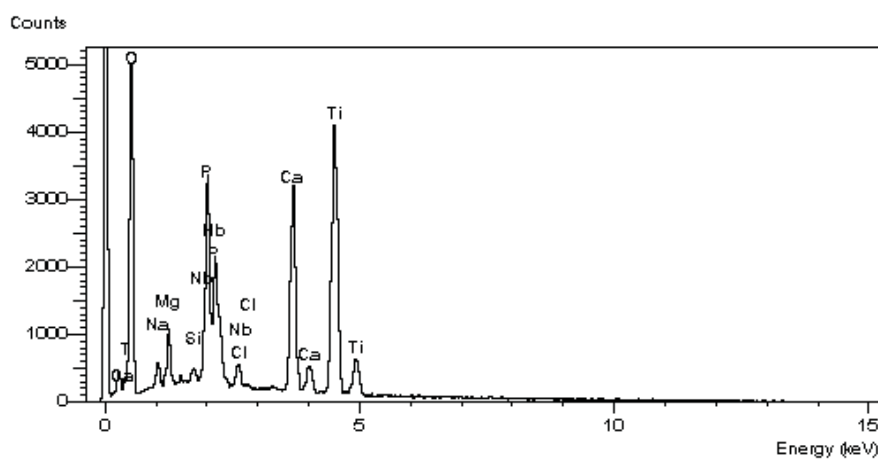


Figura 22 - Gráfico do EDS da amostra do Grupo 6 submetida ao tratamento biomimético.

5.3 Análise por Difração de Raio X - DRX

As amostras dos Grupos 1, 2, 4 e 5 foram submetidas a análise por difração de raio X para identificação dos elementos presentes.

Na análise da amostra do Grupo 1 observou-se a presença de picos do metal titânio como elemento principal (Figura 23), na análise da amostra do Grupo 2 verificou-se picos de titânio e nitreto de titânio como elementos principais (Figura 24).

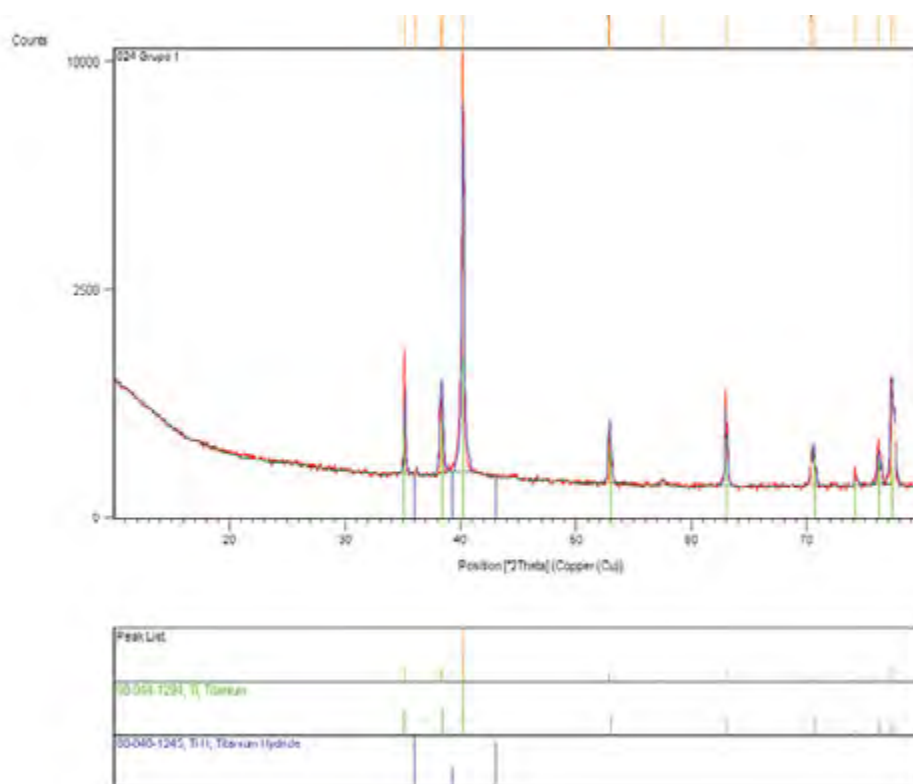


Figura 23 – Gráfico da DRX da amostra do Grupo 1.

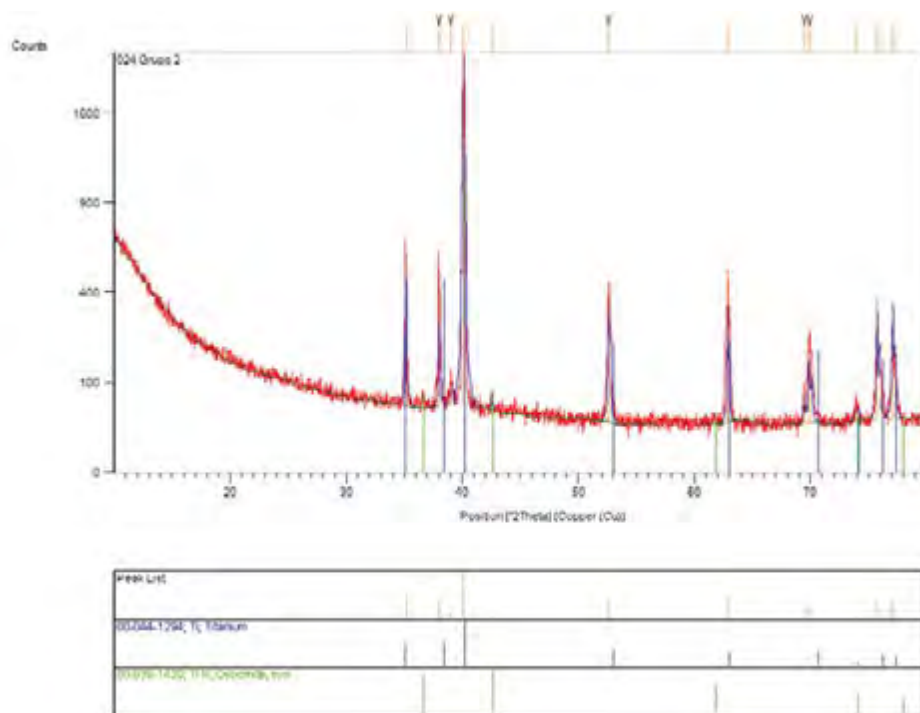


Figura 24 – Gráfico da DRX da amostra do Grupo 2.

Na análise da amostra do Grupo 4 (figura 25) observou-se a presença de picos do metal titânio e nióbio como elementos principais. A figura 26 correspondente a análise da amostra do Grupo 5 apresentou picos de titânio, nióbio e nitreto de titânio como elementos principais.

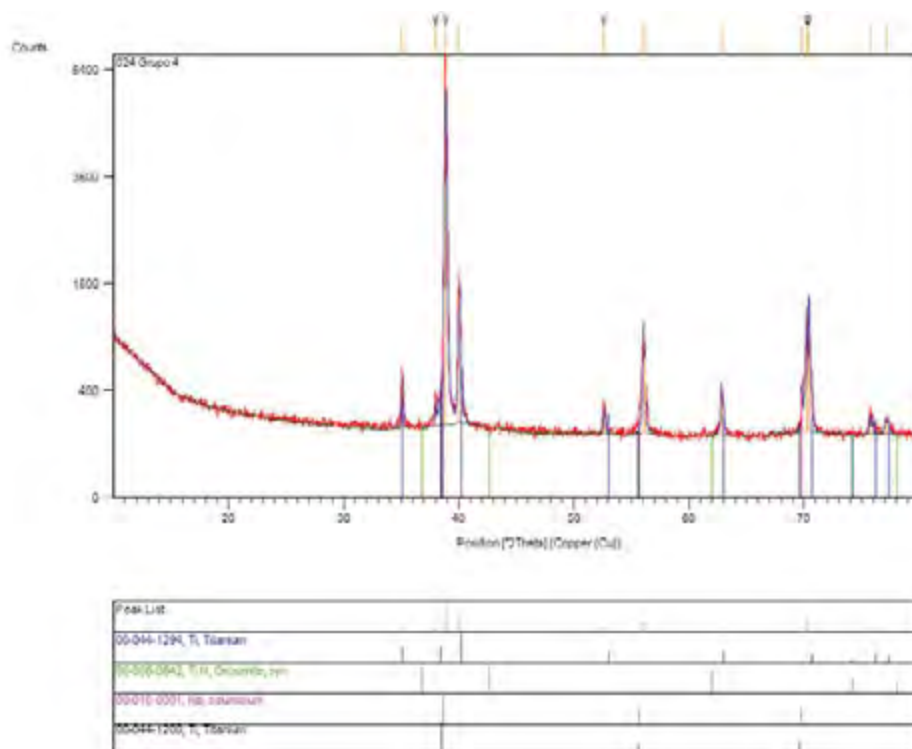


Figura 25 – Gráfico da DRX da amostra do Grupo 4.

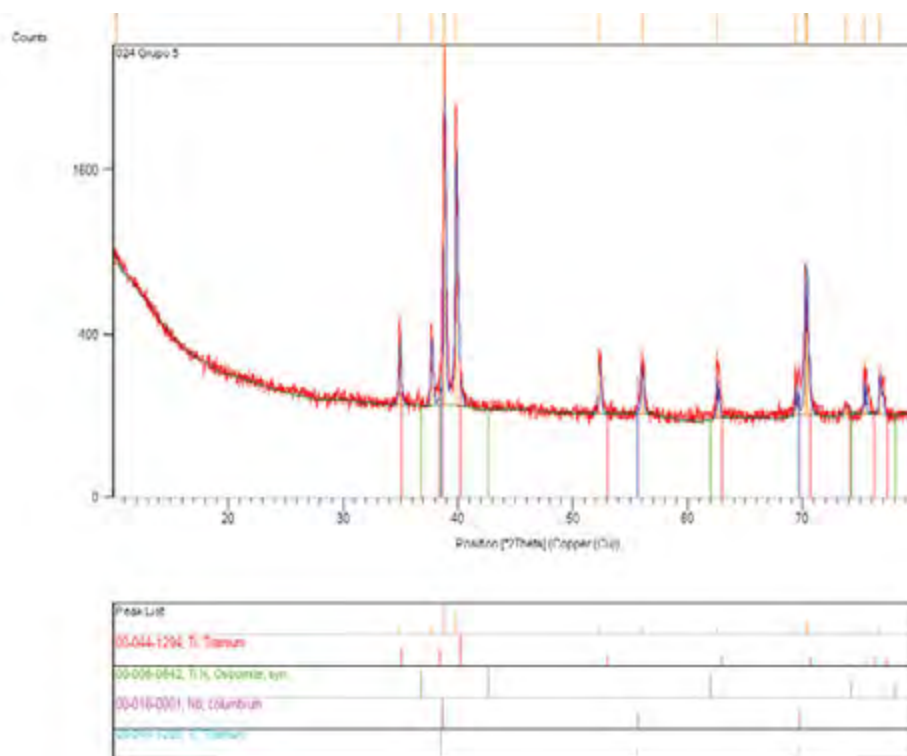


Figura 26 – Gráfico da DRX da amostra do Grupo 5.

5.4 Análise da rugosidade média

As amostras do Grupo 1 apresentaram valor médio de rugosidade de $0,9930\mu\text{m}$. As amostras do Grupo 4 apresentaram valor médio de rugosidade de $3,4330\mu\text{m}$.

Para interpretação dos dados da rugosidade média nos dois grupos de amostras densas, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, que indicou diferença estatística na rugosidade entre os dois grupos ($kw = 14,2857$; $gl = 1$; $p = 0,0000$).

Tabela 3 – Valores (μm) dos dados da rugosidade média (Ra) nas amostras dos grupos 1 e 4

Amostra	N*	Média Ra(μm)	Desvio padrão	Mediana
Grupo 1	5	0,9930	$\pm 0,1901$	0,9750
Grupo 4	5	3,4330	$\pm 0,6640$	3,2850

5.5 Adesão celular

Para a adesão celular foi calculada a porcentagem de células aderidas em relação ao número inicial de células plaqueadas (20.000 células/poço). Notou-se que em todos os grupos o percentual aumentou do momento 4h para 24h, sendo que a maior adesão ocorreu no grupo 1 onde a porcentagem foi de 20,8 % para 91,7 % do total de 20.000 células iniciais (Figura 27 e Tabela 4). Observou-se que em todos os grupos foi encontrada diferença estatística entre os momentos de 4 e 24 horas para a adesão celular.

