

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FABIA ZAMPIERI D'ANTOLA DE MELLO

Avaliação da biofuncionalidade dos implantes da liga
Ti-35Nb-7Zr comparados aos implantes comerciais
de Ti-Cp.

Lorena

2017

FABIA ZAMPIERI D'ANTOLA DE MELLO

Avaliação da biofuncionalidade dos implantes da liga
Ti-35Nb-7Zr comparados aos implantes comerciais
de Ti-Cp.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais na área de concentração: Materiais Convencionais e Avançados.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Giacomini Schneider

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

Maio de 2017

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mello, Fabia Zampieri D'antola de
Avaliação da biofuncionalidade dos implantes da
liga Ti-35Nb-7Zr comparados aos implantes comerciais
de Ti-Cp. / Fabia Zampieri D'antola de Mello;
orientadora Sandra Giacomini Schneider - ed. reimp.,
corr. - Lorena, 2017.
92 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Materiais na Área de
Materiais Convencionais e Avançados) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2017
Orientadora: Sandra Giacomini Schneider

1. Ti-nb-zr. 2. Biofuncionalidade. 3. Análise
histológica. 4. Torque de remoção. 5. Citotoxicidade.
I. Título. II. Schneider, Sandra Giacomini, orient.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me abençoou em todo mestrado e à **Nossa Senhora Aparecida** por sempre me abrir as portas dos caminhos.

Ao meu marido **Cesar**, e às minhas filhas **Luisa e Marina** por me apoiarem e acreditarem em mim quando eu mesma fraquejava. Essa conquista também é de vocês! A vocês todo o meu agradecimento e amor!

A meus pais **Vitor e Vera** e à minha irmã **Fernanda** que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando.

À minha amiga e orientadora **Professora Dra. Sandra Giacomini Schneider**, com quem tenho o privilégio de trabalhar, por me inspirar e me transformar numa pesquisadora. Obrigada por me acolher e acreditar em mim. Você sabe como tirar o melhor das pessoas ao seu redor com sua garra e determinação. Muito obrigada!

À Professora **Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, por sua paciência, atenção e dedicação a esse projeto. Foi um imenso prazer te reencontrar depois de tantos anos e ver o quão competente e dedicada você é. Obrigada pelos ensinamentos e principalmente obrigada pela sua amizade.

À empresa **Titaniumfix**, pela parceria e por viabilizar esse projeto. Agradeço em especial à **Dra, Ana Paula Semensato**, que me recebeu na empresa de braços abertos, por sua dedicação na usinagem dos implantes da liga.

Aos meus **Professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de materiais** que contribuíram para que eu fosse capaz de realizar essa dissertação.

*Às minhas amigas **Beatriz, Marcela, Marília, Daphne**, e aos amigos **Eduardo, Bento, Jorge** que sempre tiveram ao meu lado nessa caminhada. Obrigada pelo companheirismo!*

*Aos **funcionários do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena** da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos e pela dedicação em todas as etapas deste trabalho.*

*Ao **Programa de Aperfeiçoamento do Ensino** pelo estágio supervisionado e ao **Professor Dr. Sérgio Schneider**, meu supervisor, por me ensinar e me deixar vivenciar à docência.*

*À **Universidade de São Paulo** por me conceder a oportunidade de realizar a pós-graduação.*

*À **Universidade Estadual Paulista** pela estrutura para realização dos experimentos para as análises biológicas.*

*Ao **CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico** pela concessão da bolsa de estudo.*

*“Por que se chamavam
homens, também se
chamavam sonhos, e
sonhos não envelhecem”*

Milton Nascimento

RESUMO

MELLO, F.Z.D. **Avaliação da biofuncionalidade dos implantes da liga Ti-35Nb-7Zr comparados aos implantes comerciais de Ti-Cp.** 2017. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

A Ti-35Nb-7Zr é uma liga Ti- β desenvolvida pelo Grupo de Biomateriais da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, que demonstrou, em estudos anteriores, propriedades mecânicas favoráveis para ser usada como biomaterial, tais como, limite de resistência (~800 Mpa), resistência à corrosão e baixo módulo de elasticidade (33 GPa). Uma vez que o implante dentário traz melhores resultados no tocante à função mastigatória, fonação, conforto e estética, melhorando a qualidade de vida das pessoas, o presente estudo descreve a avaliação da biofuncionalidade dos implantes dentários da liga Ti-35Nb-7Zr comparados aos implantes comerciais de Ti-Cp da marca Titaniumfix. A biofuncionalidade foi avaliada por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. A avaliação *in vitro* foi realizada com células mesenquimais indiferenciadas retiradas da medula óssea de fêmures de ratos, que foram cultivadas em meio de cultura osteogênico e posteriormente realizados os testes de citotoxicidade, quantificação de proteína total e avaliação da atividade da fosfatase alcalina. A avaliação *in vivo* compreendeu a realização de implantes de Ti-Cp Titaniumfix e da liga Ti-35Nb-7Zr em tíbias de coelhos para avaliação histológica, histomorfométrica por meio do cálculo da Fração da área óssea ocupada (BAFO) e aposição óssea, e de remoção ao torque com intuito de avaliar a osteointegração. Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa, com relação aos testes *in vitro*, é possível concluir que a liga possui maior hidrofiliabilidade que o Ti-Cp; apresenta espraiamento celular similar ao Ti-Cp o que corrobora para o resultado de viabilidade celular classificando-a como não citotóxica. Nos testes de quantificação de proteína total e atividade da fosfatase alcalina a liga apresenta resultados similares ao Ti-Cp, favorecendo a ocorrência de diferenciação e proliferação das células osteoblásticas. Desta forma, pode-se concluir que a liga possui boa compatibilidade *in vitro*. Os resultados obtidos nas avaliações *in vivo*, por meio da fração de área óssea ocupada (BAFO), comprovam a semelhança entre a liga e o Ti-Cp, pois tiveram o valor percentual de osso neoformado similar. A análise de fluorescência, após a administração dos marcadores tetraciclina e alizarina, mostra que a aposição óssea também foi semelhante entre a liga e o Ti-Cp nos períodos estudados. Com relação a força de interação avaliada pelo torque de remoção é possível afirmar que a liga apresenta osteointegração comparável aos implantes comerciais Ti-Cp. Esses resultados demonstraram que os implantes da liga Ti-35Nb-7Zr apresentaram biocompatibilidade e biofuncionalidade semelhantes aos dos implantes de Ti-Cp. Além de possuir um baixo módulo de elasticidade, a liga apresentou uma osteointegração bem similar ao Ti-Cp, reunindo características que demonstram seu potencial para ser usada como biomaterial intraósseo.

Palavras-chave: Liga Ti-Nb-Zr. Biofuncionalidade. Análise Histológica. Torque de Remoção. Citotoxicidade.

ABSTRACT

MELLO, F.Z.D. **Biofunctionality evaluation of a Ti-35Nb-7Zr implants compared to Ti-Cp implants.** 2017. 92p. Dissertation (Master of Science). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Ti-35Nb-7Zr is a Ti- β alloy developed by the Biomaterials Group of the Lorena School of Engineering of the University of São Paulo, which demonstrated, in previous studies, favorable mechanical properties to be used as biomaterial, such as resistance (~ 800 Mpa), corrosion resistance and low modulus of elasticity (33 GPa). Since the dental implant brings better results regarding masticatory function, phonation, comfort and aesthetics, improving the quality of life of the people, the present study describes the evaluation of the biofunctionality of the Ti-35Nb-7Zr alloy dental implants compared to the Titaniumfix implants of Ti-Cp. The biofunctionality was evaluated by means of *in vitro* and *in vivo* tests. The *in vitro* evaluation was performed with undifferentiated mesenchymal cells removed from the bone marrow of rat femurs, which were cultured in osteogenic culture medium and subsequently performed cytotoxicity tests, total protein quantification and evaluation of alkaline phosphatase activity. The *in vivo* evaluation included the implantation of Ti-Cp Titaniumfix and Ti-35Nb-7Zr alloy implants in rabbit tibiae for histological, histomorphometric evaluation by calculating the Bone Area Fractional Occupied (BAFO) and bone apposition, and torque removal in order to evaluate the osseointegration. Considering the results obtained in this research, related to *in vitro* tests, it is possible to conclude that the alloy has a higher hydrophilicity than Ti-Cp; Shows cellular spreading similar to Ti-Cp, which corroborates the result of cell viability classifying it as non-cytotoxic. In the tests of total protein quantification and alkaline phosphatase activity the alloy presents results similar to Ti-Cp, favoring the occurrence of differentiation and proliferation of osteoblastic cells. In this way, it can be concluded that the alloy has good compatibility *in vitro*. The results obtained in the *in vivo* evaluations, through the BAFO, confirm the similarity between the alloy and Ti-Cp, since they had the percentage value similar to neoformed bone. Fluorescence analysis, after administration of the tetracycline and alizarin markers, shows that bone apposition was also similar between the alloy and Ti-Cp in the periods studied. Regarding the interaction force evaluated by the removal torque, it is possible to affirm that the alloy shows osseointegration comparable to commercial Ti-Cp implants. These results demonstrated that Ti-35Nb-7Zr alloy implants had similar biocompatibility and biofunctionality to Ti-Cp implants. In addition to having a low modulus of elasticity, the alloy presented an osseointegration very similar to Ti-Cp, bringing together characteristics that demonstrate its potential to be used as an intraosseous biomaterial.

Keywords: Ti-Nb-Zr alloy. Biofunctionality. Histologic Evaluation. Removal Torque. Cytotoxicity.

LISTAS DE FIGURAS

<i>Figura 1- Desenho esquemático de um implante e sua fixação no osso.</i>	20
<i>Figura 2- Estruturas cristalinas cúbicas de corpo centrado (CCC) e hexagonal compacta (HC), com valores dos respectivos parâmetros do Ti puro</i>	24
<i>Figura 3- Diagrama parcial do Ti e elementos de liga β estabilizadores.</i>	25
<i>Figura 4- Representação da sobreposição dos valores experimentais e teóricos da variação do módulo de elasticidade com razão e/a para os sistemas Ti-Nb-Zr.</i>	28
<i>Figura 5- Fluxograma de obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr.</i>	30
<i>Figura 6 Representação das etapas da remodelação óssea</i>	33
<i>Figura 7- Desenho esquemático da medida do ângulo de contato</i>	34
<i>Figura 8- Rota de obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr</i>	41
<i>Figura 9- Etapas de obtenção de implantes da liga Ti-35Nb-7Zr</i>	43
<i>Figura 10- Amostras de Ti-Cp e Ti-35Nb-7Zr cortadas em chapas para os ensaios in vitro</i>	44
<i>Figura 11- Parâmetros dos implantes usinados de Ti-Cp e de Ti-35Nb-7Zr para os ensaios in vivo</i>	45
<i>Figura 12 Goniômetro usado para medição do ângulo de contato</i>	46
<i>Figura 13- Imagens do cultivo e proliferação celular</i>	47
<i>Figura 14- Etapas da avaliação da citotoxicidade</i>	48
<i>Figura 15-Etapas da quantificação de Proteínas Totais</i>	49
<i>Figura 16- Procedimento cirúrgico para a inserção dos implantes, da liga</i>	52
<i>Figura 17- Etapas do procedimento cirúrgico</i>	53
<i>Figura 18- Marcadores Fluorescentes Tetraciclina e Alizarina:</i>	54
<i>Figura 19- Torque de remoção</i>	55
<i>Figura 20- Etapas do preparo histológico</i>	56
<i>Figura 21 Imagem da lâmina histológica. Contorno branco: área total do flanco da rosca do implante; contorno amarelo: área óssea neoformada ocupada.</i>	57
<i>Figura 22- Implantes usinados de Ti-Cp (implantes Titaniumfix e Implantes usinados de Ti-35Nb-7Zr (implantes da liga).</i>	59
<i>Figura 23- Resultado da microanálise obtida por meio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do implante da liga.</i>	60
<i>Figura 24- Medidas do ângulo de contato</i>	61
<i>Figura 25-Esquema da micrografia na interface amostra/meio de cultura</i>	62
<i>Figura 26- Espreadimento celular observado nas micrografias A (1000x) e B (3000x) da superfície do Ti-Cp, obtidas por MEV e micrografia C (200x) obtida por meio de MO da interface Ti-Cp e meio de cultura celular.</i>	63
<i>Figura 27- Espreadimento celular observado nas micrografias, C (1000x) e D (3000x) obtida por MEV, da superfície da liga Ti-35Nb-7Zr e micrografia E (200x), obtidas por MO da interface da liga e meio de cultura celular</i>	64

<i>Figura 28- Gráfico da Viabilidade Celular do TiCp e da liga Ti-35Nb-7Zr, após 7 dias em meio de cultura</i>	65
<i>Figura 29- Quantificação de proteína total</i>	66
<i>Figura 30- Atividade da Fosfatase alcalina</i>	67
<i>Figura 31- Fotomicrografia de Fluorescência (200X) mostrando a marcação dos fluorocorantes (linhas castanhas: tetraciclina e linhas avermelhas: alizarina) nos implantes da liga Ti-35Nb-7Zr. Nota-se a presença do Sistema de Havers (SH) onde a calcificação ocorre em lamelas concêntricas e calcificações intermitentes.</i>	69
<i>Figura 32- Fotomicrografias de Fluorescência (200X) mostrando a marcação dos fluorocorantes (linhas castanhas: tetraciclina e linhas avermelhas: alizarina) nos implantes da liga Ti-35Nb-7Zr.</i>	70
<i>Figura 33- Fotomicrografia de fluorescência com aumento de 200X, mostrando a marcação dos fluorocorantes (castanha: tetraciclina; vermelha: alizarina) nos implantes de Ti-Cp Titaniumfix onde SH: Sistemas de Havers com lamelas concêntricas</i>	71
<i>Figura 34- Fotomicrografias de fluorescência com aumento de 200X, mostrando a marcação dos fluorocorantes (castanha: tetraciclina; vermelha: alizarina) nos implantes de Ti-Cp Titaniumfix</i>	72
<i>Figura 35- Gráfico da aposição óssea em micrômetro por dia.</i>	73
<i>Figura 36- Lâminas histológicas mostrando a mesial e distal de um mesmo implante sendo que a área escura corresponde ao implante e a área clara ao tecido ósseo.</i>	74
<i>Figura 37- BAFO dos implantes de Ti e Implantes da Liga</i>	75
<i>Figura 38- Análise histológica (25x) da liga Ti-35Nb-7Zr. Imagem A observamos o implante com neoformação óssea (NO) abaixo da cortical preexistente.</i>	76
<i>Figura 39-Detalhe da figura 36 onde NO corresponde ao osso neoformado e OP ao osso preexistente. Aumento de 200x.</i>	77
<i>Figura 40- Imagem histológica (200x) do implante da Liga Ti-35Nb-7Zr mostrando em ON: osso neoformado, OP: osso preexistente, CH: canais de Havers, OS: osteócito, LC: linha cimentante, M: medula</i>	78
<i>Figura 41- Imagem histológica (25x) do implante da liga onde observamos na área roxa mais escura NO: neoformação óssea e área roxa mais clara OP: osso preexistente.</i>	79
<i>Figura 42- Áreas das roscas dos implantes da liga preenchidos por tecido ósseo neoformado.</i>	79
<i>Figura 43- Imagem histológica (25x) do implante de Ti onde podemos ver ON osso neoformado e OP osso preexistente</i>	80
<i>Figura 44- Imagem (100x) do implante de Ti onde observa-se osso neoformado em roxo mais escuro e osso preexistente em roxo claro</i>	80
<i>Figura 45- Detalhe das roscas dos implantes de Ti preenchidas por osso neoformado</i>	81
<i>Figura 46- Análise do torque de remoção dos implantes da liga e do Ti</i>	81

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 <i>Composição e propriedades dos graus de titânio.</i>	23
Tabela 2 <i>Materiais mais comumente usados para implantes e suas propriedades mecânicas sendo E módulo de elasticidade, LE limite de escoamento e LRT limite de resistência à tração.</i>	26
Tabela 3 <i>Razão elétron/átomo e módulo de elasticidade das ligas do sistema Ti-Nb-Zr e Ti-Nb-Zr-Ta.</i>	27
Tabela 4 <i>Propriedades mecânicas da liga em diferentes processamentos térmico.</i>	39
Tabela 5 <i>Fração da área óssea ocupada (BAFO) onde ATF: área total do flanco; AON: área óssea neoformada. Exemplo de cálculo no implante 2 da liga.</i>	71

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIMO- Associação Brasileira da Indústria Médica, Odontológica e Hospitalar

Al- alumínio

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM- Sociedade Americana para Testes e Materiais

BAFO- Bone Area Fraction Occupied

CCC- Cúbica de Corpo Centrado

CFO- Conselho Federal de Odontologia

CO₂- dióxido de carbono

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DEMAR- Departamento de Engenharia de Materiais

EEL- Escola de Engenharia de Lorena

EMF- Efeito de Memória de Forma

FDA- Food and Drugs Administration

HC- Hexagonal Compacta

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISO- Internacional Organization for Standardization

LEIC- Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

MO- Microscópio Óptico

Mo- Molibdênio

MTT- Sal Tetrazólio

Nb- Nióbio

OECD- Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento

PSN- Pesquisa Nacional de Saúde

Ta- Tântalo

Ti- Titânio

Ti-Cp Titânio Comercialmente Puro

TiO₂- Dióxido de titânio

UNESP- Universidade Estadual Paulista

USP- Universidade de São Paulo

V- Vanádio

W- Tungstênio

WQ- Water Quenching- Resfriado em água

Zr- Zircônio

α- Alfa

β- Beta

Θ- Teta

ω-Ômega

LISTA DE TERMOS

In vitro- fora do organismo vivo, em tubo de ensaio.

In vivo- no organismo vivo.

Stress Shield- blindagem de estresse.

Swaging- deformação a frio.

Ad libitum- sem restrições ou limites.

Lise ou lisado celular- processo de destruição ou dissolução da célula causada pela ruptura da membrana plasmática.

Espraiamento- espalhamento, irradiação, disseminação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Biomateriais	22
2.2	Ti e suas Ligas	22
2.3	Nióbio	28
2.4	Zircônio	30
2.5	Processo de Obtenção da Liga Ti-35Nb-7Zr	30
2.6	Entendendo o Processo de Remodelação Óssea	31
2.7	Molhabilidade	33
2.8	Avaliação da Biofuncionalidade	35
2.8.1	Análises in vitro	35
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr	41
4.2	Obtenção das Amostras	44
4.3	Medida do ângulo de contato	45
4.4	Teste da avaliação biológica in vitro	46
4.4.1	Teste de viabilidade celular por citotoxicidade (MTT)	47
4.4.2	Teste de quantificação de proteínas totais	49
4.4.3	Teste de atividade da fosfatase alcalina	50
4.5	Teste da avaliação biológica in vivo	50
4.5.1	Aplicação de Marcadores Fluorescentes	53
4.5.2	Ensaio do torque de remoção	54
4.5.3	Preparo Histológico	55
4.5.4	Análise histológica e histomorfométrica	57
5	RESULTADOS e DISCUSSÕES	59
5.1	Obtenção dos Implantes da Liga de Ti-35Nb-7Zr	59

5.2	Análise da Liga por EDS.....	60
5.3	Resultados de molhabilidade.....	60
5.4	Resultado da proliferação e interação celular nas superfícies dos materiais.	62
5.5	Resultado da Viabilidade Celular.....	65
5.6	Quantificação de Proteína Total	66
5.7	Análise da atividade da fosfatase alcalina	66
5.8	Resultado de pós-operatório e toxicidade sistêmica.	67
5.9	Microscopia de Fluorescência	68
5.10	Análise Histológica e Histomorfométrica.....	74
5.11	Análise da Remoção ao Torque.....	81
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO A.....	90
	APÊNDICE.....	91

1 INTRODUÇÃO

Segundo estudo realizado em 2013 pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), em convênio com o Ministério da Saúde, o Brasil tem 11% da sua população sem nenhum dente, o que corresponde a um montante de 16 milhões de pessoas. Das pessoas com 60 anos ou mais, 41,5% já perderam todos os dentes. Além disso, de acordo com dados colhidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), 23% dos brasileiros perderam 13 dentes ou mais, e 33% usam algum tipo de prótese dentária, principalmente próteses removíveis que têm a duração limitada (aproximadamente 5 anos) necessitando de várias próteses ao longo da vida.

Avanços foram notados com a Política Nacional de Promoção à Saúde em conjunto com a Política Nacional de Saúde Bucal, 'Brasil Sorridente', lançada em 2004, onde ocorreu a implantação de uma rede maior de serviços de atenção à saúde bucal, mas ainda se evidencia que ações ou tratamentos como próteses e implantes, não são realizados no serviço público de saúde e sim majoritariamente na rede privada. Entre os brasileiros com mais de 18 anos que buscaram atendimento de saúde bucal, 74,3% recorreram a consultórios particulares. As unidades básicas de saúde foram responsáveis por apenas 19,6% dos atendimentos. (PUCCA, 2006).

