

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE  
TITÂNIO COM SUPERFÍCIES BIOMIMETIZADAS

Thaís de Paula Busquim

São Carlos

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DE MATERIAIS**

ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE  
TITÂNIO COM SUPERFÍCIES BIOMIMETIZADAS

Thaís de Paula Busquim

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia  
de Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de DOUTOR em  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Orientador: Dr. Sebastião Elias Kuri

Co-orientador: Dr. Carlos Nelson Elias

Agência Financiadora: (CNPq - Parcialmente)

São Carlos  
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B979ev

Busquim, Thaís de Paula.

Estudo *in vitro* e *in vivo* da osseointegração de implantes de titânio com superfícies biomimetizadas / Thaís de Paula Busquim. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
125 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Engenharia de materiais. 2. Biomateriais. 3. Nanomateriais. 4. Implantações dentárias. 5. Química de superfície. 6. Dióxido de titânio. I. Título.

CDD: 620.11 (20<sup>a</sup>)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Edison Antonio Busquim e Solange Maria de Paula Busquim, pelo apoio e incentivo incondicionais e pela paciência incansável durante todo o tempo.

## VITAE DO CANDIDATO

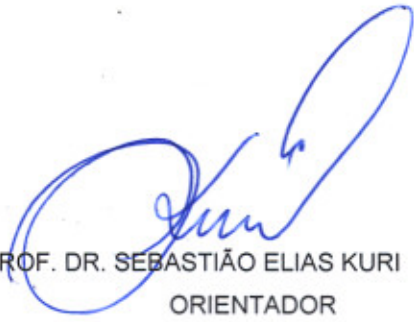
Mestre em Engenharia de Materiais na UFSCar (2007) Bacharel em Química pela UFSCar (2005).



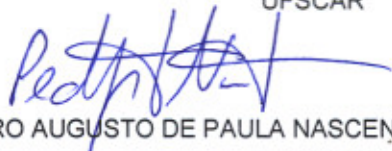
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
THAÍS DE PAULA BUSQUIM

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS, EM 30 DE MARÇO DE 2012.

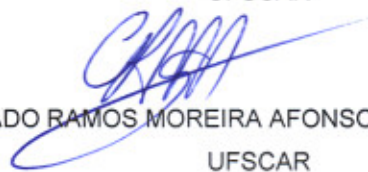
BANCA EXAMINADORA:



PROF. DR. SEBASTIÃO ELIAS KURI  
ORIENTADOR  
UFSCAR



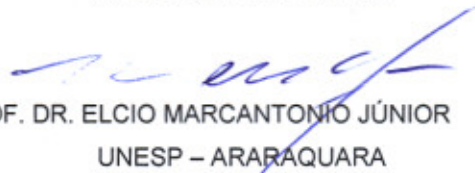
PROF. DR. PEDRO AUGUSTO DE PAULA NASCENTE  
UFSCAR



PROF. DR. CONRADO RAMOS MOREIRA AFONSO  
UFSCAR



DR. JOSÉ EDUARDO MAY  
EM CONSULTORIA LTDA



PROF. DR. ELCIO MARCANTONIO JÚNIOR  
UNESP – ARARAQUARA





## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido que este trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Sebastião Elias Kuri pela orientação, contribuição, amizade e confiança durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Nelson Elias pela co-orientação, amizade, confiança e pela disponibilidade de me receber no IME durante a execução deste trabalho.

Aos Profs. Drs. José Henrique Cavalcanti Lima e Carlos Alberto Muller, pela realização dos procedimentos cirúrgicos no Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro-RJ.

Aos Profs. Drs. Alberto Moreira e Pedro Augusto de Paula Nascente pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Oscar Balancin por possibilitar o uso de microscopia óptica.

Aos mestres Carlos Alberto Della Rovere, pela força, amizade e contribuições técnico-científicas na realização dos ensaios.

Ao Dr. José Eduardo May, pelo incentivo para trabalhar na área de biomateriais, assim como valores éticos, obrigada pela amizade.

À amiga Vânia Aparecida Morero Faria pelo apoio, paciência e incentivo imprescindíveis nos momentos finais do desenvolvimento da tese, sem você não teria chegado até aqui.

A todas as pessoas do DEMa e do IME, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao PPG-CEM pelo suporte durante os quatro anos de trabalho.

Ao DEMa e ao IME pela infraestrutura.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Conexão Sistemas de Prótese LTDA pela doação dos implantes e amostras de titânio para realização deste trabalho.



## RESUMO

As pesquisas realizadas com implantes procuram melhorar a qualidade dos produtos com o objetivo de reduzir o tempo de espera após a cirurgia para submeter os implantes às cargas mastigatórias com segurança. Para atender esta expectativa deve-se considerar que o organismo tem um tempo mínimo para realizar as reações que levam à osseointegração. O presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar a camada de óxido de titânio existente em implantes comerciais anodizados (Vulcano Actives®) e tratado com ácido (Master Porous®) e comparar com o implante não comercial com deposição de íons na superfície (Porous Nano®). O estudo consistiu em alterar as morfologias da superfície dos implantes de titânio para acelerar o processo de osseointegração. Foram feitas análises “*in vitro*” das superfícies (rugosidade, composição química, molhabilidade) e “*in vivo*” (medida indireta da osseointegração). Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos que foram sacrificados 90 dias após implantação. A composição do filme passivo foi analisada por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), espectroscopia RAMAN, microscopia eletrônica e difração de raios X. Os resultados mostraram que nas superfícies dos implantes tratados por anodização há predomínio do óxido de titânio do tipo anatase. As demais superfícies apresentam filmes de óxido com pequena espessura dificultando a caracterização e identificação da forma alotrópica do óxido de titânio. Os resultados dos ensaios mostraram que quanto maior o valor da rugosidade, maior o ângulo de contato e maior o torque de remoção da tíbia de coelhos. Os resultados mostram que é possível reduzir o tempo de ativação do implante com segurança, sendo possível obter uma interface osso-implante com resistência mecânica adequada para suportar as forças orais em situações clínicas críticas, como osso de baixa qualidade. A incubação de neutrófilos nas diferentes superfícies mostrou que em tempos curtos de interação (15 minutos) não foi possível identificar qual efeito é mais importante, a morfologia da superfície ou a composição química, enquanto em tempos maiores (60

minutos) a composição química apresentou um efeito positivo na interação celular. A espectrofotometria revelou que a adsorção da fibronectina (FN) nas superfícies Porous e dopada com Na e F apresentam comportamento semelhante (80%). Os índices de associação de células osteoblásticas nas amostras com e sem FN e os valores de radioatividade das amostras sugerem que a incorporação de FN é determinante na citocompatibilidade das superfícies. O recobrimento da superfície de titânio com FN mostrou ser uma ótima opção de tratamento dos implantes dentários para otimizar e acelerar o processo de osseointegração.

## IN VITRO AND IN VIVO STUDY OF THE OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANT WITH BIOMIMETICS SURFACES

### ABSTRACT

The researches conducted with implants are seek to improve the quality of products in order to reduce the waiting time after the surgery to undergo implants on chewing loads safely. To meet this expectation it must be considered that the body has a minimum time to perform the reactions that lead to osseous integration. This study was conducted to characterize the existing titanium oxide layer in commercial implants anodized (Vulcano Actives ®) and treated with acid (Master Porous ®) and compare with a non-commercial implant with ion deposition on the surface (Porous Nano ®). The study consisted of changing the surface morphologies of titanium implants to accelerate the process of osseous integration. In vitro analyses of surfaces were performed, as well as, (roughness, chemical composition, wettability) "in vivo" (indirect measure of osseointegration). The implants were inserted in rabbit's tibia and the rabbits were sacrificed 90 days after implantation. The composition of the passive film was analyzed by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), RAMAN spectroscopy, electron microscopy and x-ray diffraction. The results showed that implants treated by anodizing there is predominance of anatase type of titanium oxide on the surface. The others surfaces of implants have very thin oxide and the characterization techniques available have not been able to identify the allotropic form of titanium oxide. The results of the tests showed that the higher value of roughness, the greater contact angle and removal torque of implants was reached at anodized surface implants. Surface treatments show that it is possible to reduce the time of activation of the implant with security, you can get a bone-implant interface with mechanical strength appropriate to support the oral critical forces in clinical situations, such as bone of low quality. Incubation of neutrophils in the different areas showed that in short time of interaction surface morphology is the most important feature, while at longer time chemical composition has a positive

effect on cellular interaction. Spectrophotometry revealed that the adsorption of fibronectin (FN) in Porous surfaces and those Doped with Na and F is similar (80%). The association indexes of osteoblastics cells in the samples with and without FN and the values of radioactivity of samples suggest that the incorporation of FN is conclusive citocompatibility of surfaces. The surface coating of titanium with FN proved to be a great option for the treatment of dental implants to optimize and accelerate the process of osseointegration.

## PUBLICAÇÕES

[1] BUSQUIM T.P.; KURI S.E.; ELIAS C.N.; LIMA J.H.C.; MULLER C.A. Caracterização dos óxidos de titânio das superfícies de implantes dentários com diferentes tratamentos. **Revista ImplantNews**, Vol 9, n. 1, p. 49-54, 2012.

[2] ELIAS C.N.; GRAVINA P.A.; BUSQUIM T.P.; KURI S.E.; SILVA F.C. Biomimetização da superfície de implantes dentários. **Revista ImplantNews**, vol 8, p. 47-55, 2011.

[3] BUSQUIM T.P.; ROVERE C.A.D.; KURI S.E. Avaliação da resistência à corrosão de aços inoxidáveis utilizados na fabricação de instrumentais cirúrgicos. **19º Congresso CBECIMat 2010**, Campos do Jordão – SP, 21 – 25 Nov.

[4] HIGA S.M.; ROVERE C.A.D.; BUSQUIM T.P.; KURI S.E. Avaliação comparativa da corrosão localizada de aços inoxidáveis através de medidas eletroquímicas em altos potenciais. **19º Congresso CBECIMat 2010**, Campos do Jordão – SP, 21 – 25 Nov.

[5] BUSQUIM T.P.; ROVERE C.A.D.; KURI S.E. The effect of passivation on the localized corrosion resistance of laser engraved stainless steel. **SBPMat Congress. 2010**; Ouro Preto – MG, 24 – 28 Out.

[6] BUSQUIM T.P.; ELIAS C.N.; KURI S.E. Surface Characterization of Titanium Oxide of Dental Implants. **11nd International Conference on Advanced Materials VIII Encontro SBPMat - ICAM**. Rio de Janeiro. 20-25 de Set. 2009.

[7] BUSQUIM T.P.; ELIAS C.N.; KURI S.E.; MEIRELLES L. Surface characterization of micro arc oxidized dental implants. **22nd European Conference of Biomaterials 2009**. Lausanne, Switzerland. 7-11 de Set. 2009.

[8] BUSQUIM T.P.; ELIAS C.N.; MAY J.E.; KURI S.E.; NASCENTE P.A.P. Titanium Oxide Layer on the Surface of Anodized Dental Implants. **Materials & Processes for Medical Devices Conference 2009**. Minneapolis, MN – USA. J. Gilbert, Ed., p. 60-65, 10-12 de Ago. 2009.

[9] ELIAS C.N.; BUSQUIM T.P.; LIMA J.H.C.; MULLER C.A. Caracterização e Torque de Remoção de Implantes Dentários com Superfície Bioativa. **Revista Brasileira de Odontologia**. Rio de Janeiro, V.65, n. 2, p. 273-279. Jul/Dez 2008.

[10] MAY J.E.; BUSQUIM T.P.; KURI S.E.; NASCENTE P.A.P.; ELIAS C.N. Caracterização do Óxido de Titânio Formado nas Superfícies Vulcano Actives® e Tiunite®. **Revista Brasileira de Implantodontia**. Pag 6-10, Out-Dez – 2007.





## SUMÁRIO

	<b>Pág</b>
BANCA EXAMINADORA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Titânio e Suas Propriedades.....	3
2.2 A Superfície dos Implantes de Titânio.....	7
2.2.1 Tratamentos de Superfície, Rugosidade e Molhabilidade.....	7
2.2.2 Formação do tecido ósseo.....	37
2.2.3 Característica Topográfica.....	43
2.3 Característica Físico-Químico da Água.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 Descrição Geral.....	57
3.2 Preparação das Amostras.....	58
3.3 Caracterização Morfológica.....	60
3.4 “ <i>In Vitro</i> ”.....	61
3.4.1 Ensaio de Rugosidade.....	61
3.4.2 Ensaio de Molhabilidade.....	62
3.5 “ <i>In Vivo</i> ”.....	63
3.5.1 Considerações Éticas.....	63
3.5.2 Animais.....	64
3.5.3 Cirurgia.....	65

3.5.4	Ensaio de Remoção por Torque.....	67
3.6	Preparação dos Neutrófilos .....	69
3.6.1	Separação dos Neutrófilos em Gradiente de Percoll.....	69
3.6.2	Incubação dos Neutrófilos nas Diferentes Superfícies .....	71
3.7	Preparação da Fibronectina .....	71
3.7.1	Incorporação de Fibronectina.....	72
3.7.2	Cultura de Osteoblastos .....	72
3.7.3	Interação das Células com as Amostras Recobertas por FN .....	73
3.7.4	Radioatividade das Superfícies com Osteoblastos .....	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	75
4.1	Preparação das Amostras .....	75
4.2	Caracterização Morfológica .....	77
4.3	Ensaio de Rugosidade.....	98
4.4	Ensaio de Molhabilidade.....	100
4.5	Ensaio de Remoção por Torque .....	101
4.5.1	Incubação dos Neutrófilos nas Diferentes Superfícies .....	102
4.5.2	Interação das Células com as Amostras Recobertas por FN .....	105
5	CONCLUSÕES .....	109
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 Composição química da superfície de Ti cp, Ti6Al4V, e Ti50Ni imersos em solução contendo Ca, P e O. O “*” significa a composição química da superfície imediatamente antes da imersão [3].	6
Tabela 2.2 Características de diferentes superfícies de implantes comerciais quanto à rugosidade [31].	18
Tabela 2.3 Fabricantes de implantes x Tratamento de superfície e nomes comerciais [53].	31
Tabela 2.4 Valor médio e desvio padrão do ângulo de contato de líquidos com implantes [55].	32
Tabela 3.1 Grupos com os tratamentos superficiais, os tempos de cicatrização, as quantidades de amostras e o ensaio realizado.	60
Tabela 3.2 Gradientes de Percoll [95].	69
Tabela 4.1 Percentual e energia determinada por XPS dos componentes presentes na superfície dos implantes Vulcano Actives®.	89
Tabela 4.2 Picos característicos de espectroscopia RAMAN para fase rutilo e anatase [45].	98
Tabela 4.3 Parâmetros de rugosidade medidos ( $\mu\text{m}$ ) nas superfícies tratadas.	99
Tabela 4.4 Valores médios e desvios padrões dos ângulos de contato das superfícies em dois meios, água destilada e soro fisiológico.	100
Tabela 4.5 Valores médios e desvios padrões dos torques de remoção (N.cm) dos implantes.	101
Tabela 4.6 Associação de células às superfícies Porous, Porous com FN, Dopada com Na e F, Dopada com Na e F e FN.	106



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Camada de óxido de titânio em função do tempo de exposição ao meio ambiente. [1].....	4
Figura 2.2 Representação esquemática da composição da camada de óxido de uma superfície de titânio puro [1]. .....	5
Figura 2.3 Influência da topografia da superfície no comportamento das células [21]. .....	10
Figura 2.4 Diminuição da estabilidade primária e aumento da estabilidade secundária o que resulta num diminuição da estabilidade total entre a semana 2 e 4 [96 - Adaptado].....	12
Figura 2.5 Estabilidade secundária precoce (entre 2 e 4 semanas) em função do tempo para implante com tratamento de superfície [96 - Adaptado].....	13
Figura 2.6 Esboço representando os parâmetros da rugosidade Ra, Rv, Rz e Rp [28]. .....	16
Figura 2.7 Perfil da superfície oxidada do titânio imersa em eletrólitos. (A) interface metal-óxido. (B-C) camada defeituosa de elétrons. (C) interface óxido-eletrólito. (D) linha da distribuição do gradiente de concentração. (D-E) concentração excessiva de ânions. Legendas: (m) metal, (c) cátions [36]. ....	21
Figura 2.8 Superfícies características de implantes de titânio. (A) Usinado. (B) Plasma Spray. (C) tratado com laser. (D) jateado com óxido de titânio e ataque ácido. (E) duplo ataque ácido (Master Porous®). (F) anodizado (Vulcano Actives®).....	26
Figura 2.9 Superfície jateada e tratada com flúor antes da imersão na solução de SBF. À direita, após a imersão em SBF [2].....	27
Figura 2.10 Método estático de avaliação da molhabilidade da superfície dos materiais [56].....	33
Figura 2.11 Valores da porcentagem de contato osso/implante em função do tempo de implantação dos implantes com superfície tratada com base (B) e superfície apenas usinada (M) [64]. .....	36
Figura 2.12 Modelos atômicos espaciais das moléculas de água e dos radicais hidroxílicos na superfície do titânio [1]. .....	40

Figura 2.13 Avaliação por MEV da superfície dos implantes. (a) superfície jateada com TiO <sub>2</sub> . (b) superfície jateada com TiO <sub>2</sub> e atacada com HF, mostrando partículas com dimensão de 50 – 200 nm [76].	46
Figura 2.14 Medidas de PCR em tempo real dos níveis de mRNA de células aderidas na superfície de discos de titânio. Expressão de RUNX-2 mRNA incubada de 1 – 14 dias. O maior nível de RUNX-2 mRNA foi observado para a superfície TiO <sub>2</sub> /HF em todos os períodos avaliados [76].	47
Figura 2.15 Medidas de PCR em tempo real dos níveis de mRNA de células aderidas na superfície de discos de titânio. Expressão de Osterix mRNA incubada de 1 – 14 dias. O maior nível de Osterix mRNA foi observado para a superfície TiO <sub>2</sub> /HF em todos os períodos avaliados [76].	48
Figura 2.16 Ligação de hidrogênio (linhas interrompidas) entre moléculas de água e a formação de rede [84].	52
Figura 3.1 Desenho técnico dos implantes com 3,3 mm de diâmetro por 7,0 mm de comprimento total, comprimento da área ativa do implante com 5,15 mm..	58
Figura 3.2 Disco de Titânio ASTM Grau 4.	59
Figura 3.3 Ra calculado dentro do comprimento total medição (lm).	62
Figura 3.4 Imagem mostrando uma gota usada na para determinar o ângulo de contato entre o líquido e a superfície do disco de titânio.	63
Figura 3.5 Compartimento com filtragem de ar, controle de temperatura e de iluminação, com capacidade para seis gaiolas individuais (a). Gaiola em detalhe, com água, ração e maravalha (b).	64
Figura 3.6 Osso da tíbia exposto para inserção do implante (a); Perfurações ósseas já executadas (b); Implantes já instalados (c); Sutura executada (d)...	66
Figura 3.7 Tíbias dissecadas (a), implantes expostos (b).	67
Figura 3.8 Máquina de ensaios EMIC – Equipamentos – Brasil (a). Aparato utilizado nos ensaios de remoção por torque dos implantes inseridos na tíbia dos coelhos (b).	68
Figura 3.9 Início da separação, após primeira centrifugação. Observar “halo”, onde há concentração de neutrófilos (Seta) [95 - Adaptado].	70
Figura 4.1 Implantes osseointegráveis com diferentes tratamentos de superfície (a) Porous®, (b) Vulcano Actives® e (c) Deposição Nanométrica.	75
Figura 4.2 Implante estéril com tratamento Porous® - Conexão Sistema de Próteses na embalagem blister.	75
Figura 4.3 Embalagem do implante com suporte específico para o tubo que contém o produto e monta implante.	76
Figura 4.4 Discos de titânio tratados superficialmente.	76

Figura 4.5 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície Porous®.....	77
Figura 4.6 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície Vulcano Actives®.....	78
Figura 4.7 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície com deposição de nanopartículas (Na/F). ....	80
Figura 4.8 Espectro de EDS de implantes tratados com ataque ácido – Porous® (a), anodizados – Vulcano Actives® (b) e dopados com nanopartículas (c). ....	83
Figura 4.9 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante Porous® indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante é composto por TiO <sub>2</sub> .....	88
Figura 4.10 Espectro completo de XPS para uma ampla faixa de energias da superfície Vulcano Actives®. ....	89
Figura 4.11 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante Vulcano Actives® indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante anodizado é composto por TiO <sub>2</sub> . 90	90
Figura 4.12 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico referente ao elemento Ca 2p em 348 eV e 351 eV contido na superfície do implante Vulcano Actives®.....	91
Figura 4.13 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico referente ao elemento P 2p em 133,7 eV contido na superfície do implante Vulcano Actives®.....	91
Figura 4.14 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante dopado com nanopartículas de Na e F indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante é composta por TiO <sub>2</sub> .....	92
Figura 4.15 Espectro de difração de raios X da superfície Porous®. [93-Adaptado].....	93
Figura 4.16 Difratoograma de raios X da superfície Vulcano Actives® Conexão Sistemas de Prótese ( titânio; anatase; rutilo)......	94
Figura 4.17 Espectro de difração de raios X da superfície dopada com nanopartículas de Na e F [93-Adaptado]. ....	95
Figura 4.18 Espectro RAMAN mostrando bandas características da fase anatase na superfície do implante Vulcano Actives®. ....	97
Figura 4.19 Micrografias eletrônicas da superfície Porous® (a), dopada com nanopartículas de Na e F (b) e Vulcano Actives® (c) após 15 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos. ....	103

Figura 4.20 Micrografias eletrônicas da superfície Porous® (a), dopada com nanopartículas de Na e F (b) e Vulcano Actives® (c) após 60 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos..... 104

Figura 4.21 Radioatividade associada às superfícies Porous, Porous com FN, Dopado com Na e F, Dopado com Na e F com FN, num intervalo de tempo de três horas..... 108



## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ASTM –	American Society for Testing and Materials
DRX –	Difração de raios x
EDS –	Espectroscopia por Energia Dispersiva
HA –	Hidroxiapatita
IME –	Instituto Militar de Engenharia
kV –	kilo Volts
MEV –	Microscópio Eletrônico de Varredura
mA –	Miliâmpere
mA/cm <sup>2</sup> –	Densidade de corrente elétrica
µm –	Micrômetro (10 <sup>-6</sup> )
nm –	Nanômetro (10 <sup>-9</sup> )
N –	Newton
Ncm –	Medida de Torque
PGE <sub>2</sub> –	Prostagladina E <sub>2</sub>
pH –	Potencial Hidrogeniônico
SBF –	Simulated Body Fluid – Solução de plasma sanguíneo simulado
Ti cp –	Titânio comercialmente puro
TiO <sub>2</sub> –	Dióxido de titânio
TGF- β1	Fatores Transformantes de Crescimento
XPS –	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
FN –	Fibronectina
Fibrina –	Proteína esbranquiçada, insolúvel, que constitui a parte essencial do coágulo sanguíneo.
Neutrófilos	São as primeiras células do sistema imunológico que chegam ao local inflamado.
<i>Ad libitum</i>	É uma expressão latina que significa "à vontade",
Maravalha	são aparas de madeira, maior que a serragem, produzidas por raspadores e/ou outras ferramentas de trabalhar madeiras



## 1 INTRODUÇÃO

A implantodontia tem interesse em reduzir o tempo de espera após a cirurgia para submeter os implantes às cargas mastigatórias com segurança. Para atender esta expectativa deve-se considerar que o organismo tem um tempo mínimo para realizar as reações que levam à osseointegração. A estratégia consiste em alterar a biocompatibilidade das superfícies dos implantes de titânio, modificar a técnica cirúrgica e selecionar a forma (design) adequada do implante para a situação existente.

Ainda, na tentativa de aumentar o índice de sucesso dos implantes, tem-se adotado o controle da rugosidade da superfície com o objetivo de selecionar o tipo de célula que irá interagir com o implante. Sabe-se que as células osteoblásticas aderem mais rapidamente em superfícies rugosas de titânio onde há proliferação mais acentuada da síntese da matriz extracelular, do que em superfícies lisas. A nanotecnologia oferece a engenheiros e profissionais da área de biologia e saúde novos meios para entender e otimizar funções e respostas específicas de células. Mesmo assim, apesar dos avanços da implantodontia, a explicação da influência da superfície dos implantes na osseointegração permanece incompleta. As novas superfícies melhoram os resultados das aplicações clínicas em casos com baixa qualidade e quantidade de osso. No entanto, ainda existem perdas inexplicáveis de implantes.

Dentre as várias propriedades físicas e químicas que conferem a biocompatibilidade ao titânio, as propriedades da camada de óxido da superfície, se destacam como das mais relevantes [1].

Nesse contexto o presente trabalho tem como objetivo principal introduzir modificações químicas, topográficas e cristalográficas na superfície dos implantes dentais de titânio através da deposição discreta de íons em escala nanométrica e avaliar a influência destas modificações na resistência da interface osso/implante (osseointegração) com o intuito de diminuir o tempo para aplicação de cargas mastigatórias e comparar os resultados com implantes comerciais disponíveis no mercado.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Titânio e Suas Propriedades

Estudos atuais buscam materiais apropriados para a substituição de dentes perdidos, restabelecendo a estética, fonética e função, da melhor forma possível. Alguns materiais são citados em documentos, ao longo da história da humanidade, como tentativas de exercer a função dos elementos dentários, entre eles a madeira, dentes de outros animais, marfim e pinos dos mais diversos metais. O desenvolvimento da implantodontia, na tentativa de solucionar os problemas existentes de rejeição, do tipo corpo estranhos, perda do tecido ósseo e infecções, passou a utilizar novos sistemas de implantes fabricados de titânio.

O titânio é um material metálico que possui propriedades de biocompatibilidade, alta resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade em relação a outros metais como o aço, e permite a osseointegração.

A excelente resistência à corrosão do titânio e suas ligas está associada à presença de um filme de óxido superficial com grande estabilidade, denso, contínuo e altamente aderente. O titânio é um metal altamente reativo com extrema afinidade pelo oxigênio. Por isso os filmes de óxido da superfície se formam espontaneamente e instantaneamente quando uma superfície metálica de titânio é exposta ao ar ou a uma atmosfera oxidante. A cinética desta reação de formação do óxido é extremamente elevada podendo chegar à ordem de milissegundos .

Os implantes odontológicos são produzidos a partir de barras de titânio comercialmente puro. Após a usinagem e conformação do implante, sua superfície poderá ser tratada, ou o implante pode ser limpo e esterilizado, sem passar por tratamentos.

A formação da camada de óxido natural que ocorre na superfície dos implantes após a usinagem apresenta uma velocidade maior nos tempos iniciais de exposição da superfície com o ar, como mostra a Figura 2.1 [1].

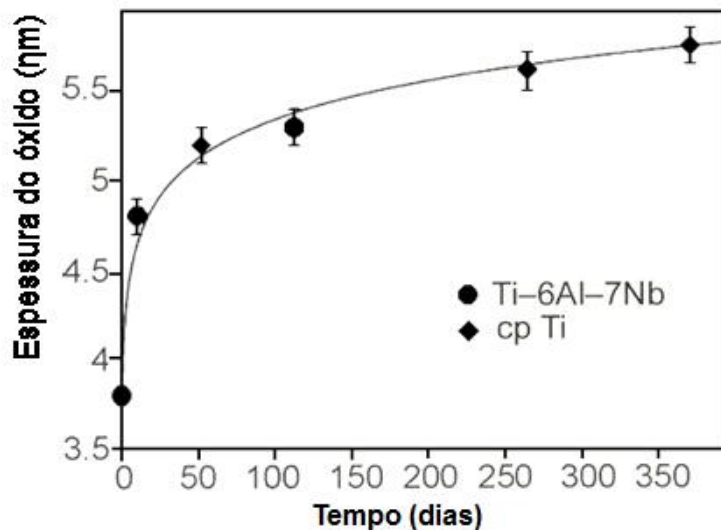


Figura 2.1 Camada de óxido de titânio em função do tempo de exposição ao meio ambiente. [1]

O óxido de titânio nativo formado sobre implantes usinados apresenta espessura entre 1,5 e 17 nm. Este filme fino formado é consequência da integridade estrutural do óxido e de sua estabilidade química dentro de uma larga faixa de pH, composição de eletrólitos e fluidos corporais [1,2]. O óxido se comporta como isolante elétrico atuando como barreira de difusão iônica e eletrônica, e dessa forma, diminui a velocidade de oxidação. Quando esse filme protetor é perdido por desgaste mecânico, o óxido é instantaneamente recomposto com a presença de átomos de oxigênio do meio.

O titânio em meio oxidante pode formar os óxidos  $TiO$ ,  $Ti_2O_3$ ,  $Ti_2O$ ,  $Ti_3O_5$ ,  $Ti_3O_2$  e  $TiO_2$ . Destes o óxido mais importante e mais abundantemente formado na superfície para osseointegração é o  $TiO_2$ . O  $TiO_2$  pode aparecer em três estruturas cristalinas: anatase, rutilo e broquita. A espessura da camada de óxido e tipo existente na superfície do implante depende das condições de fabricação. Embora o óxido de titânio apresente três formas alotrópicas o óxido formado naturalmente na superfície é amorfo.

A Figura 2.2 mostra esquematicamente o óxido de titânio formado na superfície do titânio. É possível observar no substrato metálico a presença de defeitos estruturais e átomos de oxigênio. A camada de óxido é composta de

cristais com diversas orientações, contendo na superfície espécies químicas adsorvidas, assim como, contaminações compostos orgânicos e hidrocarbonetos atmosféricos.

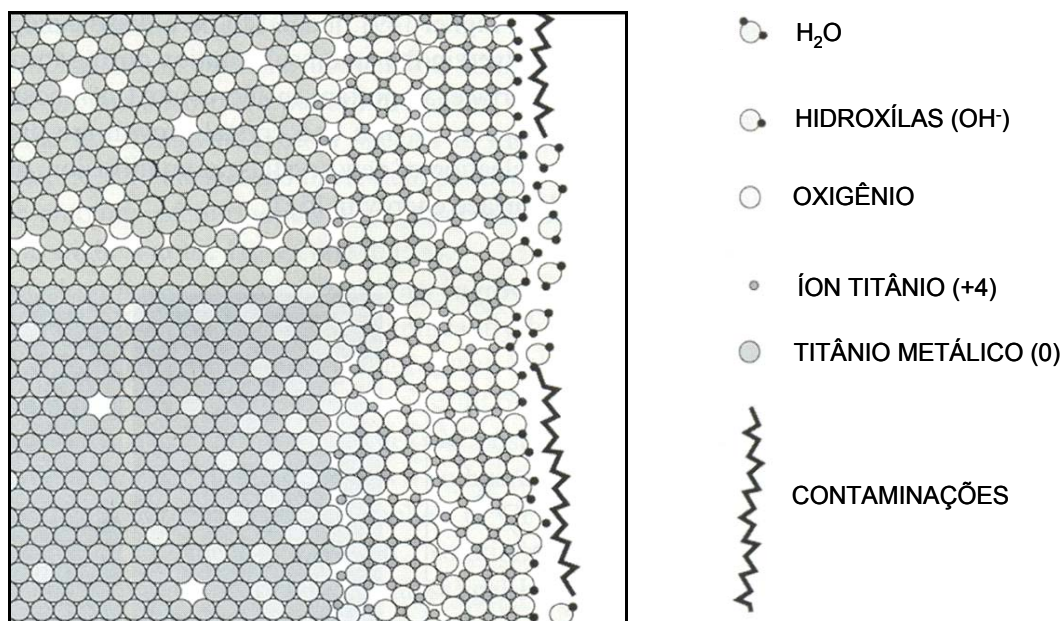


Figura 2.2 Representação esquemática da composição da camada de óxido de uma superfície de titânio puro [1].

A elevada resistência à corrosão da barreira de óxido formado sobre o substrato metálico, a estabilidade química, a forte união com o substrato são aceitos como justificativas para a biocompatibilidade do titânio. Entretanto, estas propriedades não são suficientes para justificar a total biocompatibilidade e as propriedades de osseointegração que o titânio apresenta nas diversas aplicações como biomaterial. Segundo Ellingsen, 2000 [2], devido à presença de oxigênio negativamente carregado, a superfície do óxido é capaz de atrair e fazer ligações químicas com íons cálcio (positivos) quando expostos aos fluidos do meio ambiente biológico.

Na tentativa de explicar as reações que ocorrem entre a superfície do óxido e o meio biológico Hanawa, 1991 [3] mostrou que o titânio comercialmente puro, Ti cp, é capaz de adsorver, quando imerso em uma solução eletrolítica, íons cálcio, fósforo e oxigênio como mostra a Tabela 2.1. É

possível observar que com o passar do tempo esses íons são capazes de se combinar e formar uma camada de fosfato de cálcio com relação Ca/P semelhante à de uma apatita biológica [3,4]. No mesmo estudo foi mostrado que ligas de Ti-6Al-4V quando imersas na mesma solução e ao final de 30 dias de imersão apresentavam redução dos íons alumínio presentes inicialmente na superfície, embora, surpreendentemente não tivessem sido identificados íons vanádio no início do teste. A espessura da camada de óxido foi maior na superfície do titânio puro 7,9 nm enquanto nas superfícies de titânio ligas testadas foi de 6,9 nm (TiAlV) e 6,1 nm (TiNi), este aumento pode ser atribuído à homogeneidade da superfície e conseqüentemente maior probabilidade de acesso das moléculas sanguíneas com o óxido superficial.