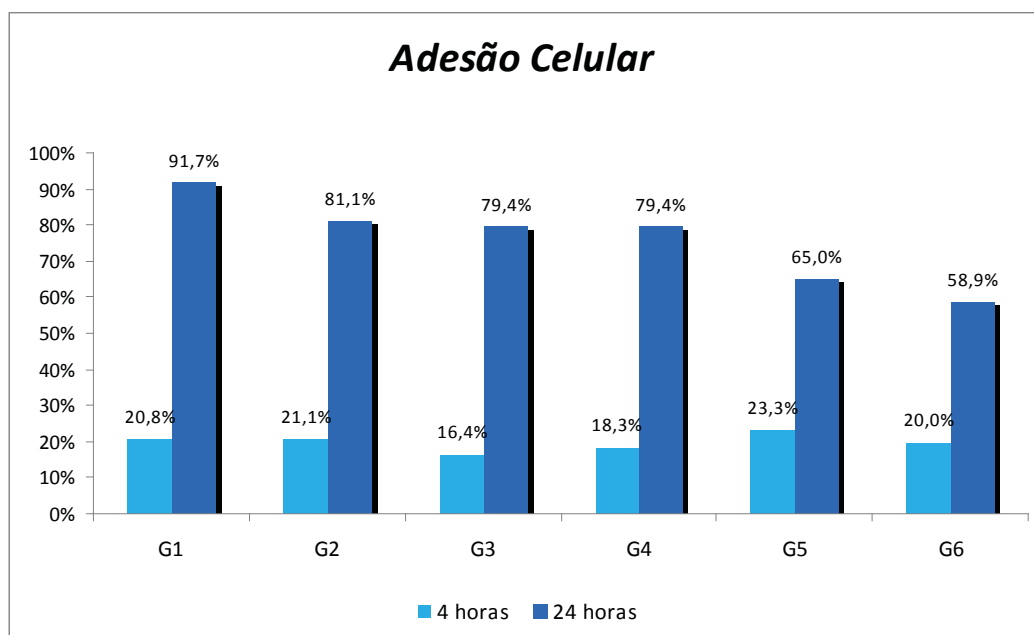


Figura 27 - Gráfico representativo da adesão celular em porcentagem de osteoblastos aderidos de cada grupo experimental nos períodos de 4h e 24h.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da adesão celular em porcentagem de osteoblastos de cada grupo experimental nos vários períodos. Teste estatístico de T-Student ($p \leq 0,05$)

Adesão Celular		Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor
G1	4 horas	20,8%	20,8%	5,2%	<0,001*
	24 horas	91,7%	91,7%	27,8%	
G2	4 horas	21,1%	20,8%	8,4%	<0,001*
	24 horas	81,1%	66,7%	35,3%	
G3	4 horas	16,4%	16,7%	5,8%	<0,001*
	24 horas	79,4%	75,0%	35,5%	
G4	4 horas	18,3%	16,7%	9,0%	<0,001*
	24 horas	79,4%	75,0%	43,5%	
G5	4 horas	23,3%	20,8%	11,2%	<0,001*
	24 horas	65,0%	58,3%	26,2%	
G6	4 horas	20,0%	20,8%	7,7%	<0,001*
	24 horas	58,9%	58,3%	27,9%	

*Diferença estatisticamente significante

Na comparação dos p -valores dos dados de adesão celular observou-se diferença estatística significativa entre o grupo 1 em relação aos grupos 5 e 6 no período de 24 horas (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de p para adesão celular entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

		G1	G2	G3	G4	G5
4 horas	G2	0,966				
	G3	0,052	0,152			
	G4	0,246	0,363	0,735		
	G5	0,833	0,690	0,118	0,230	
	G6	0,673	0,719	0,281	0,525	0,488
	G2	0,235				
24 horas	G3	0,138	0,884			
	G4	0,134	0,851	0,646		
	G5	0,016*	0,168	0,161	0,359	
	G6	0,005*	0,182	0,201	0,359	0,802
	G2					

*Diferença estatisticamente significante

5.6 Proliferação e Viabilidade celular

Verificou-se que a proliferação celular aumentou gradativamente com o tempo em todos os grupos experimentais e o período que promoveu maior proliferação foi 10 dias (Figura 28). Na tabela 6 pode-se observar que com exceção do período de 1 dia, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais nos demais períodos.

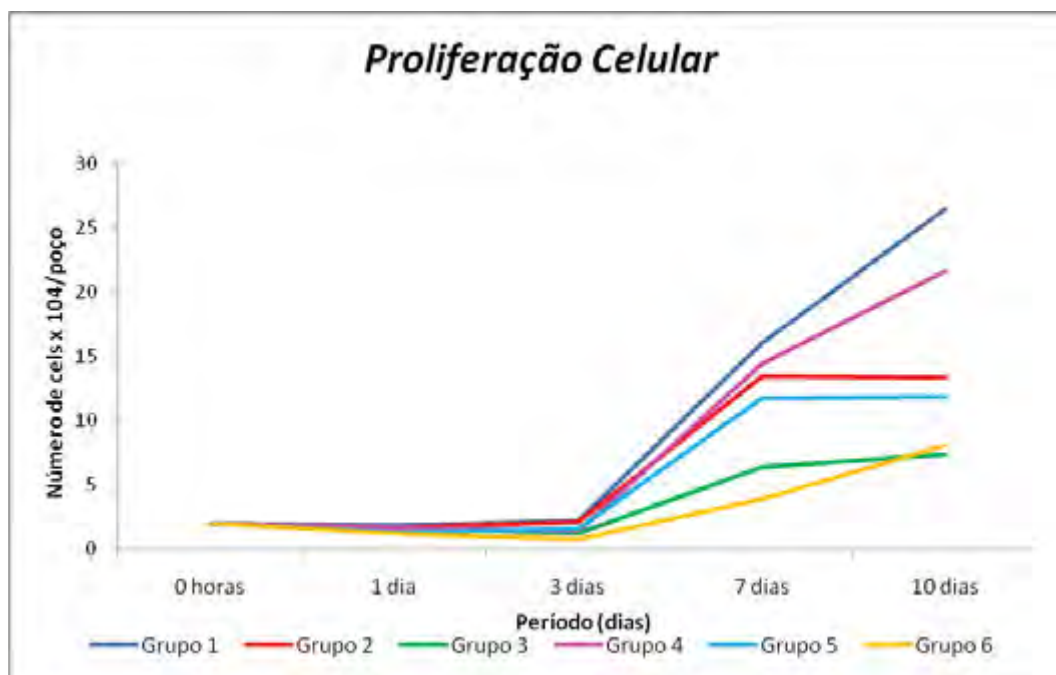


Figura 28 - Gráfico representativo da proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ / poço de cada grupo experimental nos vários períodos.

Tabela 6 - Média e desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células x 10⁴/poço entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis (p≤0,05)

Proliferação Celular	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
1 dia	G1	1,83	1,83	0,56	0,083
	G2	1,62	1,33	0,71	
	G3	1,59	1,50	0,71	
	G4	1,59	1,50	0,87	
	G5	1,30	1,17	0,52	
	G6	1,18	1,17	0,56	
3 dias	G1	2,17	2,00	0,97	<0,001*
	G2	2,06	1,83	1,02	
	G3	1,21	1,33	0,59	
	G4	1,37	1,17	0,52	
	G5	1,57	1,67	0,66	
	G6	0,76	0,67	0,31	
7 dias	G1	16,01	13,33	6,60	<0,001*
	G2	13,41	12,33	5,36	
	G3	6,37	7,67	3,66	
	G4	14,40	15,17	2,69	
	G5	11,73	10,00	4,88	
	G6	3,83	2,33	3,31	
10 dias	G1	26,53	27,83	7,89	<0,001*
	G2	13,31	12,17	4,71	
	G3	7,37	5,67	4,89	
	G4	21,64	19,17	6,05	
	G5	11,83	12,33	4,14	
	G6	8,11	8,00	5,06	

*Diferença estatisticamente significante

Analisando-se as médias e os *p*-valores dos grupos experimentais foi possível verificar que aos 10 dias o grupo 1 apresentou a maior média de proliferação celular sendo diferente estatisticamente de todos os demais grupos experimentais seguido do grupo 4 (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores da média e p - valores para proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ / poço entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Proliferação Celular		Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (MW- $p \leq 0,05$)
1 dia	G1	1,83	0,56	G5-G6
	G2	1,62	0,71	-
	G3	1,59	0,71	-
	G4	1,59	0,87	-
	G5	1,30	0,52	G1
	G6	1,18	0,56	G1
3 dias	G1	2,17	0,97	G3-G4-G6
	G2	2,06	1,02	G3-G6
	G5	1,57	0,66	G6
	G4	1,37	0,52	G1-G6
	G3	1,21	0,59	G1-G2-G6
	G6	0,76	0,31	G1-G2-G3-G4-G5
7 dias	G1	16,01	6,60	G3-G5-G6
	G4	14,40	2,69	G3-G5-G6
	G2	13,41	5,36	G3-G6
	G5	11,73	4,88	G1-G3-G4-G6
	G3	6,37	3,66	G1-G2-G4-G5
	G6	3,83	3,31	G1-G2-G4-G5
10 dias	G1	26,53	7,89	G2-G3-G4-G5-G6
	G4	21,64	6,05	G1-G2-G3-G5-G6
	G2	13,31	4,71	G1-G3-G4-G6
	G5	11,83	4,14	G1-G3-G4-G6
	G6	8,11	5,06	G1-G2-G4-G5
	G3	7,37	4,89	G1-G2-G4-G5

Na tabela 8 de valores de p é possível verificar se houve diferença entre os grupos e em qual período essa diferença ocorreu.

Tabela 8 – Valores de p para proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ / poço entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Proliferação Celular		G1	G2	G3	G4	G5
1 dia	G2	0,235				
	G3	0,138	0,884			
	G4	0,134	0,851	0,646		
	G5	0,016*	0,168	0,161	0,359	
	G6	0,005*	0,182	0,201	0,359	0,802
3 dias	G2	0,618				
	G3	0,008*	0,028*			
	G4	0,019*	0,070	0,380		
	G5	0,080	0,219	0,189	0,427	
	G6	<0,001*	<0,001*	0,026*	0,001*	<0,001*
7 dias	G2	0,372				
	G3	<0,001*	0,001*			
	G4	0,852	0,395	<0,001*		
	G5	0,042*	0,184	0,001*	0,024*	
	G6	<0,001*	<0,001*	0,071	<0,001*	<0,001*
10 dias	G2	<0,001*				
	G3	<0,001*	0,003*			
	G4	0,034*	<0,001*	<0,001*		
	G5	<0,001*	0,442	0,014*	<0,001*	
	G6	<0,001*	0,019*	0,663	<0,001*	0,044*

*Diferença estatisticamente significante

Na análise intragrupo da proliferação celular de cada grupo experimental ao longo do tempo foi constatado que em todos os grupos experimentais houve aumento na proliferação celular (Tabela 9).

Tabela 9 - Média e desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ / poço de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Proliferação Celular	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
Grupo 1	1 dia	1,83	1,83	0,56	<0,001*
	3 dias	2,17	2,00	0,97	
	7 dias	16,01	13,33	6,60	
	10 dias	26,53	27,83	7,89	
Grupo 2	1 dia	1,62	1,33	0,71	<0,001*
	3 dias	2,06	1,83	1,02	
	7 dias	13,41	12,33	5,36	
	10 dias	13,31	12,17	4,71	
Grupo 3	1 dia	1,59	1,50	0,71	<0,001*
	3 dias	1,21	1,33	0,59	
	7 dias	6,37	7,67	3,66	
	10 dias	7,37	5,67	4,89	
Grupo 4	1 dia	1,59	1,50	0,87	<0,001*
	3 dias	1,37	1,17	0,52	
	7 dias	14,40	15,17	2,69	
	10 dias	21,64	19,17	6,05	
Grupo 5	1 dia	1,30	1,17	0,52	<0,001*
	3 dias	1,57	1,67	0,66	
	7 dias	11,73	10,00	4,88	
	10 dias	11,83	12,33	4,14	
Grupo 6	1 dia	1,18	1,17	0,56	<0,001*
	3 dias	0,76	0,67	0,31	
	7 dias	3,83	2,33	3,31	
	10 dias	8,11	8,00	5,06	

*Diferença estatisticamente significante

Verificando-se os p -valores da tabela 10 observou-se que nos grupos 1, 4 e 6 existe diferença estatística significativa aos 10 dias em relação aos períodos 1, 3 e 7 dias.