A alternativa adequada para aqueles que perdem pelo menos um dente seria o tratamento por meio do implante dentário, que como opção de reabilitação oral, trazem soluções superiores no tocante à função mastigatória, fonação, conforto e estética se comparados a outros tipos de próteses, melhorando a qualidade de vida dessas pessoas (BOTTINO; TODESCAN, 2004; MAGINI, 2004).

O uso de implantes dentários vem se tornando comum entre os brasileiros. Cerca de 800 mil implantes e 2,4 milhões de componentes de próteses dentárias são colocados por ano no país, segundo levantamento da Associação Brasileira da Indústria Médica, Odontológica e Hospitalar (ABIMO). 90% deste mercado é atendido pela própria indústria nacional, que vem

crescendo, investindo em tecnologia e já exporta para diversos países, ainda de acordo com a associação. O aumento na demanda pela reabilitação oral com implantes também se dá pelo crescimento de especialistas habilitados para realizar tal procedimento. Entre 2004 e 2008, o número de novos implantodontistas por ano cresceu cerca de 260%. No início deste período, 287 novos especialistas foram registrados. Já no ano de 2014 o número pulou para 748. Hoje o Brasil tem 3563 implantodontistas de acordo com dados do Conselho Federal de Odontologia (CFO).

O implante dentário é um “parafuso”, geralmente com forma semelhante à raiz dentária. É utilizado, como suporte para algum tipo de prótese dentária. Esse suporte é instalado no osso do paciente, abaixo da gengiva. Sobre o implante, o cirurgião colocará alguma prótese dentária similar aos dentes e coroas perdidos, conforme figura 1.

Figura 1- Desenho esquemático de um implante e sua fixação no osso.



FONTE: CFO, 2015

As origens dos implantes dentários começaram com as civilizações gregas, etruscas e egípcias. Essas civilizações usavam uma gama de materiais para substituir o dente perdido tais como marfim, osso e até mesmo o metal. Porém os resultados obtidos nem sempre supriram as necessidades individuais (RING,1998).

A partir de 1950, os estudos em reposições ortopédicas tiveram grande impulso com o desenvolvimento na Suécia, pelo Dr. Per I. Branemark de um implante feito de titânio puro (Ti-Cp) que deu origem aos implantes

atuais. Ele estudou todos os aspectos envolvidos no projeto dos implantes, como dados biológicos, mecânicos, fisiológicos e funcionais e divulgou o conceito de osteointegração como sendo a possibilidade de ancoragem direta da estrutura do implante no osso, submetido a carga funcional, sem que haja a presença de tecido conjuntivo fibroso nesta interface. A osteointegração e suas aplicações práticas vêm incentivando a pesquisa de biomateriais e o sucesso dessas pesquisas está ligado diretamente ao caráter multidisciplinar que a envolve (BRANEMARK, 1983 e 1996; MCCLAURENCE, 2003).

Pesquisas com ligas de titânio (Ti) para aplicações biomédicas têm sido amplamente desenvolvidas e os resultados mais promissores são obtidos para as ligas do tipo (Ti-β). Este fato é devido às propriedades mecânicas serem favoráveis a essa aplicação. Estas ligas apresentam o maior nível de resistência mecânica, resistência à fadiga e à corrosão além de apresentarem menor módulo de elasticidade, uma propriedade interessante para implantes que ficam em contato com o osso. Estudos sobre a aplicação dessas ligas como biomateriais têm demonstrado que os sistemas Ti-Nb-Zr e Ti-Nb-Zr-Ta, apresentam características mais apropriadas devido à excelente combinação de propriedades mecânicas desses materiais (GEETHA et al., 2001; LI et al., 2012). Dentre essas ligas, a liga Ti-35Nb-7Zr que foi desenvolvida e estudada pelo grupo de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais da EEL/USP onde, vale ressaltar, no ano de 1978, também foi desenvolvida, pelo Professor Daltro Garcia Pinatti e colaboradores, uma rota tecnológica para produção de nióbio, com capacidade de produção de 40 toneladas por ano conhecida como Projeto Nióbio. A partir de então, o nióbio passou a sair do país beneficiado, em formato de lingotes, com um valor agregado muito superior. A Escola de Engenharia de Lorena passou também a abastecer o mercado nacional de nióbio, molibdênio, titânio, tântalo e suas ligas para atividades de pesquisa (USP, 2017).

A Liga Ti-35Nb-7Zr é o objeto de estudo desse trabalho, que compara os implantes comerciais de Ti-Cp da empresa Titaniumfix e os implantes da liga Ti-35Nb-7Zr por meio de testes biológicos *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (PARK; LAKES, 2007). Esses materiais devem possuir requisitos essenciais como: biocompatibilidade e biofuncionalidade.

Um material usado em substituição a tecidos e órgãos não pode causar reações indesejáveis aos pacientes e não deve produzir substâncias tóxicas caracterizando-o como biocompatível. Já a biofuncionalidade é a capacidade de o dispositivo funcionar com resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Está relacionada às propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas que permitem ao material desempenhar as funções semelhantes àquele material que está sendo substituído e que lhe forem solicitadas (BOSCHI,1996). Esta resposta apropriada do hospedeiro vai depender da interação biológica resultante do contato do material com o corpo. As reabilitações dentárias realizadas por meio de implantes têm sido amplamente estudadas, e o Ti e suas ligas têm se mostrados bons substitutos biofuncionais graças à combinação favorável de suas propriedades.

2.2 Ti e suas Ligas

O titânio (Ti) apresenta comprovada biocompatibilidade e uma excelente combinação de propriedades mecânicas e físico-químicas. O Ti conhecido como comercialmente puro (Ti-Cp) apresenta graus de pureza entre 98 a 99,5% variando suas propriedades de acordo com a quantidade de impureza presentes no processo de purificação como ferro, oxigênio, nitrogênio,

carbono e hidrogênio como demonstrado na tabela 1 (HOWARD; TIMOTHY, 1995; CALLISTER, 2007).

Tabela 1-Classificação do Ti por grau de pureza: composição e propriedades.

Titânio	Composição (%)	Módulo de Elasticidade (GPA)	Limite de Resistência à Tração (MPa)
Grau 1	Ti-0,20Fe- 0,18 O- 0,005H-0,05N-0,08C	100	240
Grau 2	Ti-0,30Fe-0,20 O- 0,015H-0,05N0,08C	103	345
Grau 3	Ti-0,30Fe-0,30 O- 0,015H-0,05N-0,08C	105	440
Grau 4	Ti-0,50Fe-0,40 O- 0,015H-0,05N-0,08C	100-120	550

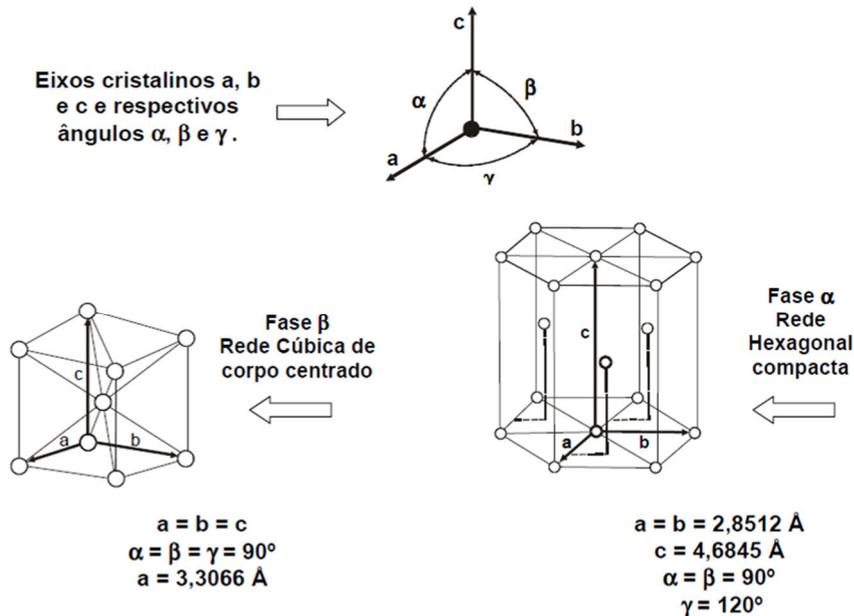
Fonte: adaptado de ASTM F67.

A maioria dos implantes dentários são confeccionados com o Ti-Cp grau 4 por possuírem a maior resistência mecânica.

As ligas de Ti são amplamente utilizados para aplicações biomédicas devido à sua combinação única de alta resistividade, alta resistência à corrosão e boa biocompatibilidade. Em contato com o ar, as ligas de Ti formam espontaneamente uma película passiva composta principalmente de dióxido de titânio (TiO₂), que protege essas ligas em ambientes agressivos como os fluidos corpóreos, fazendo com que o Ti perca a sua reatividade, se tornando extremamente inerte (CALLISTER, 2007).

À temperatura ambiente, o Ti puro apresenta-se na fase α , com estrutura cristalina hexagonal compacta (HC), a qual se transforma alotropicamente na fase β , cúbica de corpo centrado (CCC) a 882^oC como representado na figura 2.

Figura 2- Estruturas cristalinas cúbicas de corpo centrado (CCC) e hexagonal compacta (HC), com valores dos respectivos parâmetros do Ti puro

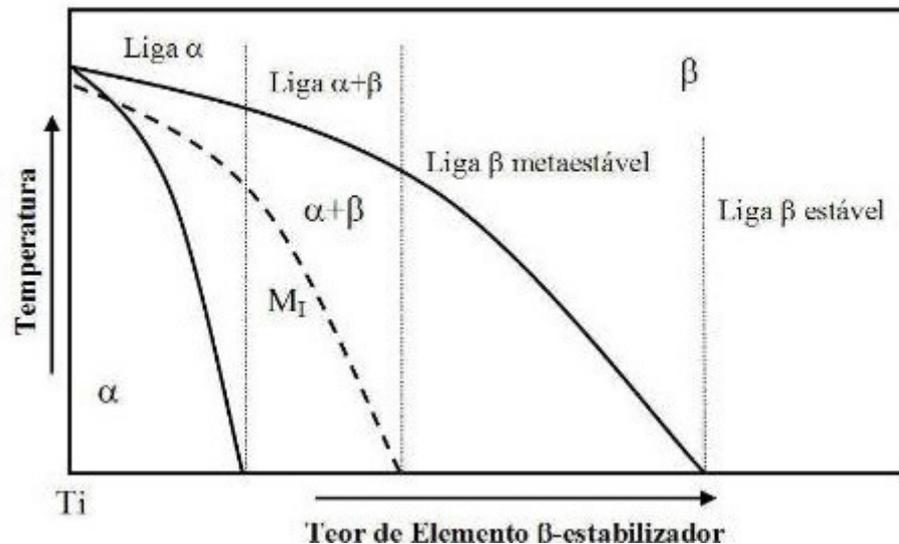


Fonte: (CULLITY, 1978); (SEAGLE et al, 1996).

A adição de elementos químicos ao Ti para a produção de uma liga visa basicamente a manutenção da fase α ou β , porém, em temperatura ambiente as fases podem existir simultaneamente. As ligas de Ti tipo β são as ligas obtidas quando uma grande quantidade de elementos estabilizadores dessa fase é adicionado ao Ti. Os elementos de liga são classificados como estabilizadores α ou β dependendo do seu efeito na temperatura de transformação de fase. O Al é o elemento mais comumente utilizado para estabilizar a fase α , já o Mo e Nb são β estabilizadores (Figura 3) (HOWARD; TIMOTHY, 1995; CALLISTER, 2007; NIINOMI, 2008). As ligas β estão sendo desenvolvidas visando não apenas maximizar a biocompatibilidade, uma vez que são compostas por elementos não tóxicos ou não alergênicos (NIINOMI, 2008b), mas também acelerar a biofuncionalidade exibindo melhores propriedades mecânicas em relação ao osso. A fabricação de ligas de Ti com módulo de elasticidade similar ao do osso cortical tem sido extensivamente pesquisada (SCHNEIDER, 2001; NIINOMI, 2003; TADDEI et al., 2007; BOTINO et al., 2009; STENLUND et al., 2015) e já é conhecido que as ligas de Ti tipo β

exibem menor módulo de elasticidade do que as ligas do tipo α ou tipo $\alpha + \beta$ (NIINOMI, 2008).

Figura 3- Diagrama parcial do Ti e elementos de liga β estabilizadores.



Fonte: adaptado de (ARRAZOLA et al., 2013).

O titânio comercialmente puro (Ti-Cp) e a liga Ti-6Al-4V são os materiais mais comumente utilizados para confecção de implantes metálicos intraósseos por apresentarem características biológicas e físico-químicas adequadas, conforme vistas na tabela 2. No entanto, tem havido preocupações de que V é potencialmente tóxico e que Al pode contribuir para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, especialmente com a implantação de longo prazo. Além disso, o módulo de elasticidade de ligas de Ti também tende a aumentar com o aumento do teor de Al. A liga Ti-6Al-4V, tem um módulo de elasticidade de aproximadamente 120 GPa, que é significativamente mais elevado do que o do osso, que tem um módulo entre 10 a 30 GPa. Essas diferenças entre módulos de elasticidade resultam na formação de grandes tensões na interface osso / implante, conhecido como *Stress Shield*, que pode conduzir à fratura e perda precoce do implante. As ligas que contêm principalmente a fase β tendem a exibir

valores de módulo de elasticidade significativamente mais baixos do que as ligas α e $\alpha + \beta$ tornando-as mais favoráveis para uso em implantes (DEWIDAR; YOON; LIM, 2006; LEMONS; DIETSH-MISCH, 2006; LAHEURTE et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 2010).

Tabela 2- Materiais mais comumente usados para implantes e suas propriedades mecânicas sendo, E: módulo de elasticidade, LE: limite de escoamento e LRT: limite de resistência à tração.

Liga	Tipo	E (GPa)	LE (MPa)	LRT (MPa)
Grau 4	α	100-120	480-655	550
Ti-6Al-4V	$\alpha+\beta$	110-140	800-1100	900-1200
Ti-13Nb-13Zr	próximo- β	62-80	836-908	973-1037
Ti-35Nb-7Zr	β	33-60	800	806

Fonte: arquivo pessoal

Pesquisas recentes mostram consideráveis esforços dedicados à exploração de ligas Ti- β devido às suas propriedades favoráveis, tais como, superelasticidade, efeito de memória de forma (EMF), baixo módulo de elasticidade, biocompatibilidade, capacidade de conformação, alta resistência à corrosão e à fadiga quando comparadas às ligas de Ti do tipo α e $\alpha + \beta$. (CHEN et al., 2008, NIINOMI; NAKAI; HIEDA, 2012). Ao contrário das ligas Ti- $\alpha+\beta$ as ligas Ti- β podem ser facilmente solubilizadas no campo β e envelhecidas a fim de se obter um endurecimento por precipitação uniforme. Além disso, a deformação a frio pode ser utilizada para modificar o comportamento de precipitação na fase β metaestável promovendo a obtenção de uma alta densidade de precipitados muito finos (KARASEVSKAYA et al., 2003).

Vale lembrar que os mecanismos de deformação em ligas Ti- β podem variar amplamente dependendo da composição específica da liga e tamanho do grão β . Esses mecanismos incluem escorregamento de discordâncias, maclação e escorregamento com desvio de discordâncias em hélice. Ligas de Ti- β tratadas por solução sólida exibem melhor trabalhabilidade a frio quando não prevalecem os mecanismos de deformação como processos de maclação e transformações de fase induzida por tensão (KARASEVSKAYA et al., 2003). Uma dessas ligas

tipo β é a liga do sistema titânio-nióbio-zircônio (Ti-Nb-Zr) que começou a ser comercializada como material de implantes ortopédicos na década de 90 (Song, 1999), sendo que suas propriedades mecânicas podem ser controladas por tratamentos térmicos e deformações a quente ou a frio. A primeira liga desse sistema que apareceu comercialmente foi a liga Ti-13Nb-13Zr com resistência mecânica da ordem de 1.300 MPa, alta resistência à corrosão e menor módulo de elasticidade (60 GPa a 80 GPa) se comparadas as ligas de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (OKASAKI et al., 1998).

Estudos desenvolvidos por Schneider (2001) sobre a obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr incluíram a rota da obtenção desse material e as análises biológicas *in vitro* e *in vivo*. Esses resultados, validaram o produto final como biocompatível. Esse primeiro estudo foi base para estudos subsequentes desenvolvidos pelo grupo de Biomateriais da EEL-USP coordenado pela professora Sandra Schneider, principalmente sobre a avaliação das propriedades microestruturais da liga Ti-35Nb-7Zr para aplicação biomédica (MACEDO; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2014) e demonstrou que a Ti-35Nb-7Zr possui rigidez próxima à encontrada para os ossos com módulo de elasticidade de 33 GPa se comparadas a outras do mesmo sistema ternário e do sistema quaternário Ti-Nb-Zr-Ta, veja tabela 3.

Tabela 3-Razão elétron/átomo e módulo de elasticidade das ligas dos sistemas Ti-Nb-Zr e Ti-Nb-Zr-Ta

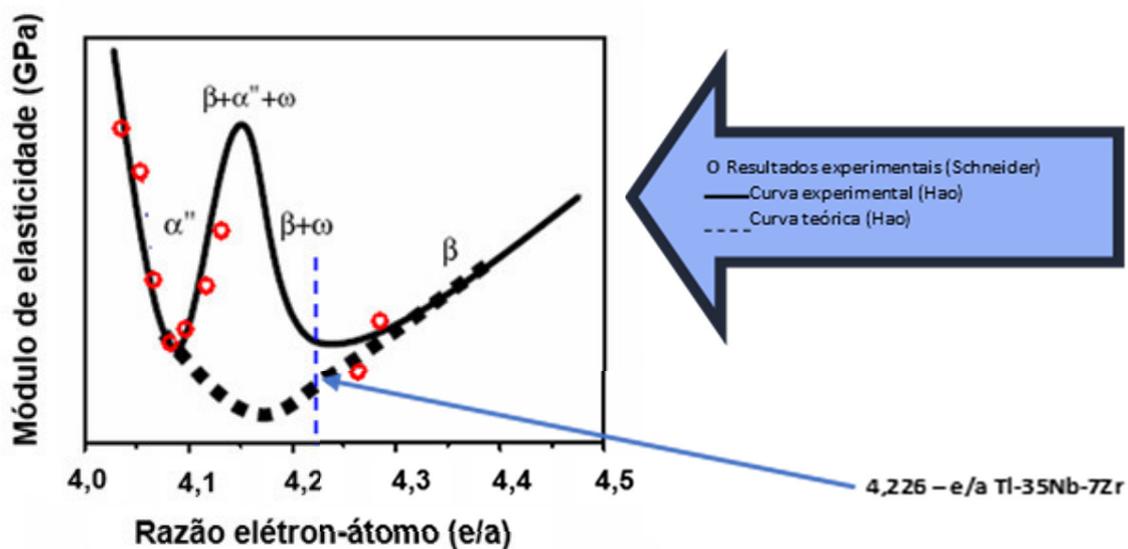
Composição em peso	Razão e/a	Módulo de Elasticidade (GPa)
Ti-5Nb-13Zr	4,028	92
Ti-8Nb-13Zr	4,045	86
Ti-10Nb-13Zr	4,058	71
Ti-13Nb-13Zr	4,077	62
Ti-15Nb-13Zr	4,089	64
Ti-18Nb-13Zr	4,109	70
Ti-20Nb-13Zr	4,123	78
Ti-41,1Nb-7Zr	4,276	65
Ti-35,3Nb-7,1Zr-5Ta	4,258	58
Ti-35Nb-7Zr	4,226	33*

*Dados experimentais da liga estudada nesse trabalho

Fonte: modificado de (MACEDO; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2014).

Observa-se que o aumento do Nb que estabiliza a fase beta deveria reduzir o módulo de elasticidade. No entanto, esta relação não é linear. Para efeito comparativo, os valores experimentais de módulo e razão elétron átomo foram sobrepostos incluindo-se uma linha pontilhada para valor de e/a da liga da dissertação segundo figura 4 a seguir.

Figura 4- Representação da sobreposição dos valores experimentais e teóricos da variação do módulo de elasticidade com razão e/a para os sistemas Ti-Nb-Zr.



Fonte: Adaptado de (HAO et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2010).

De acordo com o apresentado na literatura por Hao et al., (2007); o menor módulo teoricamente (linha pontilhada em preto) seria obtido para uma liga com e/a de 4,17 desde que as fases ω e α' fossem evitadas. No entanto, na realidade, (linha contínua) são valores 4,08 e 4,22 que representam os menores módulos por terem predominância das fases α' e β , respectivamente.

2.3 Nióbio

O Nióbio (Nb) é um metal de transição, raro e estratégico, utilizado nas ligas metálicas, em especial na produção de aços especiais utilizados em tubos de gasodutos, produção de motores de aeronaves, na propulsão de

foguetes e em vários materiais supercondutores usados na obtenção das imagens por ressonância magnética. Outras aplicações incluem a soldagem, a indústria nuclear, a eletrônica, a óptica, e a produção de joias e biomateriais já que não apresenta citotoxicidade.