Tabela 2.1 Composição química da superfície de Ti cp, Ti6Al4V, e Ti50Ni imersos em solução contendo Ca, P e O. O “\*” significa a composição química da superfície imediatamente antes da imersão [3].

AMOSTRA	Tempo de imersão	Concentração relativa em % atômica							Espessura de cada filme (nm)
		Ti	Al	V	Ni	O	Ca	P	
Ti cp	0 *	29,6	_	_	_	70,4	0,0	0,0	4,0
	1h	24,8	_	_	_	73,6	0,5	1,1	4,8
	1 dia	19,2	_	_	_	75,9	2,8	2,2	6,4
	30 dias	13,0	_	_	_	77,8	5,7	3,5	7,9
Ti6Al4V	0	27,1	4,0	0,0	_	68,9	0,0	0,0	4,1
	1dia	26,3	3,5	0,0	_	70,8	0,2	1,2	5,2
	30 dias	22,8	1,1	0,0	_	71,1	2,6	2,4	6,9
Ti50Ni	0	28,3	_	_	4,9	66,8	0,0	0,0	5,5
	1dia	28,7	_	_	3,5	67,0	0,3	0,5	5,5
	30 dias	27,4	_	_	0,3	68,8	1,4	2,1	6,1



As ligas de Ti-50Ni no mesmo trabalho demonstraram, ao final de 30 dias de imersão na mesma solução, redução de níquel na superfície, no entanto, a adsorção de cálcio e fósforo foi ainda menor causando maior deficiência na proporção Ca/P comparada à relação cálcio/fósforo de uma apatita biológica que é de 1,63:1. Esta relação só foi alcançada pela amostra de titânio pura [3].

Os implantes dentais de titânio representam uma alternativa segura na reabilitação oral de pacientes edêntulos, estando seu uso amplamente consolidado na prática clínica e fundamentado em uma vasta literatura científica. Os estudos mais recentes sobre a osseointegração têm sido direcionados no sentido de se obter altas taxas de sucesso clínico, sobretudo em sítios ósseos de menor densidade, e em abreviar o tempo necessário para submeter os implantes a cargas funcionais [5]. Nesse contexto, a superfície do titânio desempenha um papel fundamental.

## **2.2 A Superfície dos Implantes de Titânio**

### **2.2.1 Tratamentos de Superfície, Rugosidade e Molhabilidade**

O tratamento de superfície tem como objetivos: reduzir o tempo de carregamento após a cirurgia, acelerar o crescimento e a maturação óssea para permitir o carregamento imediato, aumentar a estabilidade primária, garantir o sucesso dos implantes quando instalados em regiões que apresentam um osso com menores qualidade e quantidade, obter o crescimento ósseo diretamente na superfície do implante, obter maior área possível de osseointegração, obter contato osso-implante sem a interposição de camadas protéticas amorfas, atrair células osteoblásticas, pré-osteoblásticas e mesenquimais, atrair proteínas de ligação específicas para células osteogênicas (fibronectina) e obter maior concentração possível de proteínas de ligação celular.

Diversos estudos têm demonstrado que modificações na superfície do titânio podem induzir diferentes tipos de interação celular na interface entre o

tecido ósseo e o implante, resultando em um maior grau de aposição óssea [6,7,8,9 e 10]. Segundo estes autores, propriedades como hidrofília, rugosidade e carga iônica de superfície parecem influenciar os processos iniciais da osseointegração, tais como a adsorção de proteínas, a interação bioquímica entre a célula e a superfície do implante e a proliferação celular sobre o titânio. Vários processos têm sido empregados com o objetivo de modificar estas características, tais como tratamentos por imersão e soluções ácidas, jateamentos, revestimento com fosfatos de cálcio, filmes obtidos por técnicas sol-gel, tratamentos alcalinos com condensação térmica, tratamentos térmicos, oxidação eletroquímica, deposições química e física por vapor, deposições por feixe iônico e implantação de íons, cobertura com plasma spray, deposição de fosfato de cálcio e hidroxiapatita [11].

Com o advento da osseointegração que consiste, de acordo com Branemark et al. 1977 [12], na união anatômica e funcional direta entre a superfície do implante e o osso remodelado passando o mesmo a incorporar, permanentemente, o elemento sintético, é possível a utilização de implantes osseointegráveis com um certo grau de previsibilidade e sucesso a longo prazo.

Para a obtenção de uma perfeita integração entre metal e osso, devem ser considerados vários fatores que podem levar ao insucesso da terapia, dentre eles estão a condição sistêmica do paciente, o tabagismo, a qualidade óssea, a experiência do profissional, o trauma cirúrgico, os procedimentos cirúrgicos inadequados, a utilização inadequada de antibióticos no pré e no pós-operatório, a pressão da prótese durante a cicatrização, a infecção bacteriana durante ou após a cirurgia, o carregamento inicial impróprio, o planejamento incorreto da prótese, a sobrecarga oclusal e a atividade parafuncional. Entretanto geralmente o trauma excessivo durante os procedimentos cirúrgicos, a capacidade de cicatrização prejudicada, o carregamento prematuro e a infecção bacteriana são os fatores mais significantes [13,14,15].

Nos últimos anos, os pesquisadores têm buscado introduzir alterações físico-químicas no titânio, desenvolvendo novos métodos de tratamento de

superfície, com o objetivo de aumentar a bioatividade dos implantes com o meio biológico evitando as desvantagens clínicas dos recobrimentos de hidroxiapatita, como descolamentos da interface recobrimento/implante [16,17,18].

Os critérios de sucesso para implantes odontológicos são: imobilidade clínica, capacidade em absorver e transferir carga para o osso adjacente uniformemente, ausência de sintomas clínicos, ausência de danos às estruturas vizinhas, radiolucidez peri-implantar estável e perda mínima da altura da crista óssea [19].

Os autores LEE et al. 2005 [20] comentam que a área de contato entre osso e implante pode ser aumentada com tratamentos superficiais, melhorando a estabilidade inicial, e o prognóstico em osso de baixa qualidade. A forma do implante geralmente simula uma raiz dentária, e este aspecto tem efeito na biomecânica do implante. Implantes cônicos parecem apresentar maior dissipação de tensão que implantes cilíndricos. Roscas com formato de V têm sido utilizadas para aumentar a superfície de contato e melhorar a estabilidade inicial. Acredita-se que a geometria da rosca apresenta um efeito positivo na biomecânica dos implantes. Alguns estudos mostram que o formato retangular de rosca não é favorável na cirurgia de implante. Foi demonstrado que na comparação do efeito do tamanho e forma do implante, a forma tem mais influência na distribuição de tensão no osso circundante que o tamanho do implante.

Os implantes de titânio com superfícies usinadas têm apresentado bons resultados clínicos durante décadas. Entretanto, as indústrias têm substituído a produção destes implantes por implantes com superfícies tratadas. O principal motivo baseado em estudos experimentais é a possibilidade de aplicar carga mastigatória com tempos mais curtos. Os implantes com superfícies modificadas permitem reduzir o tempo de ativação recomendado em relação os implantes usinados devido a capacidade que estes implantes têm de promover uma melhor estabilidade mecânica através da maior área de contato superficial; e a maior retenção da fibrina do coágulo sanguíneo pelos picos das rugosidades [21].

Davies J., 2003 [21] mostrou esquematicamente como a rugosidade superficial pode alterar o processo de migração celular e conseqüentemente o padrão de cicatrização inicial durante a osseointegração. A figura 2.3 representa da esquerda para a direita que o aumento gradativo e adequado da rugosidade da superfície facilita o comportamento adequado das células. As fibrinas do coágulo em formação na ferida conseguem se manter aderidas à superfície embora muitas vezes as células durante o seu movimento em direção a superfície do implante possam produzir diferentes magnitudes de força de tração sobre essas fibrinas. Isso pode muitas vezes fazer com que haja o rompimento da ligação da fibrina com a superfície e com isso a impossibilidade das células em alcançar o implante.



Figura 2.3 Influência da topografia da superfície no comportamento das células [21].

A melhor estabilidade mecânica apresentada pelos implantes com superfícies tratadas segundo a justificativa usada pela indústria possibilitaria a ativação precoce do implante, com maior segurança durante as fases iniciais do processo de cicatrização óssea [22].

Mostrou-se que grande parcela dos implantes com superfície usinada e sem tratamento é perdida nos períodos iniciais de cicatrização. De todas as falhas, 47% acontecem no período prévio à instalação das próteses e 70% ocorrem durante o seu primeiro ano de uso [14].

Com base nos conceitos existentes na Ciência dos Materiais, é possível variar a estabilidade primária e secundária dos implantes endósseos. A

estabilidade primária depende da forma e da morfologia superficial do implante. A estabilidade secundária depende principalmente das características superficiais do implante. Por meio de técnicas metalográficas é possível identificar as diferenças das superfícies dos implantes comerciais. As diferenças podem ser quanto à rugosidade, composição química, energia superficial, potencial químico, segregação de hidretos e nitretos, nível de encruamento, presença de compostos metálicos e não metálicos e existência de impurezas advindas da fabricação ou manuseio, tipo de óxido de titânio, estrutura cristalina do óxido e espessura da camada de óxido. Esta análise é importante uma vez que as proteínas interagem com os óxidos da superfície do implante e a interação depende destes parâmetros.

Outro fator importante é como a qualidade do acabamento do implante influencia o sucesso da cirurgia. Durante a fabricação dos implantes, as propriedades químicas, físicas, mecânicas e microestruturais do titânio devem ser consideradas. A composição química e a espessura da camada de óxido devem apresentar propriedades adequadas para facilitar a osseointegração, pois do contrário, podem causar o insucesso da terapia. A presença de artefatos e tensões residuais heterogêneas provenientes do processo de usinagem e o tratamento inadequado da superfície dos implantes são também prejudiciais para o êxito da osseointegração. Atualmente, existe um grande esforço da comunidade científica, empresas e profissionais para se estabelecer uma superfície ideal, que diminua o tempo da osseointegração e que permita menor número de intervenções cirúrgicas otimizando o tratamento. A variedade de técnicas e modificações de desenho tem sido propostas para melhorar a estabilidade primária em osso trabecular de baixa densidade.

O protocolo cirúrgico para inserção dos implantes osseointegráveis é realizada em 2 tempos, com um intervalo entre a instalação do implante e a ativação do mesmo de três a seis meses, ou seja, as cargas funcionais são aplicadas após um tempo de espera. Este procedimento é utilizado para impedir a micromovimentação do implante, que pode levar a formação de tecido fibroso e impedir o contato direto osso-implante. Por muito tempo, acreditou-se que uma carga prematura poderia por si mesma, induzir a

formação de tecido fibroso. Tal fenômeno pode alterar a reação das células pelo desprendimento da célula do material, ou pode levar a deformação dos osteoblastos fixados na superfície por tensão [23]. Esses autores sugeriram que os valores de tolerância para a micromovimentação deveriam estar entre 50 e 150  $\mu\text{m}$ .

No processo de osseointegração, dois fatores desempenham uma importante função: estabilidade primária (estabilidade mecânica) e estabilidade secundária (estabilidade biológica). Estabilidade secundária é o resultado do processo biológico de cura, e, portanto, não estão sob o controle direto do clínico. A Figura 2.4 mostra a estabilidade primária e secundária em função do tempo, para um processo de osseointegração de um implante sem tratamento de superfície.

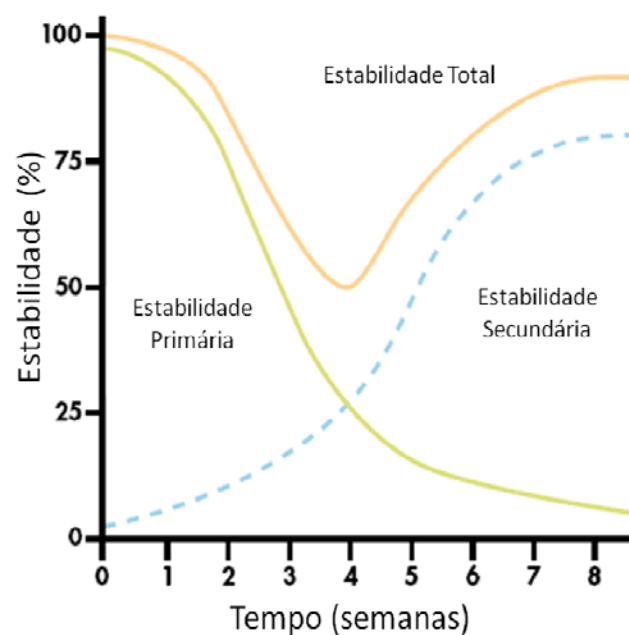


Figura 2.4 Diminuição da estabilidade primária e aumento da estabilidade secundária o que resulta num diminuição da estabilidade total entre a semana 2 e 4 [96 - Adaptado].

A estabilidade secundária plena depende de vários fatores, o mais significativo de todos é a velocidade do processo de osseointegração, que pode ser aumentada com a modificação da superfície do implante. O objetivo

no desenvolvimento dos tratamentos de superfície é alcançar estabilidade secundária mais cedo e com isso acelerar o processo de osseointegração. A Figura 2.5 mostra a estabilidade secundária de um implante em função do tempo de implantação com superfície modificada quimicamente.

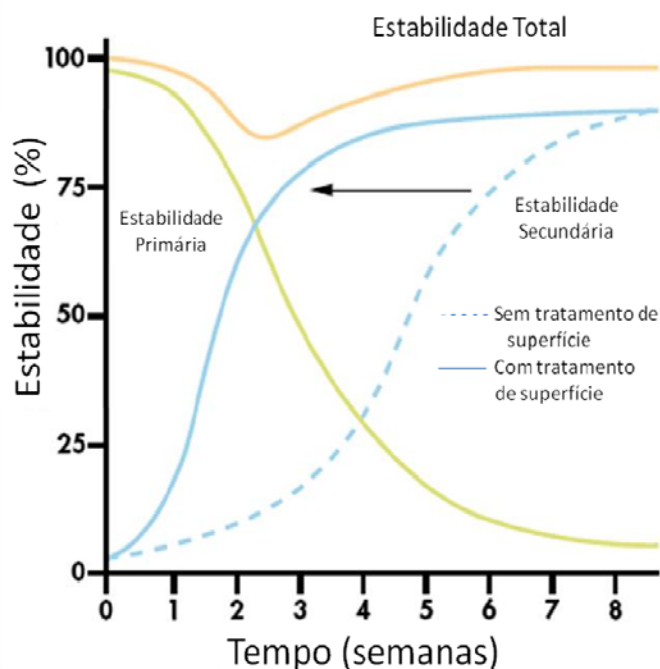


Figura 2.5 Estabilidade secundária precoce (entre 2 e 4 semanas) em função do tempo para implante com tratamento de superfície [96 - Adaptado].

Existe uma tendência na implantodontia em diminuir o tempo de cicatrização para aplicação de carga no implante diminuindo o desconforto do paciente com a utilização de próteses provisórias, assim foi desenvolvida a técnica de carga imediata. A boa estabilidade primária é um pré-requisito essencial para a utilização dessa técnica. Entre os fatores que afetam a estabilidade primária, conseguida no momento da instalação dos implantes, destacam-se a densidade óssea, a forma do implante, a técnica cirúrgica, o torque de instalação e a instrumentação. Modificações nas superfícies do implante têm sido realizadas para diminuir o tempo de osseointegração dos

implantes. A influência do tipo de superfície do implante na estabilidade primária ainda não está bem estabelecida.

Os tratamentos superficiais são realizados com o objetivo de aumentar a ligação química e mecânica entre o implante e osso. Uma superfície com rugosidade ideal é a almejada para que ocorra a deposição de matriz e crescimento do tecido ósseo em íntimo contato com o osso.

De acordo com Sul Y.T., 2002 [24], a cicatrização ao redor do implante usinado ocorre através de um processo de mineralização gradual do osso ao implante. As células em contato com a rosca permitem a mineralização óssea, mas o titânio não age como indutor [25]. O tempo de cicatrização para implantes odontológicos sem tratamento superficial é maior do que os implantes com tratamentos superficiais. Em superfícies lisas, os processos biológicos na interface osso/implante são mais lentos, e as propriedades da camada de óxido naturais levam mais tempo para ser afetada. Para minimizar o tempo de mineralização, tratamentos superficiais são realizados. Este procedimento acelera os micromecanismos de adesão celular entre o implante e o osso. Para acelerar o micromecanismo de ligação química do implante ao osso são utilizados materiais bioativos, os quais facilitam a formação de pontes de cálcio e fósforo. A espessura da camada de óxido dos implantes de titânio sofre pequeno aumento com o tempo e incorpora íons de Ca, P, S do meio fisiológico [26].

O pesquisador canadense Davies J, 2003 [21] demonstrou que a mudança da rugosidade da superfície do implante aumenta a área ativa para a osseointegração e promove maior estabilidade na ligação mecânica das fibras do coágulo sanguíneo com a superfície do implante.

Existem várias maneiras de alterar a rugosidade de uma superfície de implante, Guéhenec L.L. et al., 2006 [5] fizeram uma revisão dos diferentes métodos usados para aumentar a rugosidade da superfície e a aplicação de recobrimentos osteocondutivos em implantes dentários. Tal estudo se faz relevante, uma vez que, a taxa de osseointegração dos implantes dentários de titânio está relacionada com sua composição e rugosidade superficial. Os implantes com superfície rugosa favoreceram a ancoragem óssea e a



estabilidade biomecânica. Recobrimentos osteocondutivos de fosfato de cálcio propiciam a cicatrização e promovem aposição e cicatrização óssea, permitindo uma rápida fixação biológica dos implantes. Em seu trabalho, Guéhenec L.L. [5] e colaboradores descreveram as morfologias de implantes submetidos a tratamentos superficiais, tais como a plasma-spray de titânio, jateamento com sílica, ataque ácido, revestimentos com fosfato de cálcio e anodização. A maioria destas superfícies está disponível comercialmente e apresentaram bom prognóstico clínico (95% em 5 anos). Os autores revisaram as superfícies citadas e concluíram que a composição química da superfície e a topografia no estágio inicial de osseointegração em implantes dentários ainda não são amplamente conhecidas. Além disso, estudos clínicos comparativos com diferentes superfícies do implante não são tão bem explorados.

Os trabalhos de pesquisas mostram que a rugosidade da superfície dos implantes afeta a osseointegração e a estabilidade mecânica do implante [27]. Alguns mecanismos envolvidos na osseointegração do implante variam com a morfologia da superfície, uma vez que as células reagem de modo diferente no contato com superfícies lisas e com superfícies rugosas. Fibroblastos e células epiteliais aderem com maior intensidade em superfícies lisas e a capacidade de proliferação de osteoblastos e a síntese de colágeno é maior em superfícies rugosas.

Podemos definir a rugosidade como o conjunto de pequenas saliências (picos) e reentrâncias (vales) existentes na superfície em relação a um plano de referência ou plano imaginário. Para medir a rugosidade empregam-se aparelhos mecânicos ou eletrônicos, a exemplo do rugosímetro, também denominado perfilômetro, o qual pode ser “de contato” ou com “feixe de laser”. O emprego do rugosímetro de contato (mecânico) apresenta algumas limitações, entre elas os valores das alturas dos picos e profundidades dos vales ficam limitados à forma da ponta de medida do rugosímetro. É possível também avaliar a rugosidade por meio da microscopia de força atômica. No entanto, esta última técnica fica limitada à determinação de alguns parâmetros em pequena região [27].

O sinal da rugosidade apresenta altas freqüências e pequenos comprimentos de onda. As ondulações e demais erros de forma apresentam sinais com baixas freqüências e altos comprimentos de onda. Os rugosímetros utilizam filtros que deixam passar os sinais de alta freqüência e eliminam os sinais de baixa freqüência.

Os principais parâmetros de amplitude (pico-vale) para medir os desvios verticais em relação à superfície ideal são listados abaixo e representados no esboço da Figura 2.6.

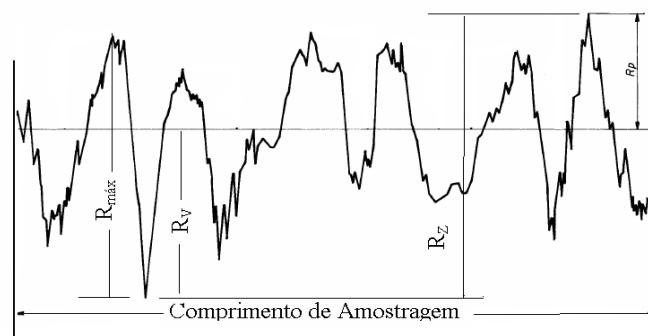


Figura 2.6 Esboço representando os parâmetros da rugosidade  $R_a$ ,  $R_v$ ,  $R_z$  e  $R_p$  [28].

- $R_a$ : Rugosidade média (roughness average, center line average ou arithmetical average). Média das amplitudes em relação a uma linha de referência. Este parâmetro quantifica a média da distância vertical entre os cinco maiores picos e cinco maiores vales. A ABNT recomenda o parâmetro  $R_a$  para avaliação da rugosidade (em  $\mu\text{m}$ ).  $R_a$  é um valor médio, às vezes, não indica o estado da superfície e é útil quantificar outros parâmetros de rugosidade.
- $R_z$ : Rugosidade Média. É a média aritmética dos cinco valores da rugosidade parcial  $Z_i$ . A rugosidade parcial  $Z_i$  é definida como a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maiores afastamentos (acima e abaixo da linha média) existentes dentro de um comprimento de amostragem. Graficamente, este valor representa a altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil, dentro do comprimento de amostragem.

- $R_{m\acute{a}x}$ : Rugosidade máxima. É o maior valor das rugosidades parciais  $Z_i$ , que se apresenta no percurso de medição. Na Alemanha, a norma DIN 4762 indica um parâmetro semelhante ao  $R_{m\acute{a}x}$  para medição de rugosidade superficial e é designado por  $R_y$ .  $R_y$  é a máxima distância entre o maior pico e o maior vale dentro do comprimento de avaliação.
- $R_p$  ou  $Z_p$ : altura máxima do pico mais elevado da rugosidade, situado acima da linha média.
- $R_v$  ou  $Z_v$ : profundidade do maior vale do perfil

Apesar da importância da rugosidade da superfície dos implantes dentais na osseointegração, não existem normas para quantificar a rugosidade dos implantes. O procedimento adotado tem sido o emprego dos mesmos parâmetros usados na engenharia. Além disto, os trabalhos disponíveis na literatura analisam apenas alguns parâmetros da rugosidade e inexistem uma explicação conclusiva da influência de cada um destes parâmetros na osseointegração.

O aumento na altura dos picos das medidas de rugosidade frequentemente, mas não sempre demonstra aumento no comprimento da onda. No entanto, se a variação na altura da rugosidade ou no comprimento da onda é mais importante para melhorar a incorporação do implante pelo tecido ósseo, em relação aos outros parâmetros de rugosidade, isto ainda é desconhecido [28]. Höstner C.H., 2001 [29] concluiu que os parâmetros de altura das rugosidades de uma superfície são mais importantes para uma forte resposta óssea do que os parâmetros de onda. Superfícies que possuem estruturas iguais em todas as direções com respeito a tamanho e desvios espaciais são denominadas isotrópicas. Tratamentos que possibilitam produzir essas superfícies nas quais as irregularidades são aleatoriamente distribuídas incluem os jateamentos abrasivos, espargimentos de plasma, ataques químicos e oxidação anódica. Outros processos de produção tais como a usinagem produzem irregularidades com diferentes e preferenciais direções: as chamadas superfícies anisotrópicas. Superfícies isotrópicas obtêm melhores

reações ósseas e uma osseointegração mais resistente comparadas às reações produzidas pelas superfícies anisotrópicas [29].

Muitos estudos em relação à rugosidade de uma superfície de implante têm sido explorados por mais de uma década. O implante com forma de parafuso idealizado por Brånemark (Nobel Biocare) era um dispositivo torneado com rugosidade mínima de superfície aceitável, variando entre 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  quantificada pelo parâmetro  $S_a$ . Por muitos anos este implante foi um padrão adotado pela maioria dos cirurgiões, principalmente devido à taxa de sucesso clínica relatada de 95% em 5 anos [30]. Contudo, a partir de meados dos anos 90 a maioria dos relatos científicos passou a apontar uma nova tendência das rugosidades produzidas nos tratamentos de superfície. Os implantes com rugosidade intermediária ( $S_a$  em torno de 1,5  $\mu\text{m}$ ) demonstravam melhor resposta óssea frente aos implantes com superfícies mais “lisas” (usinadas) e aos implantes muito rugosos. Os implantes com superfícies muito rugosas são aqueles que apresentam um valor de  $S_a$  maior que 2,0  $\mu\text{m}$  e são representados por implantes cujas superfícies são tratadas por *plasma-spray* de óxido de titânio ou hidroxiapatita. A Tabela 2.2 mostra os diferentes tipos de superfície dos implantes comerciais com suas principais características.

Tabela 2.2 Características de diferentes superfícies de implantes comerciais quanto à rugosidade [31].

RUGOSIDADE $S_a$	USO CLÍNICO	BENEFÍCIOS POTENCIAIS	RISCOS POTENCIAIS
0,0 – 0,4 $\mu\text{m}$ (lisas)	Abutments, certos implantes experimentais “usinados”.	Nenhum, se usado para ancoragem óssea.	Muito liso para adequada osseointegração.
0,5 – 1,0 $\mu\text{m}$ (minimamente rugosas)	Implantes torneados, Osseotite e os mais usados implantes antes de 1995.	A mais longa documentação clínica entre todos os implantes.	Menos perdidos por cirurgiões pouco treinados?
1,0 – 2,0 $\mu\text{m}$ (moderadamente rugosas)	Tioblast, SLA, TiUnite, Frialit - 2, maioria dos implantes atuais.	Forte resposta óssea, tendência a melhores resultados que os usinados	Muitos, mas não todos, têm somente acompanhamentos clínicos de curto prazo.
> 2,0 $\mu\text{m}$ (rugosas)	Titânio plasma-spray, implantes cobertos com hidroxiapatita.	Positiva documentação após 5 anos.	Aumento da incidência de peri-implantite.

É importante salientar que uma grande resposta óssea nem sempre significa uma elevada taxa de sucesso a médio e longo prazo. A literatura científica relata vários casos de alta incidência de periimplantite, (processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor do implante osseointegrado em função, resultando em perda de suporte ósseo) associada aos implantes de superfície muito rugosa (superfícies tratadas por plasma-spray – Sa maior que 2,0  $\mu\text{m}$ ). Por outro lado, os implantes com superfícies moderadamente rugosas como o Tioblast® (Astra Tech) não mostraram aumento na incidência de periimplantite e alguns de fato mantiveram os níveis de altura da crista óssea em estudos de 2 anos, Palmer R. et.al., 1997 [32] e de 4 anos de acompanhamento, Norton M.R., 1998 [33]. Implantes Frialit-2® (superfícies moderadamente rugosas) mostraram maior contato osso-implante após 12 semanas de cicatrização quando comparados aos implantes revestidos por plasma-spray de titânio. Mesmo que a diferença de 10% de contato osso-implante encontrada com os implantes Frialit-2® não tenha sido estatisticamente significativa, o resultado apontou uma resposta óssea melhorada mesmo com o fato dos implantes terem sido instalados em sítios de peri-implantite induzida [34]. Esse resultado demonstra a capacidade dos implantes com superfícies moderadamente rugosas de provocar uma melhor resposta dos tecidos ósseos durante a cicatrização em relação aos implantes com superfícies muito rugosas.

Davies J, 2003 [21] sugere que a topografia de superfície exerça grande influência nos primeiros estágios de cicatrização comparada ao papel desempenhado pela composição química da superfície dos implantes de titânio. As rugosidades da superfície promovem, segundo ele, uma resposta cicatricial melhorada, pois auxiliam na retenção das fibrinas do coágulo em formação durante os estágios iniciais da cicatrização. Durante esses estágios, pode ocorrer a migração de células mesenquimais indiferenciadas, células osteoprogenitoras e células osteogênicas remanescentes da parede óssea, as quais durante a sua movimentação promovem tensões de tração sobre a rede de fibrina. O tipo de rugosidade pode então estabelecer precocemente uma matriz tridimensional de fibrina cujo travamento mecânico na superfície pode

ser mais resistente à tração comparado às superfícies mais lisas. Uma vez que a matriz do coágulo tenha sido estabelecida nesse padrão de superfície, ela fornece pontes seguras através das quais as células osteoprogenitoras podem migrar da margem óssea remanescente e atingir a superfície do implante [21].

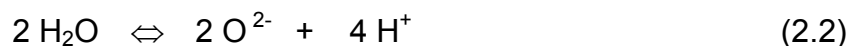
No Brasil um grupo de pesquisadores da Universidade de Guarulhos [35] realizou um estudo de caso com seres humanos, onde foi comparada uma superfície usinada e outra anodizada (Vulcano Actives<sup>®</sup>, Conexão - Sistema de Próteses). A pesquisa mostrou que o implante anodizado após 3 meses de cicatrização apresenta uma maior ancoragem do que o implante usinado. Foi observada também uma maior porcentagem de osso em contato com o implante anodizado. Os átomos das superfícies metálicas tratadas por anodização sofrem oxidação durante o processo eletrolítico induzido por um campo elétrico externo.

Durante o processo de oxidação anódica algumas reações químicas ocorrem simultaneamente na superfície do anodo. Elas podem ser distinguidas didaticamente em semi-reações conforme se segue:

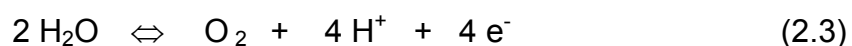
1 - Na interface titânio / óxido de titânio ocorre a formação de íons titânio segundo a semi-reação de oxidação abaixo;



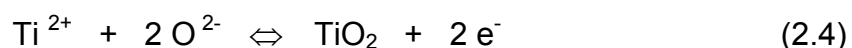
2 - Na interface óxido de titânio / eletrólito ocorre a dissociação da água e a posterior reação do oxigênio com o titânio para a formação do óxido segundo a semi-reação abaixo;



2.1 – Na interface óxido de titânio / eletrólito também ocorre a decomposição da água e a liberação de gás oxigênio, segundo a equação abaixo;



3 – Em ambas as interfaces ocorre a reação completa como na equação abaixo;



Os íons de titânio e oxigênio, formados pelas reações de oxi-redução acima, se movimentam através do óxido pela aplicação de um campo elétrico externo, levando ao crescimento da camada do óxido na superfície. Os íons metálicos ( $\text{Ti}^+$ ) difundem da interface metal-óxido em direção à interface óxido-eletrólito, enquanto os íons oxigênio difundem na direção oposta. Ao mesmo tempo em que ocorre a difusão iônica acontece a difusão eletrônica promovida pelo campo elétrico externo e pela diferença do potencial entre o eletrodo catódico e o eletrodo anódico.

A Figura 2.7 [36] mostra esquematicamente a estrutura da dupla camada elétrica formada na interface óxido-eletrólito. Observa-se também que pelo modelo sugerido ocorre o processo de oxidação conforme descrito pelas semi-reações representativas do processo de formação do óxido. Há formação de hidroxilas e posteriormente ocorrerá dissociação na superfície do titânio.

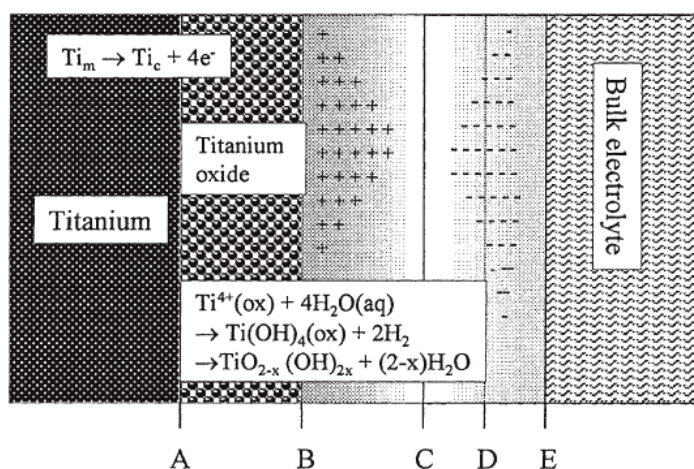


Figura 2.7 Perfil da superfície oxidada do titânio imersa em eletrólitos. (A) interface metal-óxido. (B-C) camada defeituosa de elétrons. (C) interface óxido-eletrólito. (D) linha da distribuição do gradiente de concentração. (D-E) concentração excessiva de ânions. Legendas: (m) metal, (c) cátions [36].

Existem duas categorias de reações de oxidação anódica induzidas pela aplicação de um campo elétrico externo. A primeira está relacionada ao

processo de oxidação anódica executado com valores de voltagem abaixo do limite de colapso da superfície do óxido (*breakdown limit*). Normalmente, este limite está situado por volta de 100 a 200 volts, dependendo de alguns parâmetros usados.

A característica principal da superfície de titânio obtida por meio de oxidação anódica abaixo do limite de colapso é a formação de cores vivas nas superfícies. As cores aparecem devido a interferência de luz pelas diferentes espessuras do óxido formado (alteração do índice de refração do meio) [36].