Tabela 10 - Valores de p para proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ / poço para cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Proliferação Celular		1 dia	3 dias	7 dias
Grupo 1	3 dias	0,405		
	7 dias	<0,001*	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*	0,001*
Grupo 2	3 dias	0,197		
	7 dias	<0,001*	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*	0,819
Grupo 3	3 dias	0,336		
	7 dias	0,001*	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*	0,678
Grupo 4	3 dias	0,617		
	7 dias	<0,001*	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Grupo 5	3 dias	0,268		
	7 dias	<0,001*	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*	0,575
Grupo 6	3 dias	0,015*		
	7 dias	0,016*	<0,001*	
	10 dias	0,001*	<0,001*	0,029*

*Diferença estatisticamente significativa

Na análise da viabilidade celular foi possível observar que do primeiro ao décimo dia houve aumento na porcentagem de células viáveis em todos os grupos, mas somente no período de 7 dias houve diferença estatística entre os mesmos (Tabela 11).

Tabela 11- Média e desvio padrão da viabilidade celular em porcentagem de osteoblastos em cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
1 dia	G1	57,9 %	63,6 %	13,8 %	0,267
	G2	62,2 %	62,5 %	11,5 %	
	G3	63,8 %	66,7 %	11,7 %	
	G4	62,3 %	66,7 %	14,0 %	
	G5	67,6 %	66,7 %	8,1 %	
	G6	70,3 %	70,0 %	14,3 %	
3 dias	G1	68,1 %	70,8 %	14,2 %	0,521
	G2	69,3 %	72,7 %	9,2 %	
	G3	67,8 %	66,7 %	13,2 %	
	G4	70,5 %	70,0 %	9,4 %	
	G5	72,2 %	70,0 %	7,9 %	
	G6	63,6 %	66,7 %	13,7 %	
7 dias	G1	82,5 %	86,7 %	10,3 %	<0,001*
	G2	86,7 %	86,5 %	4,3 %	
	G3	82,1 %	82,5 %	6,7 %	
	G4	88,8 %	87,8 %	5,2 %	
	G5	91,2 %	93,8 %	5,6 %	
	G6	79,4 %	78,7 %	7,4 %	
10 dias	G1	90,3 %	93,1 %	7,9 %	0,149
	G2	88,4 %	93,8 %	8,7 %	
	G3	83,5 %	84,6 %	9,3 %	
	G4	91,8 %	94,7 %	7,6 %	
	G5	88,0 %	84,6 %	9,7 %	
	G6	86,4 %	84,6 %	10,9 %	

*Diferença estatisticamente significante

Analisando-se as médias e os *p*-valores dos grupos experimentais foi possível verificar que aos 7 dias o grupo 5 obteve a maior média sendo diferente estatisticamente de todos os grupos experimentais exceto em relação ao grupo 4 (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores da média e *p*-valores da viabilidade celular em porcentagem de osteoblastos entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular		Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (Mw - $p \leq 0,05$)
1 dia	G6	70,3 %	14,3 %	-
	G5	67,6 %	8,1 %	-
	G3	63,8 %	11,7 %	-
	G4	62,3 %	14,0 %	-
	G2	62,2 %	11,5 %	-
	G1	57,9 %	13,8 %	-
3 dias	G5	72,2 %	13,7 %	-
	G4	70,5 %	9,4 %	-
	G2	69,3 %	9,2 %	-
	G1	68,1 %	14,2 %	-
	G3	67,8 %	13,2 %	-
	G6	63,6 %	13,7 %	-
7 dias	G5	91,2 %	5,6 %	G1-G2-G3-G6
	G4	88,8 %	5,2 %	G3-G6
	G2	86,7 %	4,3 %	G3-G5-G6
	G1	82,5 %	10,3 %	G5
	G3	82,1 %	6,7 %	G2-G4-G5
	G6	79,4 %	7,4 %	G2-G4-G5
10 dias	G4	91,8 %	7,6 %	-
	G1	90,3 %	7,9 %	-
	G2	88,4 %	8,7 %	-
	G5	88,0 %	9,7 %	-
	G6	86,4 %	10,9 %	-
	G3	83,5 %	9,3 %	-

*Diferença estatisticamente significante

Na tabela 13 de valores de p é possível verificar entre quais grupos, no período de 7 dias, existe diferença estatística significativa.

Tabela 13 - Valores de p da viabilidade celular em porcentagem de osteoblastos para cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular	G1	G2	G3	G4	G5
1 dia	G2	0,454			
	G3	0,244	0,676		
	G4	0,190	0,676	0,933	
	G5	0,084	0,226	0,504	0,465
	G6	0,054	0,182	0,225	0,268
3 dias	G2	0,787			
	G3	0,348	0,546		
	G4	0,967	0,723	0,405	
	G5	0,616	0,382	0,169	0,617
	G6	0,174	0,487	0,916	0,230
7 dias	G2	0,534			
	G3	0,520	0,031*		
	G4	0,071	0,164	0,004*	
	G5	0,004*	0,024*	0,002*	0,245
	G6	0,245	0,002*	0,280	0,001*
10 dias	G2	0,534			
	G3	0,061	0,074		
	G4	0,384	0,115	0,012	
	G5	0,756	0,443	0,184	0,237
	G6	0,633	0,772	0,329	0,178

*Diferença estatisticamente significativa

5.7 Viabilidade celular por ensaio colorimétrico MTT

A viabilidade celular aumentou gradualmente em todos os grupos experimentais ao longo dos períodos de análise sendo que as maiores médias de cada grupo foram observadas aos 10 dias (Figura 29). Com exceção do período de 3 dias houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais, dados observados na tabela 14.

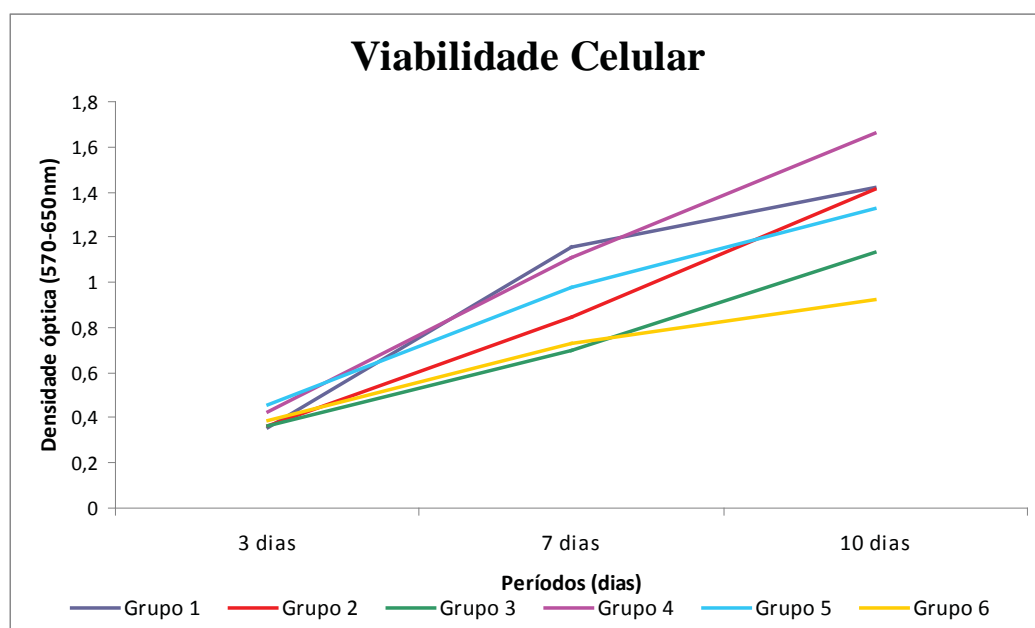


Figura 29 – Gráfico representativo da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo experimental nos vários períodos.

Tabela 14- Média e desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
3 dias	G1	0,360	0,388	0,118	0,127
	G2	0,368	0,375	0,154	
	G3	0,363	0,422	0,124	
	G4	0,423	0,446	0,102	
	G5	0,458	0,497	0,121	
	G6	0,389	0,428	0,097	
7 dias	G1	1,156	1,229	0,164	<0,001*
	G2	0,848	0,885	0,168	
	G3	0,697	0,650	0,170	
	G4	1,108	1,022	0,329	
	G5	0,978	0,981	0,241	
	G6	0,733	0,601	0,484	
10 dias	G1	1,417	1,338	0,339	<0,001*
	G2	1,409	1,325	0,196	
	G3	1,133	1,193	0,425	
	G4	1,662	1,857	0,376	
	G5	1,329	1,334	0,230	
	G6	0,926	0,914	0,376	

*Diferença estatisticamente significante

Analisando-se as médias e os p -valores dos grupos experimentais verificou-se que aos 10 dias todos os grupos alcançaram as maiores médias de viabilidade celular sendo o grupo 4 diferente estatisticamente dos grupos 1, 3, 5 e 6 (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores da média e p - valores da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular		Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (MW- $p \leq 0,05$)
3 dias	G5	0,458	0,121	G1-G3
	G4	0,423	0,102	-
	G6	0,389	0,097	-
	G2	0,368	0,154	-
	G3	0,363	0,124	G5
	G1	0,360	0,118	G5
7 dias	G1	1,156	0,164	G2-G3-G6
	G4	1,108	0,329	G2-G3-G6
	G5	0,978	0,241	G3-G6
	G2	0,848	0,168	G1-G3-G4-G6
	G6	0,733	0,484	G1-G2-G4-G5
	G3	0,697	0,170	G1-G2-G4-G5
10 dias	G4	1,662	0,376	G1-G3-G5-G6
	G1	1,417	0,339	G4-G6
	G2	1,409	0,196	G3-G6
	G5	1,329	0,230	G4-G6
	G3	1,133	0,425	G2-G4
	G6	0,926	0,376	G1-G2-G4-G5

Na tabela 16 de valores de p é possível verificar entre quais grupos e o período em que existe diferença estatística entre os mesmos.

Tabela 16- Valores de p para viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular	G1	G2	G3	G4	G5	
3 dias	G2	0,724				
	G3	0,868	0,885			
	G4	0,101	0,221	0,106		
	G5	0,029*	0,097	0,049*	0,254	
	G6	0,419	0,494	0,373	0,272	0,065
	G2	<0,001*				
7 dias	G3	<0,001*	0,011*			
	G4	0,191	0,007*	<0,001*		
	G5	0,071	0,221	0,001*	0,319	
	G6	<0,001*	0,004*	0,319	<0,001*	0,001*
	G2	0,885				
	G3	0,130	0,044*			
10 dias	G4	0,040*	0,089	0,004*		
	G5	0,604	0,290	0,310	0,019*	
	G6	0,007*	0,002*	0,141	<0,001*	0,010*

*Diferença estatisticamente significante

Na análise intragrupo observou-se um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo em todos os grupos experimentais com diferença estatisticamente significante (Tabela 17).

Tabela 17- Média e desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular		Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor
Grupo 1	3 dias	0,360	0,388	0,118	<0,001*
	7 dias	1,156	1,229	0,164	
	10 dias	1,417	1,338	0,339	
Grupo 2	3 dias	0,368	0,375	0,154	<0,001*
	7 dias	0,848	0,885	0,168	
	10 dias	1,409	1,325	0,196	
Grupo 3	3 dias	0,363	0,422	0,124	<0,001*
	7 dias	0,697	0,650	0,170	
	10 dias	1,133	1,193	0,425	
Grupo 4	3 dias	0,423	0,446	0,102	<0,001*
	7 dias	1,108	1,022	0,329	
	10 dias	1,662	1,857	0,376	
Grupo 5	3 dias	0,458	0,497	0,121	<0,001*
	7 dias	0,978	0,981	0,241	
	10 dias	1,329	1,334	0,230	
Grupo 6	3 dias	0,389	0,428	0,097	<0,001*
	7 dias	0,733	0,601	0,484	
	10 dias	0,926	0,914	0,376	

*Diferença estatisticamente significante

Na análise dos *p*-valores verificou-se que em todos os grupos experimentais ocorreu diferença estatística entre os tempos 3 dias em relação a 7 e 10 dias (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores de p para viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Viabilidade Celular		3 dias	7 dias
Grupo 1	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	0,074
Grupo 2	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	<0,001*
Grupo 3	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	0,007*
Grupo 4	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	0,001*
Grupo 5	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	0,001*
Grupo 6	7 dias	<0,001*	
	10 dias	<0,001*	0,178

*Diferença estatisticamente significante

5.8 Conteúdo de proteína total

Observou-se para o conteúdo de proteína total que existe diferença estatística significativa entre os grupos nos três tempos de coleta sendo que aos 7 dias o grupo com a maior média foi o grupo 5, sendo diferente estatisticamente dos demais grupos experimentais seguido pelo grupo 6 (Figura 30 e Tabela 19 e 20).