O Brasil detém 98% da reserva mundial de Nióbio, os outros 2% estão no Canadá e Austrália. O Brasil responde atualmente por mais de 90% do volume do metal comercializado no planeta, as maiores jazidas se encontram nos estados de Minas Gerais (75% do total), Amazonas (21%) e em Goiás (3%). Essa representatividade em relação ao nióbio desperta cobiça e preocupação por parte das grandes siderúrgicas e maiores potências econômicas, Em 2010, um documento secreto do Departamento de Estado americano, vazado pelo site WikiLeaks, incluiu as minas brasileiras de nióbio na lista de locais cujos recursos e infraestrutura são considerados estratégicos e imprescindíveis aos Estados Unidos da América. Mais recentemente, o nióbio voltou a ganhar os holofotes em razão da venda bilionária de uma fatia da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), maior produtora mundial de nióbio, para companhias asiáticas. Em 2011, um grupo de empresas chinesas, japonesas e sul coreana fechou a compra de 30% do capital da mineradora com sede em Araxá (MG) por US\$ 4 bilhões (IBRAM, 2017)

O Departamento de Engenharia de Materiais da EEL/USP faz parte da história do Niobio no Brasil, pois no ano de 1978, fechou contrato de prestação de serviços com a maior empresa mineradora de nióbio, a Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) e desenvolveu, com o Professor Daltro Garcia Pinatti e colaboradores, o Projeto Nióbio, uma rota tecnológica para produção de nióbio, com capacidade de produção de 40 toneladas por ano. A partir de então, o nióbio passou a sair do país beneficiado, em formato de lingotes, com um valor agregado muito superior. A Escola de Engenharia de Lorena passou também a abastecer o mercado nacional de nióbio, molibdênio, titânio, tântalo e suas ligas para atividades de pesquisa (USP, 2017).

2.4 Zircônio

O zircônio (Zr) é um metal material branco acinzentado brilhante e muito resistente a corrosão. Ele não é encontrado na natureza como metal livre. A principal fonte de zircônio é proveniente do zircão (silicato de zircônio, $ZrSiO_4$), que se encontra em depósitos na Austrália, Brasil, Índia Rússia e Estados Unidos. O zircão é obtido como subproduto de mineração e processado de metais pesados de titânio, a ilmenita ($FeTiO_3$) e o rutilio (TiO_2), e também do estanho. É utilizado principalmente como revestimento de reatores nucleares, devido a sua secção de choques de nêutrons ser muito baixa. Utilizado também como aditivo em aços obtendo-se materiais muito resistentes.

2.5 Processo de Obtenção da Liga Ti-35Nb-7Zr

A liga utilizada neste trabalho foi obtida seguindo uma rota de fusão previamente desenvolvida de acordo com as etapas representadas na figura 5.

Figura 5- Fluxograma de obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr



A liga Ti-35Nb-7Zr é produzida por fusão em forno a arco, com eletrodo não consumível de tungstênio, sob atmosfera de argônio (99% de pureza) em cadinho de cobre refrigerado a água. São utilizados, como material de partida, chapas de Ti, Nb e Zr de alta pureza. As chapas são cortadas em tiras, de dimensões apropriadas ao tamanho do cadinho, por meio de uma guilhotina e em seguida, decapadas em solução ácida apropriada para cada metal. O material limpo é pesado em proporções adequadas à obtenção de lingotes de aproximadamente 65 g. Os lingotes são encapsulados a vácuo em tubos de quartzo sendo, em seguida, submetidos a solubilização a 1000° C por 2 horas resfriado em água (1000°C/2h WQ) e recristalizados a 700° C por 30 minutos resfriados a água (700°C/30min WQ) (SCHNEIDER,2001)

O tratamento térmico consiste na solubilização das ligas no campo β visando garantir uma melhor homogeneidade e eliminar as possíveis influências da estrutura inicial (bruta de fusão). Após a solubilização os lingotes passam pelo processo de forjamento rotativo a frio *Swaging* até o diâmetro de 6 mm (redução em área 84%) realizado em equipamento FENN 3F, de potência de 30 CV e velocidade de 1.700 (SCHNEIDER, 2001).

2.6 Entendendo o Processo de Remodelação Óssea

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita imersa numa matriz de colágeno. A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas. Quando lesionados, os tecidos ósseos têm capacidade regenerativa, isto é, o processo de reparação óssea é efetuado por meio da formação de osso novo e não pela formação de tecido fibroso. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células do tecido ósseo podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblásticas, responsáveis pelo processo de formação e mineralização da matriz óssea, e a e células da linha osteoclásticas,

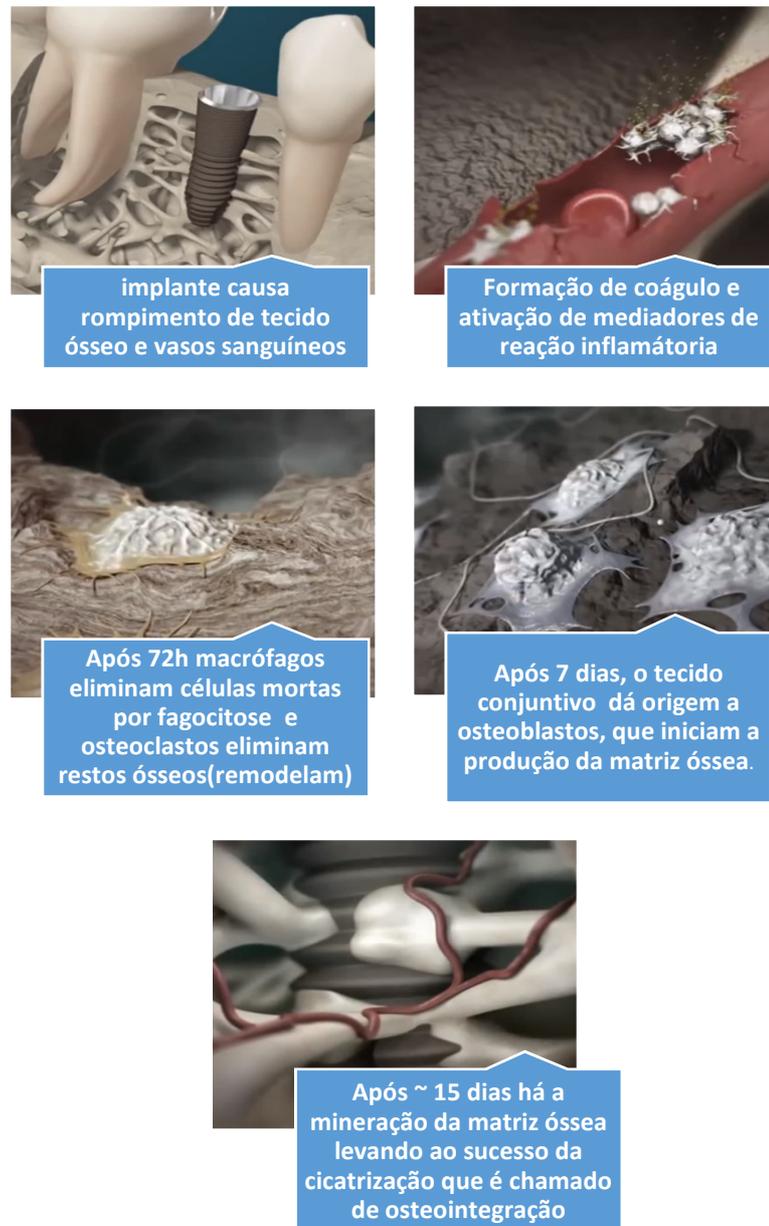
relacionadas a reabsorção óssea. Os osteoblastos maduros são células sem capacidade de divisão, mas metabolicamente muito ativas. Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colágeno tipo I e proteínas não colagênicas como a osteopontina, a osteocalcina e a fosfatase, entre outras. Estas proteínas não colagênicas têm uma importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno aos cristais minerais de hidroxiapatita. Os osteoblastos ainda sintetizam muitos e variados fatores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea. Os osteoblastos são responsáveis não só pela formação da matriz óssea, mas também pela sua mineralização (MOREIRA, 2005).

A resposta do tecido hospedeiro a implantes envolve uma série de eventos celulares e da matriz óssea, resultando na aposição do osso ao biomaterial, conforme figura 6. A medida que o osso é agredido durante o procedimento cirúrgico do implante, os vasos sanguíneos se rompem produzindo uma hemorragia localizada com a formação de coágulo.

Ocorre ainda, a morte de células ósseas e a destruição da matriz óssea adjacente ao leito da implantação (JUDAS; PALMA; FALACHO, 2012).

Durante o reparo ósseo, o coágulo sanguíneo, células e matriz óssea agredidos são removidos por fagocitose. O perióstio ao redor do leito preparado responde vigorosamente com intensa proliferação de fibroblastos e células osteoblásticas que formam um tecido celular ao redor do implante. Após aproximadamente 7 dias, o tecido celular formado ao redor do implante é transformado em tecido ósseo imaturo pela mudança da célula do tecido conjuntivo em osteoblastos, que iniciam a produção da matriz óssea. Íons de cálcio e fosfato são utilizados na mineração da matriz óssea. Esta série de eventos leva ao sucesso da cicatrização óssea que em contato íntimo com o biomaterial é chamado de osteointegração (JUDAS; PALMA; FALACHO, 2012)

Figura 6 Representação das etapas da remodelação óssea



Fonte: adaptado de *Impladentes*, 2014

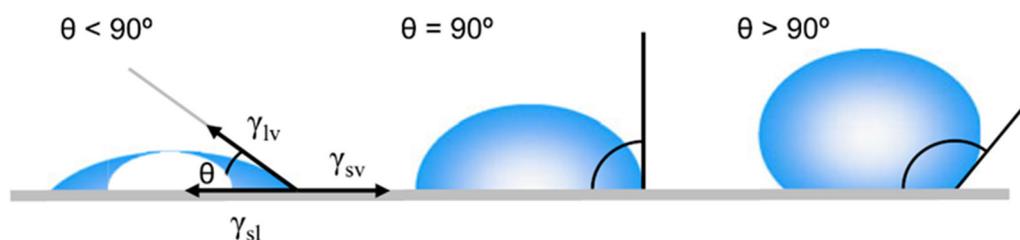
2.7 Molhabilidade

Considerando que os mecanismos envolvidos na osteointegração dependem da interação das células com a superfície do biomaterial, é importante analisar a molhabilidade da superfície e os parâmetros que a influenciam. O arranjo dos átomos na superfície dos metais apresenta forma diferenciada

quanto à disposição atômica em relação ao volume interno. Este tipo de diferença acaba ocasionando a elevação do nível de energia livre na superfície, fazendo com que ocorra uma tendência maior na adsorção dos átomos e moléculas. Isto ocorre devido ao fato de que quanto maior a energia por unidade de superfície do metal, maior será a possibilidade de surgirem reações entre a superfície do material e o hospedeiro. Portanto é de suma importância o conhecimento das propriedades da superfície dos biomateriais, mais precisamente no que diz respeito às propriedades de adesão e molhabilidade (CALLISTER, 2007).

A molhabilidade é medida por meio do chamado ângulo de contato (Θ), definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido em um plano contendo a superfície aonde a gota é depositada. Ângulos de contato pequenos ($< 90^\circ$) correspondem com alta molhabilidade, identificando o material como hidrofílico, enquanto os ângulos de contato grandes ($> 90^\circ$) correspondem com baixa molhabilidade identificando o material como hidrofóbico, segundo demonstrado na figura 7. Materiais com superfícies hidrofílicas mostram-se desejáveis frente às superfícies hidrofóbicas devido a suas maiores interações com fluidos biológicos, células e tecidos (WILD, 2005).

Figura 7- Desenho esquemático da medida do ângulo de contato



Fonte: (FRANZINI ¹, 2015).

FRANZINI, D.R. Caracterização da superfície do Ti após anodização eletroquímica visando à formação de nanotubos. Trabalho de iniciação científica, Universidade de São Paulo, 2015.

2.8 Avaliação da Biofuncionalidade

A avaliação biológica de biomateriais e dispositivos médicos é realizada por meios de ensaios efetuados de acordo com normas internacionais. Essas normas são publicações técnicas de protocolos e métodos *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos e padronizados a partir de um consenso envolvendo revisões literárias, pesquisas científicas, entre outros. A Organização de Cooperação Económica e Desenvolvimento (OECD), a Interacional Organization for Standardization (ISO) e a Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM) têm desenvolvido as normas para estes testes e ensaios. (ASTM, 2010; ISO, 2010; OECD, 2010).

A adoção dessas normas na pesquisa de biofuncionalidade visa maior eficiência nos testes, avaliando assim a segurança dos biomateriais e possibilitando um melhor gerenciamento do risco destes produtos pelas agências reguladoras.

Uma diretriz que compreende os testes de biocompatibilidade e biofuncionalidade de materiais para aplicações biomédicas é dado pela International Organization for Standardisation ISO — 10993 que contém atualmente 20 partes atualizadas até 2010, e engloba por meio de um conjunto de testes, *in vitro* e *in vivo*, as diretrizes desde a caracterização de cada material ou dispositivo médico, até a seleção adequada dos ensaios necessários e requisitos técnicos específicos para cada ensaio (ISO, 2010).

2.8.1 Análises *in vitro*

No intuito de se refinar, diminuir e substituir a utilização de animais de laboratório na pesquisa, iniciou-se na década de 80 o desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* para a avaliação de eficácia e segurança de biomateriais. Estes modelos foram utilizados com sucesso para a demonstração de mecanismos de ações específicos, principalmente no que se referem aos sistemas biológicos realizados em microrganismos, células, tecidos e órgãos.

Uma apropriada investigação *in vitro* pode ser usada para a triagem prospectiva dos biomateriais, antes dos procedimentos em animais. Os resultados são mais apropriados e permitem um melhor prognóstico do desempenho *in vivo* do material pesquisado. (ISO, 2010).

2.8.1.1 Citotoxicidade ou Viabilidade Celular

Citotoxicidade é a capacidade de um material em promover alteração metabólica nas células, podendo culminar ou não em morte celular. Métodos *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade envolvem mudanças que vão desde a morte celular até alterações de certas funções celulares como morte celular, indicado pelo arredondamento e descolamento das células do substrato, ausência ou mudança na atividade metabólica, e lise das células; redução da adesão celular; alterações na morfologia celular e proliferação celular reduzida. (WANG; LI; ZHENG, 2010).

Um dos ensaios mais comuns para testar a viabilidade celular é o ensaio de MTT, desenvolvido por Mosmann (1983). O ensaio é baseado na redução do sal tetrazólio amarelo (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a um composto formazan púrpura pela atividade da desidrogenase da mitocôndria intacta, ou seja, esta conversão somente ocorre nas células vivas.

2.8.1.2 Quantificação de Proteínas Totais

O tipo e a quantidade de proteínas adsorvidas após a instalação do implante dentário fornecem uma das condições mais importantes relacionadas ao sucesso clínico, já que respondem pela mediação da adesão, proliferação e diferenciação de células, assim como pela deposição de tecido mineralizado. Entre os métodos para quantificação de proteínas, o método de Lowry tem como objetivo determinar a concentração de proteínas numa solução com o reagente colorimétrico Folin Ciocalteau. Em condições alcalinas esta substância interage

com as proteínas da amostra gerando um complexo de cor azul que pode ser medido num espectrofotômetro no comprimento de onda entre 650 nm e 750 nm.

2.8.1.3 Atividade da Fosfatase Alcalina

A análise histológica do tecido ósseo por meio de biópsias é o método preferido para avaliar alterações na formação e reabsorção óssea. Existem, entretanto, métodos não invasivos com as mesmas finalidades, denominados marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Estes marcadores são substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos que fornece informações úteis do remodelamento ósseo sendo um dos principais marcadores bioquímicos de formação óssea.

Como a formação óssea é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação na realidade medem produtos frutos da síntese osteoblástica. (VAN STRAALLEN et al., 1991; VIEIRA, 1999).

2.8.1.4 Análises *in vivo*

Apesar do estabelecimento dos modelos *in vitro* ser fundamental, a utilização de animais de laboratório na avaliação da biofuncionalidade e da segurança de produtos, nos seus mais diversos aspectos, é imprescindível. Para tanto, todas as regras básicas de biotelmismo e manipulação de animais devem, obrigatoriamente, ser observadas. Recomenda-se que os animais de laboratório utilizados em experimentos sejam manuseados dentro dos preceitos éticos preconizados, de forma a contribuírem para o refinamento dos ensaios e diminuição do estresse a que possam ser submetidos durante a realização de ensaios, com a redução do número de animais utilizados e substituição por ensaios *in vitro* quando possível (ISO, 2010; SILVA, 2011).

Os testes em animais, na avaliação de biomateriais, são procedimentos que avaliam a biocompatibilidade e a biofuncionalidade de um novo biomaterial antes de seu uso clínico

2.8.1.5 Avaliação do Pós Operatório

Os animais utilizados devem ser observados por sete dias após a procedimento. Mortes, alterações clínicas, e sintomas de toxicidade devem ser registrados. Todos os animais encontrados mortos, ou sacrificados por estarem moribundos ao final do período de observação devem ser necropsiados com exame macroscópico das vísceras. (OECD, 2010; ISO, 2010; SILVA, 2011).

2.8.1.6 Resposta biológica dos implantes

Em relação aos implantes, a resposta biológica só pode ser avaliada em condições *in vivo*, de acordo com as normas internacionais de utilização e experimentação animais. Os resultados destes testes podem ser extrapolados para a segurança em uso clínico humano, principalmente aqueles relacionados aos processos de regeneração. Os animais comumente utilizados são ratos e/ou coelhos, adultos.

Os implantes são realizados por meio de cirurgias nas regiões da tíbia ou fêmur, nas quais são realizadas cavidades cirúrgicas (ISO 10.993 – Parte 6, 2004). A compreensão dos eventos celulares e moleculares que ocorrem na interface célula-biomaterial nos implantes ósseos consiste no fator decisivo para que haja sucesso clínico. (SISTA et al., 2011; SILVA, 2011).

2.8.1.7 Torque de Remoção

A avaliação da qualidade dos implantes, por meio de testes exigidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e a FDA (Food and

Drugs Administration), se faz necessária, visando um ótimo resultado clínico. A osteointegração dos implantes é avaliada através da força adesiva existente entre o osso e a superfície do implante. Testes mecânicos de torque de remoção são, usualmente aplicados com este propósito.

Os testes biomecânicos como o de remoção ao torque, medem a quantidade de força para remover o implante do osso ou para que se tenha uma falha na interface osso/implante. Estes testes fornecem informações sobre o grau de fixação do biomaterial ao tecido ósseo. O comportamento das células quando em contato com um material é considerado decisivo para que este seja considerado biofuncional ou não, especialmente pela adesão celular à sua superfície (GEHRKE; MARIN, 2015).

A compreensão das interações que ocorrem *in vitro* na interface material-células fornece subsídios para se criar condições ideais de biofuncionalidade para o sucesso do implante *in vivo*. Assim, o entendimento da resposta celular é tão importante quanto a compreensão das propriedades físico-químicas do material.

Neste contexto, este estudo visa avaliar a biofuncionalidade de implantes odontológicos usinados da liga Ti-35Nb-7Zr comparadas a implantes odontológicos comerciais usinados de Ti-Cp por meios de ensaios biológicos, *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de avaliar o potencial de substituição que a liga Ti-35Nb-7Zr pode ter frente a implantes comerciais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio da biofuncionalidade, o potencial que os Implantes usinados da liga Ti-35Nb-7Zr têm em substituir os implantes comerciais de Ti-Cp.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho compreendem a realização de testes de avaliação biológica da liga Ti-35Nb-7Zr comparativamente ao Ti-Cp, tais como:

- Testes *in vitro*:

Avaliar a viabilidade celular por meio do teste de citotoxicidade e sua influência na atividade celular

Quantificar a proteína total.

Avaliar a atividade da fosfatase alcalina

- Testes *in vivo*:

Avaliar qualitativa e quantitativamente a reparação óssea ao redor de cada implante.

Correlacionar os valores da porcentagem de neoformação óssea com o tipo de implante.