As reações de oxidação produzidas através de níveis elevados de voltagem (acima do limite de colapso) acarretam o aumento da rugosidade do óxido e o aparecimento de uma superfície com característica microtopográfica de aspecto poroso tridimensional. Além das alterações morfológicas ocorre o aumento substancial da espessura da camada de óxido formado, podendo chegar a vários micrômetros. As superfícies dos filmes de óxido formados por anodização do titânio com centelhamento (*spark anodized*) são porosos, rugosos e ao mesmo tempo não apresentam as pontas das rugosidades afiladas (como as superfícies produzidas pelos tratamentos com ácidos e jateamentos). A morfologia detalhada da superfície dependerá do tipo de eletrólito usado, assim como, de outros parâmetros do processo [37,38].

Existe uma superfície comercialmente disponível no mercado brasileiro, Vulcano Actives®, que é submetida ao tratamento de oxidação anódica em solução eletrolítica contendo cálcio e fósforo. O objetivo do tratamento é alterar as propriedades do óxido, mudar a topografia, alterar a rugosidade e a composição química com incorporação de cálcio e fósforo na camada superficial de óxido de titânio. Os filmes de óxidos de titânio crescidos em soluções ricas em Ca e P têm a função de acelerar o processo de osseointegração. A superfície submetida à oxidação anódica revelou a presença de cálcio e fósforo na superfície, além da presença de titânio e oxigênio. A superfície anodizada apresenta em relação à superfície usinada redução expressiva da concentração de titânio e aumento significativo da concentração de oxigênio. É possível afirmar que estas mudanças podem ser



atribuídas ao aumento da espessura do óxido com incorporação de cálcio e fósforo na camada superficial [39].

Um estudo realizado por Elias et.al. 2007 [40] mostrou que a superfície Vulcano Actives<sup>®</sup> da Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, SP – Brasil, apresenta valor de torque de remoção mais elevado do que a superfície usinada e jateada com TiO<sub>2</sub>, após serem inseridas em tíbias de coelhos por 12 semanas. Este comportamento é atribuído a maior união entre o osso novo e as microrugosidades na superfície do implante anodizado.

Um tratamento de superfície específico estudado por Amarante et al. 2001 [41] com superfícies modificadas com plasma de titânio (TPS) e jateados com sílica e tratados com ácido (SLA - **S**and-blasted, **L**arge grit, **A**cidetched), observaram que a porosidade não é condição para que haja deposição óssea, porém, apresenta um papel importante no percentual de aposição óssea na superfície do implante, assim como um aumento na velocidade dessa aposição. Os estudos apontaram para uma melhoria nesses parâmetros utilizando-se a superfície SLA. Os resultados mostram que a rugosidade e o tratamento químico das superfícies parecem atuar nas forças cisalhantes, principalmente avaliando o torque de remoção dos implantes. Assim, os autores observaram que as alterações na superfície dos implantes podem acelerar a osseointegração e permitir o carregamento mais precoce e a utilização em áreas com menor densidade ou auxiliar a aplicação em osso regenerado recentemente.

Um grupo de pesquisa brasileiro, coordenado por Elias et al. 2000 [42], verificou que não existe um padrão definido sobre a morfologia dos implantes e do tratamento da superfície ao avaliarem a qualidade da superfície do implantes de titânio. Concluíram que a energia superficial dos implantes e sua interação com as células estão relacionadas à interface do implante no osso, sendo que os revestimentos dos implantes influenciaram na bioadesão, e que para o titânio seu óxido é importante nessa ligação.

Outra equipe de pesquisadores coordenado por Zhu [43], investigou a influência da composição química e características dos óxidos de superfície de titânio no comportamento celular dos osteoblastos. Os óxidos de superfície do

titânio foram modificados quanto à composição e topografia mediante oxidação anódica com dois tipos de eletrólitos. Os experimentos de cultura de células demonstraram a ausência de citotoxicidade e o aumento na adesão de osteoblastos e proliferação das amostras realizadas por oxidação anódica. As células nas superfícies com microporos mostraram crescimento irregular e poligonal e mais lamelopodos, enquanto os osteoblastos das superfícies usadas como controle ou com óxidos produzidos em baixas voltagens mostraram mais fibras de tensão e intensos contatos locais. Os autores concluíram que a atividade da fosfatase alcalina (ALP) das células (são marcadores de formação óssea), não apresentou nenhuma correlação com as características das superfícies tratadas por oxidação anódica.

Ainda investigando o mesmo tratamento de superfície que Zhu 2004 [43], Li et al. 2004 [44] fizeram um estudo para avaliar a camada porosa formada na superfície do implante após o tratamento de oxidação anódica (OMA). A composição e a morfologia da camada do óxido eram dependentes da tensão aplicada durante o tratamento da oxidação. Com o aumento da voltagem, a atividade da fosfatase alcalina aumentou, enquanto que a taxa da proliferação celular diminuiu. Nos testes preliminares in vivo em coelhos, as amostras tratadas por oxidação, mostraram uma melhoria considerável em sua potencialidade de osseointegração, em comparação ao implante de titânio puro. Foi observado também que existe uma relação linear entre o aumento do potencial e a espessura da camada de óxido que se forma na superfície do implante. Em altos potenciais há o predomínio da formação do óxido rutilo e em baixos potenciais de anatase, como foi observado pelos espectros de raios-X. As composições químicas dos óxidos foram determinadas através de EDS. As concentrações de Ca, P e O aumentam com o aumento do potencial em contrapartida a concentração de Ti diminui.

Li J.-G et al. 2007 [45], utilizaram espectroscopia RAMAN para identificar o tipo de óxido formado na superfície de amostras nanocristalinas de titânio que foram sintetizadas via redox em condições hidrotermais (180 °C, 3h). Os picos de RAMAN que caracterizam o óxido rutilo são: 143,9; 236,6; 446,1 e 610  $\text{cm}^{-1}$ . Para o anatase: 145,6; 395; 514,2 e 642,5  $\text{cm}^{-1}$ . Foi observado que

fatores como temperatura e pH podem influenciar na formação do óxido superficial, valores de pH elevados e temperaturas baixas favorecem a formação de anatase.

Um estudo realizado por Sul Y.T. et.al. 2002 [46] em superfícies obtidas anodicamente (OMA) mostrou via espectroscopia de fotoelétrons (XPS) que a composição superficial do óxido de titânio crescido anodicamente em meio rico em Ca e P contem 10% de Ca, 8% de P, 20% de Ti. Notou que com o aprofundamento na camada de óxido, via bombardeamento iônico, os teores de Ca e P reduzem enquanto que o teor de Ti aumenta.

Outro tratamento de superfície com fluoreto foi realizado por Ellingsen et al. 2004 [47] e foi investigada como essa modificação poderia influenciar na resposta óssea após a implantação. Os implantes modificados por fluoretos apresentaram superfície com menor rugosidade do que os implantes controle (usinados). Os valores de torque de remoção e o limite de proporcionalidade entre o osso e o implante foram significativamente maiores para o grupo teste (fluoreto) em comparação aos implantes controle três meses após a implantação. As avaliações histomorfométricas demonstram maior contato osso-implante no grupo teste quando em comparação com o controle, um mês após a colocação. A modificação da superfície dos implantes, com uso de fluoretos, pode resultar em fenômenos morfológicos e físico-químicos significativos para a resposta óssea. Outra possível explicação para os resultados é que as mudanças na estrutura química da superfície podem ser mais favoráveis para a ligação óssea. Assim, baseados nos dados biomecânicos e histomorfométricos, implantes de titânio modificados com fluoretos demonstram uma ancoragem maior que os implantes de titânio não modificados. Esses implantes permitem uma maior integração com o osso que os implantes não modificados após um tempo curto de implantação.

Johansson et al. 2000 [48] analisaram as superfícies de implantes de titânio submetidos a um tratamento da superfície por jateamento com partículas de óxido de titânio e implantes semelhantes submetidos ao tratamento da superfície com fluoretos. Os autores concluíram que os implantes submetidos ao tratamento com fluoretos possuíam uma superfície levemente mais lisa do

que os implantes somente jateados. Embora as superfícies rugosas a um nível micrométrico possuam uma resposta biológica e físico-química melhorada, as superfícies mais lisas obtidas com o tratamento por fluoretos mostraram outras características importantes para a interação osso-implante. Uma dessas características é a maior capacidade destas superfícies reagirem ou adsorverem íons cálcio e fosfato e uma maior capacidade de ligação cálcio-fosfato à superfície, o que pode indicar aumento de capacidade da superfície reagir com os tecidos calcificados e criar uma integração entre o implante e o osso.

Com base em todas as alternativas apresentadas pelos pesquisadores observamos que a tendência atual é obter superfícies híbridas, morfologia com micro e nanorugosidade. Em alguns casos as empresas alteram a composição química da superfície do implante com a incorporação de cálcio, fósforo em escala nanométrica [47]. A Figura 2.8 mostra os tipos de superfícies osseointegráveis disponíveis no mercado brasileiro.

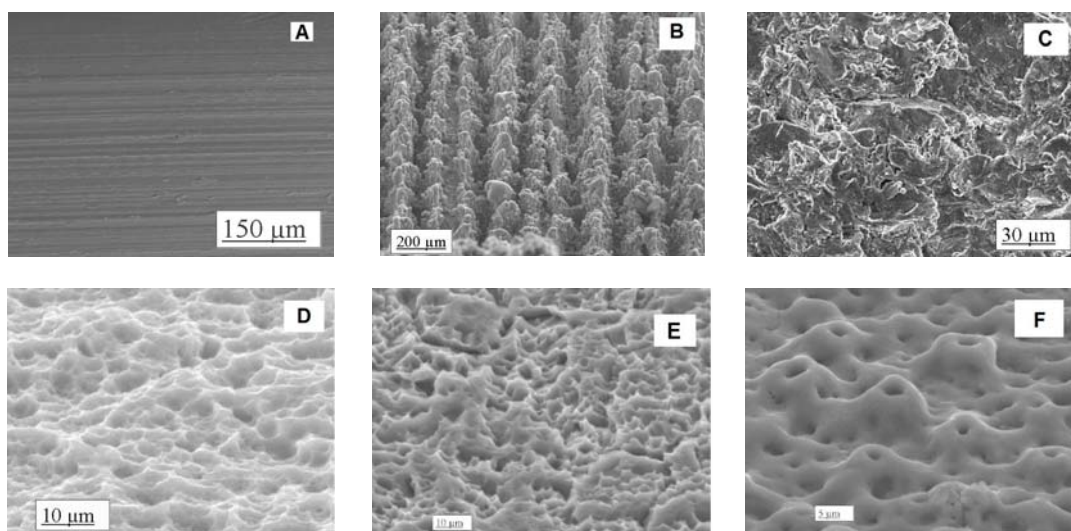


Figura 2.8 Superfícies características de implantes de titânio. (A) Usinado. (B) Plasma Spray. (C) tratado com laser. (D) jateado com óxido de titânio e ataque ácido. (E) duplo ataque ácido (Master Porous®). (F) anodizado (Vulcano Actives®).

Foi investigada a capacidade de implantes tratados com fluoretos de induzir a nucleação de fosfatos de cálcio sobre a superfície dos implantes mergulhados em solução tamponada de fosfato de cálcio. Monitorando a concentração dos íons nessa solução após a imersão dos implantes, qualquer queda nos níveis iônicos de cálcio indicaria que uma reação de nucleação de cristais de fosfato de cálcio estaria ocorrendo na superfície. O resultado mostrou que após a imersão dos implantes com superfície modificada pelos íons fluoreto nesta solução, ocorreu uma queda significativa nas concentrações de cálcio com o tempo, indicando que houve uma reação entre a superfície do implante e a solução de fosfato de cálcio [2].

Após o teste de nucleação, na análise em microscopia eletrônica de varredura da superfície foi possível observar que os implantes modificados pelos íons fluoreto apresentavam vários precipitados nucleados sobre sua superfície (Figura 2.9). Nos implantes com superfície não tratada os precipitados não foram identificados na análise com MEV. A análise química dos precipitados formados sobre as superfícies tratadas com flúor apresentou a presença de cálcio, fósforo e oxigênio, entretanto a estequiometria dos elementos não foi determinada [2].

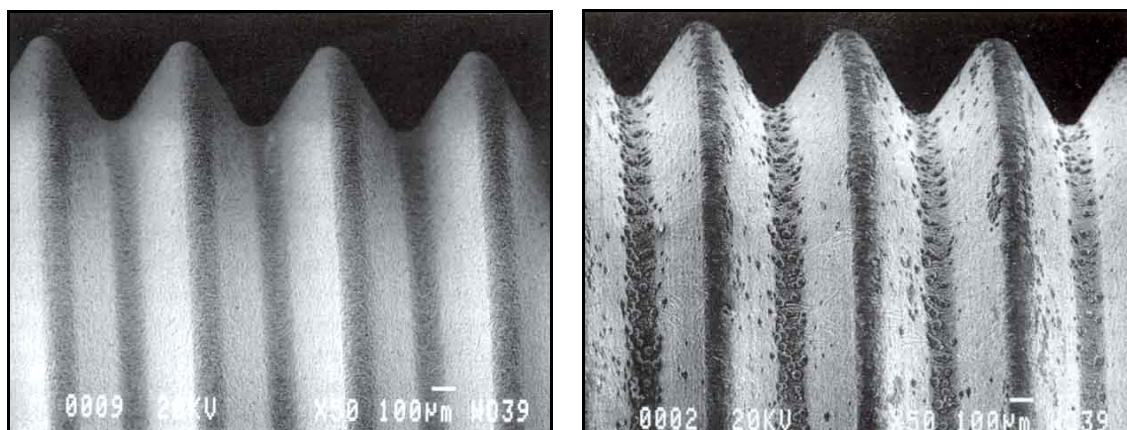


Figura 2.9 Superfície jateada e tratada com flúor antes da imersão na solução de SBF. À direita, após a imersão em SBF [2].

O efeito do tratamento de superfície dos implantes de titânio com íons fluoreto tem sido testado também em implantes com superfícies jateadas usando-se partículas de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) de diferentes granulações. Devido a sua rugosidade, uma maior retenção óssea tem sido documentada em relação às superfícies jateadas. É importante, portanto, esclarecer se uma modificação adicional da superfície com íons fluoreto poderia aumentar ou melhorar a interação osso-implante com relação aos implantes cujas superfícies já foram modificadas pelo processo de jateamento. Com tal finalidade três diferentes superfícies de implantes foram comparadas e investigadas quanto à resposta óssea: superfícies usinadas, superfícies jateadas e superfícies jateadas adicionalmente tratadas com íons fluoreto [49]. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos e após 60 dias de cicatrização, os animais foram sacrificados e determinou-se a resistência da interface osseointegrada dos implantes mediante a remoção por torque. Os resultados obtidos mostraram significativas diferenças entre os três grupos testados. Os implantes usinados apresentaram valor médio de torque de remoção de 17,2 Ncm, os jateados, uma média de 59,0 Ncm, já os implantes jateados tratados com íons fluoretos mostraram uma média de torque de remoção de 69,5 Ncm. Durante a realização das medidas de torque de remoção do grupo dos implantes com superfície modificada por fluoretos, pôde ser constatado um som particular semelhante ao som emitido por ocasião de uma fratura óssea. Este fato não pôde ser constatado durante a remoção dos implantes pertencentes aos outros dois grupos. Após o teste de torque de remoção foi constatada a presença de tecido mineralizado aderido à superfície dos implantes tratados com fluoretos, os quais não puderam ser encontrados na superfície dos implantes controles. A análise histológica do tecido aderido demonstrou se tratar de tecido ósseo que se formou em íntimo contato com a superfície do implante e que tal crescimento abrangia áreas mais extensas da superfície comparada aos implantes sem tratamento por fluoretos. Os resultados mostram fortes indícios da melhor resposta óssea das superfícies tratadas com íons fluoreto quando comparadas às superfícies usinadas e jateadas respectivamente [49].

O exato mecanismo através do qual a superfície dos implantes de titânio tratadas com os íons fluoreto induzem uma resposta óssea melhorada não está completamente elucidado. Entretanto, quando implantados no osso, a presença de fluoretos na camada de óxido superficial desses implantes e sua possível difusão pelos tecidos circundantes podem acarretar modificações que levam à uma reação melhorada com os tecidos calcificados do corpo. Os fluoretos, em baixas concentrações, possuem alguns efeitos benéficos para o tecido ósseo como, por exemplo, a incorporação aumentada de colágeno recém formado no interior da matriz óssea, o aumento da nucleação de cristais de apatita, o aumento da densidade de osso trabecular e a estimulação de células osteoprogenitoras *in vitro* [50].

O efeito do tratamento da superfície de implantes de titânio com íons fluoreto sobre a diferenciação osteoblástica *in vitro* e a formação óssea *in vivo* foi investigada paralelamente em estudo recente [51]. Neste estudo, células tronco mesenquimais foram cultivadas na superfície de discos de titânio jateados com e sem tratamento superficial por íons fluoreto. A eficácia do tratamento com íons fluoreto sobre as células foi avaliada *in vitro* pela mensuração da capacidade celular de adesão, proliferação e expressão de proteínas marcadoras dos estágios de diferenciação osteoblástica. Adicionalmente, a capacidade das superfícies tratadas com íons fluoreto de induzir uma resposta óssea melhorada foi testada *in vivo* pela instalação, em ratos, de implantes jateados com e sem tratamento de superfície. Os resultados mostraram que os implantes jateados e tratados com fluoretos foram capazes de induzir uma proliferação celular mais elevada e aumentaram a expressão de sialoproteína óssea e BMP-2 (proteína morfogenética).

A análise histológica mostrou que os implantes jateados modificados com fluoretos apresentaram a média de contato osso-implante de 55,45%. Esta média foi significativamente mais elevada quando comparada à média de contato osso-implante obtida com os implantes somente jateados (34,21%) [51].

Os mecanismos sugeridos para explicar os efeitos das superfícies modificadas por fluoretos sobre a formação óssea são possivelmente [51]:

1 - A ação positiva direta da liberação de baixas concentrações de fluoretos da superfície do implante sobre a proliferação e a diferenciação osteoblástica que poderia ser explicada pela indução de fosfatases ácidas sensíveis aos fluoretos, assim como a liberação de cálcio intracelular e também através de interações potenciais nos caminhos de sinalização dos fatores de crescimento;

2 – Os efeitos diretos da superfície modificada por fluoretos sobre a adsorção de proteínas e subsequente adesão celular;

3 – A adsorção de fosfato de cálcio pelas superfícies modificadas por íons fluoreto, o que poderia influenciar nas concentrações locais de cálcio e conseqüentemente o comportamento celular.

Os autores concluíram no estudo [51], que as superfícies jateadas modificadas por íons fluoreto foram capazes de aumentar substancialmente a formação óssea nos estágios iniciais de cicatrização em tíbias de ratos, o que foi em parte atribuído à melhor diferenciação das células tronco mesenquimais ao longo da linhagem osteoblástica.

O sucesso dos diferentes tratamentos de superfície disponíveis no mercado irá depender do comportamento das proteínas nas superfícies dos implantes de titânio. As propriedades relativas à adsorção e adesão, irão influenciar na resposta celular pós implantação e as superfícies com características hidrofóbicas e hidrofílicas apresentam comportamentos diferentes nas reações iniciais que ocorrem quando o implante entra em contato com o corpo. Nas superfícies hidrofóbicas, os sinais dos anticorpos predominam ao passo que nas superfícies hidrofílicas os sinais das trombinas e pro-trombinas são predominantes. Os resultados dos testes "in vitro" e "in vivo" indicam que a área da superfície de titânio, que ocorre o espalhamento de osteoblastos humanos, aumenta com a molhabilidade da superfície [52].

Além de tratamentos de superfície que alteram a topografia, existem tratamentos que buscam alterar a energia da superfície dos implantes. A molhabilidade da superfície é dependente da energia da superfície. Uma alta energia de superfície proporciona melhor molhabilidade e conseqüentemente melhor adsorção e deposição de moléculas inorgânicas como íons de Ca e P, e



moléculas orgânicas como proteínas, lipoproteínas e peptídeos sobre a superfície de  $TiO_2$ , potencializando a osseointegração. Estas interações provavelmente ocorrem por forças eletrostáticas entre grupos de aminoácidos com carga positiva e a superfície negativa de  $TiO_2$ , ou entre grupos de aminoácido com cargas negativas através de pontes de  $Ca^{++}$  que foram adsorvidas previamente pela superfície negativa de  $TiO_2$ . Através de um processo de jateamento com grânulos de areia e ataque ácido (SLA – Straumann AG, Waldenburg, Suíça), e o enxaguamento da superfície em uma atmosfera de  $N_2$  e contínuo armazenamento em uma solução isotônica de NaCl, conseguiu-se chegar a uma superfície com alto grau de molhabilidade (SLActive – Straumann AG, Waldenburg, Suíça) [53].

Diante dos diferentes métodos de tratamento de superfícies, podemos citar alguns utilizados pela indústria e comercializados no mercado nacional, como mostra a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Fabricantes de implantes x Tratamento de superfície e nomes comerciais [53].

Tratamento de superfície	Marca comercial
Ataque ácido	Osseotite (Biomet 3i); Master Porous (Conexão); Titamax (Neodent)
Ataque ácido e deposição de Ca P	NanoTite (Biomet 3i)
Jateamento com alumina	Ankylos (Dentsply)
Jateamento com $TiO_2$	Tioblast (Astra)
Jateamento com $TiO_2$ + tratamento com ácido fluorídrico	OsseoSpeed (Astra)
Jateamento com fosfato de cálcio	RBM (Lifecore)
Jateamento com areia e ataque ácido	SLA e SLActive (Straumann); Friadent plus (Dentsply)
Oxidação anódica	TiUnite (Nobel Biocare); Vulcano <sup>®</sup> (Conexão)

A molhabilidade de uma superfície (hidrofilia ou hidrofobia) é a medida do ângulo de contato de um líquido com a superfície. É uma das formas de quantificar a energia livre superficial dos sólidos ou a capacidade do líquido molhar o sólido. Quando o ângulo de contato é maior que 90 graus a superfície é hidrofóbica, por outro lado quando menor do que 90 graus a superfície é hidrofílica [54].

Mostram-se na Tabela 2.4 exemplos dos valores do ângulo de contato das superfícies de implantes com diferentes tratamentos.

Tabela 2.4 Valor médio e desvio padrão do ângulo de contato de líquidos com implantes [55].

	Água destilada	NaCl	Sangue
Usinado	94,70 ± 4,37	97,6 ± 6,92	103,38 ± 12,16
Ataque ácido	66,31 ± 8,31	73,0 ± 10,16	89,00 ± 17,32
Com fluoreto	64,97 ± 8,67	75,80 ± 9,45	85,82 ± 10,15
Jateado	69,86 ± 5,63	63,10 ± 3,9	79,61 ± 12,31
Anodizado	5,61 ± 1,84	15,59 ± 5,63	25,82 ± 4,15

Os valores do ângulo de contato se alteram bastante nas superfícies de implantes com diferentes tratamentos, a superfície anodizada do implante em contato com os líquidos é mais hidrofílica do que as demais superfícies apresentando ângulo de contato em água destilada de 5,61° em NaCl 15,59° e em sangue 25,82°. Comparando esses valores com a superfície contendo fluoretos observamos que em água destilada o valor é de 64,97°, em NaCl 75,80° e em sangue 85,82. Já a superfície usinada apresenta ângulo de 94,70° em água destilada, 97,60° em NaCl e 103,38° em sangue. Os resultados mostram que quanto maior o ângulo mais hidrofóbica é a superfície o que diminui a velocidade com que as reações biológicas no processo de osseointegração acontecem [55].

Quanto maior a interação do líquido com a superfície, maior é o achatamento da gota (Figura 2.10). A gota colocada em uma superfície inclinada poderá movimentar-se ou não em função da intensidade da força de atração entre os átomos do líquido e do sólido. Na situação de equilíbrio, a relação entre as energias dos átomos da superfície do sólido com o líquido ( $\gamma_{SL}$ ), a energia na interface do sólido com o vapor ( $\gamma_{SV}$ ) e a energia superficial líquido-vapor ( $\gamma_{LV}$ ) são correlacionadas pela equação proposta por Young:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} \cos\theta \quad (2.5)$$

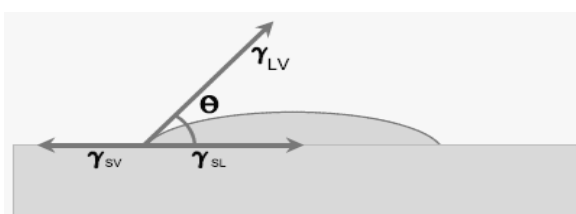


Figura 2.10 Método estático de avaliação da molhabilidade da superfície dos materiais [56].

Nesta equação, o valor de  $\theta$  representa o ângulo de contato. O ângulo de contato, medido experimentalmente em goniômetro, é o parâmetro empregado para quantificar a molhabilidade [55].

No trabalho realizado por Baier e Meyer, 1988, citado por Coutinho M.P e Elias C.N., 2009 [55] foi relacionada a tensão superficial crítica dos implantes com a biocompatibilidade. Segundo estes autores, materiais com alta energia livre superficial adsorvem mais facilmente macromoléculas e possuem maior número de sítios favoráveis para permitir ligações das células. A regra geral é que materiais com tensão superficial entre 20 e 30 dinas/cm<sup>2</sup> exibem baixa bioadesão e os materiais com valores de tensão superficial superiores a esta faixa apresentam melhores resultados para a osseointegração.

Lim Y.J. e colaboradores, 2001 [57,58] investigaram o efeito dos tratamentos da superfície sobre o ângulo de contato. Nesses trabalhos foram usadas diferentes soluções: água destilada, solução de NaCl, suspensão de células neutrofílicas humanas e uma suspensão de células do tipo osteoblástica (MG-63). Com os resultados foi possível identificar uma fase

cristalina do óxido formado sobre as superfícies que demonstraram comportamento hidrofóbico. Essa fase identificada foi o rutilo (tetragonal). No entanto, o óxido formado sobre as superfícies que demonstraram um comportamento hidrofílico era composto por uma mistura de fases cristalinas de rutilo e anatásio (ambas tetragonais). Sendo assim, levando-se em conta a relação entre a energia de superfície e molhabilidade, os autores sugerem que a energia de superfície representada pela medida de ângulo de contato para o titânio e suas ligas deve estar relacionada ao tipo de estrutura cristalina presente na camada dos seus óxidos. Os resultados também mostraram uma correlação entre ângulo de contato e a rugosidade. Quando o ângulo medido é maior que  $45^\circ$  o ângulo de contato aumenta linearmente com a rugosidade avaliada e quando o ângulo medido é menor que  $45^\circ$  o ângulo de contato decresce linearmente com a rugosidade.

Uma vez que os implantes dentários representam alternativas para reabilitação oral, de fácil acesso, torna-se prudente afirmar que o clínico pode se deparar com um paciente portador de baixa densidade óssea o que de acordo com Pan et al. 2000 [59] parece acarretar em um menor contato entre o osso e o implante assim como menor qualidade e quantidade deste tecido ósseo. Assim, é importante estudar alterações nas superfícies dos implantes que induzam a osseointegração mais rápida. Apesar de existirem na literatura diversos resultados obtidos nas pesquisas com implantes osseointegráveis existem dúvidas quanto aos reais micro-mecanismos envolvidos na formação da união entre o osso e o titânio, principalmente em relação à necessidade ou não da presença de algum estímulo elétrico ou mecânico para induzir a ligação óssea [60,61].

Elias e colaboradores [62] analisaram os sistemas de implantes Nobel Biocare (TiUnite), Conexão Sistema de Prótese (Vulcano Actives), 3i (Osseotite) e Neodent (Porous). As análises das morfologias das superfícies mostraram que os implantes da Nobel Biocare e da Conexão são semelhantes e os valores dos torques de remoção dos implantes das tíbias de coelhos 12 semanas após a cirurgia foram 72 N.cm e 62 N.cm, respectivamente. Os valores do torque de remoção dos implantes da 3i e da Neodent apresentaram

valores inferiores aos dois primeiros sistemas, 45 N.cm e 51 N.cm, respectivamente, a queda no torque de remoção foi atribuída à presença de cavacos de usinagem na superfície dos implantes o que comprometeu a resistência da interface osso/implante.

De acordo com ELIAS et. al. [54], a superfície Vulcano Actives® da Conexão Sistema de Prótese, apresenta valor de torque de remoção mais elevado (83 N.cm) do que a superfície usinada (57 N.cm) ou jateada com TiO<sub>2</sub> (72 N.cm), após serem inseridas em tíbias de coelhos por 12 semanas. Este comportamento é atribuído a maior união entre o osso novo e as microrugosidades na superfície do implante Vulcano. Actives®.

Um estudo [63] realizado com coelhos comparou o torque de remoção de implantes comerciais com superfícies modificadas em períodos de 3 e 6 semanas. Foram comparadas superfície com incorporação de íons Mg; o implante comercial TiUnite® e o Osseotite®, este possui duplo ataque ácido. Três semanas após as cirurgias o implante com Mg apresentou maior torque de remoção (27 N.cm) enquanto o TiUnite® e o Osseotite® apresentaram 21 N.cm e 15 N.cm, respectivamente. A porcentagem de contato ósseo foi maior para o implante contendo Mg, 29% enquanto o TiUnite® e Osseotite® 18% e 15%, respectivamente. Com seis semanas as diferenças não foram tão significativas quanto ao torque de remoção, 37,5 N.cm para o implante Mg, e 36,5 N.cm para o implante TiUnite® e 28 N.cm para o Osseotite®. No entanto a porcentagem de contato ósseo foi bem maior para o implante com Mg (39%), enquanto o TiUnite® e o Osseotite® apresentaram 31 e 28%, respectivamente. Os resultados indicam que a superfície com Mg apresenta uma rápida osseointegração apesar da baixa rugosidade da superfície em comparação à superfície mais rugosa do TiUnite®.

Um grupo de pesquisadores da Universidade de Guarulhos [35] realizou um estudo com seres humanos, onde foram comparadas as superfícies tratada com ácido e anodizada com designações comerciais Porous® e Vulcano, respectivamente. A pesquisa teve como objetivo avaliar a porcentagem de contato osso/implante assim como a densidade óssea após 2 meses de cicatrização. Foi observado que o implante anodizado apresenta uma maior

porcentagem osso/implante (32%) do que o implante usinado (17,4%). Foi observada uma maior densidade óssea no produto com superfície anodizada 50% enquanto o implante usinado apenas 22%.

A mudança na composição química da camada de óxido tem a capacidade de influenciar o tipo de íon adsorvido, durante as primeiras interações com o meio biológico [3]. A presença de cálcio e de fósforo no óxido está diretamente relacionada ao aumento da capacidade de atração e de ligação de proteínas do soro à superfície do titânio. Os implantes contendo Ca e P apresentam maiores valores de torque de remoção 19 N.cm e 15 N.cm, respectivamente, enquanto o implante usinado apresenta torque de remoção de 12 N.cm. Da mesma forma a porcentagem osso/implante foi maior para o implante contendo Ca em sua superfície (49%) enquanto o implante contendo P e o usinado apresenta 44 e 20%, respectivamente, após um período de 6 semanas em tíbias de coelhos [46].

Um estudo comparativo realizado por Strnad J., 2007 [64], mostrou que o implante tratado superficialmente por ataque básico (Bio – Surface) apresentou maior contato osso/implante (BIC % - Bone Implant Contact) do que o implante apenas usinado após 12 semanas de implantação, como mostra a Figura 2.11.

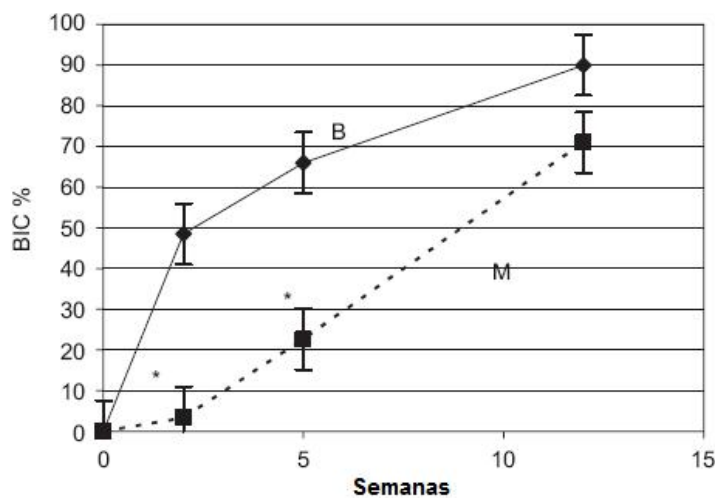


Figura 2.11 Valores da porcentagem de contato osso/implante em função do tempo de implantação dos implantes com superfície tratada com base (B) e superfície apenas usinada (M) [64].

É possível observar que nas primeiras 5 (cinco) semanas de implantação a porcentagem de contato osso/implante foi bem maior para o implante tratado basicamente do que para o implante usinado. Após 12 (doze) semanas os valores já estão mais próximos, indicando que o tratamento de superfície influencia bastante nas primeiras reações que ocorrem entre o meio biológico e o implante [64].

A molhabilidade apresentada pela superfície atacada com base apresenta ângulo de contato bem menor ( $27,2^\circ$ ) do que a superfície usinada ( $79,5^\circ$ ). A característica hidrofílica da superfície facilita as reações que ocorrem entre o meio biológico e a superfície do implante. A grande quantidade de grupos hidroxílicos na superfície do implante estimula as ligações entre o implante e os íons cálcio e fosfato presentes no plasma sanguíneo [64].