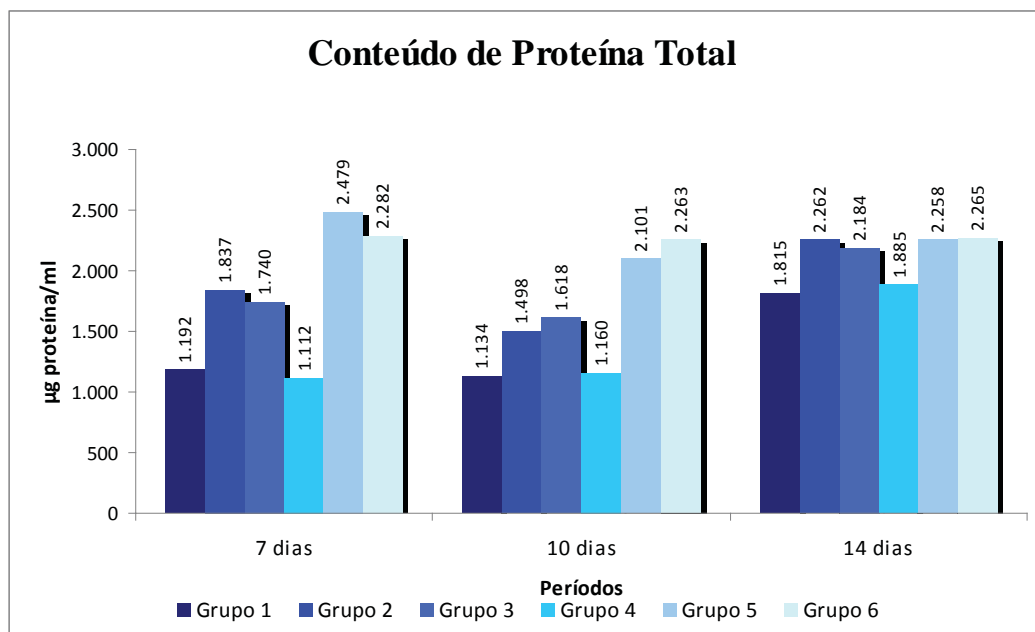


Figura 30 – Gráfico representativo do conteúdo de proteína total em µg/mL de cada grupo experimental nos vários períodos.

Tabela 19 - Média e desvio padrão do conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Proteína Total	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
7 dias	G1	1.192	1.177	227	<0,001*
	G2	1.837	1.781	295	
	G3	1.740	1.807	237	
	G4	1.112	1.195	156	
	G5	2.479	2.562	264	
	G6	2.282	2.275	231	
10 dias	G1	1.134	1.276	359	<0,001*
	G2	1.498	1.714	387	
	G3	1.618	1.712	567	
	G4	1.160	1.292	318	
	G5	2.101	2.073	561	
	G6	2.263	2.300	332	
14 dias	G1	1.815	1.957	337	0,010*
	G2	2.262	2.221	444	
	G3	2.184	2.080	423	
	G4	1.885	2.017	395	
	G5	2.258	2.198	262	
	G6	2.265	2.124	433	

*Diferença estatisticamente significante

Tabela 20 - Valores da média e *p*- valores do conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Conteúdo de Proteína Total		Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (MW- $p \leq 0,05$)
7 dias	G5	2479	264	G1-G2-G3-G4-G6
	G6	2282	231	G1-G2-G3-G4-G5
	G2	1837	295	G1-G4-G5-G6
	G3	1740	237	G1-G4-G5-G6
	G1	1192	227	G2-G3-G5-G6
	G4	1112	156	G2-G3-G5-G6
10 dias	G6	2263	332	G1-G2-G3-G4
	G5	2101	561	G1-G2-G3-G4
	G3	1618	567	G1-G4-G5-G6
	G2	1498	387	G1-G4-G5-G6
	G4	1160	318	G2-G3-G5-G6
	G1	1134	359	G2-G3-G5-G6
14 dias	G6	2265	433	G1
	G2	2262	444	G1-G4
	G5	2258	262	G1-G4
	G3	2184	423	G1
	G4	1885	395	G2-G5
	G1	1815	337	G2-G3-G5-G6

Na tabela 21 de valores de *p* é possível verificar se houve diferença entre os grupos e em qual período essa diferença ocorreu.

Tabela 21 - Valores de p para conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Proteína Total	G1	G2	G3	G4	G5
7 dias	G2	<0,001*			
	G3	<0,001*	0,934		
	G4	0,443	<0,001*	<0,001*	
	G5	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
	G6	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
10 dias	G2	0,010*			
	G3	0,010*	0,520		
	G4	0,590	0,010*	0,011*	
	G5	<0,001*	0,001*	0,017*	<0,001*
	G6	<0,001*	<0,001*	0,002*	<0,001*
14 dias	G2	0,012*			
	G3	0,046*	0,520		
	G4	0,351	0,040*	0,110	
	G5	0,001*	0,885	0,443	0,008*
	G6	0,033*	0,950	0,633	0,085

*Diferença estatisticamente significante

Na análise intragrupo verificou-se que em todos os grupos experimentais, exceto Grupo 6, houve diferença estatisticamente significante no conteúdo de proteína total ao longo dos períodos (Tabela 22).

Tabela 22 - Média e desvio padrão do conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Proteína Total	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
Grupo 1	7 dias	1.192	1.177	227	<0,001*
	10 dias	1.134	1.276	359	
	14 dias	1.815	1.957	337	
Grupo 2	7 dias	1.837	1.781	295	<0,001*
	10 dias	1.498	1.714	387	
	14 dias	2.262	2.221	444	
Grupo 3	7 dias	1.740	1.807	237	0,011*
	10 dias	1.618	1.712	567	
	14 dias	2.184	2.080	423	
Grupo 4	7 dias	1.112	1.195	156	<0,001*
	10 dias	1.160	1.292	318	
	14 dias	1.885	2.017	395	
Grupo 5	7 dias	2.479	2.562	264	0,042*
	10 dias	2.101	2.073	561	
	14 dias	2.258	2.198	262	
Grupo 6	7 dias	2.282	2.275	231	0,932
	10 dias	2.263	2.300	332	
	14 dias	2.265	2.124	433	

*Diferença estatisticamente significante

Na análise dos p -valores verificou-se que nos grupos 1, 2, 3 e 4 houve diferença estatística entre o tempo de 14 dias em relação a 7 e 10 dias. O grupo 5 apresentou diferença entre os tempos 7 e 10 dias e 7 e 14 dias. No grupo 6 essas diferenças não puderam ser observadas (Tabela 23).

Tabela 23 - Valores de p para conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Proteína Total		7 dias	10 dias
Grupo 1	10 dias	0,868	
	14 dias	<0,001*	<0,001*
Grupo 2	10 dias	0,065	
	14 dias	0,006*	<0,001*
Grupo 3	10 dias	0,678	
	14 dias	0,010*	0,011*
Grupo 4	10 dias	0,300	
	14 dias	<0,001*	<0,001*
Grupo 5	10 dias	0,029*	
	14 dias	0,044*	0,373

*Diferença estatisticamente significativa

5.9 Atividade da fosfatase alcalina

Para atividade da fosfatase alcalina os grupos 4 e 5 obtiveram os maiores resultados, nos três períodos de análise, em relação aos demais grupos. Verificou-se que ocorreu um aumento da atividade de fosfatase alcalina de 7 para 10 dias em todos os grupos e que esta foi reduzida no período de 10 para 14 dias, exceto no grupo 1 (Figura 31).

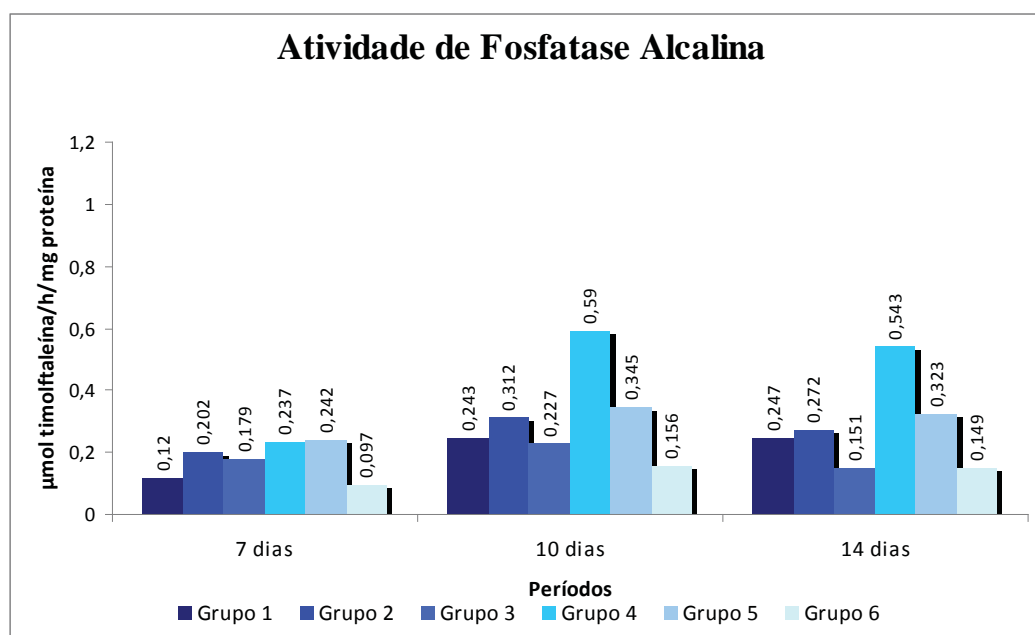


Figura 31 - Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina em $\mu\text{mol timolfaleína/h/mg proteína}$ de cada grupo experimental em cada período.

Na tabela 24 observou-se que houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais nos três períodos de avaliação com as maiores médias registradas nos Grupos 4 e 5.

Tabela 24 - Média e desvio padrão da atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em $\mu\text{mol timolftaleína/h/mg}$ proteína entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Fosfatase Alcalina	Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor	
7 dias	G1	0,120	0,109	0,047	0,001*
	G2	0,202	0,194	0,068	
	G3	0,179	0,161	0,087	
	G4	0,237	0,185	0,239	
	G5	0,242	0,254	0,124	
	G6	0,097	0,101	0,065	
10 dias	G1	0,243	0,178	0,229	<0,001*
	G2	0,312	0,302	0,132	
	G3	0,227	0,202	0,128	
	G4	0,590	0,419	0,396	
	G5	0,345	0,248	0,187	
	G6	0,156	0,138	0,095	
14 dias	G1	0,247	0,190	0,142	<0,001*
	G2	0,272	0,200	0,147	
	G3	0,151	0,116	0,084	
	G4	0,543	0,480	0,302	
	G5	0,323	0,314	0,088	
	G6	0,149	0,157	0,036	

*Diferença estatisticamente significativa

Analisando-se a média e os p -valores dos grupos experimentais verificou-se que no período de 14 dias o Grupo 4 apresentou-se com maior atividade de fosfatase alcalina em relação aos demais grupos, com diferença estatística significativa (Tabela 25).

Tabela 25– Valores da média e p -valores da atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Fosfatase Alcalina		Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (MW- $p \leq 0,05$)
7 dias	G5	0,242	0,124	G1-G6
	G4	0,237	0,239	G6
	G2	0,202	0,068	G1-G6
	G3	0,179	0,087	G1-G6
	G1	0,120	0,047	G2-G3-G5
	G6	0,097	0,065	G2-G3-G4-G5
10 dias	G4	0,590	0,396	G1-G3-G5-G6
	G5	0,345	0,187	G1-G3-G4-G6
	G2	0,312	0,132	G6
	G1	0,243	0,229	G4-G5
	G3	0,227	0,128	G4-G5
	G6	0,156	0,095	G2-G5
14 dias	G4	0,543	0,302	G1-G2-G3-G5-G6
	G5	0,323	0,088	G3-G4-G6
	G2	0,272	0,147	G3-G4-G6
	G1	0,247	0,142	G3-G4-G6
	G3	0,151	0,084	G1-G2-G4-G5
	G6	0,149	0,036	G1-G2-G4-G5

Na tabela 26 de valores de p é possível verificar se houve diferença entre os grupos e em qual período essa diferença ocorreu.