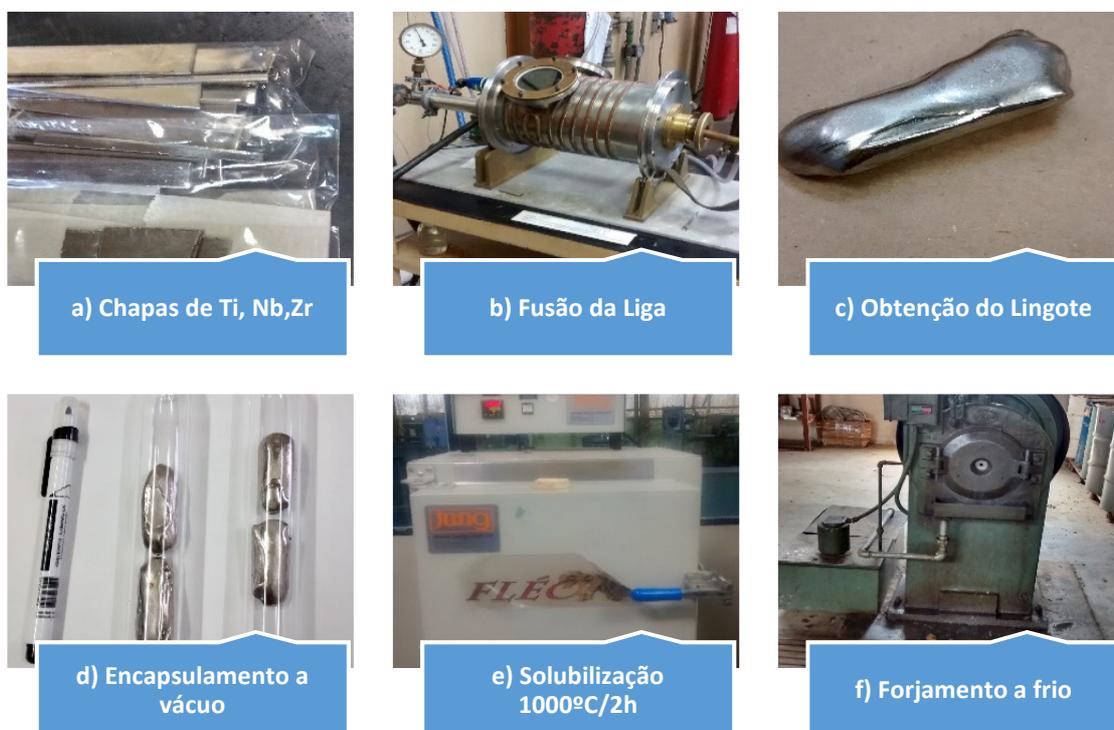
Correlacionar os valores obtidos da força de remoção com o tipo de implante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr

A liga Ti-35Nb-7Zr foi produzida em forno de fusão a arco. Os lingotes obtidos foram submetidos a tratamento térmico de solubilização (1000 ° C / 2h – esfriados em água), deformados a frio e recristalizados (700°C/30min-resfriados em água), conforme rota de obtenção explicada no item 2.3 e detalhada na figura 8.

Figura 8- Rota de obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr



Fonte: arquivo pessoal

A Liga deformada foi recristalizada à 700°C/2h por ser uma temperatura menor que a teórica e próxima à de transição da fase, com um tempo de tratamento menor para promover o refino de grão e a melhoria das propriedades mecânicas (ganho de resistência sem perda de ductilidade) (SCHNEIDER et al., 2010; MACEDO; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2014). Parte

da liga foi cortada em chapas e seguiram para análise *in vitro* e outra parte foi levada a empresa Titaniumfix, grande parceira do projeto, para usinagem que originou os implantes para as análises *in vivo*. Inicialmente, para confecção dos implantes, as barras da liga Ti-35Nb-7Zr com aproximadamente 210 mm de comprimento e 6 mm de diâmetro, não atenderam aos parâmetros de usinagem usados pela empresa Titaniumfix em seus tornos, tornando necessário confeccionar o lingote com maior diâmetro. Além disso, outra dificuldade foi acertar a cilindridade da barra exigidos em escala industrial.

A cilindridade é uma tolerância que qualifica uma superfície cilíndrica no seu conjunto. Segundo a empresa Titaniumfix o campo de tolerância aceitável para a confecção de implantes está especificado entre 0 a 0,04mm sobre a cota de diâmetro nominal, para que seja possível a alimentação das barras nos tornos automáticos do tipo CNC (controle numérico computadorizado). O sistema é movido por uma pinça com atuação pneumática e guiada por uma bucha, onde ambas são dependentes do diâmetro e da cilindridade das barras e possuem precisão. Se uma dada barra não atender à essas questões, o sistema não funciona.

Uma solução possível foi o lingote do material passar pelo torno antes do forjamento para retirar as irregularidades do lingote e assim melhorar a diferença de cilindridade quando deformado a frio. Com o torneamento perdeu-se um pouco de massa (65 g para 48 g) mas optou-se por ganhar em cilindridade em detrimento ao comprimento da barra. Na deformação a frio os lingotes foram passados três vezes em cada martelo para favorecer ainda mais a cilindridade.

Após essas mudanças na rota de obtenção da liga conseguiu-se uma diferença de cilindridade menor que a anterior que passou de 0,20 mm a 0,12 mm com diâmetro total de 7,40 mm com barras de 195 mm de comprimento. Essas etapas são apresentadas na figura 9. Na tentativa de usinagem também foi relatado pela empresa que a liga estava “emplastrando” quando usinada. Segundo pesquisas de Amâncio et al., (2013), devido a elevada ductilidade do nióbio, ocorre o emplastramento do metal na ferramenta de corte obtendo uma superfície de baixa qualidade. Portanto, para melhorar a qualidade superficial na usinagem, houve necessidade de se encontrar os melhores ângulos de afiação

da ferramenta e até mesmo fabricar ferramentas de corte em aço rápido ao invés de usar ferramentas diamantadas.

Figura 9- Etapas de obtenção de implantes da liga Ti-35Nb-7Zr



Fonte: arquivo pessoal

A condição de obtenção e tratamento da liga foi escolhida com base em 10 anos de resultados anteriores obtidos pelo Grupo de Biomateriais da EEL-USP lideradas pela professora Sandra Giacomini Schneider que levam em conta os resultados do processamento termomecânico e das propriedades mecânicas obtidas por meio de ensaios mecânicos consideradas mais apropriadas para a investigação em questão segundo tabela 4 a seguir.

Tabela 4- Propriedades mecânicas da liga em diferentes processamentos térmicos

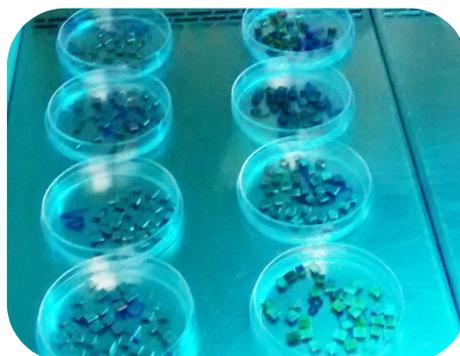
Propriedades Mecânicas	Recristalizada 1000°C/2h WQ	Forjada	Recristalizada 700°C/30min WQ
Limite de resistência (MPa)	430 ± 4	806 ± 11	493 ± 2
Limite de escoamento (MPa)	186 ± 5	806 ± 11	333 ± 8
Módulo de elasticidade (GPa)	54 ± 1	33 ± 1	60 ± 1
Redução em área (%)	75 ± 3	83 ± 4	55 ± 2
Alongamento (%)	40 ± 1	11 ± 1	21 ± 1

Fonte: adaptado de (MACEDO; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2014).

4.2 Obtenção das Amostras

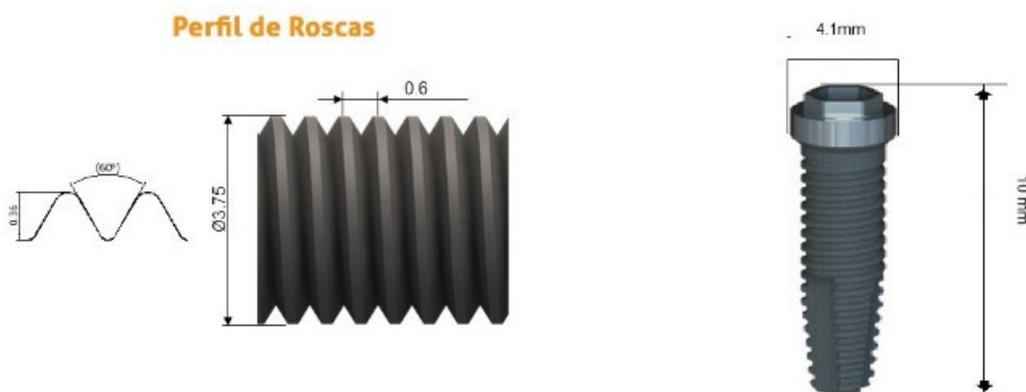
As amostras deste trabalho constituem-se de amostras de Ti-Cp e amostras da liga Ti-35Nb-7Zr cortadas em chapas de 4 mm de comprimento, 4 mm de largura e 1,5 mm de espessura para as análises *in vitro*, e de implantes odontológicos na forma de parafusos para testes *in vivo* (Figuras 10 e 11). Os implantes comerciais (Ti-Cp) e implantes da liga foram obtidos através de torno CNC de alta precisão em parceria com a empresa Titaniumfix. Estes implantes têm como parâmetros 3,75 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento.

Figura 10- Amostras de Ti-Cp e Ti-35Nb-7Zr cortadas em chapas para os ensaios *in vitro*



Fonte: arquivo pessoal

Figura 11- Parâmetros dos implantes usinados de Ti-Cp e de Ti-35Nb-7Zr para os ensaios *in vivo*



Fonte: Titaniumfix, 2017.

4.3 Medida do ângulo de contato

A medição do ângulo de contato foi feita no Departamento de Física e Química da UNESP (Guaratinguetá) com um goniômetro modelo 300 da marca Rame-hart (Figura 12). Em cada amostra foram colocadas três gotas de água na quantidade de 0,5 ou 0,75 μ L. Nove medições para cada uma delas, obteve-se os valores de ângulos de contato para cada gota e com isso, calculou-se o valor médio de ângulo de contato e o desvio padrão de cada amostra.

Figura 12 Goniômetro usado para medição do ângulo de contato



Fonte: arquivo pessoal

4.4 Teste da avaliação biológica *in vitro*

Todos os procedimentos de cultura celular, implantes e análises histológicas foram desenvolvidos e executados, pela pesquisadora, no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), no Biotério e no Laboratório de Osso, localizados no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, Unesp, Campus de São José dos Campos.

A análise biológica foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP protocolo nº 007/2016-CEUA-ICT-UNESP (ANEXO A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para isolamento e proliferação celular foram usadas células da medula de fêmures de ratos cultivadas por períodos de até 21 dias em meio essencial mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7 mL de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco, Invitrogen, USA), à temperatura de 37°C em atmosfera úmida de estufa contendo 5% de CO₂

(Sanyo). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia conforme figura 13.

Figura 13- Imagens do cultivo e proliferação celular



Fonte: arquivo pessoal

4.4.1 Teste de viabilidade celular por citotoxicidade (MTT)

Esse teste é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a conversão do sal 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, O MTT é um sal, que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis, produzindo um produto solúvel no meio de cultura, e então, efetua-se uma análise

espectrofotométrica do corante incorporado. A quantidade de MTT é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

As células foram cultivadas em placas com 24 poços e avaliadas após 7 dias de cultura. As alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS foram preparadas, em seguida foi feita a incubação 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. Após esse período, as culturas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução DMSO (Dimetilsulfóxido) em cada poço sob agitação por 10 minutos em mesa agitadora orbital (Solab), para a solubilização completa do precipitado formado. A seguir, três alíquotas de 100 µL de cada poço foram retiradas e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU) conforme figura 14. Os dados foram aferidos como absorbância e expressos em porcentagem sendo o Ti-Cp (controle) foi considerado 100%.

Figura 14- Etapas da avaliação da citotoxicidade



a) placas cultivadas



b) Sal MTT



c) Agitadora orbital



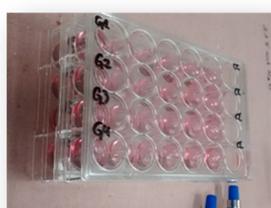
d) Leitor de Microplaca

Fonte: arquivo pessoal

4.4.2 Teste de quantificação de proteínas totais

O conteúdo de proteína total foi calculado após 7 e 10 dias de cultura, de acordo com o método de Lowry. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37°C, e preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para lise das células e exposição das proteínas. Após 30 minutos, 1 mL da solução de cada poço foi misturado com 1 mL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich) e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. A esta mistura foi acrescida 1mL de reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e deixado por 30 minutos à temperatura ambiente (Figura 15). A seguir, mediu-se a absorbância espectrofotometricamente a 680nm (espectrofotômetro Micronal AJX 1900) e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/ml.

Figura 15-Etapas da quantificação de Proteínas Totais



a) Cultura de células com amostras



b) Lise de células



c)Reagente de Lowry



d) Reagente de Folin



e) Espectrofotômetro

Fonte: arquivo pessoal

4.4.3 Teste de atividade da fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi feita utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica) e também de acordo com Oliveira et al. (2007)). Inicialmente, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 minutos a 37°C. À solução, foi adicionada alíquota de 50 µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em µmol de timolftaleína/hora/µg proteína.

4.5 Teste da avaliação biológica *in vivo*

Para este estudo foram utilizados sete coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 3,0 kg, com 5 meses de idade, os quais receberam um implante de cada tipo, em cada tíbia, divididos de acordo com o material de fabricação: implantes usinados de Ti-Cp da marca comercial Titaniumfix e implantes usinados da liga Ti-35Nb-7Zr. Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP onde a pesquisadora realizou um curso de Habilitação em Experimentação Animal. As cirurgias foram realizadas em sala cuidadosamente limpa, com álcool etílico na concentração de 70%; com instrumentos devidamente esterilizados. A cirurgiã e a auxiliar utilizaram aventais e materiais descartáveis e estéreis. Primeiramente, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular, com uma mistura de 13 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands), substância sedativa analgésica e relaxante muscular, com 33 mg/Kg de quetamina (Dopalen - Agibrands do Brasil Ltda.) como anestésico geral. Anestésico local composto por cloridrato de prilocaína

3% associado à felipressina 0,03 UI/ml (Citanest a 3% – Dentsply) também foi utilizado. Após antissepsia da região da tíbia e anestesia dos coelhos, a cirurgia para instalação dos implantes foi iniciada. Os locais cirúrgicos das tíbias foram submetidos à tricotomia. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente à face medial da tíbia. A cortical da tíbia foi exposta e foram realizadas as lojas cirúrgicas. A perfuração para instalação dos implantes foi realizada com a sequência de brocas padronizada pela empresa Titaniumfix, a 1200 rpm (rotações por minuto), para a utilização de implantes de diâmetro 3,75 mm por 10,0 mm de comprimento. Os dois implantes, de Ti e da liga, foram instalados manualmente, com a ajuda de montadores cirúrgicos, nas tíbias direita e esquerda de cada animal até atingir estabilidade primária, onde há uma adaptação mecânica inicial entre o osso e o implante, e foram adaptados os parafusos de cobertura. Durante todo este procedimento foi mantida irrigação abundante com cloreto de sódio a 0,9%, evitando o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso, que pode causar necrose do tecido (Figura 16).

Após o procedimento cirúrgico de colocação dos implantes, o tecido muscular foi suturado com fio absorvível nº4 (Monoglyde Poliglecarpone 25), a pele foi suturada com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson) e novamente foi realizada antissepsia com álcool. Os animais receberam terapia antibiótica com benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI (Pentabiótico – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 1,35 ml/kg, no pós-operatório imediato. Após a cirurgia, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, e monitorados até o prazo da eutanásia de 6 semanas. As etapas desses procedimentos estão resumidas na figura 17.

Figura 16- Procedimento cirúrgico para a inserção dos implantes, da liga Ti-35Nb-7Zr e Ti-Cp, em tíbias de coelhos da raça Nova Zelândia.



Etapa pré-operatória: sedação e analgesia dos animais

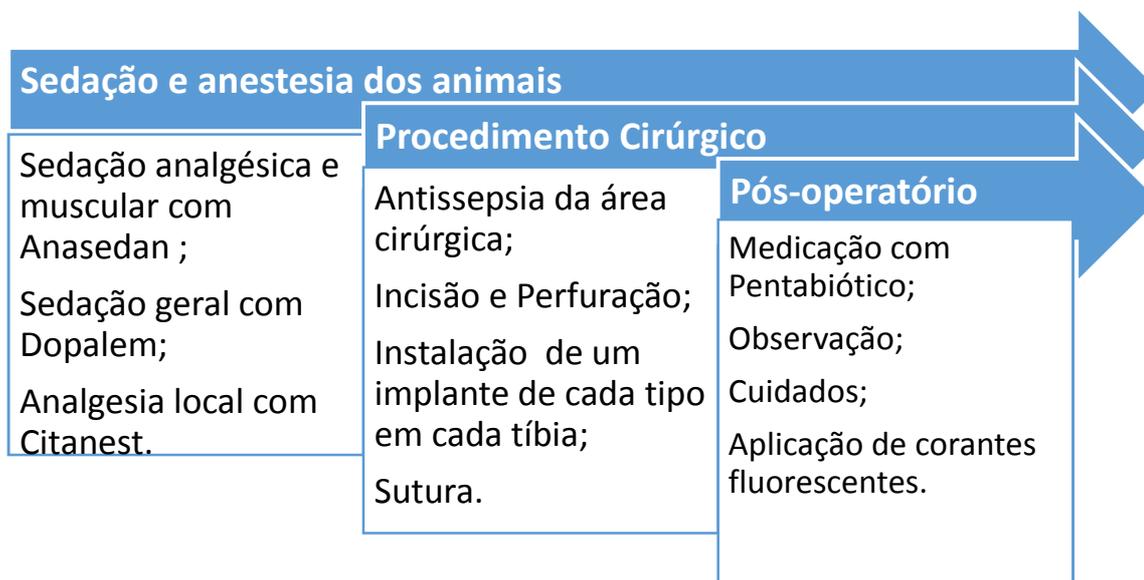


Perfuração da tíbia de acordo com o diâmetro dos implantes



Implantes da liga e de Ti posicionados

Fonte: arquivo pessoal

Figura 17- Etapas do procedimento cirúrgico

Fonte: arquivo pessoal

4.5.1 Aplicação de Marcadores Fluorescentes

No decorrer da pesquisa foram administrados, subcutaneamente, marcadores ósseos de união à apatita, com a finalidade de verificar o processo de neoformação óssea. Utilizou-se sequência de dois marcadores com cores diferentes, tetraciclina (Cloridrato de oxitetraciclina 50 ml – Terramicina) e alizarina (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.), ilustrados na figura 18.

Inicialmente, o marcador em pó de alizarina foi pesado em balança de precisão (BEL Engin Mark, modelo 210 A) na quantidade de 30 mg. Em seguida foram diluídos em 100 ml da solução-tampão, constituída de 100 ml de água destilada e 2 g de Na₂HPO₄ para posteriormente serem administrados nos animais. A tetraciclina foi aplicada na quantidade de 1,5 ml/Kg do animal. As aplicações foram realizadas nos períodos de 7 e 14 dias para tetraciclina, 21 e 28 dias para alizarina.

A utilização destes marcadores foi realizada para avaliar a taxa de aposição óssea, por meio da mensuração da distância entre as diferentes marcações no tecido ósseo. Esta distância foi dividida pelo intervalo de tempo entre os períodos de administração do marcador ósseo, para obter a taxa de aposição mineral.

Figura 18- Marcadores Fluorescentes Tetraciclina e Alizarina:



Fonte: imagem da internet, domínio público.

4.5.2 Ensaio do torque de remoção

Uma vez eutanasiados os animais, 14 implantes de 7 tíbias foram cirurgicamente expostos através de incisão com bisturi com lâmina 15. Os tecidos que recobrem as tampas de cicatrização foram removidos cuidadosamente. A seguir, os montadores dos implantes foram colocados com seus respectivos parafusos. O implante foi mantido numa posição perpendicular ao solo. O torquímetro foi mantido no longo eixo do implante. O seu módulo de leitura foi mantido no modo de leitura em pico, ou seja, o aparelho apesar de mostrar em seu visor o aumento da força de torque de remoção, registrou ao final apenas o valor máximo alcançado (Figura 19). O valor registrado em N.cm correspondeu ao momento em que a união implante/osso foi rompida.

Figura 19- Análise de remoção ao torque com torquímetro digital



Fonte: arquivo pessoal

4.5.3 Preparo Histológico

As outras 7 tíbias foram submetidas ao processamento histológico utilizando a técnica do metilmetacrilato e corte em Labcut (Extec). Após a fixação em formol a 10% por 48 horas, os fragmentos ósseos contendo os implantes foram lavados abundantemente, submetidos a concentrações crescentes de álcool (60%, 70%, 80%, 90% e 100%) para desidratação e imersos em xilol para diafanização. A seguir, cada implante foi embebido em solução resinosa, gradativamente, utilizando como reagentes o metilmetacrilato associado com dibutilfitalato na proporção de 85% e 15%, respectivamente, associado posteriormente a 1 g de peróxido de benzoila.

O bloco de resina contendo a peça histológica foi posicionado no aparelho de corte Labcut 1010 (EXTEC) e submetido ao disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro para secção dos implantes. A seguir, os cortes obtidos de cada implante foram limpos, polidos em politriz Labpol 8-12 (EXTEC) com lixa

d'água de granulação 1500 e colados com éster de cianocrilato (Super Bonder) sobre uma lâmina de acetato. A colagem foi realizada em um dispositivo para prensagem das lâminas, visando obter um maior paralelismo entre a lâmina e a superfície a ser desgastada, conseguindo-se, dessa maneira, uma fina e uniforme camada da cola. Com a utilização de um suporte para a placa de acetato, o corte foi desgastado em politriz Labpol 8-12 (EXTEC), usando sequência crescente de lixas d'água (400, 600, 800, 1200, 2500 e 4000). No decorrer do desgaste, as lâminas foram observadas em microscópio para a verificação de uma mínima espessura com o máximo de detalhes. As etapas desse processo estão detalhadas na figura 20.