### **2.2.2 Formação do tecido ósseo**

O sistema de formação de coágulos é uma reação natural do organismo para reduzir o processo de sangramento. Simultaneamente, há uma reação inflamatória para reparação do tecido que sofreu a injúria. Estes eventos são importantes para entender a osseointegração, uma vez que, imediatamente, após a instalação, os implantes de titânio interagem com os fluidos biológicos e com tecidos, dando início na osseointegração. É nesta fase que as propriedades físicas, rugosidade, molhabilidade e composição química da superfície do implante têm importância primordial [65].

A osseointegração está associada às respostas celulares que contribuem para a formação de osso em superfícies aloplásticas. As reações iniciais entre os tecidos e a superfície dos implantes governam as reações futuras e determinam a atividade biológica da superfície e a resposta celular. A resposta celular depende das propriedades da superfície, que influenciam na natureza da composição subsequente do filme de proteínas que é adsorvido na superfície do implante Scheideler L. et al. 2003, apud Elias C.N. et. al. 2008 [65].

Os materiais bioinertes não são rejeitados pelo organismo, as células induzem a formação de uma cápsula de tecido fibroso ao redor do biomaterial. Para os materiais bioativos, em especial o titânio comercialmente puro (Ti cp), as células induzem uma resposta biológica específica na superfície do biomaterial para identificar o tamanho da rugosidade. Com base na identificação da rugosidade, as células iniciam diferentes reações e com diferentes velocidades. Nas superfícies de titânio lisas (rugosidades inferiores a  $0,5 \mu\text{m}$ ) há ligação de fibroblastos. Nas superfícies com rugosidade entre  $0,5$  e  $1,5 \mu\text{m}$ , há a adesão de osteoblastos. Ou seja, não basta que a célula identifique a presença do Ti cp para ocorrer a osseointegração, as reações que são desencadeadas na superfície dependem da rugosidade superficial. Cada superfície provoca uma reação específica com várias fases que ocorrem simultaneamente [66].

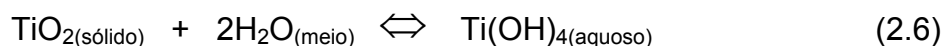
Procura-se ter controle das características da superfície dos implantes para garantir adequada adsorção de proteínas, adesão, espalhamento, crescimento e ativação celular. Portanto, o emprego do titânio na fabricação dos implantes dentários não é suficiente para garantir a osseointegração, a rugosidade deve ter valores capazes de atrair células específicas que levam à deposição óssea e mineralização. É importante que ocorra uma resposta específica dos tecidos. Na região em contato com tecidos duros, a superfície do implante deve ter rugosidade para favorecer a atração e adesão de osteoblastos. Na região de contato com tecidos moles, a superfície deve ser lisa para permitir a aderência de fibroblastos [65].

Independendo do nível da rugosidade, as células não se ligam diretamente à superfície do material bioativo. A ligação ocorre por meio de glicoproteínas da matriz extracelular (MEC). Para esta ligação ocorrer, há necessidade da presença de receptores, entre eles as integrinas. Como mostrado nos trabalhos in vitro, a adesão das células é observada pelo seu espalhamento e reorganização das proteínas do citoesqueleto. Nos pontos de contato das células com o biomaterial ocorrem trocas de informações com a MEC, esta troca de sinais resulta em ativação gênica, espalhamento e remodelamento das células. A cada gene ativado resulta em nova função no



processo de adesão. Quando o biomaterial está revestido por glicoproteínas ou por fragmentos reconhecíveis pela célula e, havendo a adsorção, há início de uma cascata de reações de sinalização intracelular, a qual induz o espalhamento da célula, a secreção de enzimas, mitose e outras funções. O entendimento destes mecanismos é importante para a análise da osseointegração, uma vez que os osteoblastos são células que dependem de ancoragem e da presença de rugosidade [65].

A superfície dos implantes de titânio sem tratamento de superfície não são capazes de adsorver íons cálcio e fosfato Ellingsen J.E., 2000 [2]. A capacidade da adsorção de íons pelo titânio e da indução e crescimento de cristais de apatita na sua superfície estão ligados à presença de inúmeros grupos hidroxílicos (Ti-OH) formados pela reação química do óxido superficial com a água e/ou os líquidos biológicos [4]. A reação de formação dos grupos hidroxílicos na superfície do titânio e sua posterior dissolução em presença de um meio aquoso, segundo um ponto de vista termodinâmico, é mostrada abaixo:



A concentração de sítios (Ti-OH) formados na superfície dos implantes de titânio pode ser aumentada através de tratamentos físico-químicos adequados [67].

As hidroxilas formadas na superfície pela reação do óxido de titânio com a água e outros eletrólitos do meio biológico podem sofrer posterior dissociação com liberação de espécies iônicas no meio. A maneira como a hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) se dissocia, quando nas condições termodinâmicas adequadas, como mostra a Figura 2.12, pode produzir na superfície do titânio cargas elétricas tanto positivas como cargas negativas que são as propriedades que as hidroxilas possuem quando estão ligadas aos metais de transição (grupo IV da tabela periódica).

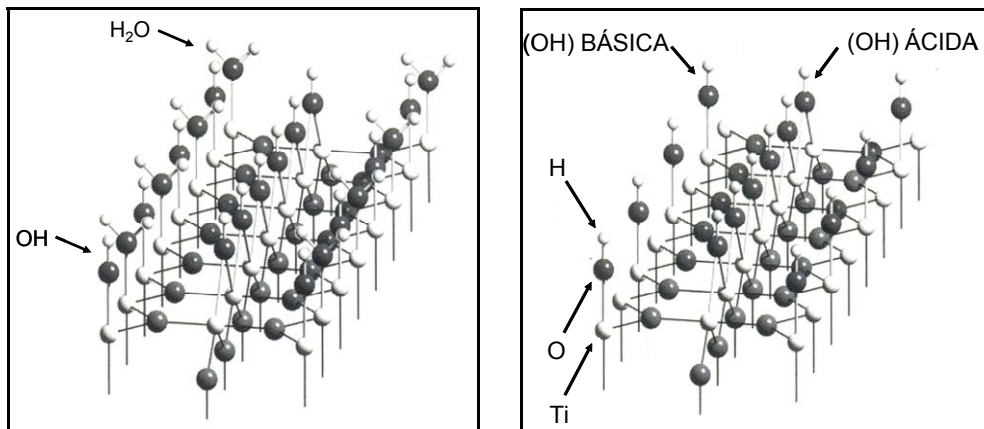


Figura 2.12 Modelos atômicos espaciais das moléculas de água e dos radicais hidroxílicos na superfície do titânio [1].

Embora, sob uma ótica didática as hidroxilas se comportem como radicais básicos quando em solução aquosa, quando elas estão ligadas aos metais de transição (metais com n°. de oxidação +4) essas hidroxilas possuem um caráter anfótero. Esse caráter anfótero pode fazer com que elas se comportem tanto como radicais ácidos, quanto radicais básicos, dependendo do pH do meio e da forma como o oxigênio se liga ao íon metálico. Quando o oxigênio da hidroxila estiver ligado a um átomo de titânio, o comportamento da hidroxila poderá ser básico com a liberação de radicais hidroxílicos (OH<sup>-</sup>) no meio durante sua dissociação. No entanto, quando o oxigênio da hidroxila estiver ligado a dois átomos de titânio ela poderá apresentar um comportamento ácido com a liberação de prótons (H<sup>+</sup>) quando da sua dissociação em condições adequadas.

Sendo assim, a camada de óxido de titânio possui a característica anfótera que é capacidade de atrair e adsorver do meio onde é inserido tanto íons positivos, quanto íons negativos devido a suas cargas superficiais. Essa capacidade é de fundamental importância na compreensão do mecanismo de interação do implante de titânio com o meio biológico dentro do universo da osseointegração. Para o sucesso da osseointegração é de vital importância o tipo de interação da superfície do implante, após a sua instalação em um leito ósseo hemorrágico. As primeiras interações com o meio biológico dizem respeito a adsorção de íons positivos presentes no plasma sanguíneo,

principalmente o cálcio, sódio, potássio e o magnésio e os radicais negativos tais como os fosfatos, flúor e carbonatos, entre outros.

Existe uma relação direta entre a concentração de hidroxilas da superfície do titânio e a adesão e atividade dos osteoblastos [68]. A conjunção favorável de várias características físico-químicas de superfície como a rugosidade adequada, a elevada energia e a concentração elevada de grupos hidroxílicos acarretam a aderência de maior número de osteoblastos e atividade mais alta dessas células em culturas *in vitro* [68]. No entanto, outras características físicas e químicas inerentes ao filme de óxido formado na superfície têm sido usadas com o objetivo de explicar o bom desempenho clínico que os implantes de titânio tem obtido ao longo das décadas numa ampla variedade de aplicações [1,69].

O organismo contém células que estão programadas para converter-se em células formadoras de osso. As células predestinadas são chamadas células progenitoras ósseas ou células osteogênicas, as quais se originam a partir de células mais primitivas, as células mesenquimatosas indiferenciadas.

Quando há necessidade de regeneração óssea, as células progenitoras ósseas se diferenciam para osteoblastos que finalmente produzem o osso. Após a formação dos osteoblastos, há emissão de prolongamentos citoplasmáticos que entram em contato com prolongamentos celulares de outros osteoblastos. Entre os osteoblastos e seus prolongamentos há amplos espaços denominados “espaço intercelular”. Os osteoblastos produzem e secretam compostos orgânicos para o espaço intercelular.

As secreções orgânicas dos osteoblastos são classificadas em componente fibroso (colágeno tipo 1) e um componente amorfo constituído de proteoglicanos, proteínas não colagênicas e glicoproteínas. Nesta matriz, as osteocalcinas e as osteonectinas são componentes amorfos, portanto o osteoblasto produz a matriz orgânica do tecido ósseo. Uma vez formada a matriz osteóide, inicia-se um processo de mineralização ou calcificação por intermédio de deposição, principalmente de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita. Uma vez mineralizada a matriz, as células osteoblásticas rodeadas por matriz mineralizada passam a denominar-se osteócitos. Os

osteócitos são osteoblastos que foram aprisionados na matriz mineralizada. No entanto, nem todos os osteoblastos se transformam em osteócitos; alguns migram para a superfície do osso quando formam a matriz orgânica. Nestes casos, os osteoblastos são componentes celulares das membranas que recobrem a superfície de todos os ossos. Estas membranas são o perióstio e o endóstio. Além destas células, participam do remodelamento ósseo as células osteoclásticas (osteoclastos) que são responsáveis pela remoção de tecido ósseo (osteoclasia). Os osteoclastos são originados das células do sistema monocítico-fagocitário, que derivam dos monócitos que migram para os espaços extravasculares a partir do sangue circulante [70,71].

Considerando que a interação das células e tecidos com o implante são afetadas pela topografia em níveis macroscópicos e à rugosidade em nível microscópico, a princípio, espera-se que o aumento da área superficial do implante, aumente o número de sítios para as células se ligarem, facilite o crescimento dos tecidos e aumente a estabilidade mecânica. Porém, isto não é uma regra geral. O efeito da microestrutura superficial na adesão de células depende do tipo de célula. Células gengivais do tipo fibroblastos de humanos aderem melhor às superfícies eletropolidas que às superfícies tratadas com ácido ou jateadas. Em contrapartida, macrófagos exibem rugofilia, ou seja, preferem superfícies rugosas. As células epiteliais são mais atraídas por superfícies rugosas do que por superfícies lisas, assim como células osteoblásticas aderem com maior facilidade às superfícies rugosas como as encontradas em implantes comerciais tratados com jateamento do que em superfícies polidas.

Bowers et al., 1992 [72] analisaram a influência da rugosidade na adesão e morfologia das células osteoblásticas em amostras de titânio. Os implantes usinados e jateados com partículas de  $Al_2O_3$  de 25 e 250  $\mu m$  apresentaram resistência ao torque praticamente iguais, apesar das rugosidades serem muito diferentes e os implantes jateados com partículas de  $Al_2O_3$  com 25  $\mu m$  apresentarem maior área de contato osso-implante do que os tratados com partículas de  $Al_2O_3$  com 250  $\mu m$ . As dimensões das microcavidades, assim como a orientação das ranhuras superficiais dos

implantes, influenciam na adesão das células, proliferação, diferenciação e produção de fatores locais.

Apesar destas diferenças, não está claro como a superfície do implante promove ou inibe a osteogênese. Possivelmente, o êxito depende da osteogênese rápida em torno do implante, ou seja, da rápida adesão de osteoblastos na superfície do implante. Até a presente data, não existem dados suficientes que expliquem o processo de adesão inicial dos osteoblastos. O comportamento das células é dependente da interação e da ação desencadeadora de atividades das células e das moléculas.

### **2.2.3 Característica Topográfica**

A morfologia da superfície do implante a nível micrométrico já foram extensivamente caracterizados, embora, não haja um consenso sobre qual a rugosidade ideal capaz de promover a melhor resposta óssea. As pesquisas estão muito voltadas para investigar a reação das células às diferentes mudanças estruturais da topografia, ou seja, as características nanométricas de uma superfície. Nesse contexto existe um grande interesse nas estruturas nanométricas com o desenvolvimento acelerado das pesquisas no campo da nanotecnologia. Todo tratamento de superfície que promova alterações a nível micrométrico causará inevitavelmente também alterações à nível nanométrico.

As nanoporosidades de uma superfície são capazes de regular a expressão genética de células do tipo osteoblástica (MG-63) [73]. Uma nova superfície de implante com nanoporosidades (nanoPORE, Out-link, Due Carrare, Padova, Italy) é capaz de regular positivamente os genes relacionados à imunidade, transporte vesicular e apoptose (morte celular programada geneticamente) [73].

Duas alternativas podem ser seguidas para a implementação de nanoestruturas em implantes osseointegráveis: 1) adição e 2) subtração. A adição consiste geralmente na imersão do implante em uma solução contendo partículas com a dimensão controlada, que em conjunto com as estruturas presentes na superfície, irá determinar a dimensão final. A subtração consiste

na remoção de material da camada mais externa da superfície, produzindo uma topografia única, que pode ser controlada por parâmetros do método escolhido, variando o tempo de imersão, a concentração da solução ou a temperatura de trabalho. Não existe risco em potencial na utilização de nanoestruturas quando estas estiverem adequadamente estáveis na superfície dos implantes dentários. A preocupação existe nos casos onde as nanoestruturas são adicionadas a superfície e apresentam o risco de deslocamento, o que representaria um risco de perda óssea associada a inflamação local em função da fagocitose desta partícula. Além da reabsorção óssea, existe o problema do rompimento da interface osso-implante quando esta estrutura “descola” da superfície. Em geral, a preocupação não afeta os métodos de subtração, pois a maioria dos problemas observados até hoje foram com partículas adicionadas e com dimensões maiores [74].

O tecido ósseo é composto de numerosos materiais como colágeno e hidroxiapatita, que se encontra em escala nanométrica, e provém uma adequada estrutura para a interação celular. Embora a confecção de materiais para substituir osso e partes perdidas do corpo não seja recente, a utilização de materiais nano-estruturados em relação aos materiais convencionais é relativamente nova e recente por apresentarem melhores propriedades superficiais (quando comparados aos convencionais). Nanomateriais apresentam um aumento do número de átomos, partículas ou porosidades nas superfícies, uma maior área de superfície e uma alteração na distribuição de elétrons se comparados aos materiais convencionais, fazendo com que fiquem mais reativos que os materiais convencionais [74].

No trabalho de Mendonça G. et.al. 2010 [75], foram utilizados discos de Titânio (Ti) comercialmente puro Grau IV com diferentes tipos de superfícies nanoestruturadas (NEODENT Implantes Osteointegráveis, Curitiba, PR, Brasil): Ti usinado (L); Ti com ataque ácido (Ac); Ti revestido com óxido de titânio–forma cristalina anatase (A); Ti revestido com óxido de titânio–forma cristalina rutilo (R); Ti revestido com óxido de alumínio (Al); Ti revestido com óxido de zircônia (Zr). As superfícies não se comportaram de maneira igual, indicando também um papel importante do material utilizado para recobrir estes

implantes. A superfície recoberta com Alumina de maneira geral apresentou os melhores resultados de torque de remoção e expressão inicial dos genes relacionados à diferenciação de osteoblastos. A superfície recoberta com Zircônia apresentou um maior contato osso-implante, mas uma resposta mais lenta na expressão gênica, a qual refletiu em valores mais baixos de torque de remoção até 21 dias. As superfícies recobertas com óxido de titânio apresentaram valores menores de torque de remoção, contato osso-implante e expressão gênica quando comparados as superfícies com Alumina ou Zircônia, entretanto estes valores foram maiores do que a superfície controle (Usinada). De acordo com outros autores, a modificação da nanoestrutura da alumina também influenciou na adesão de células ósseas. Foi observado um aumento de duas vezes na adesão de osteoblastos apenas modificando a forma da estrutura de alumina de nanopartículas para nanofibras. Demonstrando que não somente o tamanho do material pode ser importante, mas também a forma que ele apresenta para uma melhor relação com as proteínas que irão permitir a adesão celular [75].

Osteointegração em implantes endósseos requer ativação das principais moléculas reguladoras que afetam osteoblastogênese, promovendo a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais não diferenciadas. As proteínas morfogenética ósseas (BMPs) são moléculas proeminentes de sinais de osteogênese. O principal componente intracelular responsável pela transdução osteogênica nas células-tronco mesenquimais é RUNX-2, um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento e reparação óssea. Um segundo componente intracelular que controla a osteoindução é Osterix, outro fator de transcrição necessário para o desenvolvimento esquelético ósseo. Em estudos com ratos, a retirada de RUNX-2 ou Osterix, moléculas sinalizadoras do desenvolvimento do esquelético e osteoblastogênese foi observado que não houve formação óssea significativa. Enquanto muitas outras moléculas sinalizadoras intracelulares são importantes para a regulação de formação óssea, RUNX-2 e Osterix são claramente indispensáveis para esse processo [76].

Implantes usinados, jateados com  $\text{TiO}_2$  e jateados com  $\text{TiO}_2$  e atacados com HF foram caracterizados por MEV. Com um aumento de 5000x foi observado rugosidade moderada nos implantes jateados como mostra a Figura 2.13 (a). A superfície do implante atacada com HF apresentou característica nanométrica da ordem de 100 nm, como pode ser observado na Figura 2.11 (b). Comparando a composição química das duas superfícies por XPS, foi observado que existe 0,8% de átomos de flúor na superfície do implante atacado com HF e nenhum traço de flúor do implante apenas jateado [76].

A superfície jateada apresenta rugosidade média de 1,3 – 1,45  $\mu\text{m}$  enquanto a superfície jateada e atacada com ácido apresentam rugosidade média entre 1,2 – 1,4  $\mu\text{m}$ , valores bem superiores aos apresentados pela superfície usinada 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$ . A superfície tratada com HF apresenta característica nano e microtopográfica com estruturas de 50 – 200 nm.

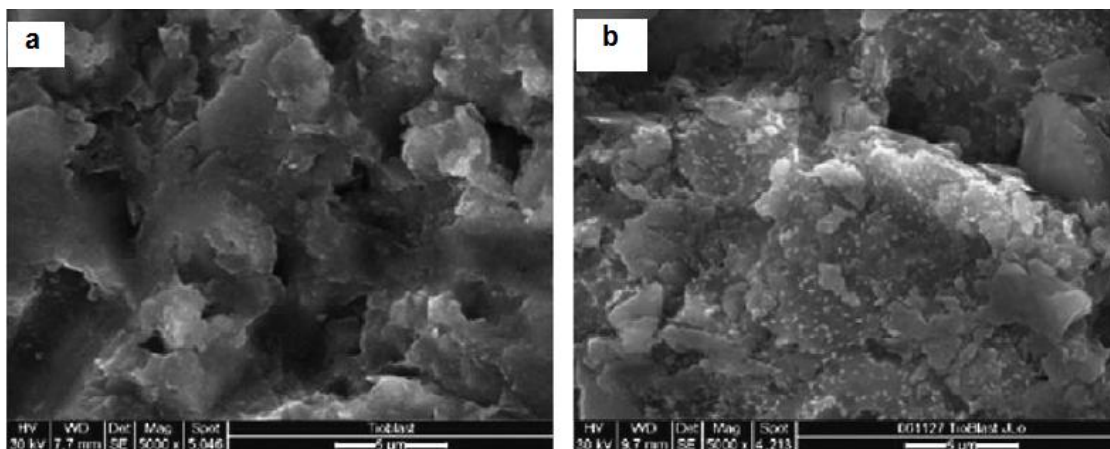


Figura 2.13 Avaliação por MEV da superfície dos implantes. (a) superfície jateada com  $\text{TiO}_2$ . (b) superfície jateada com  $\text{TiO}_2$  e atacada com HF, mostrando partículas com dimensão de 50 – 200 nm [76].

A diferenciação da célula MC3T3-E1 de calvária de murano foi examinada nas 3 diferentes superfícies. A Expressão do RUNX-2 foi evidenciado na cultura de células MC3T3-E1 sobre a superfície usinada, como pode ser observado na Figura 2.14. Após 24 horas, a superfície jateada com  $\text{TiO}_2$  apresentou um modesto crescimento na expressão do RUNX-2 enquanto



a superfície jateada com  $\text{TiO}_2$  e atacada com HF apresentou a maior expressão da molécula. Os níveis de RUNX-2 mRNA se mantêm altos para as superfícies  $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2/\text{HF}$  no período de (1 – 14 dias) com maiores níveis para a superfície  $\text{TiO}_2/\text{HF}$ . As 3 superfícies apresentaram maiores níveis após 72 horas de tratamento com suplemento osteogênico [76].

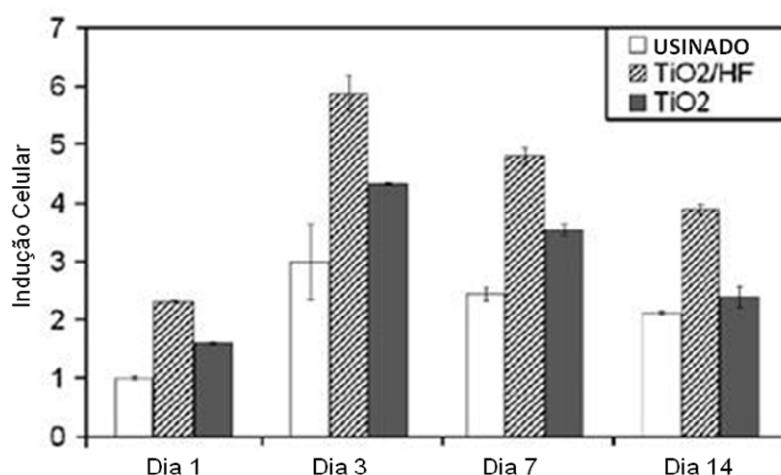


Figura 2.14 Medidas de PCR em tempo real dos níveis de mRNA de células aderidas na superfície de discos de titânio. Expressão de RUNX-2 mRNA incubada de 1 – 14 dias. O maior nível de RUNX-2 mRNA foi observado para a superfície  $\text{TiO}_2/\text{HF}$  em todos os períodos avaliados [76].

Da mesma forma que o RUNX-2 o Osterix mRNA foi avaliado durante 14 dias de cultura celular, como mostra a Figura 2.15. Em 24 horas o Osterix foi apenas observado nas duas superfícies  $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2/\text{HF}$  e não na superfície usinada. Assim como o RUNX-2 o Osterix apresentou nível máximo no terceiro dia de incubação. A superfície que apresentou o maior nível de Osterix após 14 dias foi a  $\text{TiO}_2/\text{HF}$  [76].

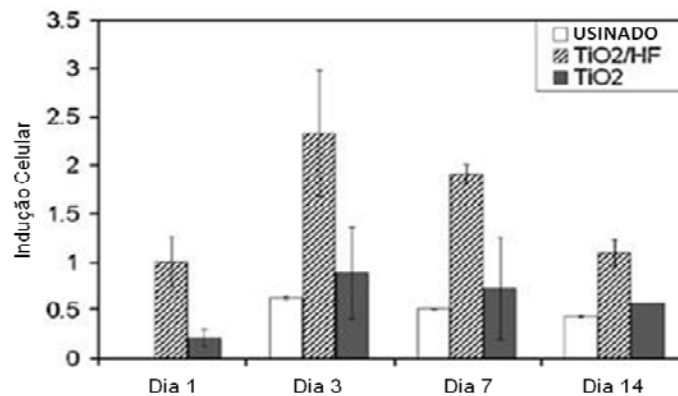


Figura 2.15 Medidas de PCR em tempo real dos níveis de mRNA de células aderidas na superfície de discos de titânio. Expressão de Osterix mRNA incubada de 1 – 14 dias. O maior nível de Osterix mRNA foi observado para a superfície TiO<sub>2</sub>/HF em todos os períodos avaliados [76].

As micrografias revelaram que o tratamento de superfície TiO<sub>2</sub>/HF provocou características nanométricas na superfície do implante. Ambas culturas de células apresentaram células aderentes e o nível de mRNA indica que o tratamento TiO<sub>2</sub>/HF apresentou células osteoindutivas aderentes e formadoras de osso [76].

Em 2008, autores avaliaram três tipos de superfície de implantes através de diferentes metodologias (interferômetro, MEV, XPS) e as respostas do tecido ósseo a esses implantes (torque de remoção, avaliação histológica). As superfícies avaliadas sofreram três tipos de tratamento de superfície: jateada por TiO<sub>2</sub>; jateada por TiO<sub>2</sub> + tratamento com ácido fluorídrico; e jateada por TiO<sub>2</sub> + modificada por partículas de HA nanométricas. Os resultados demonstraram que o tratamento químico das superfícies produziu uma nanotopografia sobre a microtextura das superfícies jateadas. Análises químicas demonstraram a presença de íons específicos sobre as superfícies modificadas, como íons flúor para os implantes submetidos ao tratamento com ácido fluorídrico e íons de Ca e P para a superfície submetida a partículas de HA. Os resultados dos testes de torque de remoção demonstraram maiores valores de torque para as superfícies modificadas, comparadas à superfície jateada por TiO<sub>2</sub>. Isto indica que a nanotopografia associada à deposição de

ions específicos sobre a superfície promove uma maior e mais rápida formação óssea, o que pode ser comprovada através dos exames histológicos. Estes resultados estão de acordo com os resultados de outros estudos demonstrando que a deposição de nanopartículas associada à nanotopografia potencializa a osseointegração [77].

Fibroblastos humanos foram cultivados sobre superfícies contendo projeções colunares nanométricas produzidas por litografia coloidal. Os resultados mostraram através de microscopia eletrônica e imunofluorescência que as células fibroblásticas alteravam seu citoesqueleto para uma forma pouco usual para este tipo de célula. A forma celular apresentava morfologia com processos citoplasmáticos semelhantes aos encontrados nos macrófagos. Foi observado que as células adquiriam uma disposição espacial sobre a superfície que sugeria uma tentativa de endocitose das nanocolunas por parte dessas células [78].

O comportamento de macrófagos e osteoclastos foram testados *in vitro* sobre superfícies de titânio contendo diferentes porcentagens de nanoprotusões. Os resultados mostraram que as características nanométricas das superfícies foram capazes de aumentar a ativação dos osteoclastos com liberação de agentes quimiotáticos e a formação de uma rede de fibronectina, podendo dessa forma, prover uma superfície melhor condicionada para a posterior adesão e atividade dos osteoblastos [79].

A expressão de proteínas colágenas e não-colágenas da matriz óssea nas culturas de células osteogênicas foi testada sobre três diferentes superfícies: titânio nanotexturizado, titânio com rugosidade semelhante aos implantes usinados e superfícies de vidro [80]. Os resultados demonstraram que as células cultivadas sobre superfícies nanotexturizadas apresentaram uma expressão de osteopontina e sialoproteína óssea acima do normal. Esse resultado pode ser atribuído às interações resultantes entre as células a matriz e o substrato, que por sua vez, influenciariam a transdução dos sinais oriundos do meio e poderiam assim alterar a expressão genética das células [80].

Com o objetivo de investigar a possibilidade de modulação da adesão celular mediada por pontos e sulcos nanométricos de superfície, células

osteoprogenitoras da medula óssea humana foram cultivadas sobre superfícies apresentando características topográficas nanométricas que foram preparadas por técnicas de fotolitografia. Os resultados obtidos mostraram que as nanorugosidades da superfície permitiram não só o controle sobre a adesão, mas também sobre o citoesqueleto, o crescimento celular e a produção de marcadores de diferenciação osteoblástica como osteopontina e osteonectina. Este resultado demonstrou que as células da medula óssea são altamente responsivas às características nanométricas de uma superfície [81]. Dados existentes na literatura científica mostram que a rugosidade nanométrica da superfície de um implante pode influenciar no comportamento *in vitro* dos diferentes tipos celulares por promover fortemente a alteração da morfologia, da adesão, da proliferação e da regulação genética. Entretanto, os mecanismos que controlam tais respostas celulares e a influência das características nanométricas de uma determinada superfície permanecem ainda não totalmente esclarecidos.

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar os mecanismos através dos quais o comportamento das células pode ser alterado pelas diferentes topografias superficiais micro e nanométricas [82]. Uma das hipóteses sugere que, para que haja influência das características nanométricas sobre a retenção celular, deve existir uma relação mínima de proporcionalidade entre o tamanho da célula e a dimensão do defeito da superfície [83].

### **2.3 Característica Físico-Químico da Água**

A água age como solvente junto à superfície dos biomateriais. Entretanto, a água no meio biológico participa diretamente na suspensão de células no sangue. É o principal constituinte dos fluidos intersticiais que banham os tecidos, e age como um carreador essencial para reações bioquímicas do corpo. A água constitui 70% ou mais em peso dos tecidos vivos. A molécula de água é pequena (0,25 nm no longo eixo) e por isso ágil no sistema biológico. Por tudo isso, acredita-se que a água seja a primeira

molécula que entre em contato com a superfície dos biomateriais em qualquer aplicação.

Consequentemente, o comportamento físico-químico da água próximo às superfícies dos biomateriais e no fluido biológico circundante é de grande importância, particularmente no estudo das interações entre as superfícies dos implantes e os eletrólitos do sangue nos primeiros estágios da cicatrização do sítio cirúrgico.

As ligações de hidrogênio são associações eletrostáticas relativamente fracas 3-5 kcal/mol e possuem aproximadamente o mesmo valor da energia transferida de uma molécula de água a outra durante o choque entre elas. Dessa forma as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água são transitórias em sua natureza durando apenas poucos décimos de pico segundos. Contudo as moléculas de água possuem grande propensão a se associarem formando estrutura tridimensional que é mantida virtualmente devido ao mecanismo de formação e quebra instantânea das ligações de hidrogênio. Essa elevada propensão à associação entre as moléculas e formação de estrutura tridimensional através das transitórias ligações de hidrogênio confere à água dramáticos efeitos sobre as suas propriedades de solvatação.

Se essa rede tridimensional formada for mais completa em suas ligações, em relação a um estado arbitrário, então essa água deve possuir menos pares de ácido-base de Lewis disponíveis do que essa referência. Por outro lado, em uma água menos auto-associada à rede formada deve estar relativamente incompleta, dessa forma deixando disponíveis maior número de pares de ácido-base de Lewis, Figura 2.16. Os pares ácidos e básicos não compartilhados estão prontamente aptos a participarem em outras reações químicas como a dissolução de uma molécula de soluto ou a hidratação de uma determinada superfície. Do ponto de vista químico uma porção de água cujas moléculas estão menos associadas tridimensionalmente entre si possui um maior potencial químico comparado a uma porção de água mais associada [84].

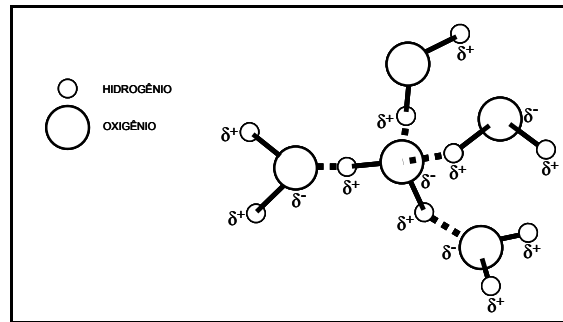


Figura 2.16 Ligação de hidrogênio (linhas interrompidas) entre moléculas de água e a formação de rede [84].

A justificativa para a elevada capacidade de auto-associação entre as moléculas de água está baseada nos conceitos químicos de ácidos e bases. Existem dois conceitos básicos da química inorgânica que definem ácidos e bases:

- 1) Definição de Brønsted-Lowry;
- 2) Definição de Lewis.

O conceito de Brønsted-Lowry estabelece que um ácido é uma substância ou íon doador de prótons ( $H^+$ ) e base é uma substância ou íon receptor de prótons ( $H^+$ ).

Lewis define como ácido uma molécula que aceita elétrons, ou simplesmente, uma densidade de elétrons de uma outra molécula doadora e o termo “base” é aplicado para uma molécula capaz de doar elétrons, ou densidade de elétrons à uma molécula ou íon capaz de receber esses elétrons [85].