Tabela 26- Valores de p para atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína entre os grupos experimentais em cada período. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Fosfatase Alcalina		G1	G2	G3	G4	G5
7 dias	G2	0,002*				
	G3	0,042*	0,290			
	G4	0,191	0,852	0,633		
	G5	0,005*	0,310	0,081	0,520	
	G6	0,395	<0,001*	0,005*	0,044*	0,001*
10 dias	G2	0,089				
	G3	0,604	0,110			
	G4	0,002*	0,054	0,003*		
	G5	0,019*	0,820	0,049*	0,031*	
	G6	0,221	0,001*	0,078	<0,001*	<0,001*
14 dias	G2	0,619				
	G3	0,012*	0,004*			
	G4	0,007*	0,019*	<0,001*		
	G5	0,054	0,254	<0,001*	0,031*	
	G6	0,028*	0,010*	0,319	<0,001*	<0,001*

*Diferença estatisticamente significante

Na análise intragrupo verificou-se que houve diferença estatisticamente significante entre os períodos de avaliação nos grupos 1 e 4 (Tabela 27). Na análise dos p -valores dos grupos experimentais observou-se que no grupo 4 houve diferença estatística significante entre o período de 7 dias em relação a 10 e 14 dias (Tabela 28).

Tabela 27- Média e desvio padrão da atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Fosfatase Alcalina		Média	Mediana	Desvio Padrão	p-valor
Grupo 1	7 dias	0,120	0,109	0,047	0,008*
	10 dias	0,243	0,178	0,229	
	14 dias	0,247	0,190	0,142	
Grupo 2	7 dias	0,202	0,194	0,068	0,075
	10 dias	0,312	0,302	0,132	
	14 dias	0,272	0,200	0,147	
Grupo 3	7 dias	0,179	0,161	0,087	0,206
	10 dias	0,227	0,202	0,128	
	14 dias	0,151	0,116	0,084	
Grupo 4	7 dias	0,237	0,185	0,239	0,003*
	10 dias	0,590	0,419	0,396	
	14 dias	0,543	0,480	0,302	
Grupo 5	7 dias	0,242	0,254	0,124	0,135
	10 dias	0,345	0,248	0,187	
	14 dias	0,323	0,314	0,088	
Grupo 6	7 dias	0,097	0,101	0,065	0,065
	10 dias	0,156	0,138	0,095	
	14 dias	0,149	0,157	0,036	

*Diferença estatisticamente significante

Tabela 28- Valores de p para atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína de cada grupo experimental ao longo dos vários períodos. Teste estatístico Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

		7 dias	10 dias
Grupo 1	10 dias	0,056	
	14 dias	0,001*	0,468
Grupo 4	10 dias	0,003*	
	14 dias	0,004*	0,917

*Diferença estatisticamente significante

5.10 Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada

Pode-se observar que os grupos que apresentaram maiores formações de matriz mineralizada foram os grupos 6 e 3 seguidos pelos grupos 5 e 2 (Figura 32). A tabela 29 mostra que houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais

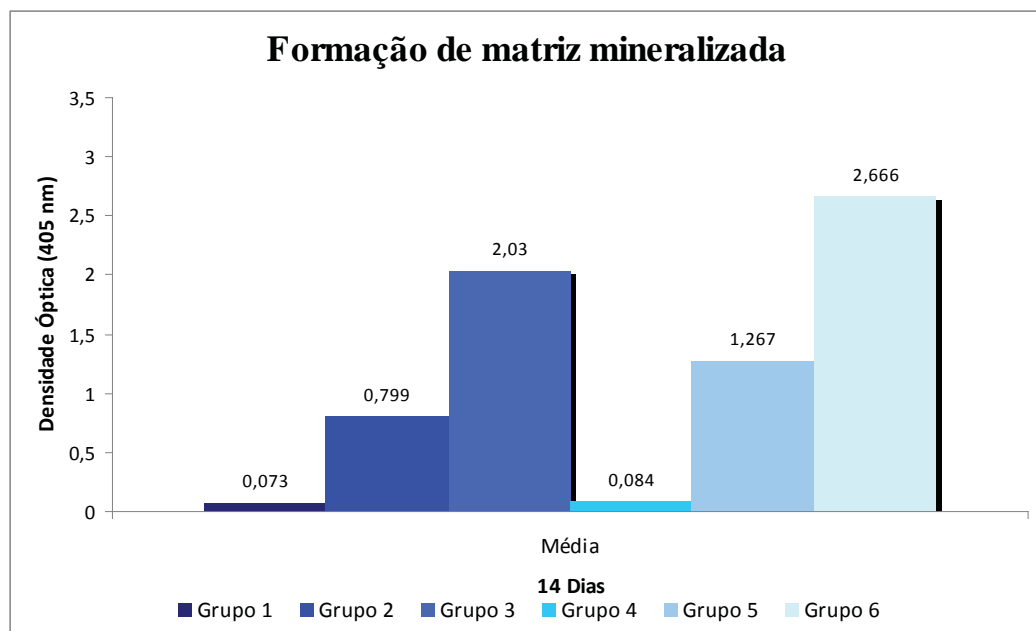


Figura 32 - Gráfico representativo da formação de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada grupo experimental período de 14 dias.

Tabela 29- Média e desvio padrão da formação de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada grupo experimental período de 14 dias. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$)

Matriz mineralizada	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Média	0,073	0,799	2,030	0,084	1,267	2,666
Mediana	0,068	0,734	2,062	0,076	1,270	2,800
Desvio Padrão	0,017	0,324	0,656	0,036	0,545	0,406
p-valor	$<0,001^*$					

*Diferença estatisticamente significante

A análise da média e dos p -valores demonstraram que as maiores médias de formação de matriz mineralizada foram alcançadas pelos grupos 3 e 6 sendo que o grupo 6 apresentou-se com diferença estatística significante em relação a todos os grupos experimentais (Tabela 30).

Tabela 30- Valores da média e p -valores da formação de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada grupo experimental período de 14 dias. Teste estatístico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Formação Matriz Mineralizada	Média (Kw)	Desvio Padrão (Kw)	Diferença Estatística (MW-$p \leq 0,05$)
14 dias	G6	2,666	0,406
	G3	2,030	0,656
	G5	1,267	0,545
	G2	0,799	0,324
	G4	0,084	0,036
	G1	0,073	0,017

Na tabela 31 de valores de p é possível verificar se houve diferença entre os grupos e em qual período essa diferença ocorreu.

Tabela 31- Valores de p para formação de matriz mineralizada entre os grupos experimentais no período de 14 dias. Teste estatístico Mann - Whitney ($p \leq 0,05$)

	G1	G2	G3	G4	G5
G2	<0,001*				
G3	<0,001*	<0,001*			
G4	0,290	<0,001*	<0,001*		
G5	<0,001*	0,011*	0,003*	<0,001*	
G6	<0,001*	<0,001*	0,006*	<0,001*	<0,001*

*Diferença estatisticamente significante

6 DISCUSSÃO

Substituir membros e órgãos perdidos do corpo humano é uma necessidade que vem da antiguidade. Com o avanço da ciência, vários materiais, próteses e implantes têm sido propostos com o objetivo de torná-los cada vez mais semelhantes aos órgãos naturais perdidos.

Para que ocorra sucesso nas ancoragens, a osseointegração é uma condição essencial. Em 1977, Branemark et al. demonstraram que este processo era possível, porém alguns fatores deveriam ser controlados, tais como biocompatibilidade do material, desenho e superfície dos implantes (Deporter et al., 1996; Deporter et al., 2001).

O titânio é o material mais utilizado em condições onde se necessita de elevado desempenho e confiabilidade devido as suas propriedades intrínsecas de elevada relação resistência mecânica/peso; baixa massa específica; elevada resistência a corrosão; excelente biocompatibilidade; a propriedade de poder ser forjado por meio de técnicas convencionais e ser fundido utilizando-se técnicas de fundição por precisão e poder ser processado por meio de metalurgia do pó (Donachie, 1988). Essas propriedades do titânio fazem dele e de suas ligas os materiais metálicos usados com maior frequência nas

indústrias aeroespacial, química, naval e na implantodontia (Kasemo, 1999; Santos, 2006).

Entretanto, os implantes de titânio na prática clínica, ortopédica e dentária, apresentam um inconveniente que é a diferença entre o módulo de elasticidade do implante metálico de Ti - 110GPa e o módulo de elasticidade do osso - 10-35GPa (Niinomi, 1998; Song et al., 1999; Dewidar et al., 2006). Contudo, este valor de elasticidade pode ser controlado de duas maneiras, com a fabricação de implantes utilizando ligas de Ti (Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009) ou com a confecção de porosidades nos implantes (Bottino et al., 2009; Laheurte et al., 2010). Estas alternativas visam diminuir a diferença entre o módulo de elasticidade dos materiais. Além disso, pode ser utilizada a combinação de ambas, com a produção de implantes de ligas de Ti com porosidade (Wang et al., 2009; Laheurte et al., 2010). Assim, espera-se um melhor resultado na performance do sistema osso-implante (Bhattarai et al., 2008).

Ligas de baixo módulo elástico, adequada resistência à corrosão e não tóxicas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de se reduzir a diferença entre o osso e os biomateriais (Long, Rack, 1998; Niinomi, 1998; Niinomi, 2008; Ning et al., 2010). Em 2008, Santos et al. avaliaram as propriedades mecânicas de amostras da liga titânio-35nióbio densas obtidas pela técnica da metalurgia do pó e constataram que esta liga apresentava-se com módulo de elasticidade na faixa de 80MPa, exibindo um valor de módulo de elasticidade aproximadamente 30% menor do que as ligas tradicionais. Assim, neste estudo amostras densas e porosas confeccionadas a partir de

ligas de titânio-35nióbio foram comparadas a amostras de titânio puro grau 2, visando avaliar a influência deste biomaterial na osteogênese *in vitro*.

Atualmente, a implantodontia se concentra em estudos que direcionam e também viabilizam a mais rápida osseointegração dos implantes para uso ortopédico e dental, na tentativa de reduzir ou até eliminar o período de regeneração óssea livre de carga funcional. Dentre as várias linhas de pesquisa com este objetivo, as características topográficas da superfície do implante na interface osso-implante são consideradas relevantes pela grande influência na qualidade da osseointegração obtida (Bhattacharai et al., 2008; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b; Rosa et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010), bem como as características do biomaterial do qual o implante foi produzido (Bhattacharai et al., 2008; Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009).

Estudos demonstraram que a rugosidade, a topografia, a composição e a energia de superfície dos implantes podem interferir em eventos na interface osso-implante (Brunski, 1999; Aparício et al., 2002; Rosa et al., 2002; Nguyen et al., 2004; Wang et al., 2009; Xiong et al., 2010), sendo assim o interesse em modificar e melhorar as características dos implantes sejam odontológicos e/ou ortopédicos é crescente (Ning et al., 2010; Xiong et al., 2010; Sista et al., 2011). Uma das primeiras alterações na superfície dos implantes foi a confecção de rugosidades (Nishiguchi et al., 1999; Rosa et al., 2002; Nguyen et al., 2004). Diversos estudos demonstraram aumento do contato do osso com o implante de superfície rugosa ou porosa em

comparação com os implantes de superfície lisa. Adicionalmente, relatou-se também que a superfície rugosa irregular é mais osteocondutora do que as superfícies lisas ou com baixo nível de rugosidade (Bowers et al., 1992; Fergusson, 1999; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008a). O nível de rugosidade média (Ra) de um material pode ser determinado por um aparelho chamado rugosímetro. Alguns autores consideram que a superfície deverá ser considerada lisa quando sua rugosidade média (Ra) estiver entre $0,10\mu\text{m}$ e $1\mu\text{m}$ e rugosa quando o nível de rugosidade (Ra) for maior do que $1\mu\text{m}$ (Bowers et al., 1992; Kanagaraja, et al., 2001; Bagno, Bello, 2004; Zinger et al., 2005). As amostras densas do titânio puro apresentaram $Ra=0,9930$, enquanto as amostras da liga titânio-35nióbio apresentaram $Ra=3,4330$, podendo ser consideradas amostras lisas e rugosas, respectivamente. Ambas apresentaram poros pequenos e isolados oriundos do processo de sinterização. Segundo Vasconcelos et al. (2008a,b), a rugosidade da superfície de implantes pode ser obtida através da técnica de metalurgia do pó, utilizada para a confecção dos implantes. Durante o procedimento ocorre a compactação do pó e em seguida a sinterização do mesmo, não ocorrendo a fundição do material. O metal quando é submetido ao processo de sinterização, tem sua temperatura elevada a cerca de 80% do seu ponto de fusão. Portanto, as partículas se unem, mas não se fundem, permanecendo espaços entre os grânulos, formando as rugosidades em todo o material inclusive na superfície. A rugosidade presente na superfície varia de acordo com os parâmetros do processamento utilizado na técnica (Vasconcelos et al., 2008a;

Vasconcellos et al., 2008b). As amostras densas utilizadas neste estudo foram confeccionadas pela técnica de metalurgia do pó, no entanto, baseado no seu valor de Ra, uma amostra foi considerada lisa, enquanto a outra foi considerada rugosa. Esta diferença na topografia de superfície, provavelmente está relacionada à composição química das amostras, pois a lisa é de titânio puro enquanto a rugosa é composta por uma liga, ou seja, neste caso específico, uma mistura de dois elementos, o titânio e o nióbio.