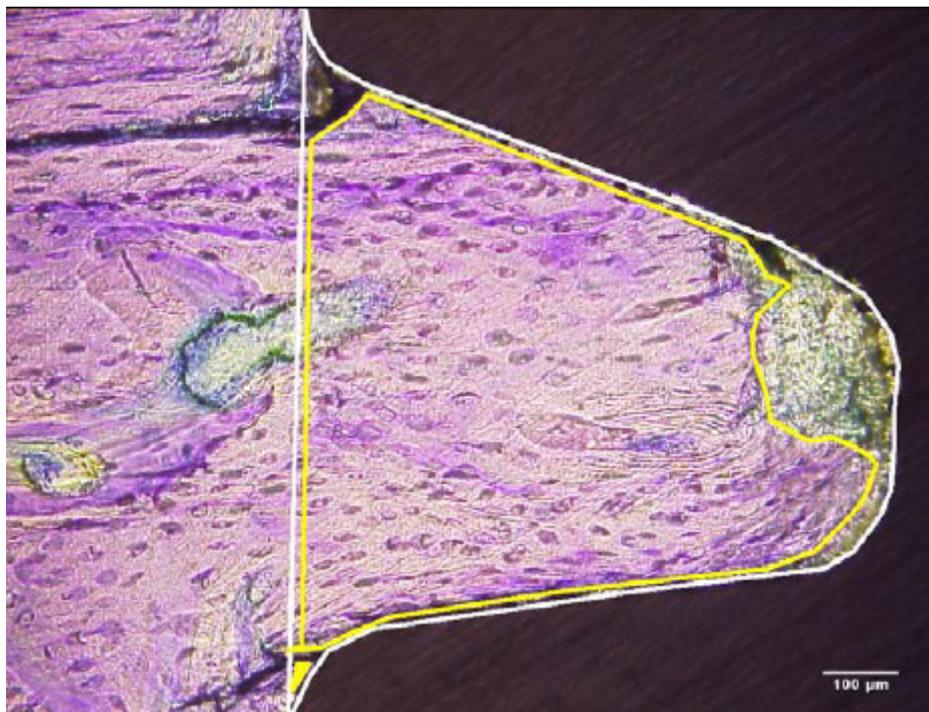
Figura 20- Etapas do preparo histológico



4.5.4 Análise histológica e histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, secções de cada implante foram avaliadas quanto à fração de área óssea ocupada entre as roscas (BAFO). Dois campos por secção foram digitalizados, representando a interface mesial e distal do implante. As imagens foram obtidas a partir de um microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 20x, sob um foco fixo, acoplado com uma câmera Axiocam MRC 5 (Zeiss) que permite a visualização das imagens digitalizadas diretamente no computador. As imagens, foram analisadas apenas pela pesquisadora para ambos os grupos. Primeiramente foi calculada a área total do flanco de uma rosca do implante e depois calculada a porcentagem de área ocupada pelo tecido ósseo neoformado nesta mesma rosca, conforme figura 21. As áreas foram calculadas utilizando o software Image J (versão Java 1.6.0_20/ 64-bit), os dados avaliados e a taxa de neoformação óssea calculadas em %.

Figura 21 Imagem da lâmina histológica. Contorno branco: área total do flanco da rosca do implante; contorno amarelo: área óssea neoformada ocupada.



Fonte:(SERRA, 2007).

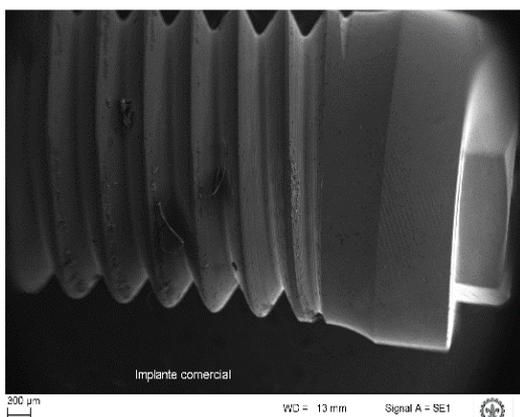
Para revelar as células dos tecidos na interface com o implante, as lâminas foram coradas com azul de toluidina e as análises histológicas foram realizadas por microscopia óptica para observação do tecido ósseo, tecido osteóide e também núcleos de células como osteoblastos, osteoclastos, células da medula, permitindo a observação da remodelação óssea que ocorre no processo de osteointegração dos implantes e a identificação das células.

5 RESULTADOS e DISCUSSÕES

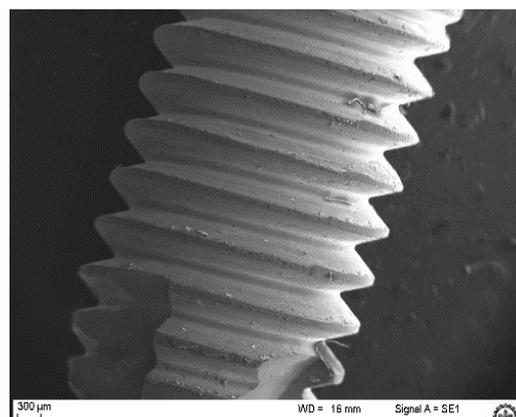
5.1 Obtenção dos Implantes da Liga de Ti-35Nb-7Zr

As barras da liga confeccionadas foram encaminhadas a Empresa Titaniumfix que conseguiu usinar a liga na forma de parafusos de acordo com os parâmetros e dimensões de seus implantes comerciais de Ti-Cp, apesar das dificuldades de usinagem preliminares, como ilustrados nas imagens de MEV na figura 22. Observa-se, a regularidade dos passos e formato das roscas tanto nos parafusos da liga quanto no Ti-Cp.

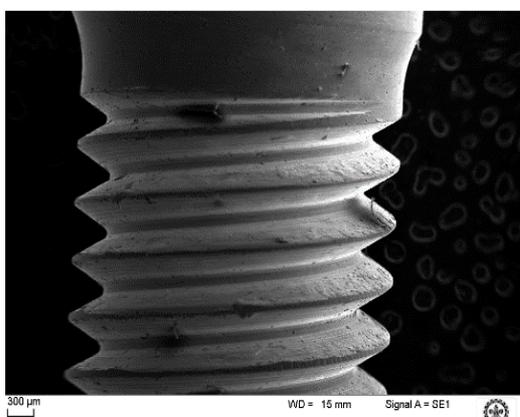
Figura 22- Implantes usinados de Ti-Cp (implantes Titaniumfix e Implantes usinados de Ti-35Nb-7Zr (implantes da liga)



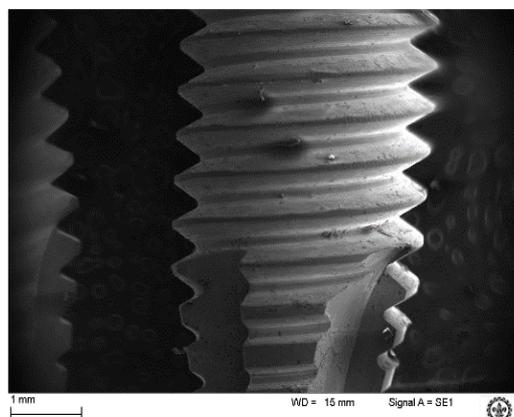
Implante Titaniumfix



Implante Titaniumfix



Implante da Liga



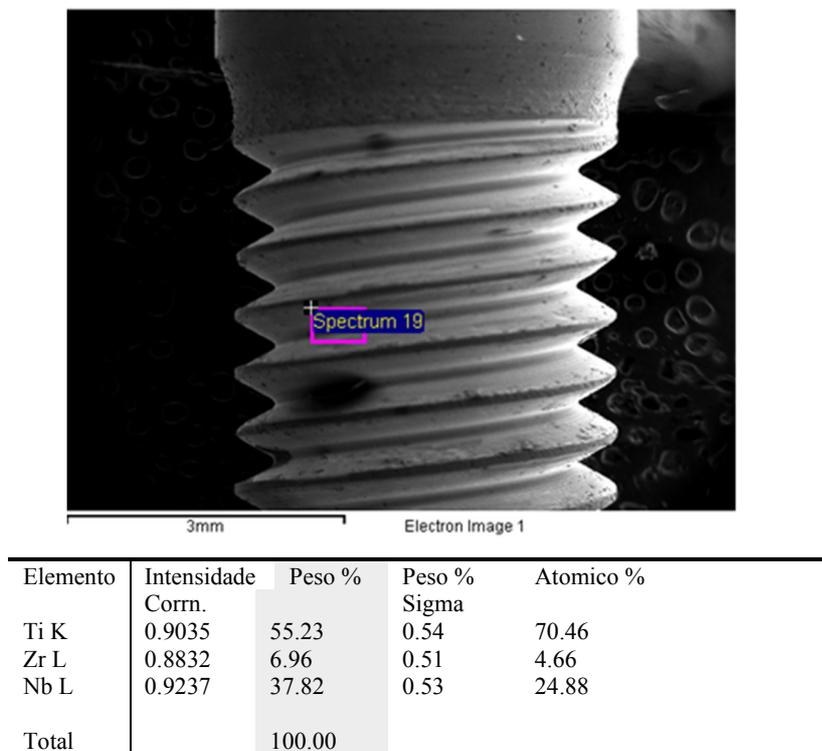
Implante da liga

Fonte: arquivo pessoal.

5.2 Análise da Liga por EDS

A análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), feita no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena-USP, foi realizada, em área e pontos aleatórios, em todos os implantes da liga. Os resultados quanto aos constituintes e quantificação não apresentaram variações entre eles. A figura 23, apresenta, de maneira representativa esses resultados, garantindo tratar-se da composição nominal pretendida.

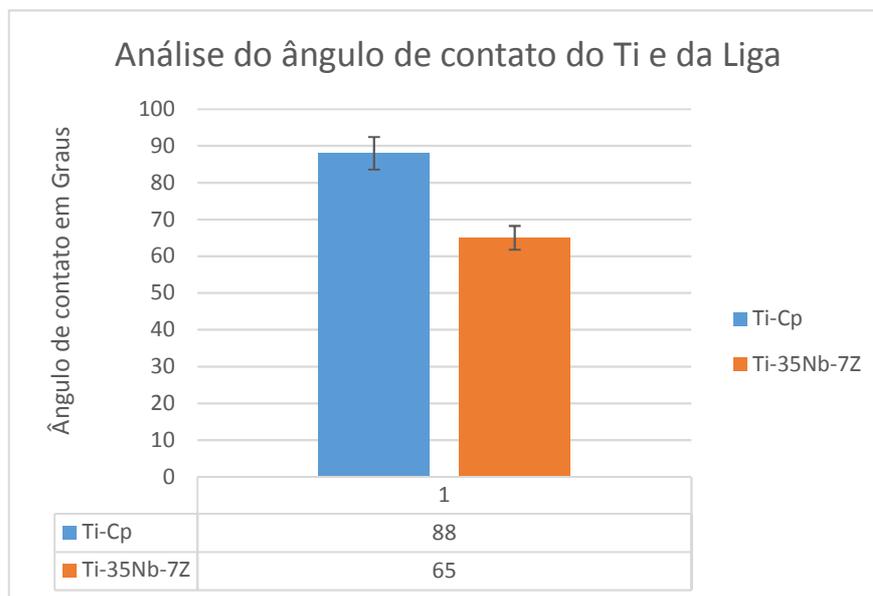
Figura 23- Resultado da microanálise obtida por meio de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do implante da liga.



Fonte: arquivo pessoal

5.3 Resultados de molhabilidade.

Os resultados de molhabilidade apresentados a seguir (Figura 24) foram obtidos a partir da média aritmética das medidas de ângulo de contato nas superfícies planas da liga e do Ti-Cp.

Figura 24- Medidas do ângulo de contato

Fonte: arquivo próprio

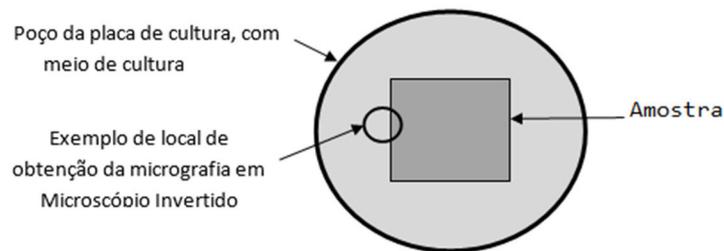
A molhabilidade é a habilidade de um líquido em manter contato com uma superfície sólida, resultante de suas interações intermoleculares. O grau de molhabilidade é determinado por um equilíbrio entre as forças de aderência e coesivas. É largamente dependente da energia de superfície e influencia o grau de contato entre o implante e o ambiente fisiológico; quanto maior a molhabilidade, maior é a interação da superfície do implante com o ambiente biológico.

Apesar dos vários fatores que interferem na molhabilidade, na medição do ângulo de contato observa-se que a liga Ti-35Nb-7Zr teve maior hidrofiliabilidade em relação ao Ti-Cp, o que sugere que a adesão celular na superfície dos implantes da liga tende a ser maior, facilitando assim a diferenciação e proliferação celular e conseqüentemente favorecendo a osteointegração. No entanto, vale ressaltar que muito pouco se sabe a respeito das inúmeras características da molhabilidade dos materiais que promovem a interação entre o tecido e o implante (COUTINHO, 2007).

5.4 Resultado da proliferação e interação celular nas superfícies dos materiais.

Os resultados da proliferação celular foram obtidos por meio de microscópio óptico (MO) na região da interface material/meio de cultura conforme esquematizado na figura 25 e também por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas superfícies das amostras.

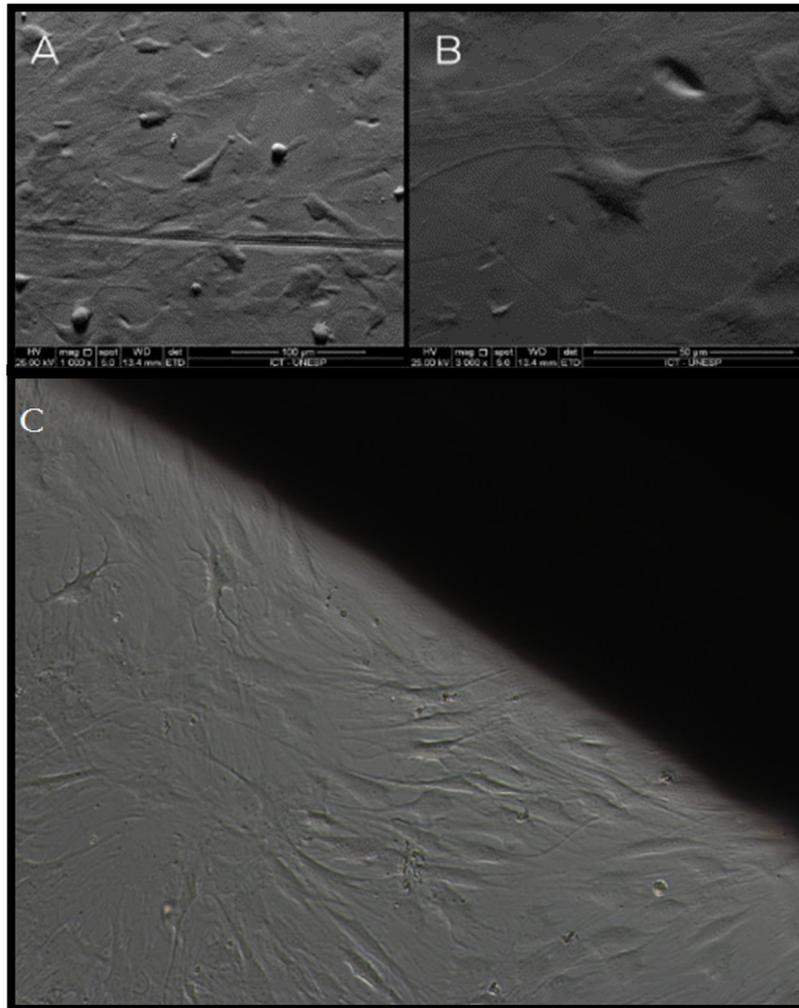
Figura 25-Esquema da micrografia na interface amostra/meio de cultura



Fonte: arquivo pessoal

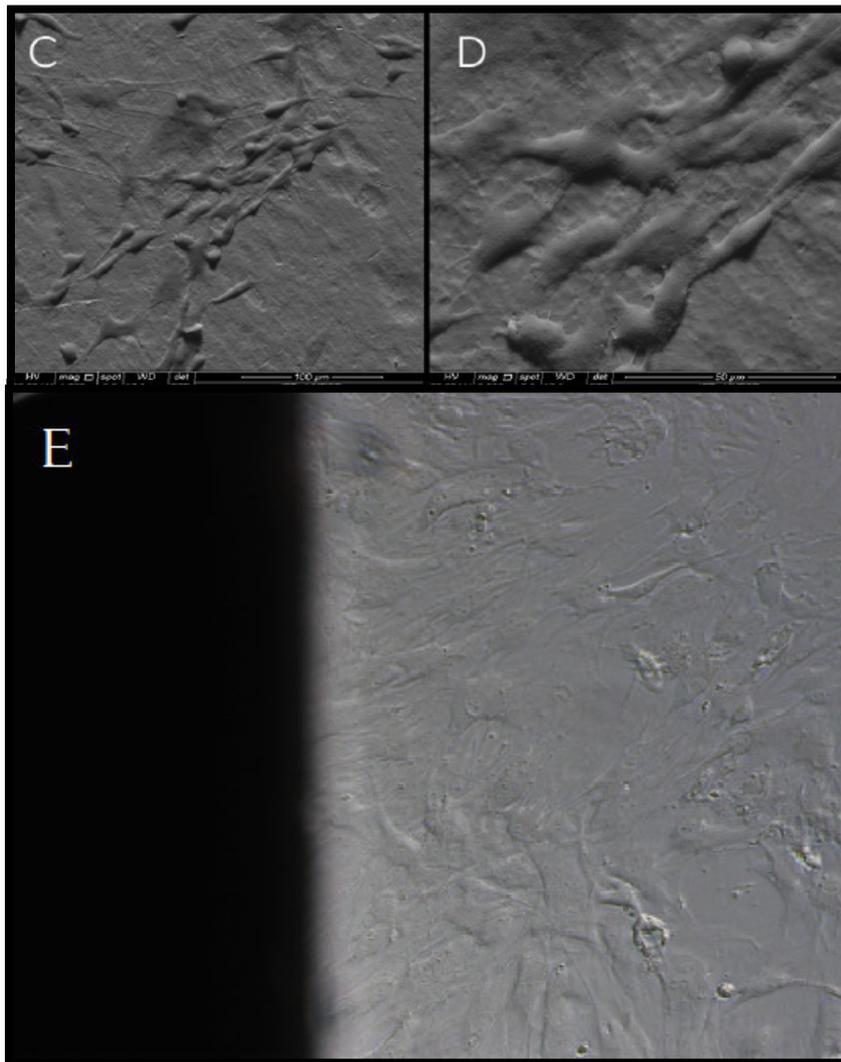
Após 7 dias em meio de cultura as células osteoblásticas em contato com as amostras, demonstraram espreado celular, ou seja, adesão, proliferação e interação celular nas superfícies vistas por MO e MEV, tanto no Ti-Cp quanto na liga Ti-35Nb-7Zr (figuras 26 e 27). Apesar da morfologia das células se apresentarem de forma distintas para o Ti e a liga, é possível verificar a ocorrência de interação e proliferação celular na superfície das duas amostras.