Mesmo que a água ( $H_2O$ ) seja estável eletronicamente, o átomo de oxigênio possui ainda dois pares de elétrons que não foram compartilhados. Quando existirem condições favoráveis a molécula de água através de sua polaridade será capaz de atrair e se ligar à prótons através de ligação covalente do tipo coordenada, formando então o íon  $H_3O^+$ . Neste caso a água se comporta como uma base de Lewis.

Em geral, superfícies hidrofílicas são aquelas que competem com a água pelas ligações de hidrogênio. Isso significa que as superfícies hidrofílicas exibem grupos funcionais de ácidos e bases de Lewis com força comparável ou

até maior que a força das ligações de hidrogênio da própria água. Isto torna mais favorável energeticamente que a água aceite ou doe densidade de elétrons para a superfície ao invés de competir com suas moléculas vizinhas pelas ligações de hidrogênio, ou seja, a reação ocorrerá na superfície do implante e não entre as moléculas de água. Consequentemente, em termos termodinâmicos, significa que a energia livre de hidratação hidrofílica é mais elevada que hidratação hidrofóbica, partindo do princípio que os ácidos e bases de Lewis são mais energéticos que as reações hidrofóbicas, que acontecem na ausência de ligações químicas [84].

Existem vários íons com relevância biológica, entre os quais os cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e os ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Estes íons são circundados por uma esfera ou camada hidratada onde os átomos de oxigênio da molécula de água estão direcionados para os cátions e os átomos de hidrogênio estão direcionados para os ânions. Os íons divalentes são mais hidratados, ou seja, possuem uma camada mais concentrada de água ao seu redor em relação aos íons monovalentes. Esses íons divalentes se encontram sempre mais próximo à superfície do material enquanto os íons monovalentes formam uma camada mais afastada [84].

Em especial as interações do meio biológico com os biomateriais iniciam-se com a adsorção de proteínas cujo processo é consequentemente afetado pela energia de superfície, molhabilidade, estrutura da água e composição eletrolítica da camada próxima à superfície [84]. Como os íons e biomoléculas do meio biológico são encontrados sempre no estado hidratado torna-se logicamente importante para o estudo das interações de superfície que o fenômeno da molhabilidade seja compreendido.

Entre as propriedades físico-químicas da superfície que exercem influência no comportamento dos implantes destacam-se as propriedades físicas relacionadas à energia (tensão superficial) e à carga elétrica de superfície.

A energia de ligação entre os átomos da superfície é menor do que entre os do interior do material, portanto a energia se torna maior na superfície em relação aos átomos do interior [86]. Tal situação induz os átomos a se

arranjarem de diferentes maneiras procurando diminuir o valor total da energia interfacial. A primeira condição é a alteração da distância entre as camadas atômicas mais externas. Outra forma é o enriquecimento da superfície por elementos de liga ou átomos de contaminantes. Uma terceira maneira é a reconstrução local da superfície com planos cristalográficos mais estáveis. A última forma possível de redução da energia interfacial se dá através da ligação dos átomos da superfície com impurezas. No caso do titânio a forma mais comum com que os átomos da superfície diminuem a energia interfacial ocorre pela ligação com impurezas ou hidrocarbonetos e compostos nitrogenados voláteis encontrados na atmosfera. Este fenômeno também ocorre com compostos orgânicos usados durante o processo de fabricação, principalmente os líquidos refrigerantes aspergidos durante o processo de usinagem.

Uma superfície com alta energia possui grande potencial de adsorção e no caso dos implantes deseja-se que suas superfícies sejam altamente adsorventes (hidrofilicidade – molhabilidade) com relação ao sangue, ou líquidos biológicos [87]. Portanto, a hidrofilicidade é um fator determinante do grau de biocompatibilidade de um biomaterial e é altamente dependente da energia de superfície. Conseqüentemente, dentro do processo de produção dos implantes deve-se priorizar criteriosamente a rotina de limpeza, manuseio e esterilização para que as superfícies possam apresentar baixos níveis de impurezas com alta energia de superfície e grande hidrofilicidade [87].

Do ponto de vista celular o aumento de hidrofilicidade, ou seja, a elevação da energia da superfície possui um efeito estimulante sobre as células osteoblásticas [57,87] que reagem preferencialmente com a superfície do implante ao invés de reagirem entre si. Osteoblastos foram cultivados sobre superfícies de titânio com baixos teores de impurezas (principalmente hidrocarbonetos atmosféricos) [87]. Com esta técnica de produção os implantes de titânio têm suas superfícies protegidas das impurezas atmosféricas através de um sistema de proteção com gás nitrogênio. Os resultados mostraram que as células osteoblásticas cultivadas sobre estas superfícies, produzem maior número de marcadores de diferenciação celular. Foi notado aumento na atividade de fosfatase alcalina, produção de osteocalcina e aumento de fatores



locais como prostaglandinas ( $PGE_2$ ) e fatores transformantes de crescimento ( $TGF-\beta_1$ ), latentes e ativos [87].

As propriedades químicas das superfícies se referem à modificação do comportamento que um biomaterial pode apresentar, em relação ao meio biológico, quando a composição química da sua superfície é alterada. Alterando a composição química da superfície, os implantes de titânio podem apresentar alterações na energia de superfície, conseqüentemente na sua capacidade de molhabilidade, refletindo diretamente na hidrofiliabilidade. A hidrofiliabilidade de uma superfície de implante de titânio está diretamente relacionada com a sua capacidade de interagir com o sangue, permitindo que este se espalhe na maior área possível de sua superfície.

Outras tentativas de aumentar a bioatividade dos implantes de titânio foram feitas mediante o tratamento em que íons e biomoléculas são introduzidos ou reagem com a camada superficial do óxido. Nestas reações são formados compostos que aumentam a capacidade de interação da superfície com o meio biológico. O emprego de oxidação anódica da superfície dos implantes de titânio em solução de eletrólitos apresenta baixo custo, simplicidade da técnica, possibilidade de execução à temperatura ambiente e não exige o emprego de atmosfera controlada. Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de alterar simultaneamente várias propriedades da superfície [88,89]. A grande parcela dos trabalhos sobre oxidação anódica desenvolvidos em implantes dentários de titânio se concentra no tratamento de superfície com íons cálcio, fosfato e sulfato, os quais são os constituintes principais do tecido ósseo [38,43,90,91]. Os resultados *in vitro* e *in vivo*, têm se mostrado bastante promissores. Contudo, recentemente estudos *in vivo* com implantes de superfície modificada pela oxidação anódica em solução de íons magnésio também demonstram resultados de resposta óssea superior quando comparados aos implantes sem tratamento [92].



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição Geral

No presente trabalho foram utilizados implantes dentários comerciais da empresa Conexão Sistemas de Prótese e pastilhas de titânio comercialmente puro (ASTM grau IV). Os implantes e pastilhas foram submetidos a 3 diferentes tratamentos superficiais que foram caracterizadas por 5 técnicas experimentais.

A morfologia da superfície foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura com sistema de microanálise acoplado (MEV/EDS - Philips XL 30 FEG, com detector Oxford Link pentafet x-ray), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS- Kratos Analytical, modelo XSAM HS) e por difração de raios X com um gerador RIGAKU, modelo RU 200B. A análise da composição dos elementos dopantes na forma de óxidos foi realizada com uso da técnica de microscopia RAMAN do Departamento de Física (UFSCar).

O ensaio de rugosidade foi realizado utilizando um Perfilômetro (Mahr GmbH, Brauweg 38 Gottingen, Germany). O parâmetro medido foi o Ra (média aritmética das rugosidades). Foram utilizados discos de titânio ASTM grau 4 com 5mm de diâmetro e 3mm de altura com os diferentes tratamentos de superfície.

O ensaio de molhabilidade foi realizado utilizando um goniômetro (Contact Angle Goniometer, Hamé-Hart Inc. USA). Água destilada foi usada como solução de referência, e os resultados foram comparados com soro fisiológico que possui diferente hidrofobicidade. O ângulo de contato considerado entre cada combinação superfície-líquido foi a média aritmética de 15 leituras.

Nas análises *in vivo* os implantes tratados foram inseridos em tíbia de coelhos. As cobaias foram submetidas a eutanásia após um determinado período de cicatrização e os implantes foram submetidos a ensaios mecânicos de remoção por torque logo após a eutanásia.

### 3.2 Preparação das Amostras

Todas as amostras (implantes dentários na forma de parafusos e pastilhas) utilizadas neste estudo foram fabricadas com titânio comercialmente puro ASTM grau IV. Todas as amostras foram fornecidas pela Conexão Sistemas de Implantes no estado como usinadas.

Para o teste *in vivo* foram usados implantes com medidas especiais para inserção na tíbia dos coelhos. A porção rosqueável destes implantes possui 3,30 mm  $\varnothing$  por 7,00 de comprimento (Figura 3.1). As amostras foram submetidas a um processo de limpeza superficial por ultra-som em solução de tricloroetileno, seguido de etanol absoluto e finalmente, de água destilada pelo tempo de 20 minutos em cada solução. Após a lavagem as amostras foram secas na temperatura de 50 °C por 2 horas.

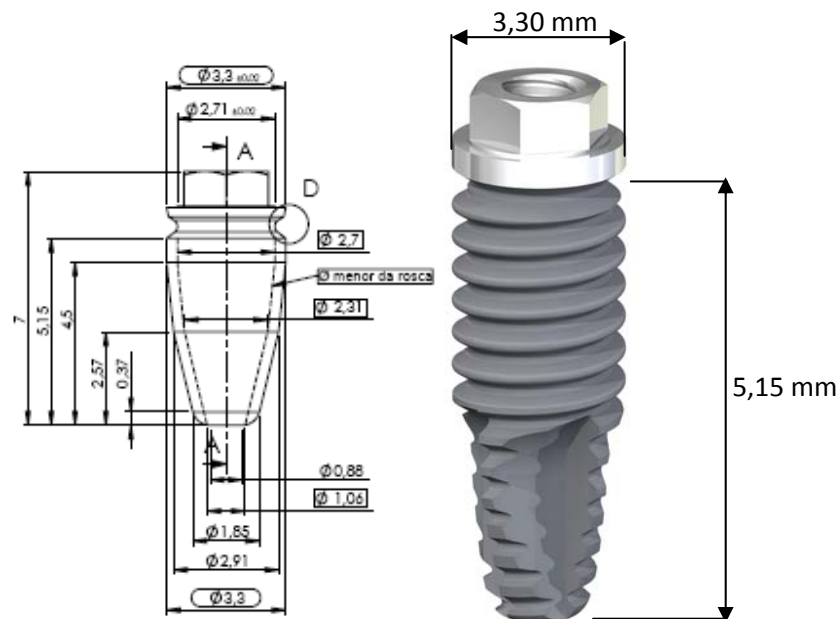


Figura 3.1 Desenho técnico dos implantes com 3,3 mm de diâmetro por 7,0 mm de comprimento total, comprimento da área ativa do implante com 5,15 mm.

Os discos de Titânio ASTM Grau 4 (Figura 3.2) utilizados para o desenvolvimento da superfície do implante foram utilizados para a caracterização em XPS e dispersão de Raio-x.

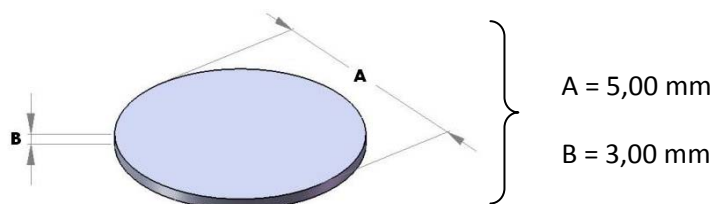


Figura 3.2 Disco de Titânio ASTM Grau 4.

Os implantes e discos de Ti foram submetidos aos tratamentos de superfície comercialmente Porous®, Vulcano Actives® desenvolvidos pela Conexão Sistemas de Próteses. Uma terceira superfície dopada com nanopartículas foi desenvolvida no presente trabalho. Esta superfície é obtida por tratamento de imersão em soluções ácidas com controle das variáveis do processo tempo, temperatura e concentração para a obtenção de um padrão específico de rugosidade superficial. Após o tratamento ácido a superfície sofre passivação em HNO<sub>3</sub>. Os métodos de tratamento de superfície não podem ser descritos, uma vez que a empresa permitiu o uso de suas instalações e o processo é de propriedade industrial da empresa.

Todos os implantes para teste *in vivo* foram esterilizados por radiação gama (CBE EMBRARAD – Tecnologia em Esterilização) de acordo com o protocolo utilizado para esterilização dos implantes destinados ao uso comercial com carga mínima de 25 kGy.

Nos ensaios *in vivo* cada coelho recebeu dois implantes que foram inseridos com separação de 5mm em uma única tíbia totalizando 24 implantes. Os procedimentos cirúrgicos foram iguais para todos os animais.

A Tabela 3.1 mostra os grupos com especificação dos tratamentos superficiais realizados, os tempos de cicatrização, as quantidades de amostras e o ensaio realizado.

Tabela 3.1 Grupos com os tratamentos superficiais, os tempos de cicatrização, as quantidades de amostras e o ensaio realizado.

Grupo	G1	G2	G3
Tempo	(Porous®) *	(Vulcano®) **	(Deposição)
90 dias (12 animais)	8 implantes TR = 8	8 implantes TR = 8	8 Implantes TR = 8

\* Tratamento com ataque ácido

\*\* Tratamento por oxidação anódica

TR = Torque de Remoção

### 3.3 Caracterização Morfológica

A morfologia da superfície (microtopografia) dos implantes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a microanálise acoplada (MEV/EDS - Philips XL 30 FEG, com detector Oxford Link pentafet x-ray), (Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE - UFSCar). A composição química das superfícies após o tratamento foi analisada por EDS. O objetivo desta análise foi verificar se os elementos presentes na solução de tratamento da superfície ficaram incorporados na camada superficial de óxido. As análises foram executadas com distância de trabalho e voltagem iguais para todas as amostras analisadas. Foram utilizadas imagens de elétrons secundários do tipo I e corrente de 20kV.

As análises realizadas por XPS foram feitas utilizando um espectrômetro de fotoelétrons excitados por raios X da Kratos Analytical, modelo XSAM HS. As análises foram feitas sob ultra-alto vácuo ( $\sim 10^{-9}$  Torr). Foi utilizada a radiação  $K\alpha$  do Al ( $h\nu = 1486,6$  eV) com uma corrente de emissão de 10 mA, a uma voltagem de 13 kV. As análises foram feitas nas pastilhas de titânio, já que a geometria dos implantes não permitiu o emprego da técnica.

Para a identificação das fases cristalinas que se formaram após os tratamentos de superfície, empregou-se um difratômetro de raios X com um gerador RIGAKU, modelo RU 200B do Laboratório de difração de raios X do LCE - UFSCar. A difração foi executada pela técnica de ângulo rasante, a qual é indicada para a análise de filmes finos. Para isto, utilizou-se monocromador e

tubo de cobre, em ângulo rasante de  $1^\circ$  com variação de varredura de  $15$  a  $70^\circ$  com passo de  $0,02^\circ$  de  $2\theta$  e tempo por passo de  $1,00$ s. A voltagem utilizada durante as análises foi de  $50$ kV e a corrente de  $100$ mA. As análises foram feitas nas pastilhas de titânio, já que a geometria dos implantes não permitiu o emprego da técnica.

Análise da composição dos elementos dopantes na forma de óxidos foi realizada com uso da técnica de espectroscopia RAMAN do departamento de Física (UFSCar). O efeito RAMAN consiste no espalhamento inelástico pela matéria. As medidas de espectroscopia Raman foram obtidas no RFS/100 Bruker FT-Raman com um laser Nd:YVO<sub>4</sub>, com comprimento de onda de  $1064$  nm, potência de  $120$  mW e a resolução espectral de  $4$  cm<sup>-1</sup>. Essas medidas foram obtidas à temperatura ambiente.

### **3.4 “In Vitro”**

#### **3.4.1 Ensaio de Rugosidade**

As mudanças na topografia dos implantes produzida pelos tratamentos químicos da superfície foi medida por um rugosímetro ótico a laser (Mahr GmbH, Brauweg 38 Gottingen, Germany). Uma vez que a geometria dos implantes não permitia a medida da rugosidade diretamente na sua superfície, foram utilizadas as pastilhas de titânio, submetidos aos mesmos tratamentos dos implantes.

O parâmetro medido foi Ra (média aritmética das rugosidades). O comprimento de medição ( $\ell_m$ ) é a porção da superfície que efetivamente é avaliada pelo processador, e corresponde a cinco comprimentos de medição unitária, como mostra a Figura 3.3. O Ra é obtido calculando-se o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade da reta média dentro do comprimento de medida  $\ell_m$ . Foram feitas cinco análises em cada amostra.

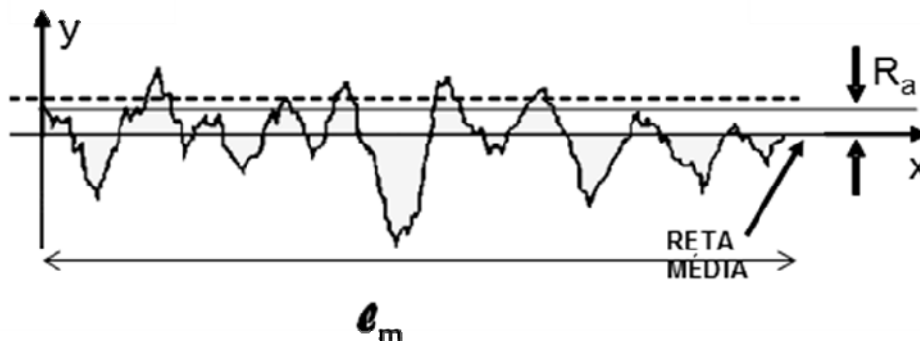


Figura 3.3 Ra calculado dentro do comprimento total medição ( $l_m$ ).

### 3.4.2 Ensaio de Molhabilidade

A análise da molhabilidade (tensão superficial) nas 3 diferentes superfícies tratadas foi obtida via medida do ângulo de contato, o qual pode variar de  $0^\circ$  a  $180^\circ$  onde menor que  $90^\circ$  caracteriza-se como “molhável” e maior que  $90^\circ$  como “não-molhável”, em gota de água destilada e soro fisiológico depositada sobre os discos de titânio tratados na Conexão Sistemas de Próteses.

A condição de equilíbrio da energia interfacial é dada por:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} \cos\theta \quad (3.1)$$

onde:

$\gamma_{SL}$  = energia interfacial da interface sólido-líquido;

$\gamma_{SV}$  = energia interfacial da interface sólido-vapor;

$\gamma_{LV}$  = energia interfacial da interface líquido-vapor; e

$\theta$  = ângulo de contato.

O ensaio de molhabilidade foi realizado em duas soluções diferentes (água destilada e soro fisiológico) utilizando um Contact Angle Goniometer (Hamé-Hart Inc. USA). O ângulo de contato considerado entre cada combinação superfície-líquido será a média aritmética de 15 leituras. As propriedades físico-químicas e a energia das superfícies podem ser quantificadas pela molhabilidade da superfície medindo-se o ângulo de contato



de líquidos com a superfície. Os valores do ângulo de contato indicam se a superfície é hidrofílica ou hidrofóbica. Esses ensaios foram realizados no Instituto Militar de Engenharia (IME), no Rio de Janeiro.

Mostra-se na Figura 3.4 a imagem representativa obtida na determinação do ângulo de contato entre o líquido e a superfície do disco de titânio.

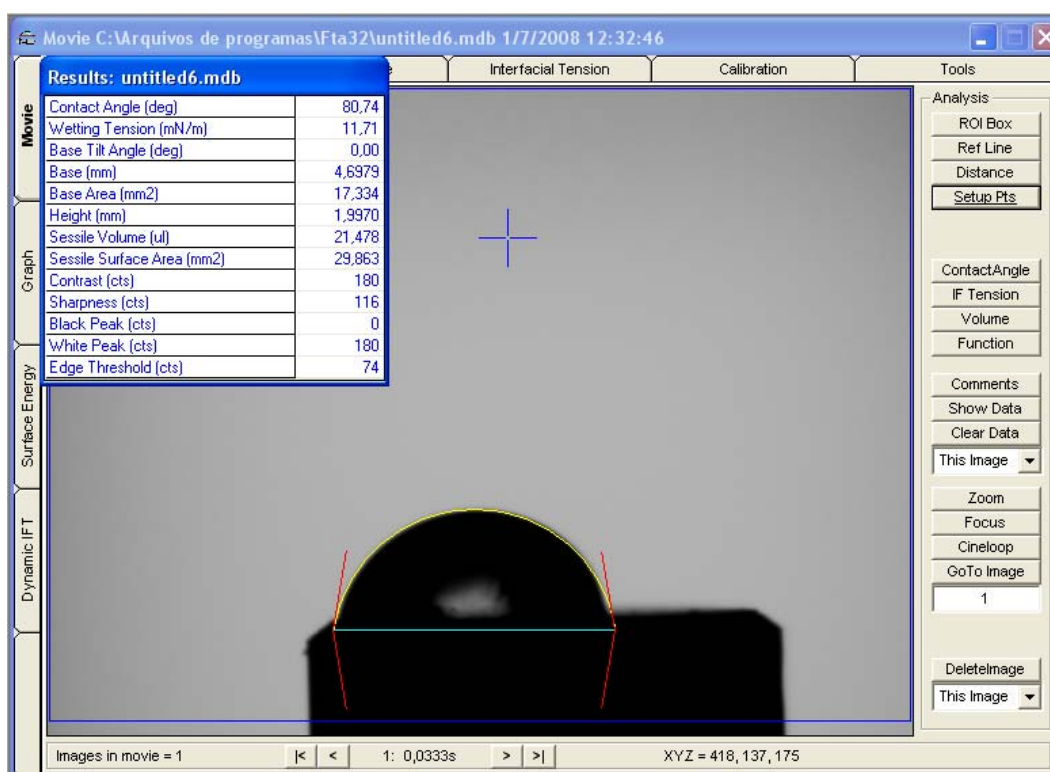


Figura 3.4 Imagem mostrando uma gota usada na para determinar o ângulo de contato entre o líquido e a superfície do disco de titânio.

### 3.5 "In Vivo"

#### 3.5.1 Considerações Éticas

Todos os procedimentos foram realizados utilizando o método experimental obedecendo às recomendações éticas e legais delineadas para a experimentação animal do Comitê de Bioética da FIOCRUZ (Rio de Janeiro - Brasil).

### 3.5.2 Animais

Foram utilizados 12 coelhos entre 8 e 9 meses de vida com 5,0 a 6,0kg de massa corpórea da raça Nova Zelândia, tratados de acordo com o protocolo e normas de pesquisa da FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). Os animais foram divididos, aleatoriamente, em três grupos: G1 – Porous® (n=4), e G2 – Vulcano® (n=4) e G3 – Deposição (n=4), acondicionados, individualmente, em gaiolas de polietileno com tampa em aço inoxidável, devidamente identificadas e colocadas em ambiente apropriado (Figura 3.5). As gaiolas foram forradas para propiciar condições favoráveis de higiene. Durante o período da pesquisa, os animais foram mantidos com temperatura controlada de 22 a 26°C e sob iluminação constante. A alimentação foi realizada com o fornecimento de ração adequada e água *ad libitum*. A troca de maravalha foi realizada diariamente. Os animais foram pesados no início da pesquisa e, semanalmente, até a sua conclusão, com o intuito de observar quaisquer alterações de massa corporal relacionadas à alimentação e/ou às condições experimentais.

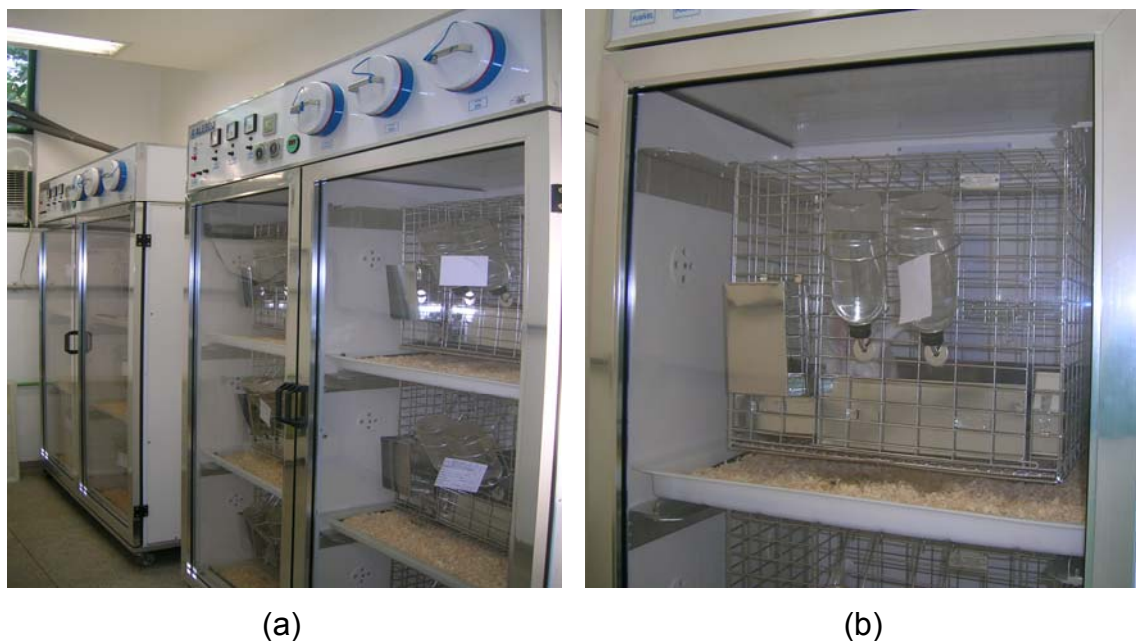


Figura 3.5 Compartimento com filtragem de ar, controle de temperatura e de iluminação, com capacidade para seis gaiolas individuais (a). Gaiola em detalhe, com água, ração e maravalha (b).

### 3.5.3 Cirurgia

Os animais foram submetidos a processo cirúrgico para instalação de implantes de titânio, com dimensões de 3,3 mm  $\varnothing$  x 7,00 mm. Cada coelho recebeu dois implantes totalizando 24 implantes. Os procedimentos cirúrgicos foram iguais para todos os animais e consistiram na inserção de 2 implantes na tíbia direita de cada animal distando 5 mm entre si.

A cirurgia foi iniciada com infiltração de anestésico local (mepivacaína com adrenalina 2%) em torno da área de tecido mole incisada, executando dessa forma o bloqueio anestésico do campo.

O tosqueamento da área cirúrgica foi realizado com tosquiador elétrico, posteriormente, foi procedida a incisão por planos no sentido do longo eixo da tíbia distando aproximadamente 4 mm do local da implantação dos implantes. Após a incisão da pele (em torno de 4 cm de comprimento), fáscia muscular, músculo e periósteo, a tíbia foi exposta. As perfurações ósseas foram iniciadas com a broca de 1,5 mm  $\varnothing$  sob refrigeração constante com soro fisiológico, e subsequentemente, foram usadas brocas com diâmetros crescentes até a broca de 2,8 mm  $\varnothing$ . Então foi executada a instalação dos implantes (3.3 mm  $\varnothing$  x 7,0 mm de comprimento, auto rosqueantes). A sutura foi realizada por planos, usando-se fio de sutura vicryl 5-0 para planos internos e mononylon 5-0 para a sutura da pele, como mostra passo a passo a Figura 3.6.



(a)



(b)

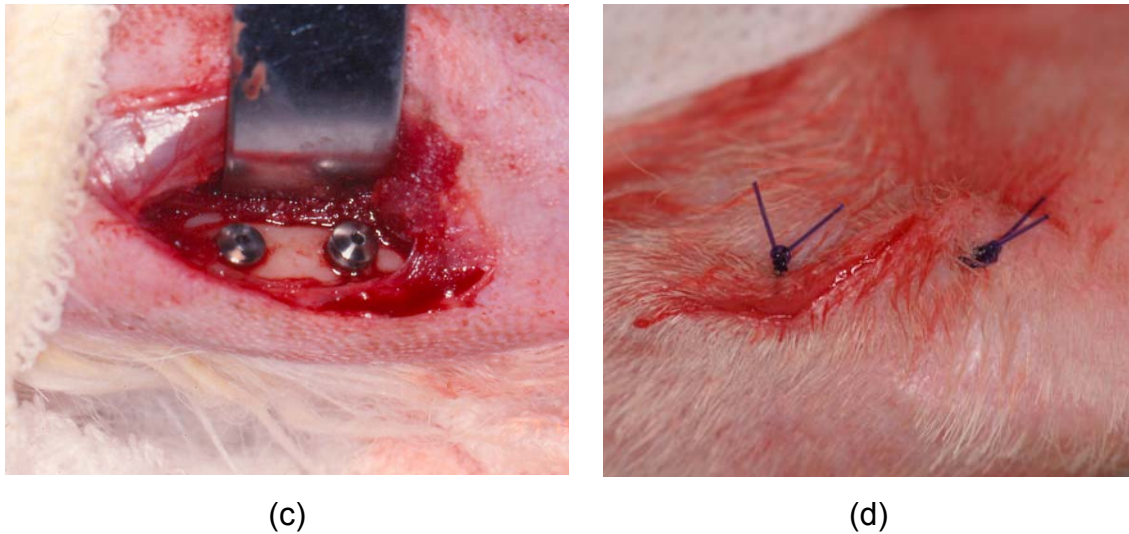


Figura 3.6 Osso da tíbia exposto para inserção do implante (a); Perfurações ósseas já executadas (b); Implantes já instalados (c); Sutura executada (d).

Os coelhos tiveram sua eutanásia programada para 90 dias (12 semanas) após a inserção dos implantes. A eutanásia foi procedida com overdose de Ketamina seguida de sangria. Em seguida, foi realizada a dissecação e coleta das tíbias dos coelhos contendo os implantes. O tecido mole inserido foi removido cuidadosamente. Primeiramente com incisão até a cortical óssea e posteriormente com o destacamento do perióstio. Deste modo, a remoção dos tecidos foi facilitada evitando qualquer contato entre os implantes e os instrumentos de remoção, Figura 3.7.

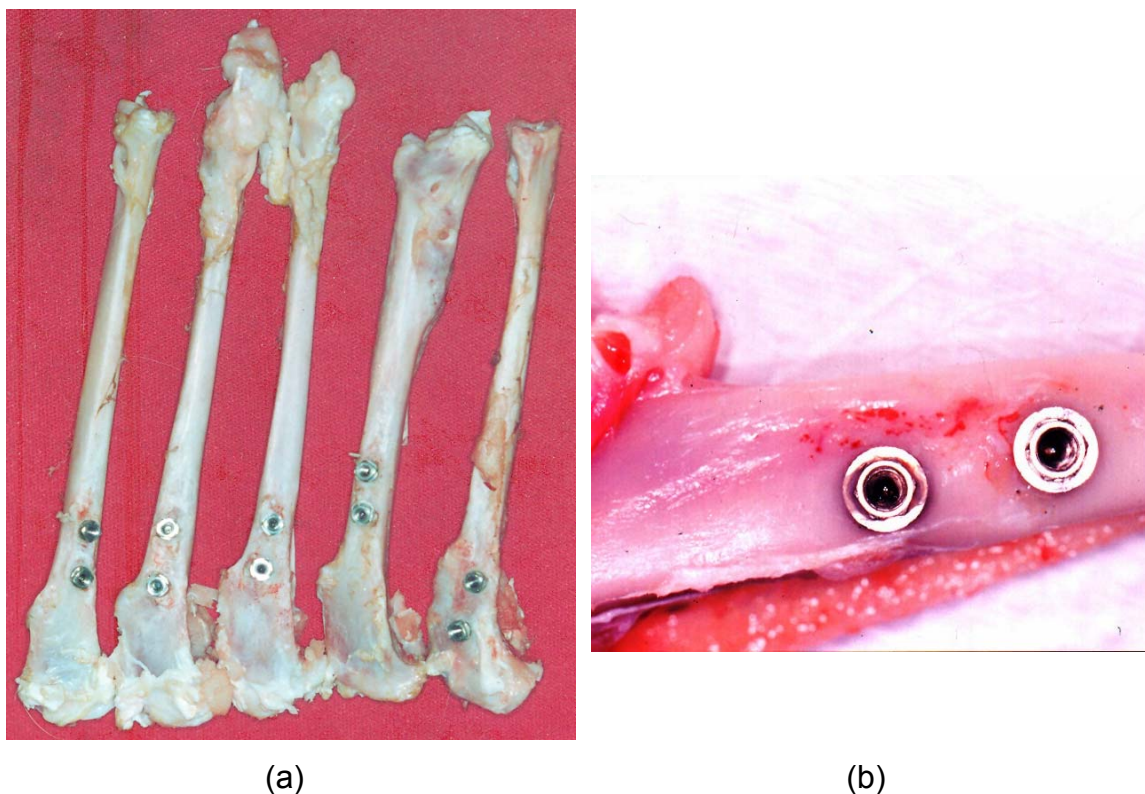
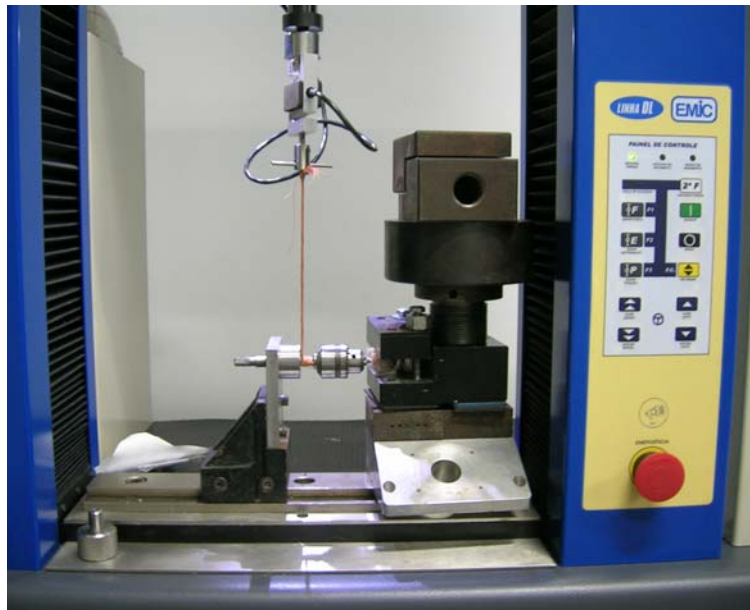


Figura 3.7 Tíbias dissecadas (a), implantes expostos (b).