Atualmente, outros tipos de superfícies têm sido desenvolvidas, dentre elas a superfície porosa. A superfície porosa pode interferir na fixação do osso ao implante e pode estar relacionada a diversos eventos celulares (Bowers et al., 1992; Fergusson, 1999; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002; Frosch et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008a) como adesão, proliferação e diferenciação celular (Sista et al., 2011). O tamanho ideal dos poros já foi objeto de diversos estudos nos quais variou de 50 μ m a 1000 μ m (Pilliar et al., 1991; Fergusson, 1999; Frosch et al., 2002; Kusakabe et al., 2004), sendo que o consenso entre os autores é que o tamanho dos poros esteja entre 100 μ m e 500 μ m (Bobyne et al., 1987; Dallant et al., 1987; Pilliar, 1991; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2002; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b; Vasconcelos et al., 2010). No presente estudo as amostras porosas de titânio puro e da liga titânio-35nióbio foram confeccionadas por meio da técnica de metalurgia do pó. Para a confecção das amostras, grânulos de uréia medindo 177 a 250 μ m foram adicionados ao pó de titânio, com a função de material espaçador. A utilização deste material espaçador

permitiu a confecção de poros que, analisados por meio de MEV e MO, apresentavam tamanho médio de $150,09\mu\text{m}^2$ para as amostras de titânio puro e de $138,99\mu\text{m}^2$ para a liga de titânio-35nióbio. Estes resultados sugerem que ambos os grupos apresentaram tamanhos de poros adequados para permitir a proliferação de tecido ósseo para o interior dos mesmos (Deporter et al., 1996; Deporter et al., 1999; Deporter et al., 2001, Deporter et al., 2002; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b). Além disso, verificou-se que com a mesma quantidade de material espaçador é possível confeccionar amostras porosas de titânio puro, bem como da liga titânio-35nióbio, sem obter diferença estatística com relação ao tamanho dos poros nos diferentes metais.

A interconexão e a quantidade dos poros são características importantes para a proliferação do tecido ósseo e tais características podem ser controladas pela técnica da metalurgia do pó (Bram et al., 2000; Wen et al., 2001; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b; Vasconcellos et al., 2010). A interconexão dos poros nas amostras utilizadas nesse estudo foi comprovada tanto pela observação ao MEV quanto pela análise metalográfica. Com relação à quantidade de poros, a estrutura porosa deve apresentar poros com tamanho e quantidade suficientes para permitir a adesão e proliferação de células, além de transporte de fluidos corpóreos para seu interior (Wen et al., 2002). A porosidade ideal em amostras de titânio é um tema amplamente discutido na comunidade científica. Alguns pesquisadores relatam que a porcentagem adequada varia de 25% a 66% (Bram et al., 2000; Nishiguchi et al., 2001; Li et al.,

2007). Segundo Kim et al. (2004) amostras com porosidade de 5% a 80% permitem proliferação óssea e subsequente mineralização, mas é necessário manter um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais (Deporter et al., 1988; Wen et al., 2001; Vasconcellos et al., 2008a; Vasconcellos et al., 2008b; Vasconcellos et al., 2010). Em relação à porcentagem de porosidade, as amostras de titânio puro porosas e as amostras da liga titânio-35nióbio apresentaram 70,5% e 61,73% respectivamente, estando dentro da faixa de porosidade sugerida pelos autores acima, como adequada para a proliferação celular. Ambas as amostras foram confeccionadas com a mesma quantidade em peso de uréia, no entanto apresentaram diferença estatística na porcentagem de porosidade. A resposta para esta diferença pode estar relacionada à diferença na densidade dos materiais.

O desenvolvimento de ligas de titânio e a elaboração de técnicas economicamente viáveis de processamento se tornaram uma tendência da tecnologia metalúrgica moderna com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas, biocompatibilidade e módulo de elasticidade do titânio, além do custo (Santos, 2006, Santos et al., 2008; Ning et al., 2010). O processo de obtenção de ligas de titânio por metalurgia do pó (M/P), a partir de pós-elementares ou pré-ligados, mostra-se uma alternativa viável, por permitir a obtenção de peças com geometrias complexas e próximas às dimensões finais (“near-net-shape”). Outras características inerentes ao processo, como a redução das etapas de usinagem, melhor acabamento superficial e maiores facilidades operacionais, podem reduzir o custo final da

fabricação de peças metálicas confeccionadas pela metalurgia do pó (Froes, Eylon, 2000; Santos, 2006; Santos et al., 2008). Além de todas as vantagens oferecidas por essa técnica, a mesma permite que substâncias como carboreto de amônio e carbamida sejam utilizadas como aditivos orgânicos, a fim de que amostras porosas possam ser confeccionadas (Bram et al., 2000). No presente estudo, as amostras de titânio puro densas e porosas e as amostras da liga titânio-35nióbio densas e porosas foram confeccionadas pela técnica de metalurgia do pó, sendo que na confecção das amostras porosas, o aditivo orgânico uréia foi utilizada como espaçador.

Adicionalmente, na tentativa de melhorar a bioatividade dos implantes de titânio, diferentes técnicas estão sendo propostas, visando promover interação química dos implantes com os tecidos e células (Nishiguchi et al., 2001; Zinger et al., 2005; Zhang et al. 2009). Estas alterações de superfícies podem ser realizadas com a utilização de recobrimentos com hidroxiapatita e fluorapatita, ionização da superfície, estimulação térmica e alcalina (Nishiguchi et al., 1999) e a deposição eletroquímica de fosfato de octacálcio (Habibovic et al., 2004). No presente estudo, amostras porosas de titânio puro e da liga titânio-35nióbio, tiveram sua superfície tratada com uma solução composta por diversos íons, os quais são capazes de precipitar heterogeneamente fosfatos de cálcio. Este processo é conhecido como tratamento biomimético (Kokubo et al., 1996; Nishiguchi et al., 1999; Kim et al., 2000; Baker et al., 2006). Nesse estudo amostras de titânio-35nióbio densas e porosas submetidas ou não ao tratamento biomimético, foram testadas quanto à sua

biocompatibilidade *in vitro*. A análise por EDS foi capaz de comprovar a presença de íons cálcio, fósforo, magnésio, cloro, sódio e titânio nas amostras de titânio puro, grupo 3, e nas amostras da liga titânio-35nióbio, grupo 6, observaram-se os mesmos íons, acrescidos do nióbio. Esses resultados indicam que houve a precipitação dos íons presentes no fluido corpóreo simulado (FCS), em ambos os materiais, demonstrando sucesso no tratamento biomimético realizado.

A biocompatibilidade de um material está intimamente relacionada ao comportamento da célula em contato com o mesmo. Adesão e espalhamento celular correspondem à primeira fase da interação célula/material, a qualidade destas etapas influenciará a proliferação e a diferenciação celular na superfície do implante (Bowers et al., 1992; Anselme, 2000; Rosa, Beloti, 2005; Ning et al., 2010; Sista et al., 2011). Neste estudo, a metodologia utilizada para verificar a biocompatibilidade da liga de titânio-35nióbio foi baseada em determinados parâmetros *in vitro*, tais como adesão, proliferação e viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e formações nodulares de matriz mineralizada. Esta é uma metodologia consagrada e que foi utilizada em diversos estudos *in vitro* com objetivos semelhantes (Rosa et al., 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Wang et al., 2009; Xiong et al., 2010; Sista et al., 2011).

De maneira geral os resultados mostraram que não houve diferença quanto à **adesão celular** entre os materiais, nas mesmas condições de topografia de superfície e tratamento. A **proliferação celular** nas amostras densas de titânio puro foi maior do

que nas da liga titânio-35nióbio, já nas amostras porosas e porosas tratadas foi semelhante. Considerando-se o mesmo material, houve menor proliferação celular nas amostras submetidas ao tratamento biomimético. A **viabilidade celular** foi semelhante frente às amostras densas e porosas dos dois materiais, exceto aos 7 dias quando houve maior viabilidade celular nas amostras da liga titânio-35nióbio. Quando se fez o tratamento biomimético a viabilidade celular foi semelhante, comparando-se os dois materiais. No entanto, considerando-se um mesmo material aos 7 dias, a viabilidade celular foi menor nas amostras submetidas ao tratamento biomimético do que nas amostras porosas sem tratamento. Na avaliação de **viabilidade por MTT** observou-se o mesmo comportamento celular frente aos dois materiais, tanto nas amostras densas quanto nas porosas, exceto aos 10 dias em que a viabilidade celular foi maior junto às amostras densas da liga titânio-35nióbio. Com o tratamento biomimético, a viabilidade celular foi semelhante, comparando-se os dois materiais. Considerando-se um mesmo material aos 7 e 10 dias, a viabilidade celular foi menor nas amostras submetidas ao tratamento biomimético do que nas amostras porosas sem tratamento. O **conteúdo de proteína total** frente aos dois materiais foi semelhante nas amostras densas, porém, nas porosas da liga titânio-35nióbio o conteúdo foi maior do que nas amostras porosas de titânio puro, nos períodos intermediários (7 e 10 dias). Nestes períodos, o conteúdo de proteína total sobre as amostras da liga titânio-35nióbio com tratamento biomimético foi maior do que nas amostras de titânio puro, porém aos 14 dias foi semelhante. No mesmo material, o tratamento biomimético não

interferiu no conteúdo de proteína total, exceto aos 7 dias, em que as amostras da liga titânio-35nióbio tratadas tiveram menor conteúdo de proteína total. A atividade de **fosfatase alcalina** foi semelhante nas amostras porosas dos dois materiais, enquanto nas amostras densas da liga titânio-35nióbio observou-se maior atividade nos períodos finais (10 e 14 dias). O tratamento biomimético não interferiu na atividade de fosfatase alcalina, comparando-se os dois materiais, exceto aos 7 dias em que piorou as condições da liga titânio-35nióbio. Considerando-se o mesmo material, o tratamento biomimético piorou as condições da liga titânio-35nióbio nos três períodos, enquanto nas amostras de titânio puro houve menor atividade de fosfatase alcalina apenas aos 14 dias. Em relação à **formação de matriz mineralizada** o comportamento celular foi semelhante junto às amostras densas dos dois materiais, porém nas amostras porosas da liga titânio-35nióbio houve maior formação de matriz. Nas amostras da liga titânio-35nióbio submetidas ao tratamento biomimético houve maior formação de matriz do que nas amostras de titânio puro. Considerando-se o mesmo material, os melhores resultados foram observados nas amostras submetidas ao tratamento biomimético.