Figura 26- Espreadimento celular observado nas micrografias A (1000x) e B (3000x) da superfície do Ti-Cp, obtidas por MEV e micrografia C (200x) obtida por meio de MO da interface Ti-Cp e meio de cultura celular.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 27- Espreadimento celular observado nas micrografias, C (1000x) e D (3000x) obtida por MEV, da superfície da liga Ti-35Nb-7Zr e micrografia E (200x), obtidas por MO da interface da liga e meio de cultura celular

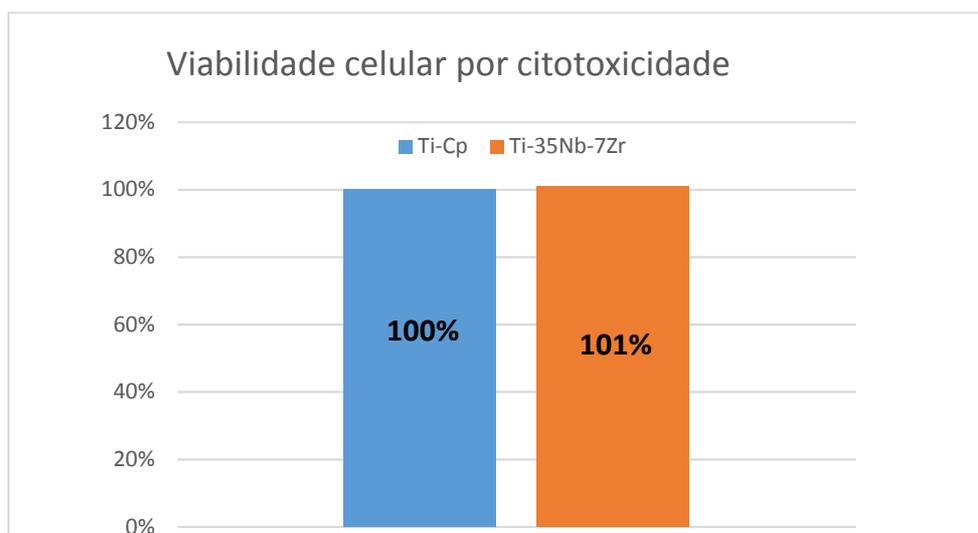


Fonte: arquivo pessoal

5.5 Resultado da Viabilidade Celular

Os dados foram plotados em gráfico (Figura 28) evidenciam os resultados de viabilidade celular, onde observar-se que o Ti-Cp e a liga Ti-35Nb-7Zr tiveram o mesmo comportamento na viabilidade celular, sem diferença estatística entre eles ($p>0,05$). Esse resultado já era esperado já que houve adesão e proliferação celular nas superfícies analisadas no teste de proliferação celular onde as amostras não apresentaram nenhuma citotoxicidade. Pelo contrário, os resultados de MEV apresentaram ilustrações de divisão celular, mantendo perfeitamente a morfologia, indicando assim boa interação entre as células e os materiais, corroborando para considerar que a liga não é citotóxica, não desenvolvendo reações imunológicas adversas no tecido adjacente e, portanto, apresenta boa biocompatibilidade *in vitro*, de acordo com os resultados visto na literatura (DONATO et al., 2009; LI et al., 2012; ANDRADE et al., 2015.).

Figura 28- Gráfico da Viabilidade Celular do TiCp e da ligaTi-35Nb-7Zr, após 7 dias em meio de cultura.



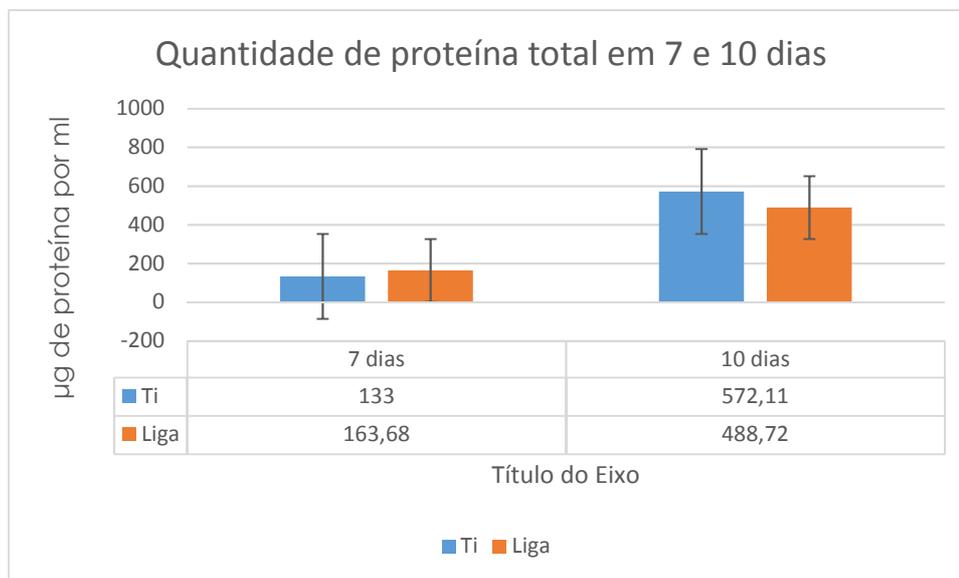
Fonte: arquivo pessoal

5.6 Quantificação de Proteína Total

A quantidade de proteína total foi calculada em período de 7 e 10 dias (Figura 29). A quantidade de proteína total é importante pois são as proteínas adsorvidas que são responsáveis pela diferenciação das células osteoblásticas e proliferação dessas células levando a formação da matriz óssea. (MAEDA, 2013).

Neste estudo não houve diferença entre as quantidades de proteínas entre o Ti e da Liga ($p > 0,05$), mostrando aumento progressivo semelhante nos períodos de 7 e 10 dias. Porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores de proteínas entre os períodos de 7 e 10 dias, que em três dias tiveram um aumento significativo (Tabela 7).

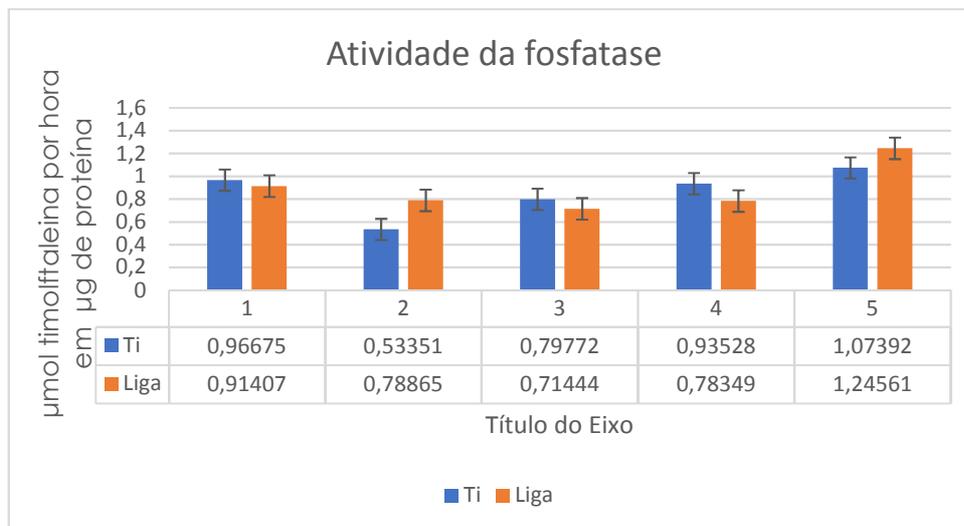
Figura 29- Quantificação de proteína total



Fonte: arquivo pessoal

5.7 Análise da atividade da fosfatase alcalina

Os resultados obtidos no teste das cinco amostras (Ti-Cp e liga) para medida da atividade da fosfatase são apresentados na figura 30.

Figura 30- Atividade da Fosfatase alcalina

Fonte: arquivo pessoal

A interpretação desse resultado demonstrou não haver diferença estatística significativa entre as amostras ($p > 0,05$). Isto é, a liga apresenta uma atividade da fosfatase alcalina equivalente à do Ti-Cp demonstrando que a liga apresenta um comportamento favorável à mineração óssea já que a fosfatase é uma proteína que marca bioquimicamente a formação óssea, isto é, reflete a atividade dos osteoblastos.

5.8 Resultado de pós-operatório e toxicidade sistêmica.

As cirurgias foram realizadas conforme metodologia descrita, ocorrendo um pós-operatório com cicatrização ideal, sem edema ou inflamação na ferida cirúrgica.

Durante o período do experimento, os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, em temperatura constante de 21°C. Os animais não apresentaram nenhum trauma físico, aumentando o peso em 1 a 1,500 kg, até o final do experimento, denotando manutenção de boa saúde sistêmica. Após o período estabelecido de 42 dias, foi realizada a eutanásia dos animais e a

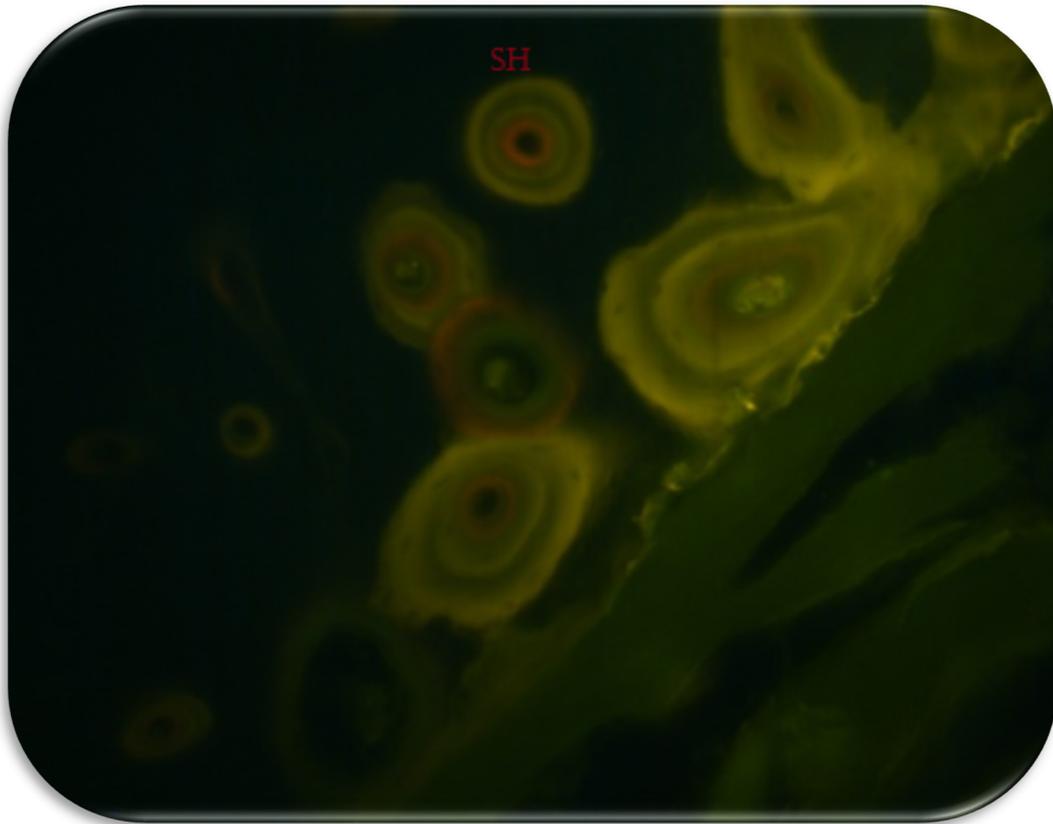
obtenção dos blocos das tíbias. Durante a coleta do material, os implantes apresentaram boa estabilidade, com ausência de mobilidade, e boa fixação ao tecido ósseo, sem sinal de inflamação ou infecção, exceto o primeiro implante da liga que foi perdido, pois não estava na loja cirúrgica quando da exposição dos implantes das tíbias. Provavelmente, foi por ser o primeiro a ser implantado, demonstrando as dificuldades e diferenças dos procedimentos clínicos entre a tibia do coelho e o osso maxilar dos humanos.

5.9 Microscopia de Fluorescência

As lâminas obtidas foram observadas em microscópio de fluorescência para analisar os tempos de formação óssea, de acordo com deposição dos marcadores alizarina e tetraciclina, e quantificar o tecido neoformado.

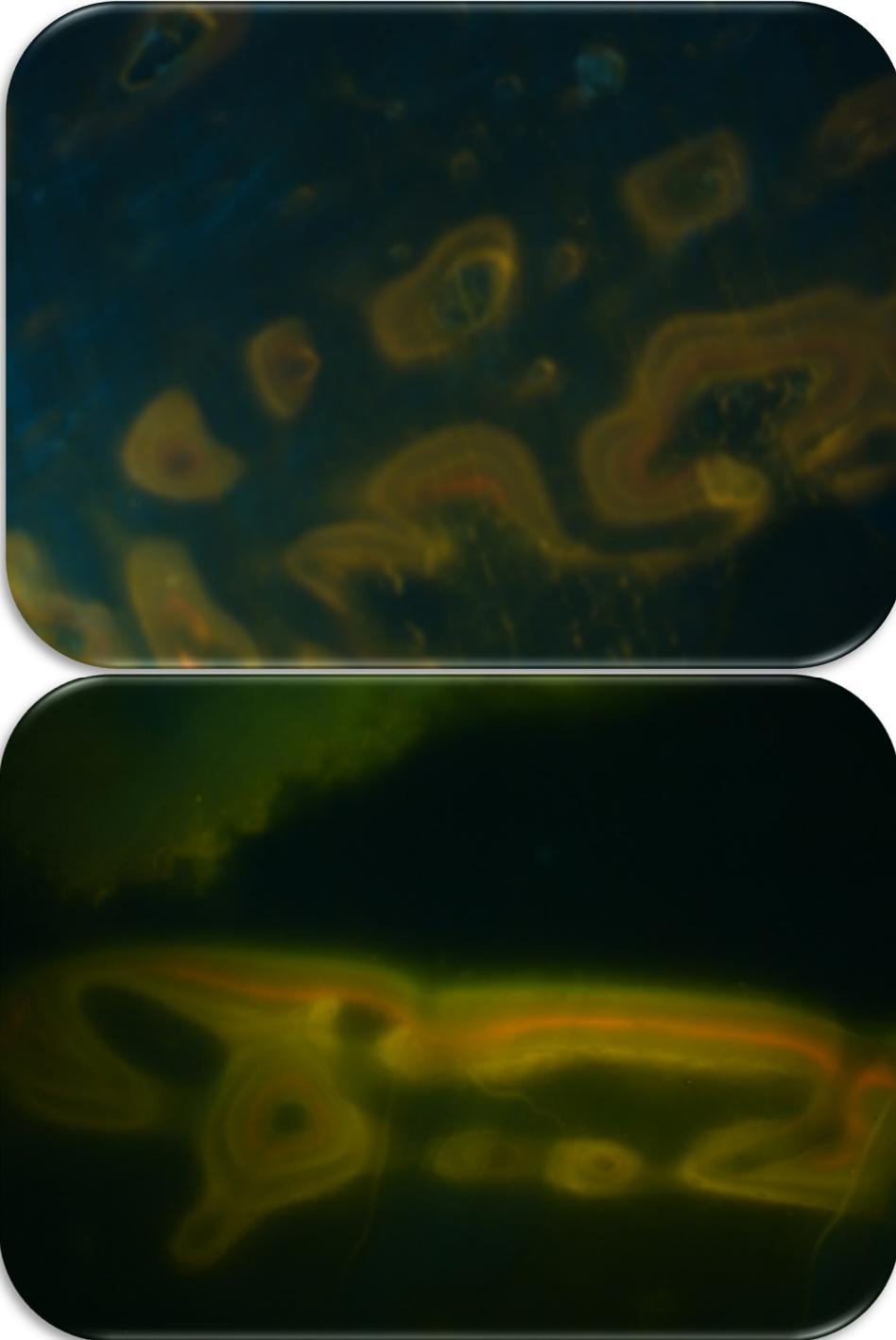
Foram detectados rótulos fluorescentes para todas as amostras como visto nas figuras 31,32, 33 e 34, sendo a tetraciclina (rótulos de cor castanha) e alizarina (rótulos de cor vermelha). A evidência da rotulação óssea mostra que a atividade osteoblástica contínua estava presente em regiões próximas à superfície do implante, demonstrando a formação e remodelação óssea ao longo das 4 semanas em que os marcadores foram aplicados. Segundo Bottino et al., (2008 e 2009), a observação de níveis de atividade óssea sustentados próximos do implante ao longo de várias semanas apoia a alta cinética de modelagem / remodelação que são responsáveis por levar à fixação biomecânica do implante devido ao processo de maturação óssea.

Figura 31- Fotomicrografia de Fluorescência (200X) mostrando a marcação dos fluorocorantes (linhas castanhas: tetraciclina e linhas avermelhas: alizarina) nos implantes da liga Ti-35Nb-7Zr. Nota-se a presença do Sistema de Havers (SH) onde a calcificação ocorre em lamelas concêntricas e calcificações intermitentes.



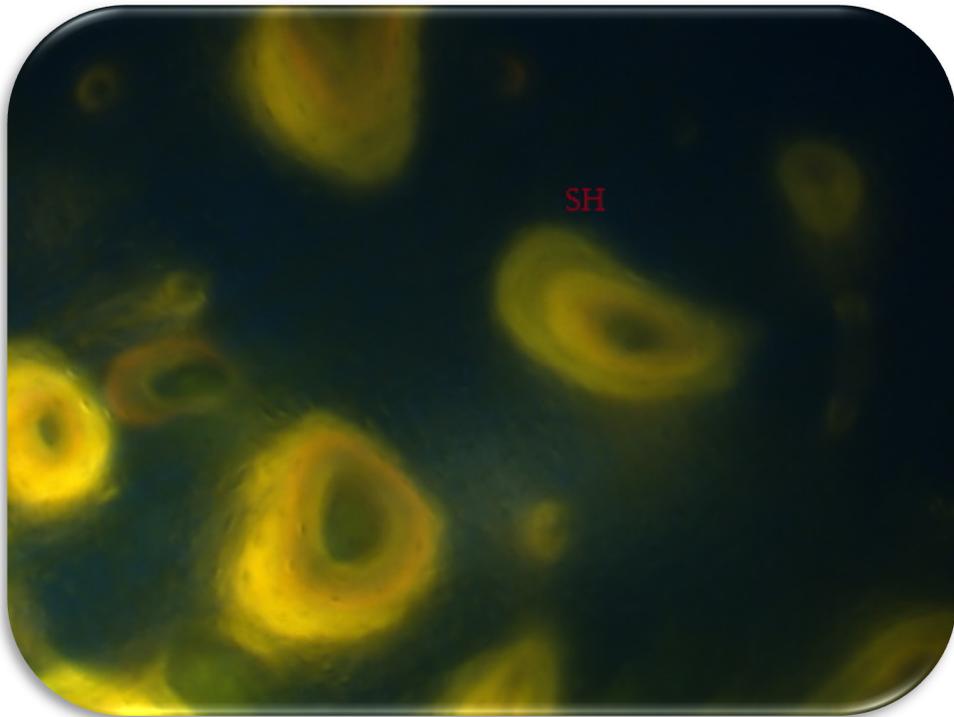
Fonte: arquivo pessoal

Figura 32- Fotomicrografias de Fluorescência (200X) mostrando a marcação dos fluorocorantes (linhas castanhas: tetraciclina e linhas avermelhas: alizarina) nos implantes da liga Ti-35Nb-7Zr.