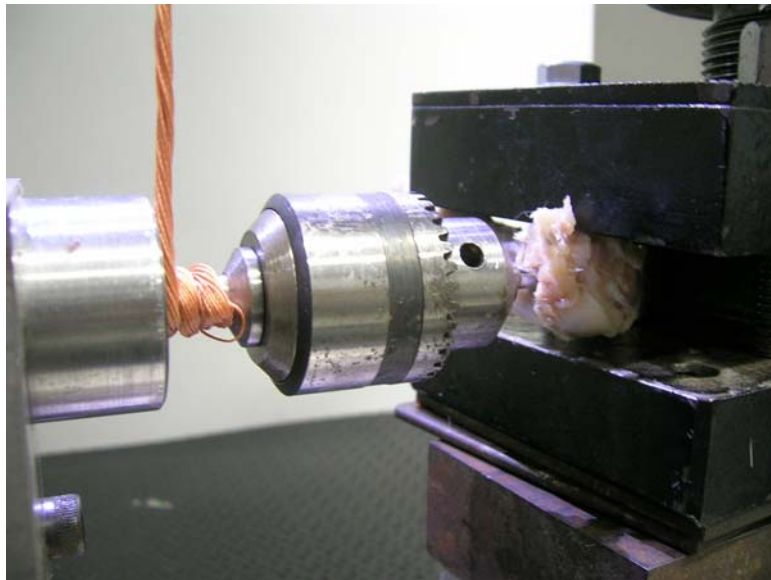
#### 3.5.4 Ensaio de Remoção por Torque

A resposta óssea ao tratamento de superfície foi avaliada através da medição dos valores de torque máximo necessário ao cisalhamento da interface osseointegrada das 24 amostras. O ensaio de torque é um teste usado como medida indireta da resistência da osseointegração dos implantes. Após 90 dias de cicatrização, a força máxima necessária ao rompimento da interface osso-implante foi medida por uma máquina de ensaios mecânicos (EMIC Equipamentos, Brasil), Figura 3.8. Neste equipamento foi adaptado um aparato para possibilitar a realização dos ensaios de torque dos implantes, instalados na tíbia dos coelhos. Esse aparato evita a interferência do operador e, conseqüentemente, possibilita a obtenção de resultados mais precisos e reais. Esses ensaios serão realizados no Instituto Militar de Engenharia (IME), no Rio de Janeiro.

Uma célula de carga de 500N, devidamente calibrada, foi usada para medir a força aplicada. O valor real do torque aplicado é o produto da carga aplicada pelo raio do eixo (diâmetro do eixo de 1,0 cm) do aparato utilizado para o teste ( $M = F \times R$ ).



(a)



(b)

Figura 3.8 Máquina de ensaios EMIC – Equipamentos – Brasil (a). Aparato utilizado nos ensaios de remoção por torque dos implantes inseridos na tíbia dos coelhos (b).

### 3.6 Preparação dos Neutrófilos

#### 3.6.1 Separação dos Neutrófilos em Gradiente de Percoll

Como os neutrófilos são as primeiras células de defesa a interagir com os implantes, imediatamente após a sua colocação, nessa pesquisa optamos pelo estudo dessa célula.

Sangue venoso periférico fresco foi obtido com uso de seringa tipo luer de 10 ou 20 mL. O sangue foi coletado, após consentimento informado, de indivíduos saudáveis e não usuários de medicamento.

Foi preparado um gradiente de percoll (Amersham Biociences, Uppsala, Suécia) com objetivo de purificar neutrófilos, por sua densidade, a partir de sangue venoso periférico heparinizado. O percoll é composto de partículas de sílica inertes, não tóxicas, que não aderem às membranas, sendo ideal para purificação de células e organelas. O gradiente foi composto por soluções a 60% e a 70% de percoll, diluído em solução balanceada de sais (HBSS). Tais soluções foram preparadas conforme a Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Gradientes de Percoll [95].

REAGENTES	60% (3 ML)	70% (3 ML)
Percoll 100% densidade: 1,130 g/mL	1800 L	2100 L
HBSS (solução balanceada de sais) 1 X	990 L	645 L
HBSS (solução balanceada de sais) 10 X	210 L	255 L

Durante a montagem de um gradiente, adicionou-se lentamente 3mL da solução de percoll 70% ao fundo de um tubo falcon de 15mL, que já continha 3mL da solução de 60%. Em seguida, 3mL de sangue heparinizado, coletado em material plástico, de forma a se evitar estimulação pelo vidro, foram colocados cuidadosamente por cima da montagem e centrifugados a 400 g por 35 minutos a 22°C em centrífuga de caçamba móvel (himac CR 20B2) com aceleração/desaceleração de 2m/seg<sup>2</sup>.

Após a centrifugação, obteve-se um halo de neutrófilos situado entre os gradientes de 60% e 70% de percoll, que foi coletado e transferido para um novo tubo. As hemácias sedimentaram para o fundo do tubo e o plasma, juntamente com 53 as plaquetas e os demais leucócitos, permaneceram na porção superior do gradiente, Figura 3.9 [95].

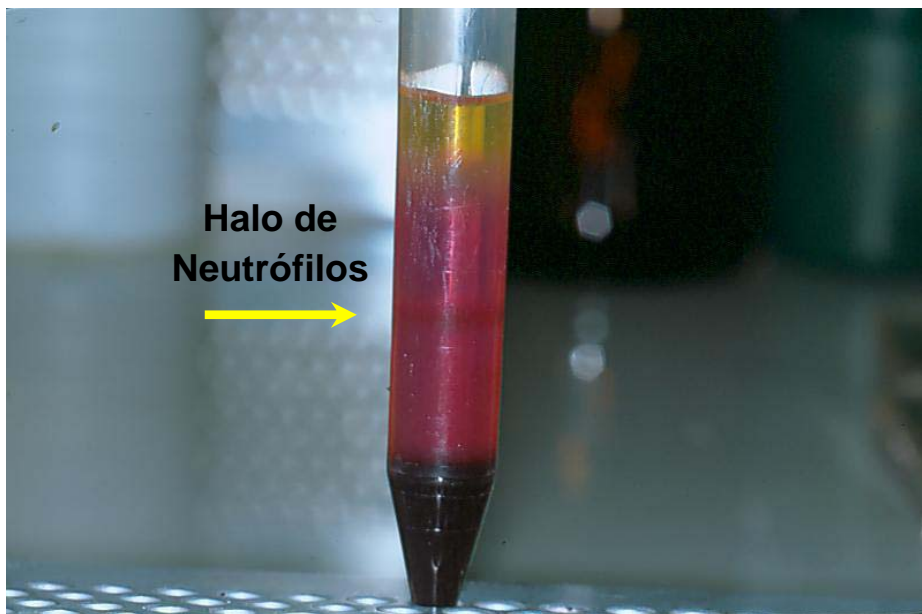


Figura 3.9 Início da separação, após primeira centrifugação. Observar “halo”, onde há concentração de neutrófilos (Seta) [95 - Adaptado].

A fração do plasma foi desprezada e o halo de neutrófilos foi retirado diretamente com uma pipeta. As células recolhidas foram lavadas duas vezes com 10mL de HBSS para retirada de resquícios do percoll e as hemácias residuais foram lisadas com 3mL de água miliQ por 15 segundos. A osmolaridade foi restaurada após este tempo, pela adição de 9mL de NaCl a 1,2%. Ao final, obteve-se um “pellet” de neutrófilos, que foi ressuspenso em 500L de PBS contendo cálcio e magnésio.

Os preparos das células foram realizados no Departamento de Patologia Molecular da Universidade de Brasília – UnB.



### **3.6.2 Incubação dos Neutrófilos nas Diferentes Superfícies**

Os neutrófilos foram incubados por diferentes tempos (15 min e 60 min) nas três superfícies. Após a colocação das células em contato com as superfícies pelos tempos referidos, as células foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

Após a exposição dos neutrófilos às superfícies de Ti, as amostras foram cobertas com uma solução fixadora de Karnovsky (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 2% e sacarose à 3%), seguido de tamponamento (solução de cacodilato de sódio 0,1 mol/L, pH 6,4 a 7,4). Esse é um método rotineiramente utilizado no preparo de amostras a serem analisadas por MEV.

A cultura das células sobre as superfícies foram realizadas no Departamento de Patologia Molecular da Universidade de Brasília – UnB.

### **3.7 Preparação da Fibronectina**

A fibronectina (FN) é um dos componentes da matriz extracelular (MEC). Ela é uma glicoproteína dimérica encontrada em todos os vertebrados sob duas formas fundamentais: solúvel (plasma sanguíneo e outros fluidos) e insolúvel (MEC de diversos tecidos). Possui peso molecular entre 440.000 e 500.000 dáltons. Cada subunidade possui uma porção aminoterminal e uma porção carboxiterminal. Pontes de dissulfeto ligam uma subunidade à outra na região próxima à porção carboxiterminal de cada uma delas. Possuem dobras que levam à remodelação estrutural e diversas conformações de acordo com o meio. Um dos objetivos dos tratamentos da superfície dos implantes é criar propriedades superficiais que favoreçam o desdobraimento e o alongamento da FN para aumentar sua ligação e fixação na superfície do implante. Todo o trabalho com as proteínas (FN) e células osteoblásticas foram realizadas no Instituto de Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro - RJ.

### 3.7.1 Incorporação de Fibronectina

A FN sérica humana (Sigma) foi diluída (10µg/mL), pH 4,5, em solução tampão acetato de sódio 20 mM (Reagen) previamente filtrado. Foi adicionado NaCl à solução para que a força iônica do meio se mantivesse a 0,145 – 0,150mol.dm<sup>-3</sup>.

As amostras foram recobertas, ou não (controle), com fibronectina na temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, os substratos com FN foram lavados com PBS (solução salina tamponada [0,15M] com fosfato [0,01M] e pH 7,2) para retirar as moléculas não adsorvidas. Um a dois minutos após o descolamento das moléculas adsorvidas com o auxílio da tripsina 0,1% e PBS, foi retirado o excesso e a solução resultante foi recolhida para ser levada ao espectrofotômetro Spectrum 22 PC para quantificar as moléculas adsorvidas. A espectrofotometria foi utilizada para determinar a absorvância da FN nas superfícies (concentração da proteína nas soluções que absorve radiação). Foram realizados controles negativo (PBS) e positivo (suspensão de FN 100µg/mL). O comprimento de onda utilizado foi de 550 nm (leitura para proteínas).

### 3.7.2 Cultura de Osteoblastos

As células osteoblásticas foram mantidas em garrafas de poliestireno contendo meio de cultura Dmem com baixa concentração de glicose (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Soromed), 1% de solução de aminoácidos essenciais (minimim Essencial amino acid solution 100x, Sigma), ácido ascórbico (0,15 g.L<sup>-1</sup>, Sigma) tamponado com Hepes 10mM (Sigma) e NaHCO<sub>3</sub> 14,3 mM (Reagen). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,2. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Para transpor as células da garrafa de cultura estoque aos substratos de ensaio de adesão, foi utilizada a técnica de deslocamento enzimático das células. Culturas confluentes foram tratadas com tripsina 0,2% (Difco) e EDTA 0,02% (Sigma) em solução salina (NaCl 0,8% [Reagen] ; KCl 0,01% [Sigma]; NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,29% [Reagen] e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02% [Sigma], em água) por 5 minutos a 37 °C. Após este tempo as células desprendidas foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela adição de soro fetal bovino à solução. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm a 22 °C e o pellet obtido foi resuspendido em meio de cultivo sem soro fetal bovino. A concentração/densidade celular da suspensão obtida foi estimada por contagem em câmara hematómica de Neubauer.

### **3.7.3 Interação das Células com as Amostras Recobertas por FN**

Após a contagem da concentração celular da suspensão em câmara hematómica,  $10^6$  células/mL foram levadas a interagir com as amostras, com e sem recobrimento de FN, totalizando quatro grupos (Porous®, Porous® com FN, Dopado com Na e F e Dopado com Na e F com FN). Após 1 hora de interação, os sobrenadantes foram descartados e as células associadas (adsorvidas e aderidas) as superfícies foram lavadas com PBS e fixadas utilizando glutaraldeído 92,5% em PBS). O glutaraldeído foi utilizado como fixador por exercer sua função sem danificar a integridade da célula (contém dois grupos funcionais que fazem ligação com duas proteínas). Deve-se evitar o uso de formaldeído (um grupo funcional apenas) para fixar as células, já que este procedimento deforma as células. Após fixação, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara hematómica de Neubauer.

### **3.7.4 Radioatividade das Superfícies com Osteoblastos**

O cultivo das células osteoblásticas humanas, HOB, foi realizado para avaliar a adesão e a proliferação celulares através de contagem por cintilação líquida. Culturas confluentes de HOB foram descoladas com tripsina, lavadas e novamente contadas em câmara hematómica. Em seguida, a cultura foi resuspendida em Dmem contendo soro e [ $^3\text{H}$ ]-timidina (1143 cpm). Após sua incorporação por um período de 12 horas, a cultura confluyente foi novamente descolada e lavada em Dmem sem soro e um cintilador líquido (Beckman,

Rack III) foi utilizado para se avaliar a radioatividade associada às células. Os valores resultantes foram expressos em contagens por minuto ou cpm. Essas células incorporadas com [<sup>3</sup>H]-timidina foram associadas às diferentes superfícies por um período de três horas. As contagens foram realizadas após uma, duas e três horas. Este método de avaliação do comportamento celular permite a reprodução do estudo de maneira precisa, favorecendo a aplicabilidade futura da incorporação de FN às superfícies de implantes dentários.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Preparação das Amostras

Os implantes com tamanho especial 3,3 mm  $\varnothing$  x 7,0 mm de comprimento foram submetidos aos tratamentos de superfície (Porous®, Vulcano Actives® e Deposição Nanométrica), Figura 4.1, e enviados para a CBE EMBRARAD para serem esterilizados por radiação gama. A Figura 4.2 mostra a embalagem tipo blister após serem irradiados por radiação gama.

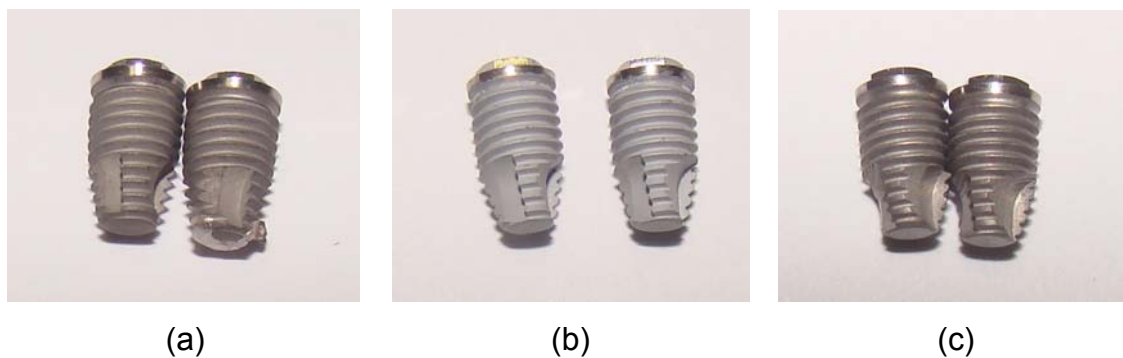


Figura 4.1 Implantes osseointegráveis com diferentes tratamentos de superfície (a) Porous®, (b) Vulcano Actives® e (c) Deposição Nanométrica.



Figura 4.2 Implante estéril com tratamento Porous® - Conexão Sistema de Próteses na embalagem blister.

A caracterização morfológica via FEG/EDS e espectroscopia RAMAN foram realizadas utilizando implantes estéreis, como mostra a Figura 4.3.



Figura 4.3 Embalagem do implante com suporte específico para o tubo que contém o produto e monta implante.

Os discos de titânio utilizados para caracterização espectroscópica XPS e difração de raios X foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento de superfície que os implantes e a Figura 4.4 mostram o aspecto superficial dessas amostras.



Figura 4.4 Discos de titânio tratados superficialmente.

## 4.2 Caracterização Morfológica

Foi realizada a caracterização da superfície dos implantes osseointegráveis através de FEG/EDS. As Figuras de 4.5 a 4.7 mostram as micrografias eletrônica de 3 superfícies estudadas, ataque ácido, anodizada e com deposição de nanopartículas, respectivamente.

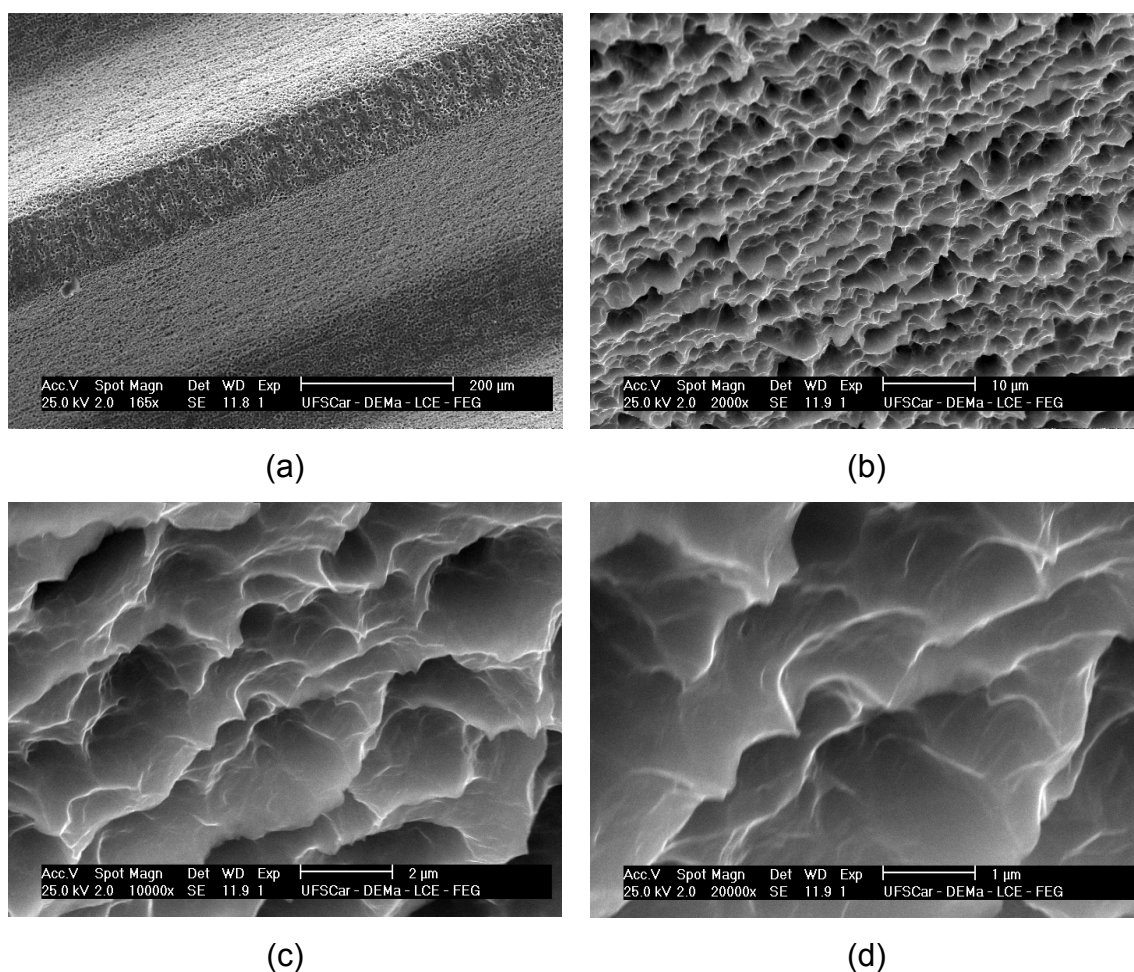


Figura 4.5 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície Porous®.

A Figura 4.5 mostra as micrografias da superfície do implante Porous® da Conexão Sistemas de Próteses. Esta superfície comercial é obtida através do tratamento de imersão do titânio em soluções ácidas, promovendo o ataque químico e produzindo uma microtopografia caracterizada por cavidades de 1 a 4 μm de diâmetro circundadas por micropicos afilados. As rugosidades desta

superfície ao contrário da superfície usinada não exibem uma orientação preferencial e por isso o ataque ácido produz uma superfície com características topográficas isotrópicas.

A Figura 4.6 apresenta as micrografias da superfície de implante que foi submetida ao tratamento de oxidação anódica em presença de íons cálcio e fósforo (Ca/P).

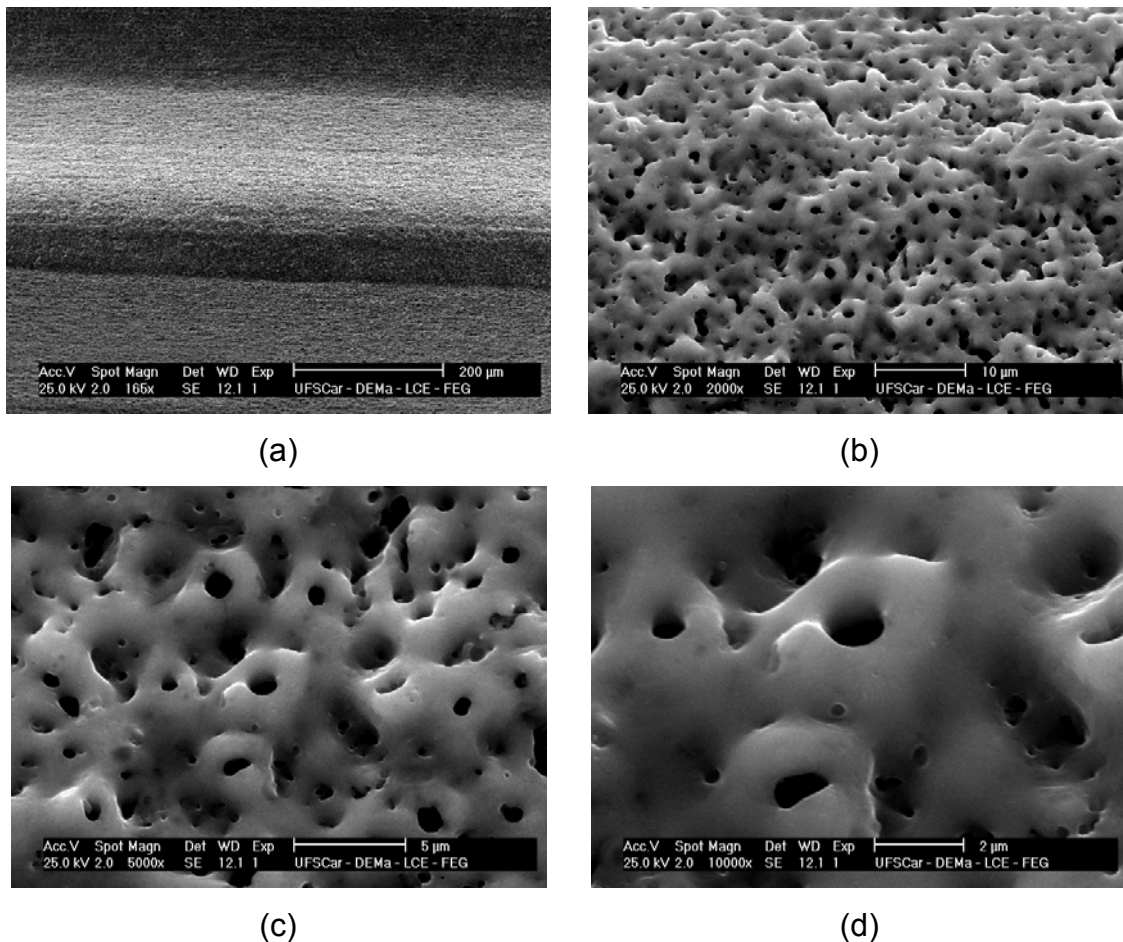


Figura 4.6 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície Vulcano Actives®.

As reações de oxidação que ocorrem na superfície do implante durante a anodização acontecem com a formação de gases, principalmente  $H_2$  e  $O_2$ , cuja concentração aumenta à medida que se eleva a taxa de formação do óxido [1].

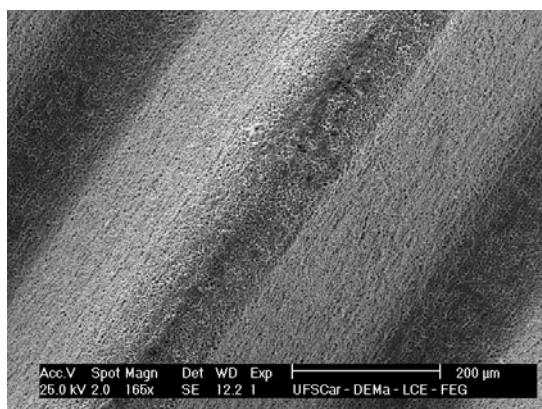


A densidade e o tamanho dos poros estão diretamente ligados à corrente aplicada quando consideramos o mesmo eletrólito. Quanto maior a densidade de corrente aplicada, maior a concentração de gases formados durante a reação, acima do potencial de “*breakdown*”. O aumento da densidade das microbolhas induz a sua coalescência com formação de bolhas de maior diâmetro que ao se encontrarem dão origem à interconexão dos poros na superfície [1]. Este mecanismo poderia explicar os vários diâmetros dos “vulcões” presentes nessa superfície.

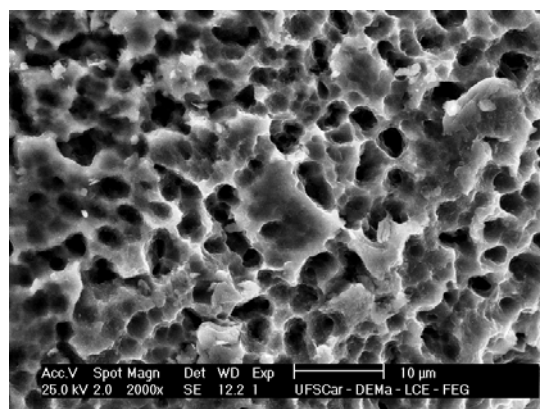
Também pode ser observado em alguns pontos da superfície, principalmente em maiores aumentos, o surgimento de defeitos semelhantes a trincas na cobertura. Esses defeitos podem ter se originado em consequência das propriedades do material formado na superfície. Sendo um material cerâmico, o óxido de titânio é um material frágil. Durante a formação do óxido a taxa de crescimento dessa camada pode ser elevada devido à corrente empregada na reação de oxidação. Dessa forma, podem ter sido geradas tensões de tração acima do limite de resistência do material ocasionando, consequentemente, a fratura da camada do óxido.

Estudos realizados por Sul Y.T., 2001b [38], 2002d [88], 2002f [89] demonstram que a topografia dos implantes de titânio obtida após a reação de oxidação anódica da superfície é dependente, entre outros parâmetros, da composição química da solução eletrolítica.

A Figura 4.7 apresenta as micrografias da superfície de implante que foi submetida ao tratamento de deposição nanométrica de Na e F.



(a)



(b)

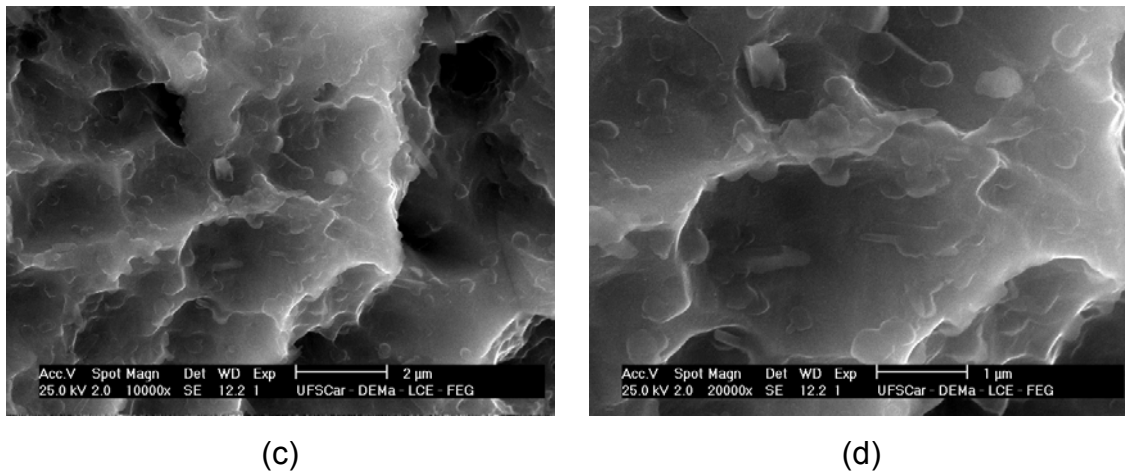


Figura 4.7 Micrografias eletrônicas de varredura da superfície com deposição de nanopartículas (Na/F).

Pode ser observado que a topografia dessa superfície (Figura 4.7) apresenta semelhança com a apresentada na Figura 4.5. Porém a superfície é composta por picos menores, arredondados, mais homogêneos e crateras rasas. A distribuição das rugosidades possui característica isotrópica, mesmo quando observadas em aumentos menores.

Esta mudança da altura dos picos é uma consequência da elevada reatividade dos íons flúor e sódio e a suscetibilidade química do óxido de titânio a estes íons. Estes resultados estão de acordo com os resultados dos trabalhos de Ellingsen, 1995 [6], 2004 [47], de Johansson, 2003 [48] e Cooper et al., 2006 [51] onde as superfícies de implantes de titânio submetidas à tratamento químico por fluoretos apresentaram valores menores de rugosidade  $R_a$  após os testes, demonstrando assim, uma superfície mais lisa após os tratamentos com fluoretos. Estes resultados demonstram que as superfícies de titânio sofrem corrosão, com diminuição da rugosidade superficial, quando são imersos em soluções de fluoretos, havendo ataque químico preferencial das arestas dos picos da superfície.

Com aumentos de 10000 e 20000 vezes é possível observar a presença de nanopartículas distribuídas uniformemente sobre a superfície do implante, o que mostra a característica híbrida desse tratamento, pois as cavidades

provenientes do ataque ácido são de ordem micrométrica, variando de 1 – 4µm de diâmetro, enquanto as partículas são menores do que 100nm.

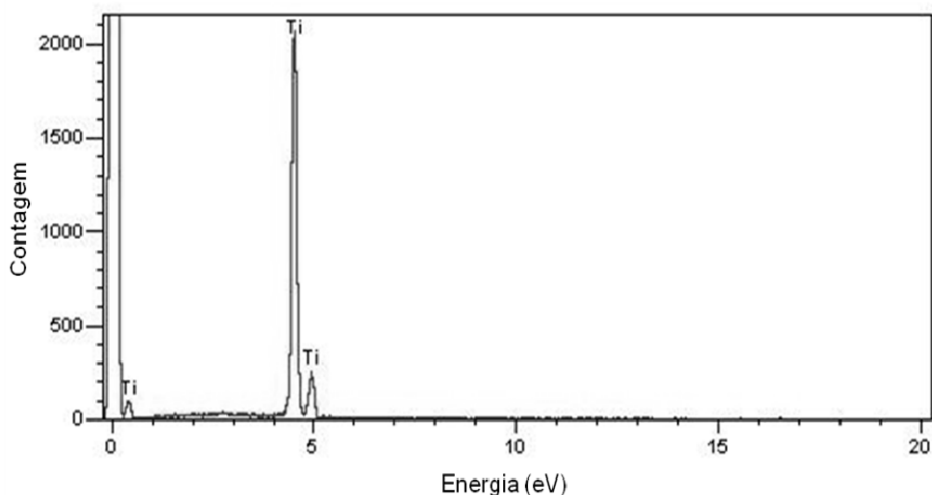
As superfícies das Figuras 4.5 e 4.6 apresentam uma topografia rica em poros e apresentam bons resultados clínicos, principalmente por possibilitar o crescimento ósseo no seu interior aumentando o travamento mecânico [42, 53, 55, 62, 65]. Sua topografia pode induzir alterações fenotípicas apropriadas das células nas primeiras semanas de cicatrização. Os trabalhos de Sul Y.T., 2004 [18] e 2005b [90] demonstraram que as superfícies tratadas por oxidação em presença de cálcio e que possuem topografia porosa semelhante à superfície da Figura 4.7 apresentam ótimos resultados de remoção por torque e de contato osso-implante in vivo quando comparadas às superfícies usinadas. Nestes trabalhos, os autores atribuíram o sucesso obtido a um conjunto de propriedades superficiais do óxido como rugosidade, cristalografia, espessura, porosidade e composição química. Porém, o papel de melhorar o travamento mecânico foi atribuído à porosidade da superfície, juntamente com a rugosidade do implante pelo crescimento de tecido ósseo no seu interior, enquanto a composição química da superfície seria responsável pela união bioquímica com o osso. Esta hipótese se baseia nos seguintes conceitos: como a osteogênese e a maturação óssea são processos biológicos relativamente lentos, e o período de cicatrização empregado nesses trabalhos foi curto (seis semanas), para a realização dos testes de remoção por torque, a maior estabilidade apresentada pela interface osso-implante parece pouco provável ter sido conseqüência do crescimento do tecido ósseo no interior dos poros. Assim, os resultados sugerem que a composição química possa ter um papel preponderante nas primeiras semanas de cicatrização e que a porosidade e rugosidade contribuiriam para os resultados positivos nos períodos mais tardios da implantação, através do crescimento de tecido ósseo no interior dos poros e rugosidades aumentando assim a resistência ao cisalhamento da interface osseointegrada.