Analisando-se os grupos aos pares, numa análise intergrupo, observou-se que em todos os grupos houve adesão celular, porém, esta foi maior no período de 24h, quando comparada ao período de 4h. Logo, acredita-se que a adesão é tempo-dependente. Comparando-se os grupos 1 e 4, isto é, as amostras densas, verificou-se que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os mesmos, sugerindo que o aumento da rugosidade, neste caso específico, não

interferiu na adesão celular. Este resultado está de acordo com o estudo de Rosa et al. (2002), em que a adesão celular não foi afetada pela microporosidade. Em contrapartida, Sista et al., em 2011, estudando a adesão celular após 4h de cultura, verificaram que a adesão foi maior em amostras de titânio-50zircônia, a qual tinha rugosidade menor que amostras de titânio puro e titânio-50nióbio, neste caso com diferença estatística significativa. Comparando-se os grupos de amostras porosas e porosas tratadas, tanto de titânio puro quanto da liga titânio-35nióbio, não foi possível encontrar diferenças estatísticas entre os mesmos. Este resultado indica que a liga de titânio-35nióbio apresenta potencial de aderir células osteogênicas tanto quanto o titânio puro, material consagrado pela sua biocompatibilidade. Em geral, o tratamento biomimético não interferiu na adesão celular quando os grupos de mesmo material e superfície foram comparados.

A proliferação celular foi testada nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias. Os resultados do presente estudo mostraram que houve proliferação celular em todos os grupos experimentais. Analisando-se os grupos de amostras densas, grupos 1 e 4, verificou-se que em todos os períodos o grupo 1 apresentou as maiores médias, tendo sido encontrada diferença estatística significativa entre os mesmos nos períodos de 3 e 10 dias. Esses resultados sugerem que a menor rugosidade do titânio puro favoreceu a proliferação celular. Tais resultados concordam em parte com os de Rosa et al. (2002), os quais sugeriram que os eventos iniciais da osteogênese não são afetados pela topografia do material, porém, superfícies com topografias mais

regulares favorecem eventos intermediários e finais, como proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina. Segundo esses autores, as superfícies mais regulares facilitam o crescimento e a expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico. Entretanto, para Xiong et al.(2010) e Sista et al. (2011) a maior capacidade de adesão e proliferação celular estaria mais relacionada à energia de superfície do material do que à maior rugosidade.

Com relação às amostras porosas de titânio puro e da liga titânio-35nióbio, grupos 2 e 5, não foi encontrada diferença estatística quanto à proliferação celular, demonstrando a capacidade da liga titânio-35nióbio porosa de permitir a multiplicação das células. Quando os grupos 3 e 6, foram avaliados, verificou-se diferença apenas aos 3 dias, porém, nos períodos de 7 e 10 dias a proliferação celular foi semelhante nos dois grupos, indicando que o tratamento biomimético foi efetivo quando realizado em amostras da liga titânio-35nióbio, permitindo proliferação celular sobre sua superfície.

A viabilidade celular pode ser verificada de duas maneiras, na câmara de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripan 0,5%, em que os valores são expressos pela porcentagem de células viáveis (Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Franco et al., 2009), ou através do teste colorimétrico MTT. No presente estudo a porcentagem de células viáveis foi avaliada nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias e verificou-se o aumento ao longo do tempo em todos os grupos. Comparando-se os grupos de amostras densas, não houve diferença estatística entre amostras de titânio puro e da liga titânio-35nióbio. Quando as amostras porosas foram

comparadas, diferenças estatísticas foram observadas somente aos 7 dias, em que a porcentagem de células viáveis foi maior nas amostras da liga titânio-35nióbio (grupo 5) em relação ao titânio puro poroso (grupo 2). Entre as amostras tratadas, grupos 3 e 6, não houve diferenças. A viabilidade celular verificada pelo teste colorimétrico MTT demonstrou que a mesma aumentou gradualmente em todos os grupos. No período de 7 dias, não houve diferença entre os grupos 1 e 4, amostras densas, enquanto no período de 10 dias, o grupo 4 mostrou-se significativamente melhor que o grupo 1. Entre os grupos 2 e 5, e os grupos 3 e 6 não houve diferenças entre os materiais. De acordo com os resultados apresentados neste teste sugere-se que a liga titânio-35nióbio não apresenta citotoxicidade, demonstrando a biocompatibilidade do material.

O conteúdo de proteína total representa a capacidade de síntese das células e pode ser considerado parâmetro importante de avaliação da osteogênese *in vitro* (Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005). Neste estudo apesar dos índices de proteína total da liga titânio-35nióbio densa, grupo 4, terem se mostrado maiores nos períodos de 10 e 14 dias do que os índices apresentados pelo titânio puro denso, grupo 1, não houve diferença estatística entre os grupos. Esses achados sugerem que a maior rugosidade encontrada nas amostras da liga titânio-35nióbio não afetou de maneira significativa o conteúdo de proteína total, resultados que estão de acordo com os encontrados por Rosa et al. (2002). Em relação às amostras porosas, a liga titânio-35nióbio apresentou índices mais elevados de proteína total nos períodos de 7 e 10 dias, com diferença estatística em relação ao titânio

puro poroso, esta diferença não pôde ser observada no período de 14 dias. Quando as amostras tratadas foram comparadas, verificou-se que os índices de proteína total da liga titânio-35nióbio, grupo 6, foram maiores em todos os períodos com diferença estatística significativa em relação ao grupo 3, nos períodos de 7 e 10 dias. Esses resultados são importantes, pois, demonstram de maneira significativa, a capacidade que as células cultivadas sobre as amostras da liga titânio-35nióbio têm de produzir proteínas, o que pode ser importante no processo de osteogênese.

Segundo Simão et al. (2007), o papel da fosfatase alcalina não está claro devido à complexidade no processo de extração e solubilização dessa enzima, presente em tecidos ósseos e/ou cartilagosos. Tal processo pode alterar sua estrutura, sua atividade catalítica e outras propriedades relacionadas à sua função. Sabe-se que a fosfatase alcalina é um importante marcador de diferenciação osteoblástica (Franco et al., 2009) e que existe uma correlação entre a atividade de fosfatase alcalina e produção de matriz mineralizada (Sugawara et al., 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005).

No presente estudo, a atividade de fosfatase alcalina foi observada em todos os grupos, sendo que o pico desta atividade foi aos 10 dias, com exceção do grupo 1. As amostras densas da liga titânio-35nióbio apresentaram maiores índices de atividade de fosfatase alcalina em relação ao titânio puro, sendo que essa diferença foi significativa nos períodos de 10 e 14 dias. Neste caso a rugosidade da superfície das amostras de titânio-35 nióbio pode ter interferido de maneira positiva na atividade de fosfatase alcalina, estando em

desacordo com os resultados encontrados por Rosa et al.(2002), em que as superfícies mais regulares permitiram maior atividade da enzima. Em relação aos grupos porosos, grupos 2 e 5, os valores da atividade da enzima na liga titânio-35nióbio também se mostraram maiores, porém, sem diferenças estatísticas. Na avaliação dos grupos tratados, grupos 3 e 6, os índices de atividade foram estatisticamente maiores no grupo 3 em relação ao grupo 6 no período de 7 dias, não tendo sido observada diferença nos demais períodos. De maneira geral, os resultados demonstram que a liga titânio-35nióbio é capaz de permitir a atividade de fosfatase alcalina, importante enzima relacionada à formação de matriz mineralizada.

A mineralização da matriz é o evento final da formação óssea (Rosa et al., 2008). Em estudos utilizando culturas osteogênicas, a mineralização é considerada como parâmetro funcional *in vitro*, refletindo o avanço da diferenciação das células (Hoemann et al., 2009). No presente estudo, o grupo 4, liga titânio-35nióbio densa, apresentou maior média de formação de matriz mineralizada em relação ao titânio puro denso, grupo 1, porém, diferença estatística não pôde ser observada. Este resultado sugere que a rugosidade aumentada da liga titânio-35nióbio não interferiu na mineralização da matriz. Em relação às amostras porosas, a média de formação de matriz mineralizada do grupo 5, liga titânio-35nióbio, foi significativamente maior em comparação ao grupo 2, titânio puro. O mesmo foi observado nas amostras tratadas, nas quais a média de formação de matriz mineralizada no grupo 6, liga titânio-35nióbio, mostrou-se significativamente maior que no grupo 3, titânio puro.

Sugawara et al. (2002) observaram que a atividade de fosfatase alcalina é essencial no processo de mineralização da matriz e sugeriram que o aumento na atividade de fosfatase alcalina implica em maior formação de matriz mineralizada, porém, segundo Simão et al. (2007) esta correlação não está clara.

Os resultados apresentados nesta tese sugerem que a relação entre a maior média de atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada, possa existir. Analisando-se os resultados, no período de 14 dias, verificou-se que a média de fosfatase alcalina no grupo 4 foi maior do que no grupo 1, o mesmo ocorreu na formação de matriz mineralizada. Em relação aos grupos porosos, a média de fosfatase alcalina no grupo 5 foi maior do que no grupo 2, tendo sido observado o mesmo em relação à formação de matriz mineralizada. Desta forma, como nos estudos realizados por Sugawara et al. (2002) pôde ser observada relação direta entre esse marcador e a mineralização da matriz. Em contrapartida, o mesmo não pode ser verificado nas amostras porosas tratadas, grupos 3 e 6, nos quais a relação não foi direta. Os resultados mostraram que o grupo 3, titânio puro tratado apresentou maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao grupo 6, liga titânio-35nióbio, porém, a formação de matriz mineralizada no grupo da liga foi estatisticamente maior do que no do titânio puro, ou seja, neste caso, houve relação inversa. Estes resultados estão de acordo com Hoemann et al.(2009) que concluíram que o nível de atividade de fosfatase alcalina não é proporcional ao nível de mineralização em culturas de células osteoblásticas derivadas de calvária e/ou outras linhagens. Beloti e Rosa (2005) sugeriram que

deve haver uma quantidade específica de fosfatase alcalina capaz de produzir matriz mineralizada e que faça com que essa correlação seja direta. Sugere-se, pois, que mais estudos sejam realizados.

Os testes *in vitro* mostraram que liga titânio-35nióbio é biocompatível, uma vez que permitiu a adesão celular, proliferação e viabilidade celular, síntese de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e ainda a formação de matriz mineralizada. A porosidade não interferiu nessa propriedade e, em algumas situações, até melhorou a biocompatibilidade da liga. O tratamento biomimético favoreceu a maior produção de proteína total e matriz de mineralização em amostras da liga em relação ao controle de titânio puro.

Assim, a liga titânio-35nióbio desponta como um biomaterial promissor a ser empregado na fabricação de implantes, tanto na ortopedia quanto na odontologia.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados nessa tese foi possível concluir que amostras densas e porosas da liga titânio-35nióbio permitem a adesão, proliferação e viabilidade celular, síntese de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e ainda a formação de matriz mineralizada por células osteogênicas. Concluiu-se também que o tratamento biomimético favorece a formação de matriz mineralizada, especialmente na liga Ti-35Nb. A liga titânio-35nióbio consagra-se, pois, como um material biocompatível, com potencial para ser utilizado em implantes biomédicos.

8 REFERÊNCIAS*

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981 Oct; 52:155-70.

Andrade MC, Sader MS, Filgueiras MR, Ogasawara T. Microstructure of ceramic coating on titanium surface as a result of hydrothermal treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2000 Nov;11(11):751-5.

Andrade MC, Filgueiras MRT, Ogasawara T. Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *J Eur Ceramic Soc*. 2002; 22:505-10.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(7):667-81. Review.

Aparicio C, Gil FJ, Planell JA, Engel E. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1105-11.

Attaia YA, Fuerstenau DW. The equilibrium composition of hidroxiapatite and fluorapatite-water interfaces. *Colloids and Surfaces*. 1988; 34: 271-285.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Dec;15(6):683-92. Review.

Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 2004 Sep;15(9):935-49. Review.

Baker KC, Anderson MA, Oehlke SA, Astashkina AI, Haikio DC, Drelich J, et al. Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata. *Materials Science and Engineering:C.* 2006 Sep; 26(8):1351-1360.

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J.* 2005 Jan;16(2):156-161.

Bhattacharai SR, Khalil KA, Dewidar M, Hwang PH, Yi HK, Kim HY. Novel production method and in-vitro cell compatibility of porous Ti-6Al-4V alloy disk for hard tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Aug;86(2):289-99.

Boyn D, Engh CA, Pilliar RM. Histological comparison of biological fixation and bone modeling with canine and human porous coated hip prostheses. In: *AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications.* Philadelphia: ASTM; 1987.p.185-206.

Bottino MC, Coelho PG, Henriques VA, Higa OZ, Bressiani AH, Bressiani JC. Processing, characterization, and in vitro/in vivo

evaluations of powder metallurgy processed Ti-13Nb-13Zr alloys. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 1;88(3):689-96.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992 Fall;7(3):302-10.