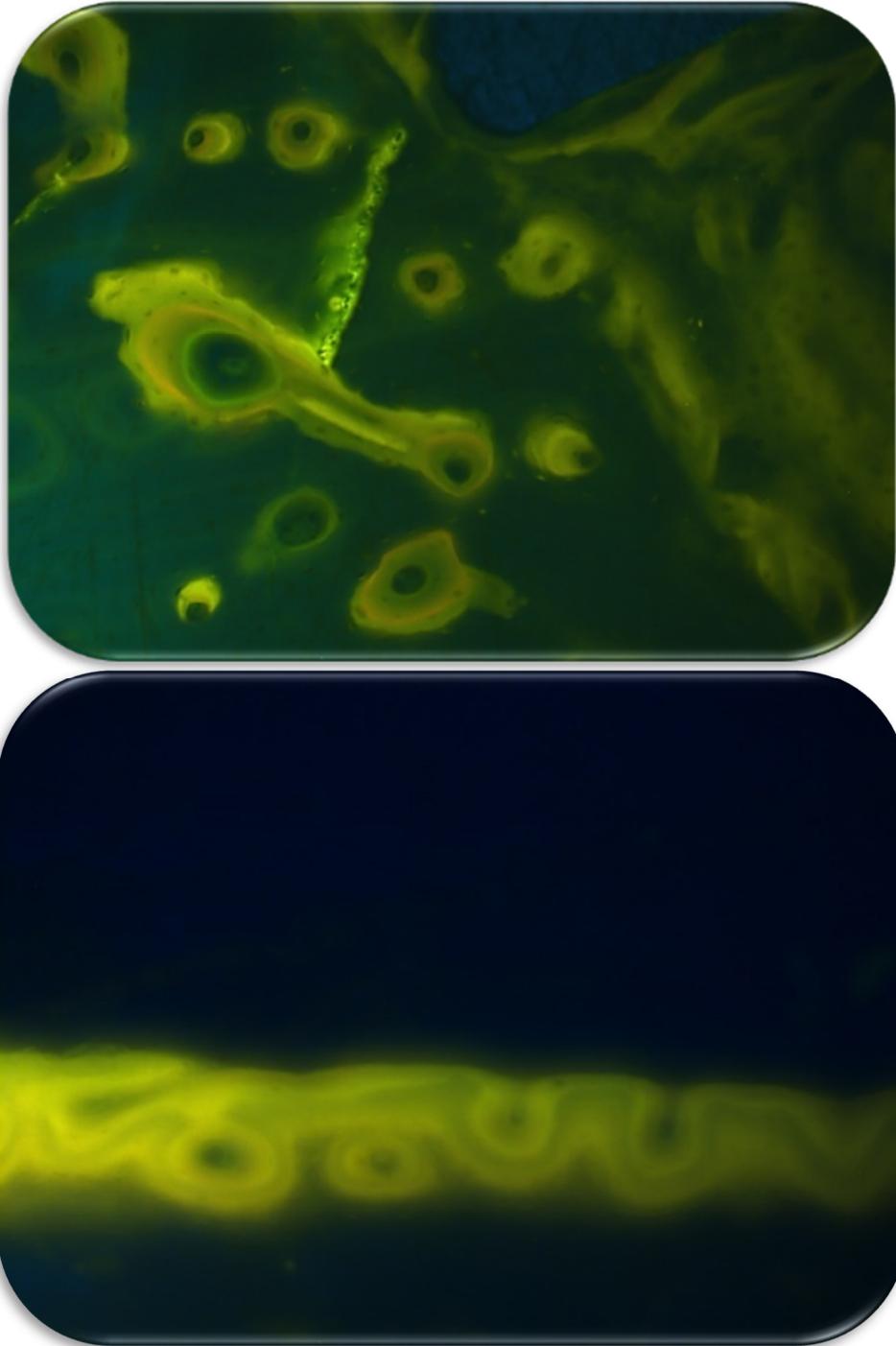
Fonte: arquivo pessoal

Figura 33- Fotomicrografia de fluorescência com aumento de 200X, mostrando a marcação dos fluorcorantes (castanha: tetraciclina; vermelha: alizarina) nos implantes de Ti-Cp Titaniumfix onde SH: Sistemas de Havers com lamelas concêntricas



Fonte: arquivo pessoal

Figura 34- Fotomicrografias de fluorescência com aumento de 200X, mostrando a marcação dos fluorcorantes (castanha: tetraciclina; vermelha: alizarina) nos implantes de Ti-Cp Titaniumfix



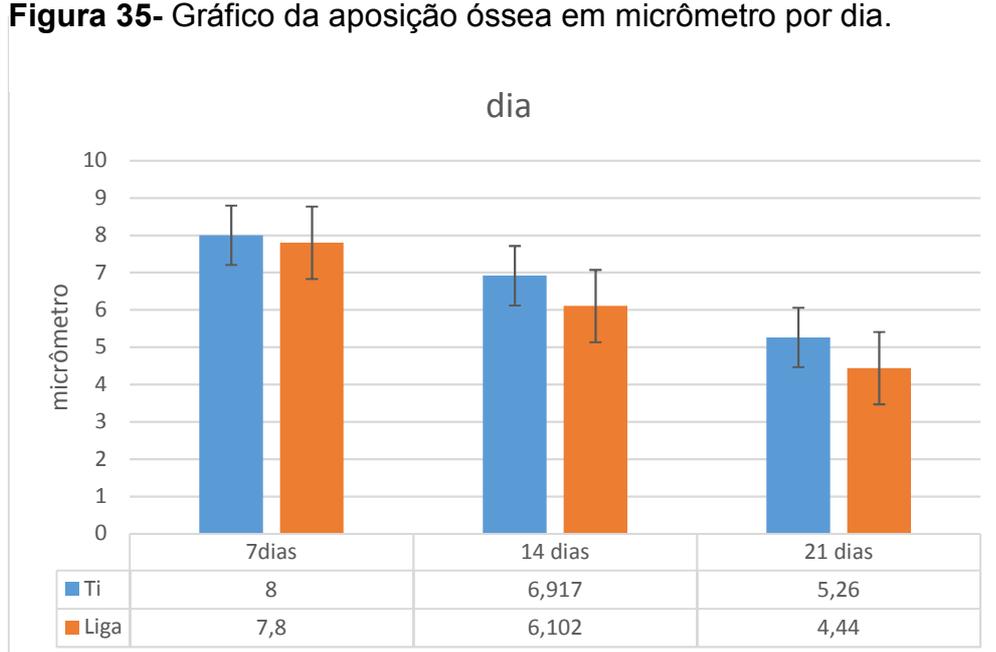
Fonte: arquivo pessoal

A técnica para avaliar a aposição óssea consistiu em identificar as linhas ou rótulos de coloração nas lâminas histológicas e medir a distância entre elas. A relação entre o intervalo de administração dos marcadores fluorescentes e a distância quantificada na lâmina possibilitou o cálculo da taxa de formação óssea em unidade de distância (μm) por unidade de tempo (dia).

Observando a aposição óssea calculada neste trabalho (Figura 35), nota-se que a neoformação foi maior nos primeiros 7 dias onde a osteogênese é mais ativa e onde observa-se uma aposição óssea maior que nos outros períodos.

Essa aposição foi decrescendo nos períodos de 14 e 21 dias quando a cinética de remodelação é menor, no entanto, não houve diferença na aposição óssea dos implantes estudados (Ti-Cp e liga) ($p > 0,05$).

Figura 35- Gráfico da aposição óssea em micrômetro por dia.

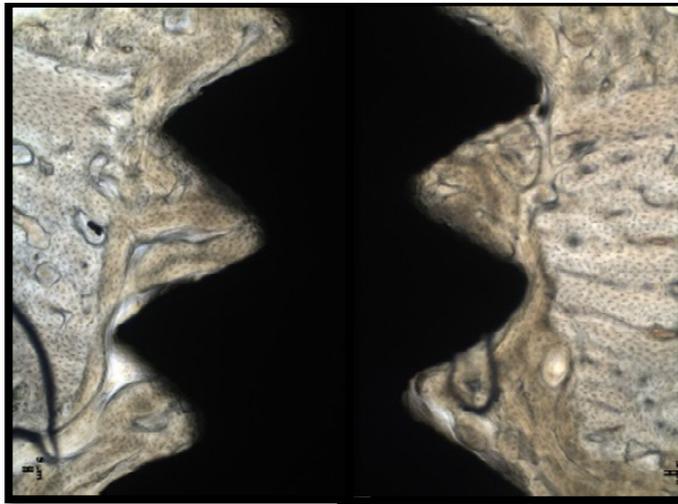


Fonte: arquivo pessoal

5.10 Análise Histológica e Histomorfométrica.

Para avaliar histomorfometricamente a osteointegração dos implantes estudados nesse trabalho, as lâminas obtidas no preparo histológico, foram analisadas segundo a fração de área óssea ocupada (BAFO), expresso em porcentagem de osso ocupado nos flancos mesial e distal de cada rosca, conforme exemplificado na figura 36. Posteriormente, foram calculadas as porcentagens para cada implante, (Tabela 5).

Figura 36- Lâminas histológicas mostrando a mesial e distal de um mesmo implante sendo que a área escura corresponde ao implante e a área clara ao tecido ósseo.



Fonte: arquivo pessoal

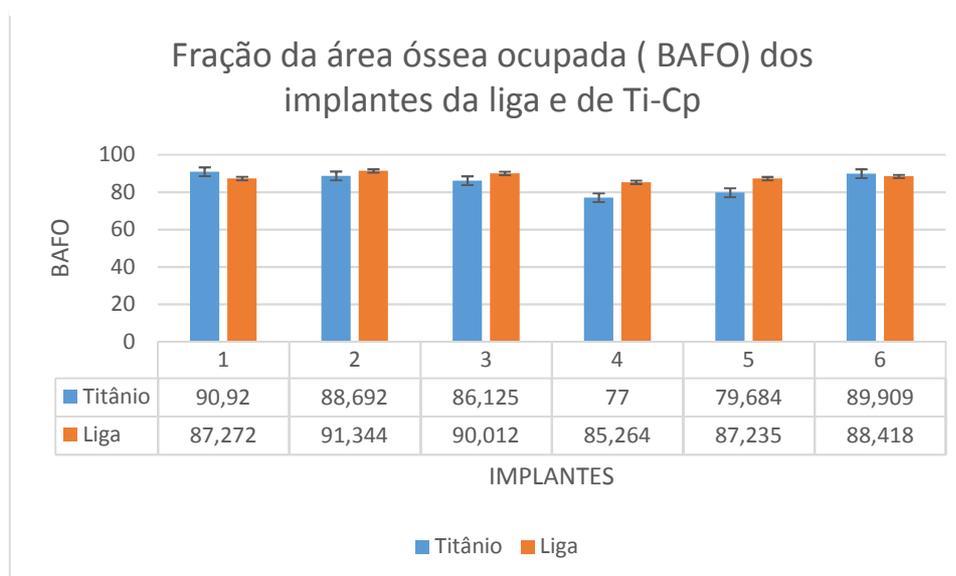
Tabela 5- Frações das áreas ósseas ocupadas (BAFO). Onde ATF: área total do flanco; AON: área óssea neoformada. Exemplo de cálculo no implante 2 da liga.

IMPLANTE 2 LIGA			ATF	AON	BAFO	Media
Lamina	A	M	11,178	8,857	79,236	86,51778
		D	11,793	11,017	93,41983	
Lamina	B	M	10,325	9,383	90,87651	83,84021
		D	11,278	8,729	77,39847	
Lamina	C	M	10,432	8,697	83,36848	85,00738
		D	9,211	8,001	86,86353	
Lamina	D	M	12,032	11,509	95,65326	92,93417
		D	11,985	10,811	90,20442	
Media p implante			88,234	77,004		87,27248

Fonte: arquivo pessoal

Na análise histomorfométrica, os dois implantes (Ti e liga) apresentaram fração de área óssea ocupada (BAFO) bem similares (Figura 37) de acordo com estudos encontrados na literatura para os sistemas Ti-Nb-Zr e Ti-Nb-Zr-Ta (MARIN et al., 2010; SILVA, 2014), não havendo diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$).

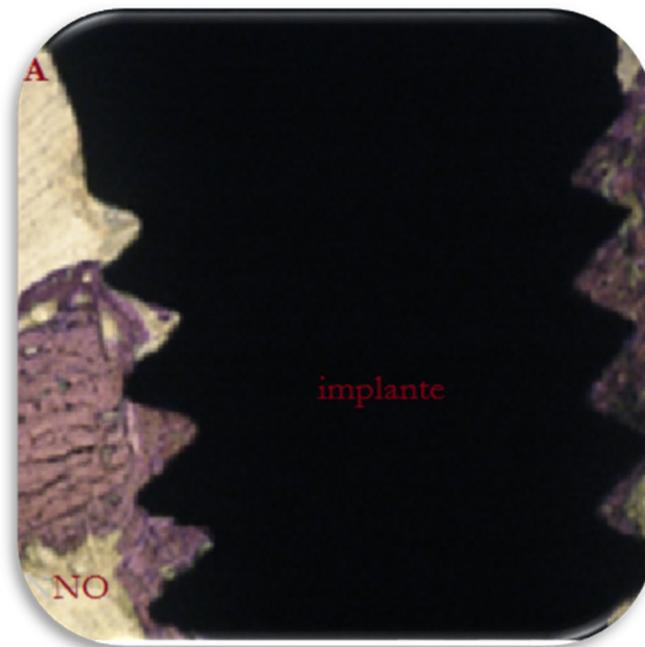
Figura 37- BAFO dos implantes de Ti e Implantes da Liga



Fonte: arquivo pessoal

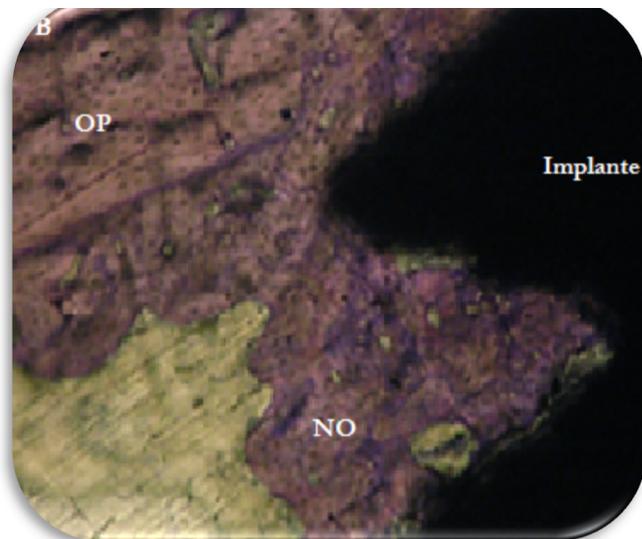
Na análise histológica identificamos neoformação óssea nos dois tipos de implante, conforme figuras 38 a 45. Osso compacto é observado com numerosos sistemas de Havers, formados por lamelas ósseas concêntricas dispostas em torno de um canal central. As lamelas com lacunas de osteócitos, também dispostas em anéis concêntricos, que se intercomunicavam por canalículos. Nos dois implantes, na região inferior e superior da cortical óssea, foram observados sinais de neoformação óssea, sugerindo osteointegração em períodos mais longos. Observamos ainda a delimitação da área de tecido ósseo neoformado e a cortical óssea preexistente.

Figura 38- Análise histológica (25x) da liga Ti-35Nb-7Zr. Imagem **A** observamos o implante com neoformação óssea (**NO**) abaixo da cortical preexistente.



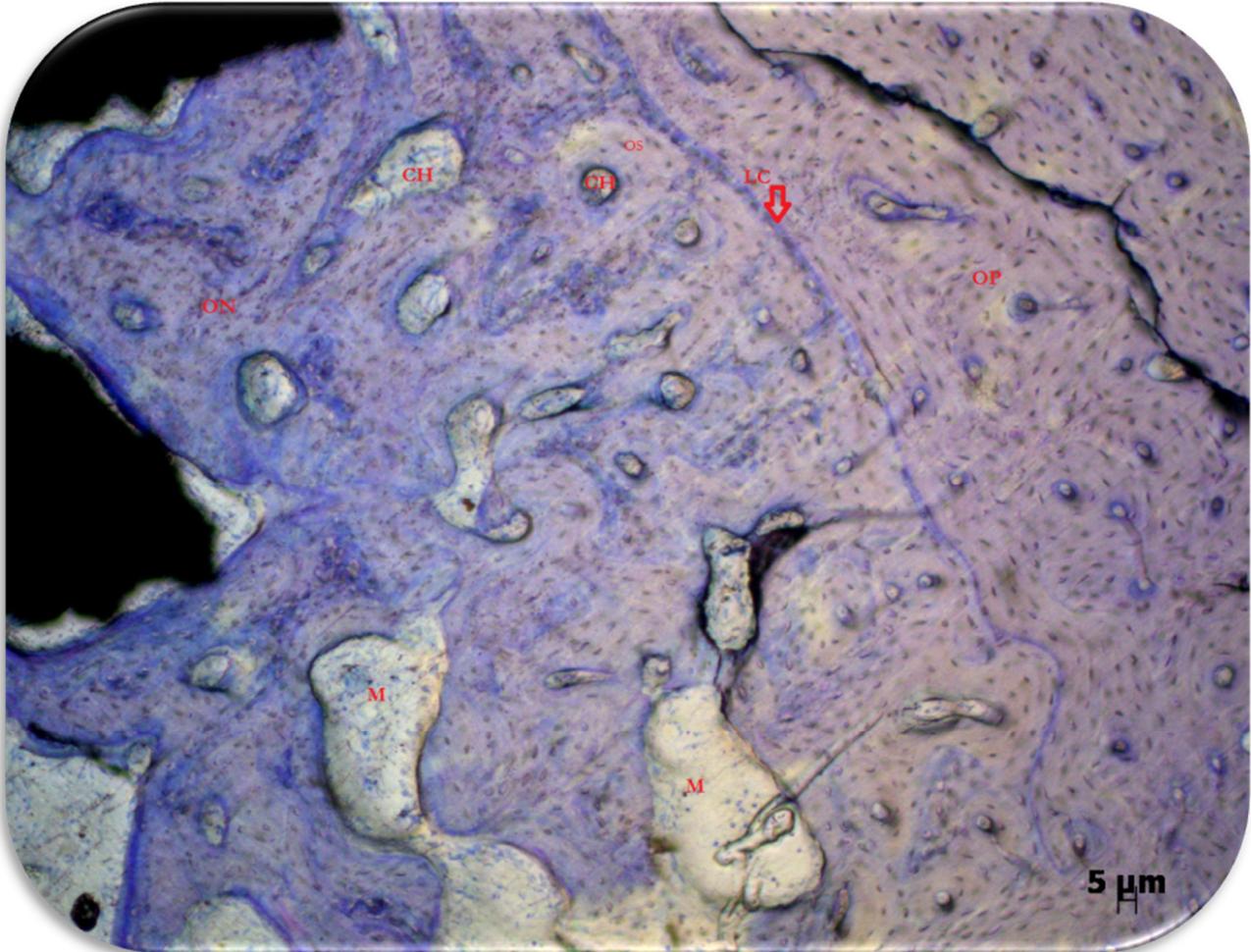
Fonte: arquivo pessoal

Figura 39-Detalhe da figura 36 onde NO corresponde ao osso neoformado e OP ao osso preexistente. Aumento de 200x.



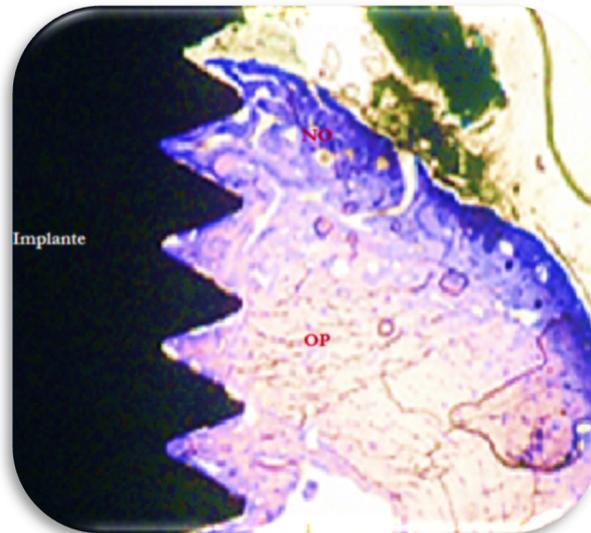
Fonte: arquivo pessoal

Figura 40- Imagem histológica (200x) do implante da Liga Ti-35Nb-7Zr mostrando em **ON**: osso neoformado, **OP**: osso preexistente, **CH**: canais de Havers, **OS**: osteócito, **LC**: linha cimentante, **M**: medula



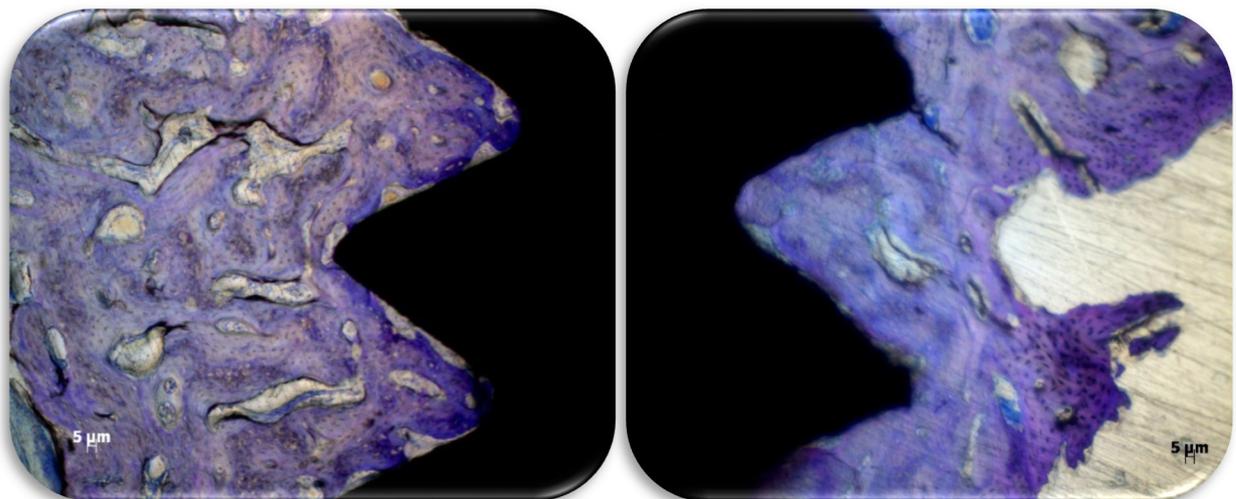
Fonte: arquivo pessoal

Figura 41- Imagem histológica (25x) do implante da liga onde observamos na área roxa mais escura **NO**: neoformação óssea e área roxa mais clara **OP**: osso preexistente.



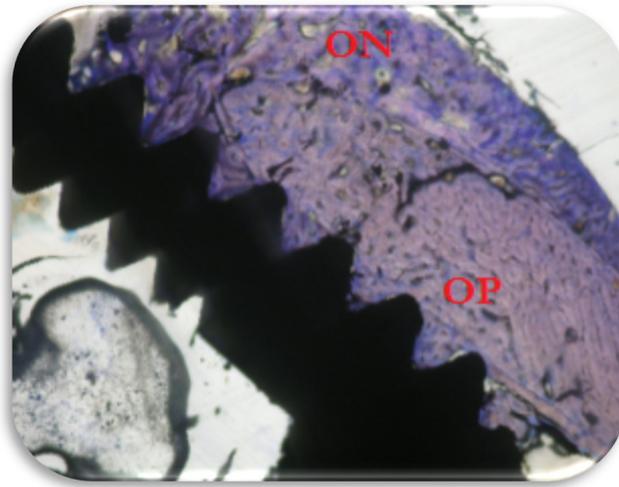
Fonte: arquivo pessoal

Figura 42- Áreas das roscas dos implantes da liga preenchidos por tecido ósseo neoformado.