A superfície mostrada na Figura 4.7 por apresentar topografia muito semelhante à superfície Porous® consagrada na prática clínica e por possuir características híbridas (nano e micrométricas) possuem alto grau de

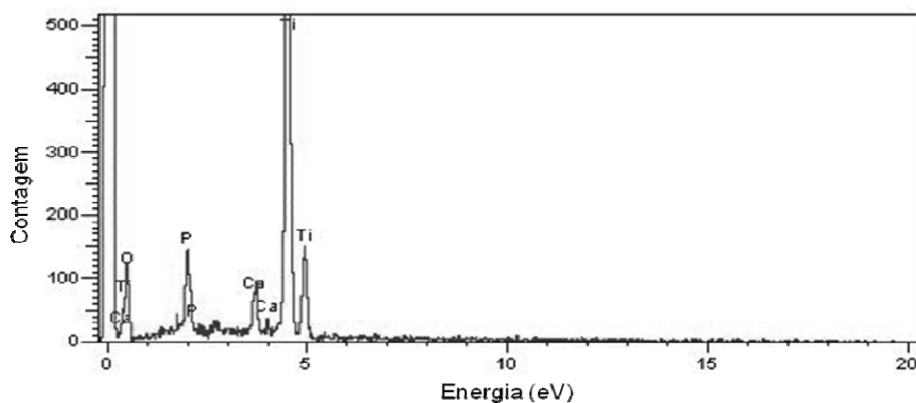
previsibilidade de sucesso clínico, tendo em vista que as reações biológicas ocorrem nessas escalas [47,73,74,75,76,77,78,80,81,82,83].

A composição química das superfícies após o tratamento foi analisada por espectros de EDS. As análises foram executadas da mesma forma em todos os implantes. Foram obtidos espectros no vale entre as terceiras e quartas roscas, a partir do topo dos implantes, utilizando-se as mesmas condições operacionais, como distância de trabalho (WD), corrente do feixe e o tempo de contagem que foi de 100 segundos. Os resultados da análise executada refletiram a composição química média do campo escolhido.

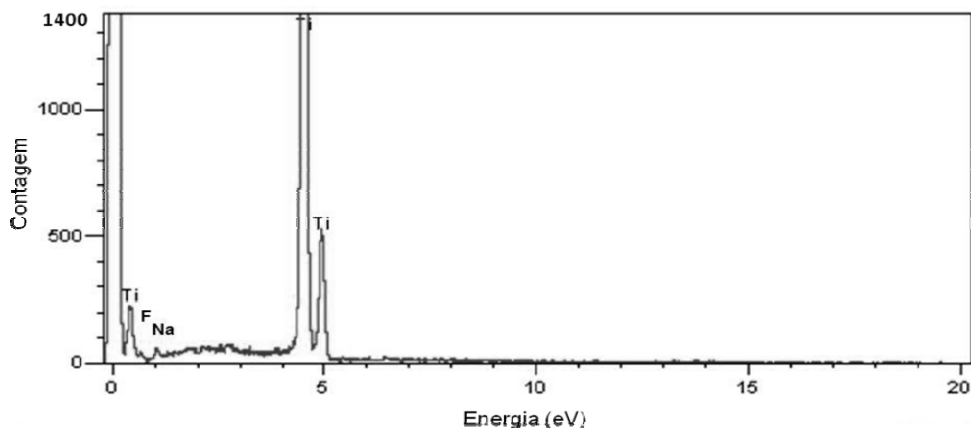
A Figura 4.8 mostra os espectros de EDS dos implantes com tratamento superficial.



(a) Implante Porous®.



(b) Implante Vulcano Actives®.



(c) Implante com deposição de nanopartículas de Na e F.

Figura 4.8 Espectro de EDS de implantes tratados com ataque ácido – Porous® (a), anodizados – Vulcano Actives® (b) e dopados com nanopartículas (c).

A Figura 4.8 mostra o resultado da análise química da superfície dos implantes obtida através de EDS. Observa-se que a superfície Porous® (Figura 4.8 (a)) é composta por Ti. A superfície do implante Porous é obtida por ataque ácido seguido do tratamento de limpeza e passivação com  $\text{HNO}_3$ . A elevada concentração de titânio neste caso demonstra em parte, a interferência do substrato metálico na composição química da superfície, uma vez que a profundidade de interação do feixe de elétrons com a superfície ultrapassa a espessura da camada de óxido. Sendo assim, o sinal recebido pelo detector de raios X reproduzirá as informações da camada do substrato metálico com o qual o feixe interagiu.

Dessa forma é possível observar um forte sinal de titânio metálico no espectro, o que é o reflexo das elevadas concentrações de titânio na composição química. A ausência de oxigênio aponta, juntamente com os valores de concentração do titânio, que o processo de tratamento empregado não tem o objetivo principal de aumentar a espessura da camada de óxido, mas apenas alterar a topografia produzindo um padrão específico de rugosidade. Além disso, o tratamento de passivação após o ataque ácido é empregado somente na obtenção de uma camada de óxido uniforme capaz de

proteger a superfície do implante das degradações químicas e assim evitar reações indesejáveis com o meio biológico. Embora o óxido de titânio, quando formado na superfície do implante, não possua uma estequiometria fixa podemos presumir apoiados nos valores das concentrações de titânio, ausência de oxigênio e também do tratamento empregado, que o óxido da superfície possui espessura muito pequena.

O processo de oxidação anódica pode ter como resultado principal o aumento da espessura da camada superficial devido o aumento da oxidação do titânio metálico. Sendo assim, as informações sobre a concentração de oxigênio e titânio, Figura 4.8 (b), sugerem que possa ter havido o aumento da espessura da camada de óxido durante o processo de anodização, muito embora, devido à ausência de estequiometria fixa do óxido, seja necessário o emprego de técnicas mais sensíveis de análise química de superfície para confirmar tal suposição.

Embora tenha sido observado o aumento da concentração de oxigênio e o decréscimo da concentração de titânio indicando a possibilidade do crescimento da camada de óxido da superfície durante o processo de tratamento por oxidação, existe a necessidade do emprego de técnicas mais sensíveis de análise química de superfície tais como o XPS, para que este comportamento possa ser confirmado com propriedade.

A composição química da superfície dopada com nanopartículas apresentou os elementos Na e F, Figura 4.8 (c). Comparando a composição química desta superfície com a composição química da superfície Porous®, Figura 4.8 (a), podemos observar que há uma indicação de que concentração superficial do titânio aumentou e o oxigênio continua ausente na superfície. Pode-se notar que os elementos flúor e sódio foram incorporados à superfície ainda que em baixas concentrações.

Um fator importante observado nos resultados da análise química das superfícies Porous® e dopada com nanopartículas foi a ausência de oxigênio. Estes resultados são discutíveis, uma vez que esta superfície foi imersa em solução aquosa de fluoretos, portanto, esteve em contato com meios onde o oxigênio se encontrava presente, o que indica que a bolha de interação do

feixe de EDS com o substrato está suplantando a baixa concentração de oxigênio presente na superfície na forma de óxido.

É claramente demonstrado que a superfície metálica do titânio é altamente reativa, sendo necessários apenas décimos de milissegundos para que ocorra a oxidação. Quando a superfície é exposta a meios que contenham átomos de oxigênio ocorre então a formação do óxido que é estável quimicamente em diversos meios [1]. Por outro lado os fluoretos são elementos com elevado potencial de corrosão que prontamente atacam a superfície do óxido, e reagem com o titânio metálico subjacente levando à formação de fluoreto de titânio e hidrogênio como subprodutos [37]. O tratamento da superfície com íons Na e F consistiu na imersão do implante de titânio em solução de fluoretos e sódio. Os resultados da análise química desta superfície indicam ter havido reação dos elementos químicos presentes na solução com a camada superficial do óxido resultando em sua corrosão. Desta forma, poderiam ser justificados os resultados das análises que mostraram o aumento da concentração de titânio e a ausência do oxigênio com a presença de flúor e sódio na superfície após o tratamento. Por outro lado, pode ser levantada a hipótese de que ainda que os fluoretos e o hidrogênio reagissem com a superfície do óxido, promovendo sua corrosão com liberação de oxigênio, hidrogênio gasoso, formação de  $H_2O$  e produtos de corrosão, ainda assim, seria formada uma camada oxidada devido às condições em que foram realizados os tratamentos. Já foi comprovado que a superfície do titânio na presença de átomos de oxigênio sofre oxidação espontânea e instantânea com a formação de camada inerte de óxido e que uma superfície metálica pura só é obtida em condições laboratoriais extremamente controladas, permanecendo assim somente enquanto estas condições forem mantidas [37]. O que nos parece mais razoável, e poderia justificar a ausência de oxigênio nos resultados das análises químicas desta superfície com mais propriedade, seria o fato da análise por EDS ter sido incapaz de detectar o oxigênio em baixas concentrações nas quais supostamente este elemento estaria presente.

O oxigênio é um elemento de baixo número atômico, portanto, um elemento leve da tabela periódica. O EDS é uma técnica de análise química

geralmente aceita como qualitativa e semi-quantitativa, entretanto, a capacidade de detecção e quantificação de elementos leves da tabela periódica é reduzida e em alguns casos é até mesmo incapaz de identificá-los. Conseqüentemente, a ausência de oxigênio na composição química desta superfície pode ser justificada pela incapacidade de discriminação, por parte da sonda, de baixas concentrações de oxigênio presentes na superfície e não pela ausência do próprio elemento. Para obter resultados mais precisos da composição química da superfície de implantes modificados pelo processo de oxidação anódica, torna-se necessário o emprego de técnicas de análise superficial que sejam mais sensíveis na detecção de elementos leves e que possam estar presentes em concentrações muito reduzidas. Para essa finalidade foi empregada a análise de superfície através da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) entre outras técnicas.

A composição química da superfície é uma propriedade importante nos implantes de titânio e a modificação adequada desta propriedade com a introdução de elementos químicos específicos que afeta favoravelmente os resultados clínicos. O cálcio e o fósforo presentes na camada de óxido da superfície dos implantes são capazes de aumentar o contato osso-implante e os valores de remoção por torque, pois podem fornecer sítios na superfície para nucleação de cristais de fosfatos de cálcio facilitando a mineralização da superfície, tornando-a quimicamente similar ao tecido ósseo; podem facilitar a adesão de proteínas de ligação celular (fibronectina e vitronectina) através da ligação com os domínios RGD destas proteínas; e é capaz de ativar subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas da membrana celular e assim, facilitar a ligação e adesão dos osteoblastos à superfície dos implantes [46]. O cálcio é capaz de aumentar o ponto isoelétrico do titânio tornando sua superfície mais positiva no biolíquido. O aumento da concentração de cargas elétricas positivas na superfície promove forte atração sobre os fosfatos. Uma vez que a concentração de fosfatos na superfície tenha se elevado existirá maior atração pelo cálcio conseqüentemente aumentando a precipitação de cristais de fosfato de cálcio na forma de apatitas biológicas. Simultaneamente uma parcela do cálcio presente na superfície é dissolvida, devido à queda do pH local



promovida pelo processo inflamatório. Quando os implantes de cálcio são introduzidos no tecido ósseo, há um aumento da saturação de cálcio nas vizinhanças da superfície, aumentando assim, a cinética de precipitação dos fosfatos de cálcio.

Os bons resultados clínicos apresentados pela superfície contendo cálcio pode ser atribuído pela resposta óssea melhor observada nos estágios precoces da cicatrização, também através de um mecanismo proposto de ligação química entre a superfície e as proteínas polianiónicas que possuem um papel importante na ligação das células ósseas à superfície dos implantes de titânio [18]. Recentemente foi mostrado que o magnésio incorporado à superfície dos implantes de titânio também é capaz de melhorar as respostas teciduais obtendo-se elevados valores de remoção por torque e contato osso-implante medida por frequência de ressonância. Através destes resultados tem sido demonstrado que a ligação bioquímica do tecido ósseo com a superfície do implante é altamente influenciada pela presença e concentração de íons divalentes como cálcio e magnésio na camada superficial do óxido do titânio [90,92].

Análises de XPS foram realizadas para quantificar a porcentagem dos elementos presentes na superfície dos implantes com os diferentes tratamentos de superfície. A Figura 4.9 mostra o espectro em alta resolução para o óxido de titânio presente na superfície do implante Porous®.

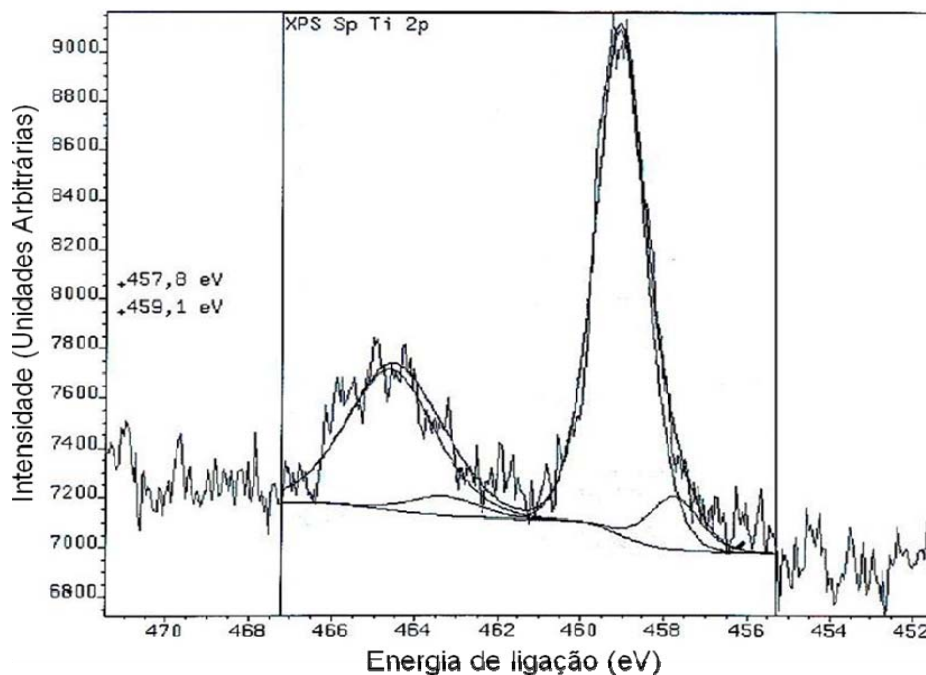


Figura 4.9 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante Porous® indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante é composto por  $\text{TiO}_2$ .

Na superfície Porous® apenas o Ti e o O são esperados, pois a solução utilizada no tratamento e o processo de fabricação não propiciam a adesão de nenhum outro elemento na superfície do implante.

A Figura 4.10 mostra o espectro completo obtido por XPS para o implante Vulcano Actives®. Observa-se a presença de picos característicos da presença dos óxidos de titânio, cálcio e fósforo, bem como de carbono.

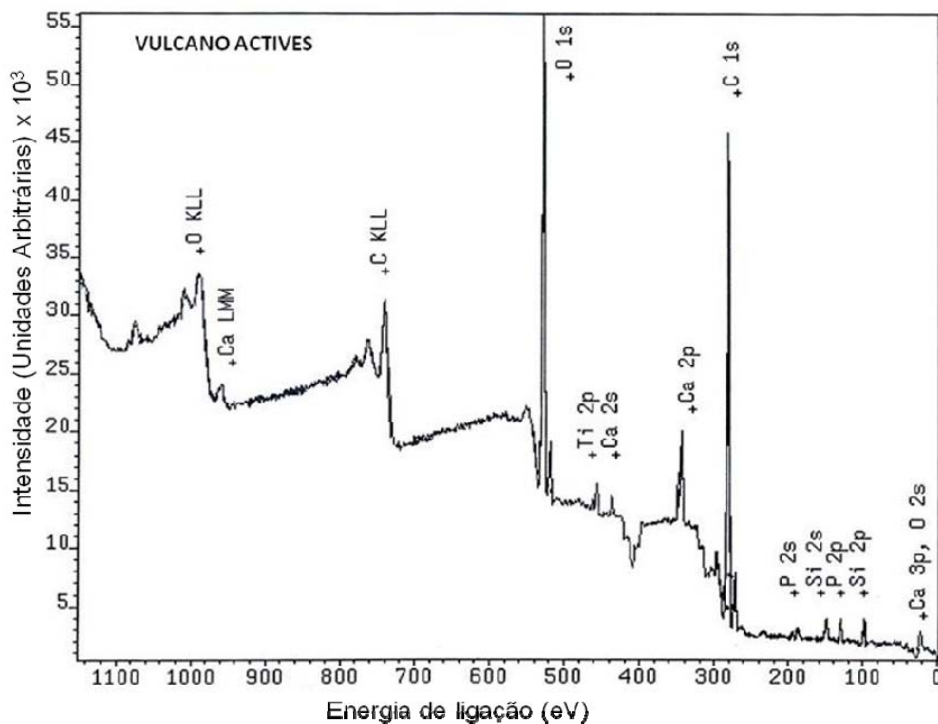


Figura 4.10 Espectro completo de XPS para uma ampla faixa de energias da superfície Vulcano Actives®.

Através da intensidade dos picos obtidos foi possível quantificar as composições relativas do Ti, Ca e P, as quais são apresentadas na Tabela 4.1. Com base nos dados da Figura 4.10 é possível constatar que superficialmente há a presença de óxido de titânio enriquecido com Ca e P. Nota-se também que a porcentagem relativa de óxido de titânio é bem inferior à concentração de Ca e P, como mostra a Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Percentual e energia determinada por XPS dos componentes presentes na superfície dos implantes Vulcano Actives®.

Componentes	Porcentagem (%)	Energia (eV)
TiO <sub>2</sub> (Rutilo, Anatase)	15	457,8 e 459,1
Ca	49	347,7
P	36	133,7

O carbono é sempre encontrado na superfície do titânio de tal forma que o processo de limpeza mais meticuloso é incapaz de eliminar totalmente [37]. O mais breve contato com o ar atmosférico expõe a superfície à presença destes contaminantes, que assim, serão prontamente adsorvidos.

O espectro de XPS em alta resolução revela picos de energia para o Ti 2p, Figura 4.11, na camada de  $\text{TiO}_2$ . O espectro de XPS indica que a composição química da superfície do óxido dos implantes obtidos por oxidação micro arco (OMA), consiste principalmente de  $\text{TiO}_2$ . A matriz oxidada incorpora os íons Ca e P, Figura 4.12 e Figura 4.13, respectivamente. Isto também é observado pela presença relativamente mais baixa de Ti do que Ca e P. Os valores obtidos por XPS representam a composição superficial do óxido, porque a interação do feixe de elétrons interage com as primeiras camadas atômicas.

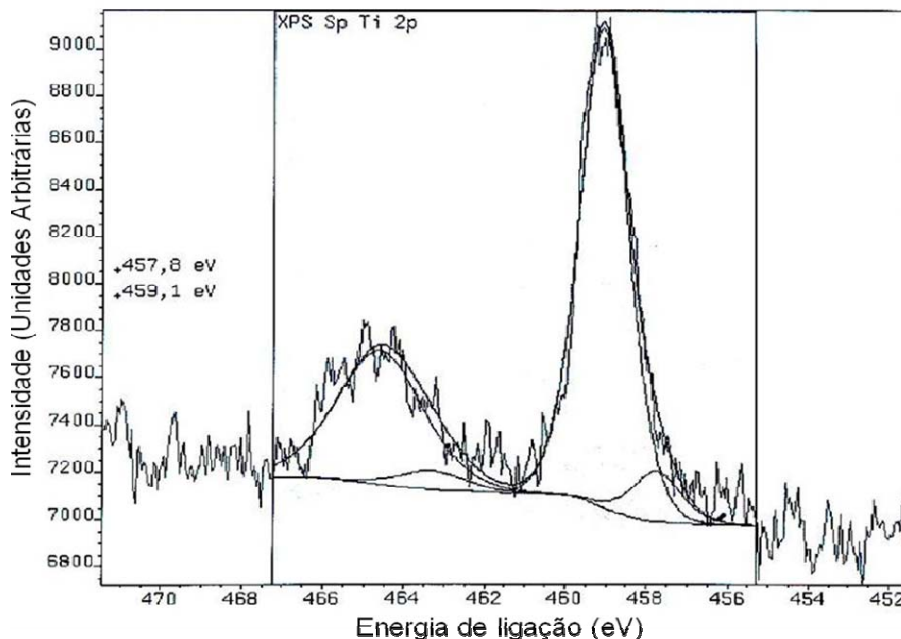


Figura 4.11 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante Vulcano Actives® indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante anodizado é composto por  $\text{TiO}_2$ .

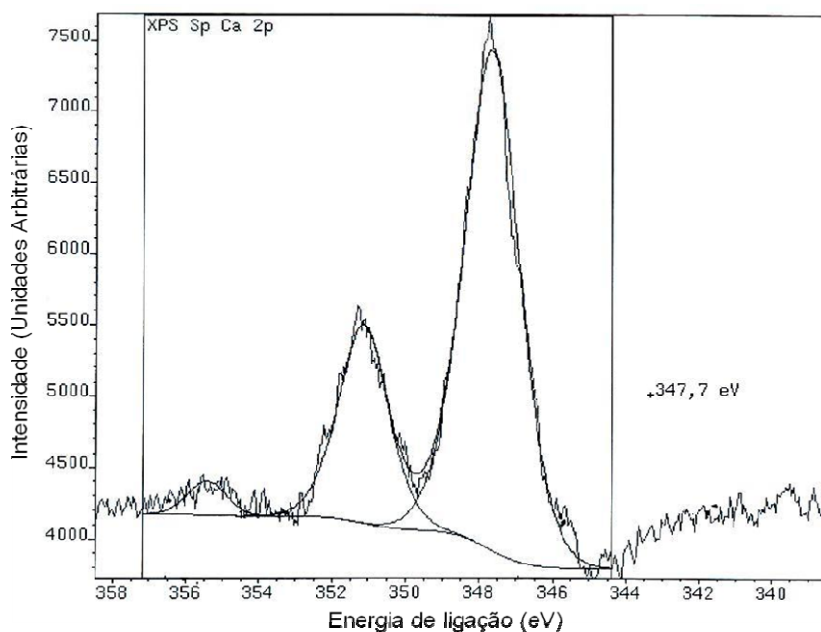


Figura 4.12 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico referente ao elemento Ca 2p em 348 eV e 351 eV contido na superfície do implante Vulcano Actives®.

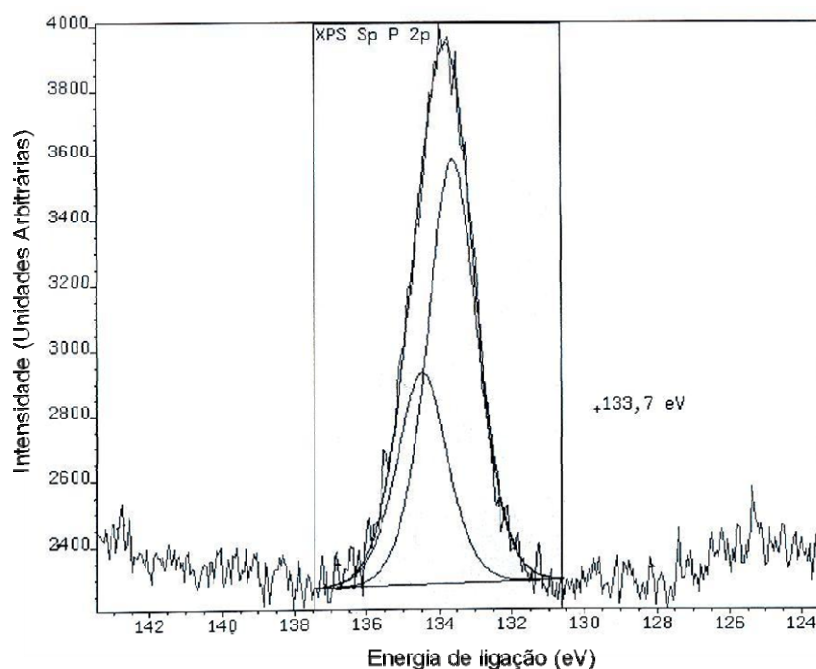


Figura 4.13 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico referente ao elemento P 2p em 133,7 eV contido na superfície do implante Vulcano Actives®.

O implante dopado com nanopartículas de Na e F, não apresentaram picos representativos desses elementos, foi observado apenas pico de Ti, da mesma forma que o implante Porous®, como mostra a Figura 4.14.

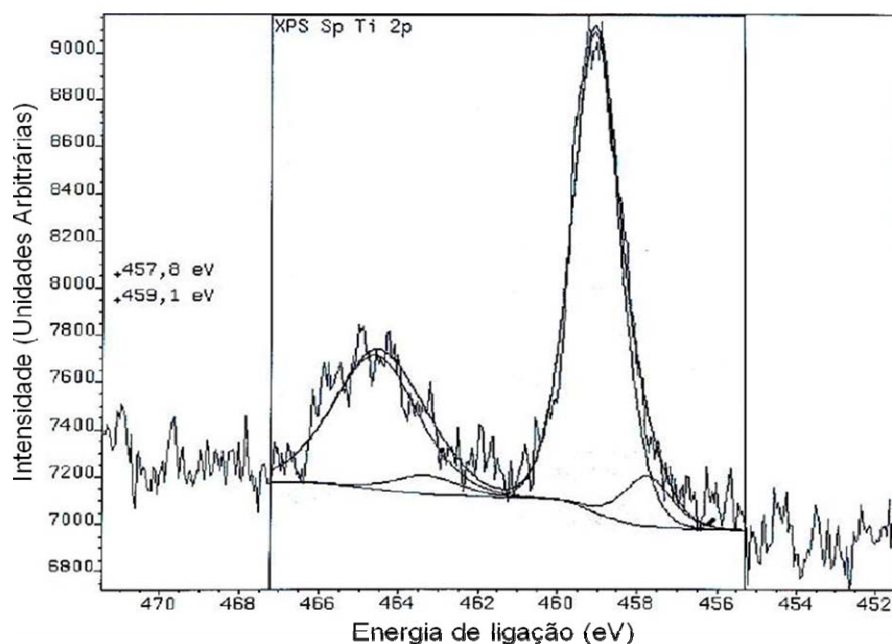


Figura 4.14 Espectro de alta resolução de XPS mostrando o pico duplo do Ti 2p em 459eV e 464eV para o implante dopado com nanopartículas de Na e F indicando que a camada de óxido formada na superfície do implante é composta por  $\text{TiO}_2$ .

A técnica de XPS permite identificar o estado de ligação de um elemento químico com base em suas energias de ligação. Esta técnica permite diferenciar o estado de oxidação do titânio na superfície na forma de anatase ou rutilo. No entanto, esta análise só é possível em camadas finas de óxido. O feixe do XPS interage somente com as primeiras camadas atômicas da superfície e não possui capacidade de penetração. Para a análise de maiores espessuras é necessário remover camadas atômicas por “sputtering” usando um feixe de íons e, a cada camada removida faz-se a análise da nova superfície exposta. Com este procedimento, obtém-se o perfil da composição ao longo da espessura da camada que recobre a amostra.

O feixe de partículas usado na difração de raios X possui maior capacidade de penetração que o feixe XPS. Com a técnica utilizada de difração de raios X determina-se a estrutura cristalina das fases presentes em camadas espessas. Portanto, as técnicas de difração e XPS são complementares.

A Figura 4.15 mostra o difratograma de raios X para o implante Porous® [93 - Adaptado] é possível observar um predomínio do óxido tipo rutilo.

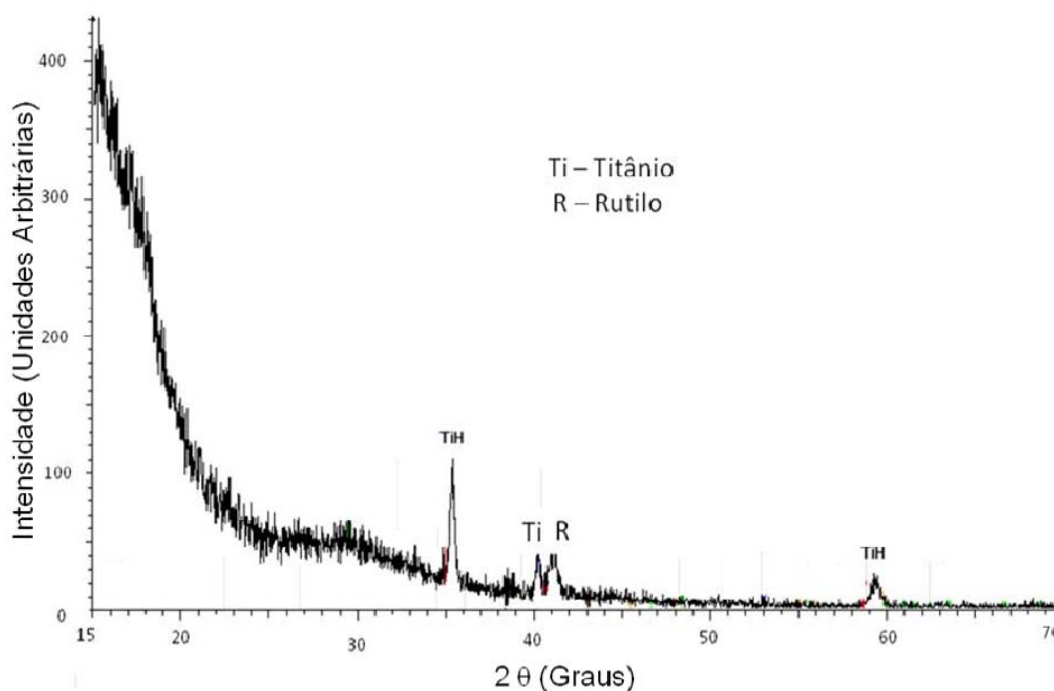


Figura 4.15 Espectro de difração de raios X da superfície Porous®. [93- Adaptado].

A análise do espectro de difração de raios X da superfície Porous® na Figura 4.15 mostra a presença de fases cristalinas de hidreto de titânio (TiH) e titânio metálico. Sabe-se que a superfície Porous® (Conexão Sistemas de Implantes) é submetida a tratamento superficial por imersão em soluções ácidas. O hidreto de titânio é um subproduto encontrado em superfícies de titânio tratadas com ácido fluorídrico [94]. Quando os cristais de hidreto de titânio estão presentes na superfície, as células osteoblásticas do tipo MG63 mostram aumento na atividade específica da fosfatase alcalina, uma enzima marcadora da diferenciação osteoblástica. A presença da fosfatase alcalina

geralmente está associada ao decréscimo da proliferação celular e aumento da diferenciação fenotípica das células com aumento da atividade osteogênica. A composição química age sinergicamente com outras propriedades da superfície para tornar os implantes mais osteocondutores. Sendo assim, a presença dos cristais de hidreto de titânio na superfície Porous, pode ser um fator que agindo sinergicamente com outras propriedades poderia aumentar a biocompatibilidade desta superfície. Entretanto, estudos mais específicos devem ser conduzidos no futuro com o objetivo de determinar o papel específico dos cristais de hidreto de titânio na superfície dos implantes de titânio em relação aos resultados da osseointegração.

Foi obtido o difratograma de raio X do implante Vulcano Actives®, o qual mostra a presença de óxidos de titânio na forma estrutural de rutilo e anatase, aparentemente com maior porcentagem deste último, Figura 4.16. Devido à pequena espessura da camada de óxido da amostra e a intensidade do feixe usado na difração, este penetrou completamente a camada de óxido e atingiu o substrato, justificando-se a presença do titânio no difractograma.