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):137-46. Review.

Boyer RR. Aerospace applications of beta titanium alloys. *J Metals*. 1994 Jun;46: 20-3.

Bram M. High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts. *Adv Eng Mater*. 2000 Jan;2(4): 196-9.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.

Bruijn JD, van den Brink I, Mendes S, Dekker R, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:74-81.

Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res*. 1999 Jun;13:99-119.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Jan-Feb;15(1):15-46. Review.

Chou YF, Chiou WA, Xu Y, Dunn JC, Wu BM. The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite. *Biomaterials*. 2004 Oct;25(22):5323-31.

Coelho PG, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Janal MN, Suzuki M. Biomechanical and bone histomorphologic evaluation of four surfaces on plateau root form implants: Na experimental study in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(5):39-45.

Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo evaluation of a CSTi dental implant: a healing time course study. *J Oral Implantol*. 1995;21(3):82-90.

Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S267-73. Review.

Dallant P, Meunier A, Christel P, Guillemin G, Sedel L. Quantitation of bone ingrowth into porous implants submitted to pulsed electromagnetic fields. In: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987.p. 286-300.

Davidson JA, Kovacs P. Biocompatible Low modulus titanium alloy for medical implants, US Patent. 1994 5.545.227.

Denissen H, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontol.* 2000 Feb;71(2):272-8.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J, Howley TP, et al. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Dent Res.* 1986 Aug;65(8):1064-70.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Chipman ML, Valiquette N. A histological comparison in the dog of porous-coated vs. threaded dental implants. *J Dent Res.* 1990 May;69(5):1138-45.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Pharoah M, Smith DC, Chipman M, et al. A prospective clinical study in humans of an endosseous dental implant partially covered with a powder-sintered porous coating: 3- to 4-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Jan-Feb;11(1):87-95.

Deporter DA, Todescan R, Nardini K. Use of a tapered, porous-surfaced dental implant in combination with osteotomes to restore edentulism in the difficult maxilla. *Implant Dent.* 1999;8(3):233-40. Review.

Deporter D, Pilliar RM, Todescan R, Watson P, Pharoah M. Managing the posterior mandible of partially edentulous patients with short, porous-surfaced dental implants: early data from a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001 Sep-Oct;16(5):653-8.

Deporter D, Todescan R, Riley N. Porous-surfaced dental implants in the partially edentulous maxilla: assessment for subclinical mobility. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 Apr;22(2):184-92.

Dewidar MM, Yoon HC, Lim JK. Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process. *Metals Mater Int*. 2006 Apr;12:193-206.

Donachie, M. J. Titanium a technical guide. Philadelphia: ASM; 1988.

Ducheyne P, Cuckler JM. Flexible porous titanium for revision surgery: concept and initial data. In: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. ASTM953. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications. Philadelphia: ASTM; 1987.p. 303-14.

Feng B, Chen JY, Qi SK, Zhao JZ, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 May;13(5):457-64.

Ferguson R. Use of a porous-surfaced implant system. *Dental Implantol Update*. 1999 Jan;10(1):1-5.

Forsgren J, Svahn F, Jarmar T, Engqvist H. Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomater*. 2007 Nov;3(6):980-4. Epub 2007 May 23.

Franco R de L, Chiesa R, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Human osteoblastic cell response to a Ca- and P-enriched titanium surface obtained by anodization. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(4):841-8.

Froes FH, Eylon D. Production of titanium powder. In ASM Handbook. Philadelphia: ASM International; 2000.

Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, et al. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(4):214-27.

Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J, et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res*. 2003 Mar;21(2):213-23.

Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):443-50.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*. 2004;329:77-84.

Guo Y, Zhou Y, Jia D. Fabrication of hydroxycarbonate apatite coatings with hierarchically porous structures. *Acta Biomater*. 2008 Mar;4(2):334-42. Epub 2007 Aug 23.

Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr;15(4):373-80.

Henriques VAR, Cairo CAA, Silva CRM, Bresciani JC. Microstructural Evolution of Ti -13N -13Zr Alloy During Sintering.

Advanced Powder Technology - Material Science Forum. 2005;498-499.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):318-23. Epub 2008 Oct 7.

Ilan DI, Ladd AL. Bone grafts Substitutes. *Oper Techn Plastic Recons Surg*. 2003;9(4):151-160.

Kanagaraja S, Wennerberg A, Eriksson C, Nygren H. Cellular reactions and bone apposition to titanium surfaces with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(13):1809-18.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J Prosthet Dent*. 1983 Jun;49(6):832-7.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4):510-5.

Khan MA, Williams RL, Williams DF. The corrosion behaviour of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(7):631-637.

Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 5;52(3):553-7.

Kim HK, Jang JW, Lee CH. Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15:825-30.

Kokubo T, Miyaji F, Kim HM. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. *J Am Ceram Soc.* 1996;79(4):1127-9.

Kuroda D, Niinomi M, Morinaga M, Kato Y, Yashiro T. Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials. *Materials Science and Engineering: A.* 1998 Feb;243(1-2):244-249.

Kusakabe H, Sakamaki T, Nihei K, Oyama Y, Yanagimoto S, Ichimiya M, et al. Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. *Biomaterials.* 2004 Jul;25(15):2957-69.

Laheurte P, Prima F, Eberhardt A, Gloriant T, Wary M, Patoor E. Mechanical properties of low modulus beta titanium alloys designed from the electronic approach. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010 Nov;3(8):565-73. Epub 2010 Jul 24.

Li JP, Habibovic P, van den Doel M, Wilson CE, Wijn JR, van Blitterswijk CA, et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials.* 2007;28:2810-20.

Liang F, Zhou L, Wang K. Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment. *Surf Coat Tech.* 2003 Sept;165:133-9.

Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants [corrected and republished with original paging, article originally printed in *Clin*

Oral Implants Res. 1991 Jan-Mar;2(1):1-19]. Clin Oral Implants Res. 1991 Jul-Sep;2(3):1-19. Review.

Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical application. Mater Sci Eng. 2004 Jan;47:49-121.

Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement- a materials science perspective. Biomaterials. 1998 Jul;19:1621-639.

Lopez-Heredia MA, Sohier J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008 Jun;29(17):2608-15. Epub 2008 Mar 20.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.

Machnee CH, Wagner WC, Jaarda MJ, Lang BR. Identification of oxide layers of commercially pure titanium in response to cleaning procedures. Int J Oral Maxillofac Implants. 1993;8(5):529-33.

Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. J Cell Biochem. 2008 Feb 1;103(2):393-400.

Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. Biomaterials. 2004 Feb;25(5):865-76.

Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering A*. 1998 Mar;243:231-36.

Niinomi M. Metallic biomaterials. *J Artif Organs*. 2008 May;11:105-10.

Ning C, Ding D, Dai K, Zhai W, Chen L. The effect of Zr content on the microstructure, mechanical properties and cell attachment of Ti-35Nb-xZr alloys. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):1-8. Epub 2010 Jul 6.

Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*. 1999 Mar;20(5):491-500.

Nishiguchi S, Kato H, Neo M, Oka M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res*. 2001 Feb;54(2):198-208.

Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Coating bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jan-Feb;1(1):33-8. Review.

Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):403-13.

Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar;80(3):554-64.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS.

Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990 Jun;143(3):420-30.

Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Nov-Dec;13(6):805-10.

Pilliar RM, Deporter DA, Watson PA, Pharoah M, Chipman M, Valiquette N, et al. The effect of partial coating with hydroxyapatite on bone remodeling in relation to porous-coated titanium-alloy dental implants in the dog. *J Dent Res.* 1991 Oct;70(10):1338-45.

Qazi JI, Rack HJ. Metastable Beta Titanium Alloy for Orthopedic Applications. *Advanced Engineering Materials.* 2005 Nov;7(11): 993-98.

Rosa AL, Beloti MM, Noort RV, Hatton AV, Devlin AJ. Surface topography of hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Nov;16(3):209-15.

Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J.* 2005;16(3):225-30. Epub 2006 Jan 12.

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits *in vitro* osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol.* 2008;28:205-11.

Santos DR. Obtenção da liga Ti-35Nb por metalurgia do pó para utilização em próteses ortopédicas [tese]. Guaratinguetá: Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2006.

Santos DR, Pereira MS, Cairo CAA, Graça MLA, Henriques VAR. Isochrnal sintering of blended Elemental Ti-35alloy. *Material Science and Engineering A*. 2008 Apr;472:193-7.

Scharnweber D, Beutner R, Rössler S, Worch H. Electrochemical behavior of titanium-based materials - are there relations to biocompatibility? *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1215-20.

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:22-35. Review.

Schneider SC. Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (RJ): IPEN ; 2001.

Schroeder A, Pohler O, Sutter F. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*. 1976 Jul;86(7):713-27.

Simão AM, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell Biol Int*. 2007 Nov;31(11):1405-13. Epub 2007 Jun 28.

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Feb;97:27-36.

Song Y. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of β -type bio-titanium alloys, *Materials Science & Engineering - A -Structural Materials: Properties, Microstructure and Processing*. 1999 Mar;260(1-2):269-274.

Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:7-21. Review.

Stephen SJ, Froes FH. Titanium metallurgy and applications. *Lighth Metal Age*. 1988;46(11):5-12.

Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol*. 2002 Mar;88(3):262-9.

Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Röser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Oct-Dec;12(10-12):1025-31.

Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002 Jan;23(2):491-501.

Sumner DR, Galante JO. Determinants of stress shielding: design versus materials versus interface. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 Jan;274:202-12.

Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh WR. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant

integration: comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res.* 2000 Jul;51(1):15-22.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Sep-Oct;15(5):675-90. Review.

Vasconcelos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YR. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008 Mar;19:2851-7. (a)

Vasconcelos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YR. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Materials Research.* 2008;11(3):275-80. (b)

Vasconcellos LMR, Leite DO, Nascimento FO, Vasconcellos LGO, Graça MLA, Carvalho YR, Cairo CAA. Porous titanium for biomedical applications: an experimental study on rabbits. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 2010;15(2):407-12.

Xiong J, Li Y, Hodgson PD, Wen C. In vitro osteoblast-like cell proliferation on nano-hydroxyapatite coatings with different morphologies on a titanium-niobium shape memory alloy. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Dec;95(3):766-73.

Yan WQ, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. Bonding of chemically treated titanium implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 1997 Nov;37(2):267-75.

Yang YZ, Tian JM, Tian JT, Chen ZQ, Deng XJ, Zhang DH. Preparation of graded porous titanium coatings on titanium implant materials by plasma spraying. *J Biomed Mater Res*. 2000 Nov;52(2):333-7.

Wang BL, Li L, Zheng YF. In vitro cytotoxicity and hemocompatibility studies of Ti-Nb, Ti-Nb-Zr and Ti-Nb-Hf biomedical shape memory alloys. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):Epub 2010 Aug 3.

Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Material Science and Engineering*. 1996 Nov;A213:134-137.

Wang X, Li Y, Xiong J, Hodgson PD, Wen C. Porous TiNbZr alloys scaffolds for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 2009 Jun;5:3616-3624.

Wen CE, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scripta Materialia*. 2001 Nov;45(10):1147-53.

Wen CE, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T, Mabuchi M. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13:397-401.

Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron*. 2005 Sept; 36(7-8):583-92. Review.

Zhang E, Zou C. Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimético process: Characterization and in vivo evaluation. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(5):1732-41.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1837-47.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9017
Fax (12) 3947-9019 / ajgotti@sjc.unesp.br / Godont@sjc.unesp.br

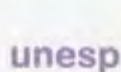
 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 027/2008-PA/CEP, sobre "Osteogênese in vitro e in vivo em amostras de titânio recobertas com diamante, sob responsabilidade de DENNIA PEREZ DE ANDRADE, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de dezembro de 2008.



Prof. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Dr. Arnaldo de Sousa, 177 - São José dos Campos - CEP 13241-970 - Fone: (13) 3391-9999 - FAX: (13) 3391-9999



Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

São José dos Campos, 09 de junho de 2011

Ofício nº 012/11-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	DENNIA PEREZ DE ANDRADE
Projeto	Osteogênese in vitro e in vivo em amostras de titânio recobertas com diamante
PARECER	
<p>Por solicitação do Pesquisador, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para " Biocompatibilidade in vitro em amostras porosas de titânio-nióbio submetidas a tratamento biomimético. ". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 027/2008-PA/CEP de 10/12/2008..</p>	

Atenciosamente,

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO

Coordenadora