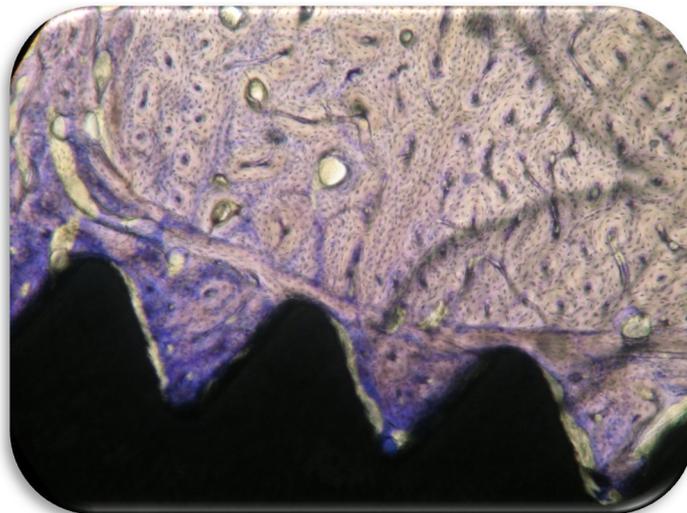
Fonte: arquivo pessoal

Figura 43- Imagem histológica (25x) do implante de Ti onde podemos ver **ON** osso neoforado e **OP** osso preexistente



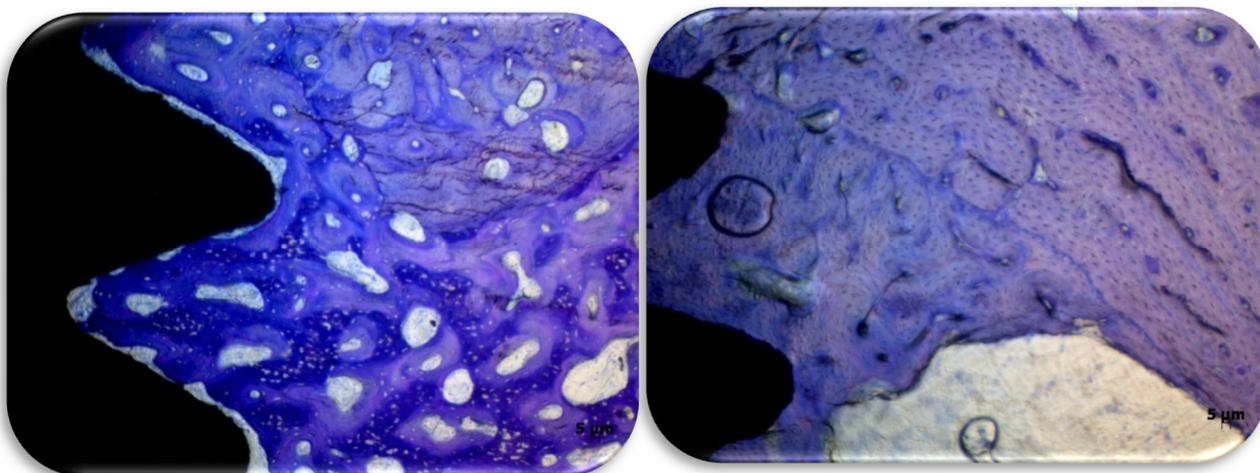
Fonte: arquivo pessoal

Figura 44- Imagem (100x) do implante de Ti onde observa-se osso neoforado em roxo mais escuro e osso preexistente em roxo claro



Fonte: arquivo pessoal

Figura 45- Detalhe das roscas dos implantes de Ti preenchidas por osso neoformado

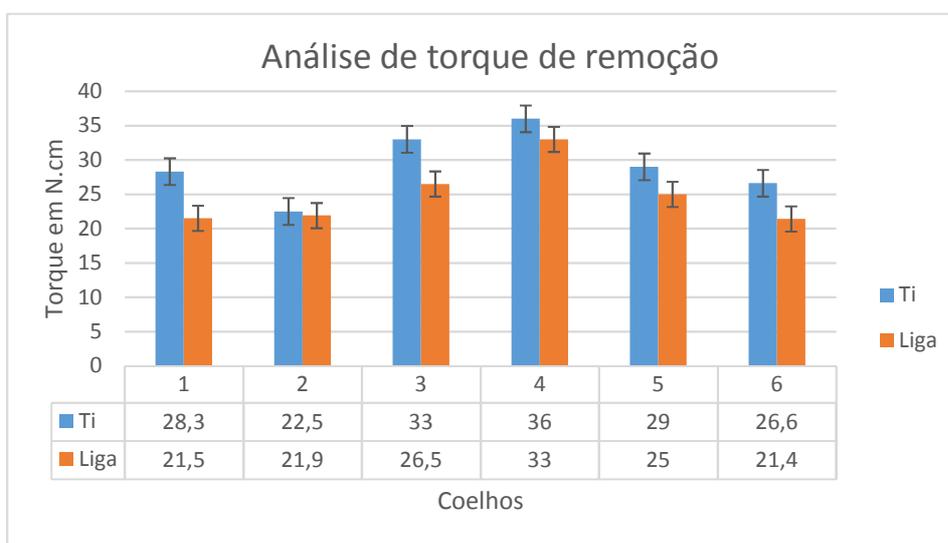


Fonte: arquivo pessoal

5.11 Análise da Remoção ao Torque

Os valores da remoção ao torque foram calculados em N.cm, conforme representado graficamente na figura 46.

Figura 46- Análise do torque de remoção dos implantes da liga e do Ti



Fonte: arquivo pessoal

As forças de torque de remoção têm sido usadas como uma medida biomecânica segura de ancoragem ou osteointegração em que as forças requeridas para remover os implantes podem ser interpretadas como um aumento na força de osteointegração. (STEIGENGA et al., 2004; GEHRKE; MARIN, 2015). Os resultados obtidos neste trabalho, não apresentaram diferença estatística significativa entre os implantes da liga e os implantes de Ti-Cp ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que além da análise histológica e histomorfométrica, a análise biomecânica dos implantes à remoção de torque também demonstra que houve osteointegração similar entre os implantes de Ti-Cp e implantes da liga e o osso.

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa, com relação aos testes *in vitro*, é possível concluir que a liga possui maior hidrofiliabilidade que o Ti-Cp; apresenta espriamento celular similar ao Ti-Cp o que corrobora para o resultado de viabilidade celular classificando-a como não citotóxica. Nos testes de quantificação de proteína e atividade da fosfatase a liga apresenta resultados similares ao Ti-Cp, favorecendo a ocorrência de diferenciação e proliferação das células osteoblásticas. Desta forma, pode-se concluir que a liga possui boa compatibilidade *in vitro*.

Os resultados obtidos nas avaliações *in vivo*, por meio da fração de área óssea ocupada (BAFO), comprovam a semelhança entre a liga e o Ti-Cp, pois tiveram o valor percentual de osso neoformado similar. A análise de fluorescência, após a administração dos marcadores tetraciclina e alizarina, mostra que a aposição óssea também foi semelhante entre a liga e o Ti-Cp nos períodos estudados. Com relação a força de interação avaliada pelo torque de remoção é possível afirmar que a liga apresenta osteointegração comparável aos implantes comerciais Ti-Cp.

Mesmo não sendo objetivo desta pesquisa, foi possível verificar, apesar das dificuldades iniciais, a usinabilidade da liga Ti-35Nb-7Zr, pois foi possível confeccionar implantes odontológicos nas dimensões e parâmetros dos implantes comerciais Ti-Cp.

Por fim, diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se afirmar que o implante da liga Ti-35Nb-7Zr além de apresentar um baixo módulo de elasticidade, o que favorece a distribuição de forças entre o implante e o osso, também apresentou características biocompatíveis e biofuncionais em todos os testes realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo um biomaterial promissor para ser usado como implante intraósseo, não só na área odontológica, mas também, na área de próteses ortopédicas em geral.

REFERÊNCIAS

AMÂNCIO, D et.al. **Estudo do aprimoramento dos ângulos da geometria da ferramenta de aço rápido para o torneamento do nióbio em torno CNC utilizando métodos de Taguchi**. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DA FABRICAÇÃO, 7.Penedo,15 a 19 de abril de 2013.

ARRAZOLA, P.J. et al., **Machining of titanium alloys used in aviation**. CONGRESS OF MACHINE TOOLS AND MANUFACTURING TECHNOLOGY, 19. Donostia - San Sebastián, 2013.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **F67**: Standard Specification for Unalloyed Titanium, for surgical applications. 2013.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS **E667-F2477**: Medical, devices and services. Standards and Engineering Library, USA, 2010.

BOSCHI, A. O., O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? IN SEMINÁRIO REGIONAL DE BIOMATERIAIS DE SANTA CATARINA. **Anais**, Santa Catarina, Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC. p. 4 – 16, 1996.

BOTTINO, M.C.et al. Processing, characterization, and in vitro/in vivo evaluations of powder metallurgy processed Ti-13Nb-13Zr alloys. **J Biomed Mater Res A**, v.88, n.3, p.689-696, 2009.

_____. Histomorphologic evaluation of Ti-13Nb-13Zr alloys processed via powder metallurgy. A study in rabbits. **Mat Sci and Engin C**, v. 28, n 2, p. 223-7, 2008.

BOTTINO, M.C.; TODESCAN, F. F. Planejamento em implantes osseointegrados. In: J. C. DINATO (Ed.). **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2004.

BRANEMARK, P.I. Osseointegration and its experimental back-ground. **J Prosthet Dent.**, v. 50, n. 3, p.399-410, 1983.

_____. Tissue-Integrated Prostheses.Osseointegration in clinical dentistry. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 54, n. 4, p. 611 – 612, 1996.

CALLISTER, W.D. **Propriedades mecânicas dos metais**. In: **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução**. 7ª ed. Rio de Janeiro: cap. 6, p. 131, 2007.

CFO-Conselho Federal de Odontologia. Cresce o número de implantes dentários no Brasil. Disponível em: <cfo.org.br/todas-as-noticias/cresce-o-numero-de-implantes-dentarios-no-brasil>. Acesso em abril, 2015.

CHEN, Y. et al. Change in anisotropy of mechanical properties with β -phase stability in high Zr-containing Ti-based alloys. **Materials Science and Engineering A**, v.480, p. 167-174, 2008.

COUTINHO, M. P. **Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro**, 2007. Dissertação (mestrado) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

CULLITY, B. D. Elements of X-Ray Diffraction. **Addison-Wesley**, Ed. 1978. P. 506-507.

ANDRADE, D. P. et al. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 538–544, 2015.

DEWIDAR, M.M.; YOON, H.C.; LIM, J.K. Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process. **Metals Mater Int.** v. 12, n. 3, p. 193, 2006.

DONATO, T. A. G. et al. Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 4, p. 1365–1369, 2009.

GEETHA, M. et al. Effect of thermomechanical processing on microstructure of Ti-13Nb-13Zr alloy, **Journal of Alloys and Compounds**, v.329, p.264-271, 2001.

GEHRKE, S. A.; MARIN, G. W. Biomechanical evaluation of dental implants with three different designs: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbits. **Annals of Anatomy**, v. 199, p. 30–35, 2015.

HAO, Y. L. Elastic deformation behavior of Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 2, p. 277–286, 2007.

HOWARD, E.B.; TIMOTHY, L.G. Metals hand-book. 8 ed. **Metals Park**, Ohio: American Society for Metals, 1995.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas-. **Pesquisa nacional de saúde, 2013**: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. – Rio de Janeiro, IBGE, 2015.

IBRAM-Instituto Brasileiro de Mineração-**China detém 15% da produção brasileira de nióbio, metal raro e estratégico.** Disponível em: <http://www.ibram.org.br/150/15001002.asp?ttCD_CHAVE=156677> acesso em: junho 2017.

ISO INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION **10.993** Biological Testing of Medical and Dental Materials Devices. Parts 1-20, 2010.

ISO INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION **7.405** Evaluation of Biocompatibility of medical devices used in dentistry, 2004.

IMPLADENTES. Cicatrização óssea após a preparação de implante dentário, 2014. Disponível em: <www.youtube.com/watch?v=pv0jh99bAM4: > Acesso em: fevereiro, 2016.

JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R.I.; **Estrutura dinâmica do tecido ósseo. Clínica Universitária de Ortopedia dos HUC-CHUC**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Texto de apoio para os alunos do Mestrado, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARASEVSKAYA, O. P. et al. Deformation behavior of beta-titanium alloys. **Materials Science and Engineering A**, v. 354, p. 121-132, 2003.

KASEMO B. Biocompatibility of titanium implant: surface science aspects. **J Prosthet. Dent.** v.49, n.6, p.832-837, 1983.

LAHEURT, P. et al. Mechanical properties of low modulus beta Titanium Alloys Designed from the Electronic approach. **J Mechanical Behave Biomed**, 2010.

LEMONS, J.E., DIETSH-MISCH F. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. **Implantes dentários contemporâneos**. 2^a ed. São Paulo: Santos; 2006. Cap. 20. p. 271-302.

LI, Q. et al. Effect of Zr on super-elasticity and mechanical properties of ti-24at%Nb- (0, 2 4) at%Zr alloy subjected to aging treatment, **Materials Science and Engineering A**, 536, 197-206.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol. Chemistry**, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.

MACEDO, B.Z.; SCHINEIDER, S.G.; SCHINEIDER, S, Avaliação das propriedades microestruturais e mecânicas da liga Ti-35Nb-13Zr e Ti4I, INB-7,17Zr para aplicação biomédica. **Tecnol. Metal. Mater. Miner**, v 11 p. 27-33, 2014

MAEDA, N. T. **Avaliação Da Neoformação Óssea Em Tíbia De Coelhos Utilizando Cúpula De Hidroxiapatita Associada a Diferentes Biomateriais**. Tese (doutorado), IPEN, USP, v. 1, p. 78, 2013.

MAGINII, R. D. S. Considerações periodontais no planejamento da osseointegração. In: DINATO, J. C. (Ed.). **Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, p.81-103, 2004.

MARIN, C. et al. Biomechanical and histomorphometric analysis of etched and non-etched resorbable blasting media processed implant surfaces: An

experimental study in dogs. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 3, n. 5, p. 382–391, 2010.

MCCLARENCE, E. **Close to the edge**: Branemark and the development of osseointegration. 1.ed. Berlin: Quintessence, 2003.

MOREIRA, P.L **Avaliação in vitro dos processos de proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e a mineralização sobre matrizes aniônicas de colágeno para reparo ósseo**. Tese (doutorado), Universidade de Campinas, SP. 2005

MOSMANN, T. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival application in poliferation and citotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v .65 p. 55-63, 1983.

NIINOMI, M.; NAKAI, M.; HIEDA, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. **Acta Biomater**, v. 8 n.11, p.3888–3903, 2012.

NIINOMI, M. Fatigue performance and cytotoxicity of low rigidity titanium alloy, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr. **Biomaterials**.v.24, n.16, p. 2673-2683, 2003.

_____. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **J Mechan Behavior Biomed Mater**, v.1, n. 1, p. 30-42, 2008.

_____. Metallic biomaterials. **J Artif Organs**, v.11, n.3, p. 105-110, 2008b.

OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT **473**: Environmental health and safety publications. Series on testing and assessment in OEC guidelines for testing of chemicals, Paris, 2010.

OKASAKI, Y.et al. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. **Biomaterials**, v.19, n.13, p.1197-1215, 1998.

OLIVEIRA, P.T.et al. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produce nanotopography. **J Biomed Mater Res A**, v.80, n.3, p.554-562, 2007.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials an Introduction**. Springer Science & Business Media, 3ª ed. p.2-200, 2007.

PUCCA, J.R. A política nacional de saúde bucal como demanda social. **Ciênc. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 243-246, mar. 2006.

SEAGLE, S. R. The state of the USA titanium industry in 1995. **Materials Science and Engineering A**, v. 213, p. 1-7, 1996.

SERRA, G.G. Desempenho de mini implantes ortodônticos submetidos à carga imediata. Estudo in vivo. Tese (doutorado). Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2007.

SCHNEIDER, S.G.; **Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial**. Tese (doutorado) São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2001.

SCHNEIDER, S.et al. S.G. **Efeito do processamento termomecânico nas propriedades da liga biomédica Ti-35Nb-7Zr**. In; LATIN AMERICAN CONGRESSCOF ARTIFICIAL ORGANS AND BIOMATERIALS, 6 Gramado, RS, 2010. v1, p.1-6, 2010.

SHACKELFORD, J.F. **Ciência dos Materiais**. 6. ed, São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.

SILVA, F. M.da. **Desenvolvimento, Caracterização E Estudo Pré-Clínico De Dispositivos Implantáveis Biocompatíveis Baseados No Polímero Poli (E-Caprolactona)**. Tese (doutorado), São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,2011.

SILVA, J.R. da. **Avaliação histomorfométrica de implantes dentários confeccionados em titânio comercialmente puro Grau IV e liga de Ti-6Al-4V Grau V**. - Dissertação (mestrado), Duque de Caxias, Universidade do Grande Rio, 2014.

SISTA, S.et al. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. **J Biomed Mater Res A.**, v.97, n.1, p. 27-36, 2011.

SONG, Y. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of β -type bio-titanium alloys. **Mater Sci Engin A.** v.260, n.1, p. 269-274, 1999.

STEIGENGA, J. et al. Effects of implant thread geometry on percentage of osseointegration and resistance to reverse torque in the tibia of rabbits. **J. Periodontology**, v.75, p.1233–1241, 2004.i

STENLUND, P. et al. Bone response to a novel Ti-Ta-Nb-Zr alloy. **Acta Biomaterialia**, v. 20, p. 165–175, 2015.

TADDEI, E.B. et al. Ensaio de citotoxicidade e influência do tratamento de solubilização na microestrutura da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para potenciais aplicações ortopédicas. **Rev Materials**, v.12, n.1, p.120-127, 2007.

USP, Universidade de São Paulo, **Histórico sobre o Departamento de Engenharia de Materiais** Disponível em:< <http://www.demar.eel.usp.br/historico>> Acesso em junho, 2017.

VAN STRAALLEN, J. P. et al. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clinica. Chimica. Acta, Amsterdam**, v. 201, n.1-2, p. 27-33, 1991.

VASCONCELLOS, L.M.R. et al. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. **Material Research**, v.11, n. 3, p. 275-280, 2008.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq. Bras. Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 415-422, 1999.

WANG, B.L.; LI, L.; ZHENG, Y.F. In vitro cytotoxicity and hemocompatibility studies of Ti-Nb, Ti-Nb-Zr and Ti-Nb-Hf biomedical shape memory alloys. **Biomedical Materials**, v.5, n.4, 2010.

WILD, M. Superhydrophilic SLActive implants. **Straumann document**, 2005. Disponível em:

<www.straumann.com.br/pt/profissionais/produtosesolucoes/linhas-de-implantes/sla-slactive/slactive>. Acesso em janeiro, 2016.

ZHAO, G. et al. High surface energy of SLActive implants enhances cell response to titanium substrate microstructure. **J. Biomed. Mater. Res.A**. v.75, p. 49-58, 2005.

ANEXO A



CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada **Avaliação da biofuncionalidade dos implantes da liga Ti-35 NB-7Zr comparados aos implantes Ti-Cp** registrada com o nº **007 /2016-CEUA-ICT-UNESP**, sob a responsabilidade do Profa. Dra. **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradores a Mestranda **FABIA ZAMPIERI D'ANTOLA DE MELLO** e a Discente **MARILIA NANNI**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 10/06/2016.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2016 a 31/12/2016	
Espécie/inhagem/raça	Coelhos	
Nº de Animais	10	
Peso/idade	Variável/ 4 meses	
Sexo	Fêmea	
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP	


 Profa. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**
 Vice-Coordenadora em exercício

Apêndice

Teste estatístico para resultado de Viabilidade Celular

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,33E-06	1	3,33E-06	0,068233	0,795839	4,195972
Dentro dos grupos	0,001368	28	4,89E-05			
Total	0,001371	29				

Fonte: arquivo pessoal

Análise estatística de quantificação de proteína total

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	0,561204	1	0,561204	8,830328	0,097042	18,51282
Colunas	9,32662	2	4,66331	73,37536	0,013445	19
Erro	0,127108	2	0,063554			

Fonte: arquivo pessoal

Análise estatística para atividade da fosfatase

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001934	1	0,001934	0,043867	0,839336	5,317655
Dentro dos grupos	0,352761	8	0,044095			
Total	0,354695	9				

Fonte: arquivo pessoal

Análise estatística para aposição óssea

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	0,561204	1	0,561204	8,830328	0,097042	18,51282
Colunas	9,32662	2	4,66331	73,37536	0,013445	19
Erro	0,127108	2	0,063554			
Total	10,01493	5				

Fonte: arquivo pessoal

Análise estatística do BAFO

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	28,81241	1	28,81241	1,829316	0,201146	4,747225
Dentro dos grupos	189,0045	12	15,75037			
Total	217,8169	13				

Fonte: arquivo pessoal

Análise estatística de torque de remoção

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	56,7675	1	56,7675	2,650684	0,134563	4,964603
Dentro dos grupos	214,1617	10	21,41617			
Total	270,9292	11				

Fonte: arquivo pessoal