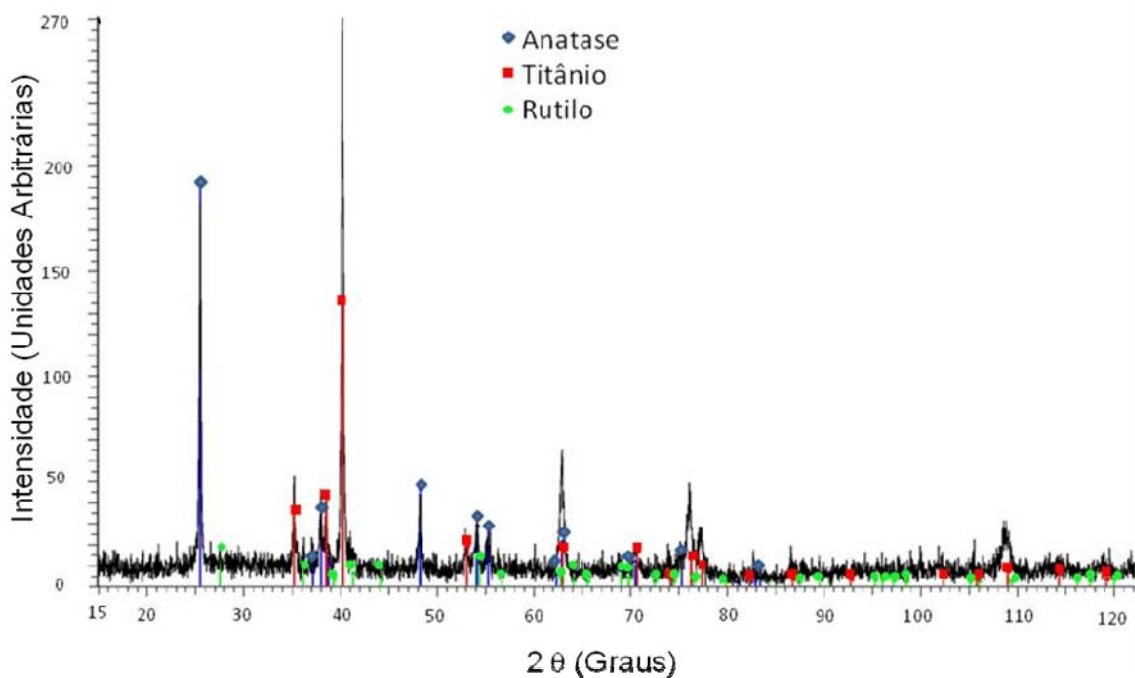


Figura 4.16 Difratograma de raios X da superfície Vulcano Actives® Conexão Sistemas de Prótese ( ■ titânio; ◆ anatase; ● rutilo).



Comparando os dados obtidos por XPS com os resultados obtidos por difração de raios X conclui-se que os elementos Ca e P encontram-se dispersos em altas concentrações, preferencialmente nas camadas mais externas do óxido formado por oxidação micro arco.

A Figura 4.17 mostra o difratograma de raios X para o implante dopado com nanopartículas de Na e F [93 - Adaptado]. É possível observar um predomínio do óxido tipo rutilo e a presença da fase de hidreto de titânio, assim como mostrado no difratograma da superfície Porous®, Figura 4.15.

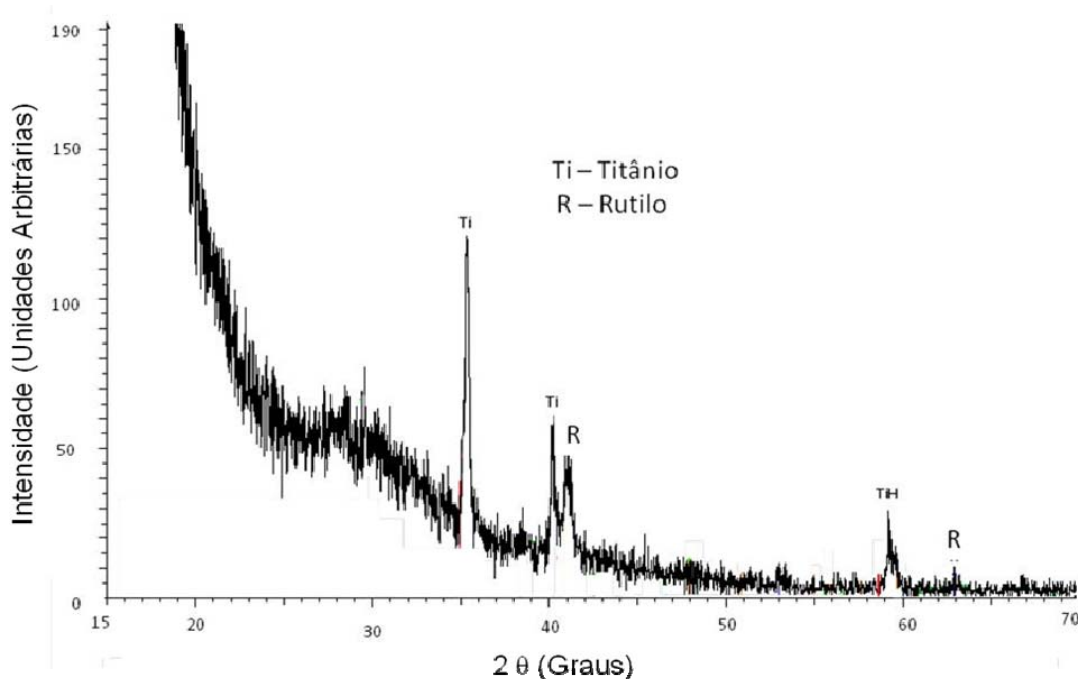


Figura 4.17 Espectro de difração de raios X da superfície dopada com nanopartículas de Na e F [93-Adaptado].

As alterações produzidas pela oxidação anódica, geralmente vêm acompanhadas da mudança cristalográfica do óxido pelo aparecimento de fases cristalinas de anatásio e algumas vezes de anatásio e rutilo misturadas ao óxido amorfo [46,88,89]. Embora no presente trabalho não tenha sido analisada e medida a espessura da camada da superfície após os tratamentos executados e por isso não possa ser concluído com propriedade o crescimento da camada de óxido, é possível presumir tal resultado, uma vez que a

mudança do óxido amorfo para uma mistura de amorfo com presença de fases cristalinas de  $\text{TiO}_2$  é uma característica determinante do aumento de espessura. A espessura final e o tipo de fase cristalina presente, assim como sua proporção, dependerão da escolha e combinação entre os diversos parâmetros usados durante a reação de oxidação, tais como, densidade de corrente, tipo de eletrólito, concentração e temperatura da solução [38].

Tem sido discutido em vários trabalhos científicos o papel da cristalinidade da camada de óxido do titânio nos resultados obtidos in vivo usando-se modelos animais [38]. Melhores respostas ósseas foram determinadas em testes de remoção por torque, frequência de ressonância e análise histoquímica nos implantes que possuem fases cristalinas de anatásio e rutilo com anatásio misturadas à fase amorfa do óxido da superfície, quando comparados aos implantes que possuem apenas óxido amorfo [36,43]. Até o momento não é conhecido o papel preciso desempenhado pela cristalinidade do óxido de titânio nos resultados positivos de osseointegração relatados na literatura. No entanto, há uma indicação de que o óxido mais cristalino possa reduzir a cinética de dissolução da superfície reduzindo conseqüentemente os produtos da degradação liberados no meio biológico. Desta forma, as interações da superfície do implante com o meio biológico, podem ser melhoradas, principalmente as interações iniciais com as biomoléculas, uma vez que foi demonstrado a ocorrência de maior adesão de proteínas à superfícies de titânio que apresentam fases cristalinas de rutilo e anatásio em seus óxidos.

Através das análises de XPS e difração de raios x foi possível identificar a presença dos óxidos rutilo e anatase na superfície do implante Vulcano Actives, porém não foi possível quantificar qual fase está presente predominantemente. Assim, foram feitas análises dos óxidos de titânio por espectroscopia RAMAN. A espectroscopia RAMAN só revelou picos na superfície anodizada, não sendo possível aplicar essa técnica na superfície Porous® e dopada com nanopartículas de Na e F, pois devido ao filme óxido nessas superfícies serem pouco espessos a interação do raio laser não foi sensível aos detectores do equipamento.

A espectroscopia RAMAN se dá quando um feixe de luz monocromático interage e é espalhado pelas moléculas de um composto, verifica-se que uma pequena parte da luz espalhada tem uma frequência que difere da radiação incidente. Os espalhamentos causados pelas colisões dos fótons incidentes com as moléculas da amostra podem ser classificadas em 3 diferentes maneiras:

- 1) Elástica com a mesma energia do fóton incidente (Rayleigh)
- 2) Inelástico com perda de parte da energia do fóton incidente (Stokes)
- 3) Inelástico e com espalhamento em uma energia maior do que o fóton incidente (Anti Stokes)

A maior parte das colisões de fótons incidentes no material é elástica. No espalhamento Rayleigh após a interação a molécula volta ao estado inicial de energia sem que altere a frequência. Entretanto cerca de 1 molécula em um milhão sofre espalhamento inelástico que envolve uma troca de energia quantificada entre a molécula e o fóton incidente e a molécula entra então num estado vibracional que é captado pelos detectores RAMAN.

A Figura 4.18 mostra o espectro RAMAN para a superfície Vulcano Actives®.

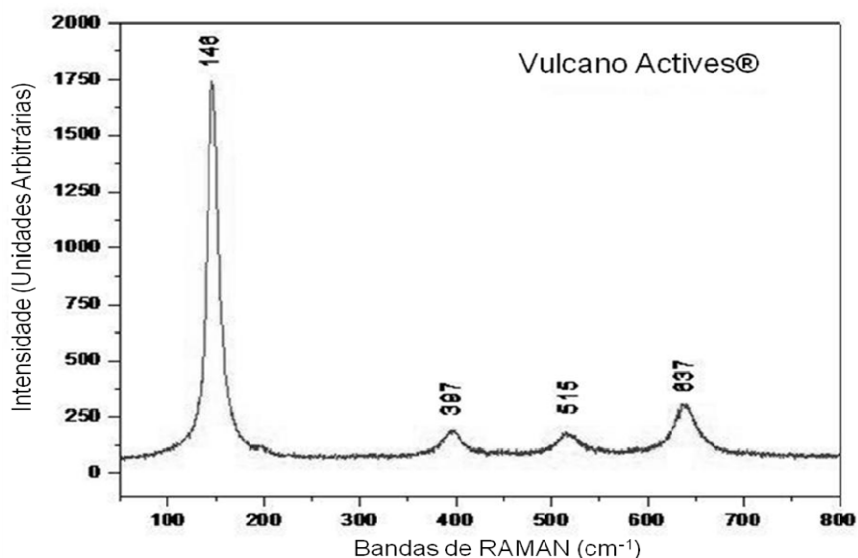


Figura 4.18 Espectro RAMAN mostrando bandas características da fase anatase na superfície do implante Vulcano Actives®.

A Tabela 4.2 mostra os picos característicos das fases rutilo e anatase [45]. Através dos valores tabelados foi possível observar que a fase anatase é a predominante na superfície do implante anodizado, como mostrou a Figura 4.18.

Tabela 4.2 Picos característicos de espectroscopia RAMAN para fase rutilo e anatase [45].

Óxidos	Raman (cm <sup>-1</sup> )
TiO <sub>2</sub> (Rutilo)	143,9 – 236,6 – 446,1 – 610,0
TiO <sub>2</sub> (Anatase)	145,6 – 395,0 – 514,2 – 642,5

A literatura sugere que a osseointegração é favorecida na presença de óxido de titânio na forma de rutilo e menos favorecida na forma de anatase. Este fenômeno ainda não é bem compreendido na literatura. No entanto, este trabalho mostra que, independentemente da forma cristalina do óxido de titânio, o fator mais importante é a composição da superfície imediatamente em contato com o organismo. Considerando que a interação entre as células e a camada de óxido ocorre em distâncias atômicas a mudança na composição química que ocorrem em nível atômico pode influenciar na biocompatibilidade e no prognóstico da osseointegração do implante.

Com base nos trabalhos publicados e nos estudos in vivo da superfície Vulcano Actives® da Conexão Sistemas de Prótese, em que foram realizados testes com coelhos e em humanos, Elias [12] e Shibli [15], respectivamente, observa-se que esta superfície é eficaz na indução do crescimento ósseo na interface implante-osso e que há redução do tempo necessário à osseointegração em relação aos demais tratamentos de superfície.

### 4.3 Ensaio de Rugosidade

A Tabela 4.3 mostra os resultados dos parâmetros de rugosidade medidos na superfície das pastilhas de titânio após os tratamentos químicos

executados. Mediu-se o valor de Ra (média aritmética das rugosidades) e Rq (média quadrática das rugosidades). Foram feitas cinco análises em cada amostra e os resultados apresentados refletem a média entre os valores obtidos em cada análise.

Tabela 4.3 Parâmetros de rugosidade medidos ( $\mu\text{m}$ ) nas superfícies tratadas.

IMPLANTES	Ra ( $\mu\text{m}$ )	Rq ( $\mu\text{m}$ )
Porous®	0,68 + 0,12	0,90+ 0,06
Dopado com Nanopartículas Na / F	0,72 + 0,05	0,92+ 0,05
Vulcano Actives®	0,86 + 0,17	1,10+ 0,15

Os valores de Ra entre os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, exceto o grupo das amostras anodizadas. Após a anodização há formação de pequenas saliências distribuídas em toda a superfície, a rugosidade apresentada foi superior aos demais grupos e o maior desvio padrão dos parâmetros da rugosidade indica a formação de morfologia heterogênea. Com base nos valores mostrados na Tabela 4.3, pode-se verificar que os maiores níveis de rugosidade foram obtidos nos discos com tratamento semelhante aos implantes comerciais Vulcano Actives®. Os discos com ataque ácido, Porous®, apresentaram níveis de rugosidade menor.

A superfície dopada com Na/F e a superfície Porous® são obtidas por ataque ácido e subsequente tratamento de imersão em solução de Na e F. Entretanto os valores de Ra e Rq obtidos e listados na Tabela 4.3 foram mais elevados para a superfície dopada com Na e F, o que pode estar associado à característica híbrida da superfície com nano e microrugosidades. Aumentando-se a área total (picos e vales) de uma superfície aumenta-se o número de radicais reativos ( $\text{OH}^-$ ) e o número de sítios ácidos e bases de Lewis na superfície. Esta alteração torna a superfície mais reativa no meio biológico aumentando a capacidade de atração de íons, principalmente cálcio e fósforo. A presença de cálcio aumenta a possibilidade da ligação de biomoléculas polianiónicas, algumas delas responsáveis pela ligação e adesão das células osteoprogenitoras à superfície do implante.

Aumentando-se a área superficial, haverá um aumento da retenção mecânica das fibrinas do coágulo sanguíneo na superfície do implante. Conseqüentemente, a migração celular em direção à superfície será facilitada. Uma vez que as células tenham atingido a superfície do implante, após a migração, elas encontrarão também, maior área de superfície para adesão, espalhamento e sua posterior diferenciação. A maneira com que os picos estarão distribuídos na superfície afetará o comportamento do ciclo celular, refletindo diretamente na qualidade da osteogênese.

A topografia das superfícies dos implantes, analisadas neste estudo através da medida dos parâmetros de rugosidade, contribui efetivamente para os resultados alcançados nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

#### 4.4 Ensaio de Molhabilidade

A Tabela 4.4 mostra os resultados dos valores médios dos ângulos de contato medidos na superfície das pastilhas de titânio após os tratamentos químicos executados em duas soluções, água destilada e soro fisiológico (NaCl 0,9%).

Tabela 4.4 Valores médios e desvios padrões dos ângulos de contato das superfícies em dois meios, água destilada e soro fisiológico.

IMPLANTES	Ângulo de contato (Água)	Ângulo de contato (Soro)
Porous®	67,44 ° ± 8,20	46,35 ° ± 1,51
Dopado com Nanopartículas Na / F	69,96 ° ± 4,95	44,15 ° ± 0,89
Vulcano Actives®	46,15 ° ± 2,74	26,45 ° ± 1,24

O ângulo de contato entre o líquido e a superfície é determinado visualmente e varia com a composição química da superfície. Este parâmetro de fácil determinação é utilizado para avaliar a biocompatibilidade. Quando o ângulo de contato é maior que 90 graus a superfície é denominada hidrofóbica

e para valores inferiores a 90° a superfície é hidrofílica. A superfície com características hidrofílica permite o maior contato do coágulo com a superfície do implante. Em todas as amostras o ângulo de contato com solução salina foi inferior ao ângulo com água destilada. As amostras anodizadas apresentaram molhabilidade significativamente superior às demais. Os implantes anodizados não devem ser submetidos à irrigação durante a instalação para evitar que o soro ocupe o espaço na camada de óxido que deve ser ocupado pelo coágulo sanguíneo.

#### 4.5 Ensaio de Remoção por Torque

Mostra-se na Tabela. 4.5 a comparação biomecânica da resistência da osseointegração pelos valores obtidos nos ensaios de remoção dos implantes por torque após 12 semanas de cicatrização em coelhos.

Tabela 4.5 Valores médios e desvios padrões dos torques de remoção (N.cm) dos implantes.

IMPLANTES	Torque (N.cm)
Porous®	63,46 ± 9,40
Dopado com Nanopartículas Na / F	64,89 ± 9,85
Vulcano Actives®	72,37 ± 10,40

Quanto ao torque de remoção os implantes menos rugosos, Porous®, foram mais facilmente removidos em relação aos implantes com outras superfícies. Apesar dos implantes anodizados apresentarem maior torque médio de remoção, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos implantes tratados com ácido ou com sódio e flúor após 12 semanas de implantação em tíbias de coelhos.

Existe uma relação direta entre a rugosidade, molhabilidade e torque de remoção. Os resultados indicam que quanto maior a rugosidade e menor o ângulo de contato conseqüentemente maior será a aposição óssea no implante

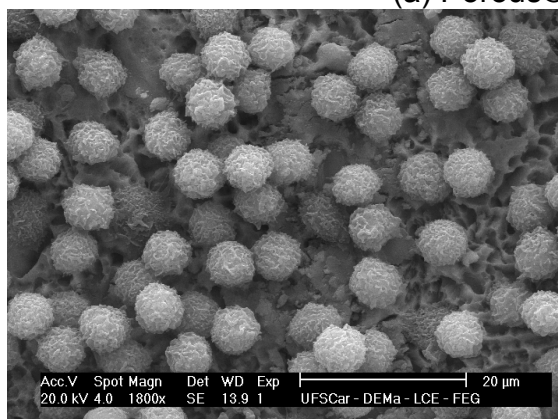
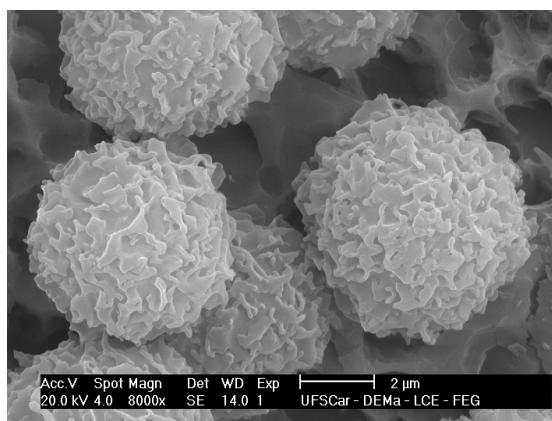
e o torque de remoção apresenta valores mais elevados, como mostra a Tabela 4.5.

#### 4.5.1 Incubação dos Neutrófilos nas Diferentes Superfícies

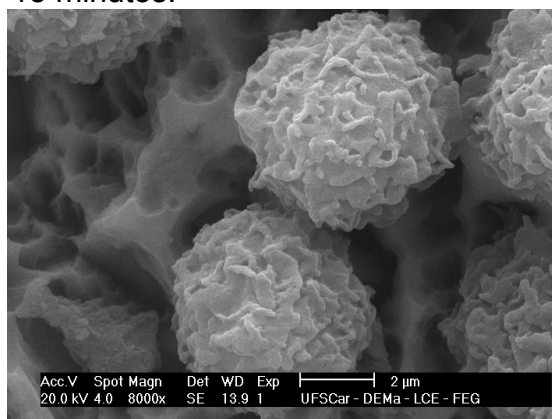
Como os neutrófilos representam a maior população dentre os leucócitos nas respostas inflamatórias disparadas pelos biomateriais, foi estudada a morfologia dessas células. A caracterização morfológica das células nas superfícies de Ti foi realizada com auxílio do MEV. A Figura 4.19 mostra a micrografia eletrônica da superfície Porous® (a), dopada com nanopartículas de Na e F (b) e Vulcano Actives® (c) após 15 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos.



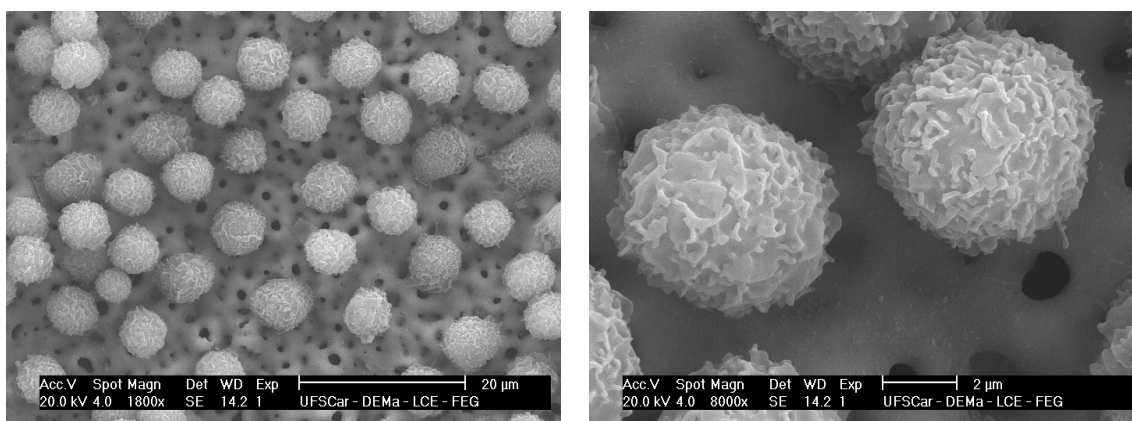
(a) Porous® - 15 minutos.



(b) Dopada com nanopartículas de Na e F - 15 minutos.



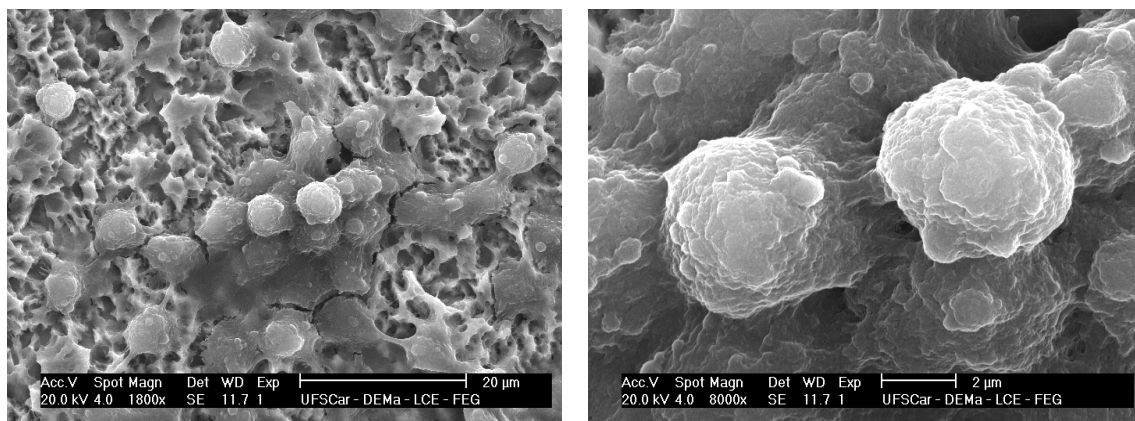




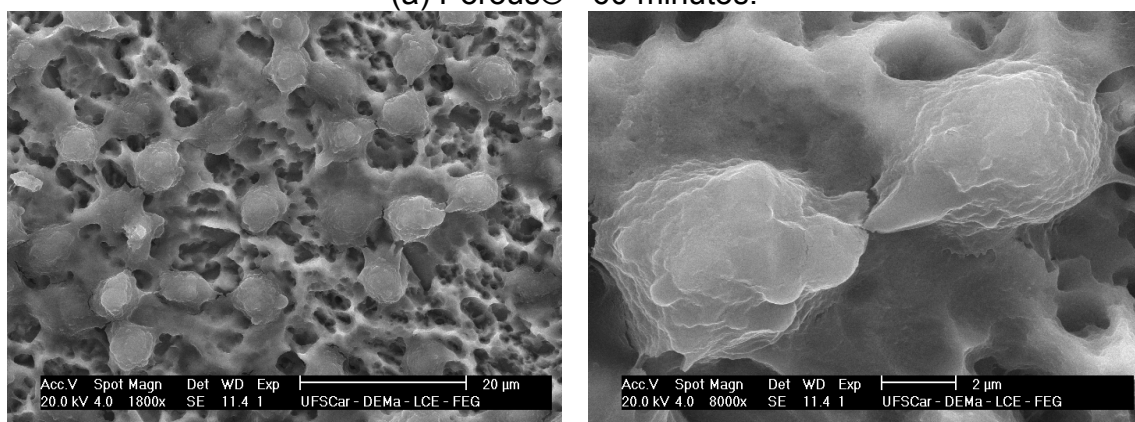
(c) Vulcano Actives® - 15 minutos.

Figura 4.19 Micrografias eletrônicas da superfície Porous® (a), dopada com nanopartículas de Na e F (b) e Vulcano Actives® (c) após 15 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos.

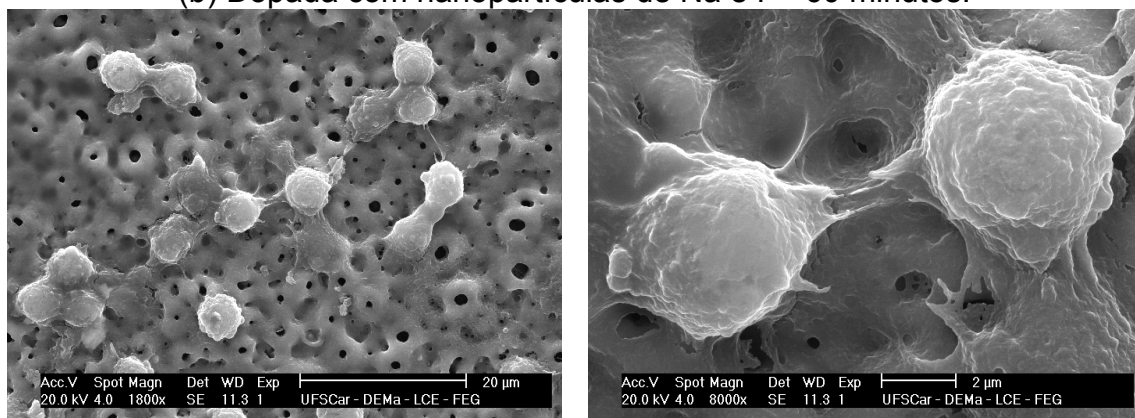
As micrografias mostram que as três superfícies estudadas apresentam grande afinidade por neutrófilos, tendo em vista a grande densidade de células aderidas na superfície após 15 minutos de incubação. É possível observar uma maior quantidade de neutrófilos presentes na superfície Porous® e dopada com Na e F caoticamente distribuídos e sobrepostos em tempos curtos de incubação, como mostra Figura 4.19 (a, b). Porém, na Figura 4.19 (c) existe uma distribuição homogênea das células coincidindo com a morfologia de “vulcões” presente na superfície Vulcano Actives®. Aos quinze minutos a maioria das células exibiu uma morfologia achatada com um leve espalhamento, não apresentando diferença significativa entre as três superfícies, assim foi realizada uma cultura de neutrófilos com um tempo maior de incubação, 60 minutos, a fim de tentar elencar qual superfície tem melhor e maior afinidade por neutrófilos. A Figura 4.20 mostra as micrografias eletrônicas das três superfícies após 60 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos.



(a) Porous® - 60 minutos.



(b) Dopada com nanopartículas de Na e F - 60 minutos.



(c) Vulcano Actives® - 60 minutos.

Figura 4.20 Micrografias eletrônicas da superfície Porous® (a), dopada com nanopartículas de Na e F (b) e Vulcano Actives® (c) após 60 minutos de incubação em solução contendo neutrófilos.

Os neutrófilos apresentam nesse momento, após 60 minutos, uma morfologia bem mais complexa se comparado aos tempos de interação

anteriormente considerados, 15 minutos. Após 60 minutos de incubação as células, em todas as placas, apresentam-se em um estado mais avançado de ativação, exibindo lamelas, uropódios, filipódios e, nota-se também invaginações. A superfície Porous® e a dopada com Na e F apresentam morfologias muito parecidas e menor diferenciação celular, quando comparadas com a superfície Vulcano Actives®. Essa última apresenta grande atividade celular com presença de pseudópodes e invaginações entre células, como mostra a Figura 4.20 (c). Os resultados mostram que nos tempos iniciais, a morfologia celular é amplamente influenciada pela rugosidade a qual, propicia maior imbricamento e acomodação das células.

Apesar de terem sido observadas diferenças morfológicas e de adesão entre as superfícies ao longo do tempo, as diferenças morfológicas não parecem ter o mesmo comportamento que a adesão, sugerindo mecanismos de adesão que estejam relacionados não somente a interações físicas por imbricamento da célula na superfície, mas também interações em nível molecular independentes de manifestação morfológica. Esse comportamento indica que a composição química da superfície apresenta um efeito benéfico na diferenciação celular.

#### **4.5.2 Interação das Células com as Amostras Recobertas por FN**

Como as superfícies Porous® e dopada com Na e F apresentaram características e comportamentos muito semelhantes nos ensaios de torque de remoção, rugosidade e molhabilidade, assim como na resposta à interação com neutrófilos, foi realizado um estudo com proteínas (Fibronectina) e osteoblastos para tentar entender o efeito das nanopartículas presentes na superfície dos implantes dentários.

As superfícies de titânio Porous® e Dopado com Na e F foram levadas a interagir com cristal violeta (1% em PBS). Em seguida, o corante associado às superfícies foi eluído com metanol. Controles negativo (solução tampão) e positivo (suspensão de FN) foram avaliados por espectrofotometria. A 550 nm (leitura para proteínas), o PBS resultou em 0,326 unidades de leitura ou de

absorbância (UA). No mesmo comprimento de onda, a suspensão de FN (100µg/mL) resultou em 2992 unidades. Após a incorporação de FN nas pastilhas Porous e Dopado com Na e F, as medidas espectrofotométricas resultaram em 2473 unidades de absorbância (82,6%) a 550 nm. Estes resultados mostram que as superfícies apresentam comportamentos semelhantes no que se refere à incorporação de FN para o tempo ensaiado.

Um total de  $10^6$  células osteoblásticas humanas/mL foi levada a interagir com as superfícies Porous e Dopado com Na e F. Após uma hora de interação  $7,9 \times 10^4$  células/mL e  $2,3 \times 10^5$  células/mL encontravam-se associadas às pastilhas Porous e Dopado com Na e F (sem recobrimento protéico), respectivamente. A associação de células as duas superfícies, com e sem a incorporação de fibronectina, resultou em índices de associação diferentes, como mostra a Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Associação de células às superfícies Porous, Porous com FN, Dopada com Na e F, Dopada com Na e F e FN.

SUPERFÍCIE	ÍNDICE DE ASSOCIAÇÃO (%)
Porous	0
Porous com FN	44,7% ± 0,8%
Dopada com Na e F	0
Dopada com Na e F com FN	57,4% ± 0,3%

Para fins de comparação, os valores dos índices de associação foram considerados nulos para as amostras sem FN. Os valores dos índices de associação de células às amostras com FN mostrados na Tabela 4.6 indicam que, em relação às amostras sem FN, houve aumento de 44,7% ( $\pm 0,8\%$ ) e 57,4% ( $\pm 0,3\%$ ) para as superfícies Porous e Dopado com Na e F, respectivamente.

O índice de interação célula/superfície Dopado com Na e F recoberta com FN foi da ordem de 28% maior em relação à superfície Porous com FN.

Após a incorporação de [3H]-timidina por 12 horas, a radioatividade associada às células foi avaliada. Em seguida,  $1,8 \times 10^6$  células/mL, correspondendo a 1,07 cpm, foram levadas a interagir com as superfícies Porous, Porous com FN, Dopado com Na e F e Dopado com Na e F com FN.

Após uma hora de interação, observou-se que 70% das células (0,75 cpm) ficaram associadas à superfície Porous. Isto ocorreu provavelmente porque algumas células morreram ou não se associaram à amostra no início do processo. O número de células associadas aumentou com o tempo de interação, atingindo 0,86 cpm após três horas, ou seja, houve um aumento de 15% de células associadas devido à proliferação e divisão celulares.

Com relação à superfície Porous com FN, 92% das células (0,98 cpm) se associaram após uma hora de interação e este número aumentou com o tempo, atingindo 1,12 cpm após três horas (aumento de aproximadamente 14%).

Apenas 64% das células levadas a interagir com a superfície Dopado com Na e F (0,687 cpm) permaneceram associadas após um período de uma hora, mas este número aumentou aproximadamente 32% após três horas de interação, atingindo 0,905 cpm.

Na superfície Dopada com Na e F com FN, 90% das células (0,97 cpm) se associaram após uma hora de interação. O número de células associadas aumentou 12% com o tempo, atingindo 1,09 cpm após um período de três horas. Os resultados descritos estão representados na Tabela 4.6 e Figura 4.21.

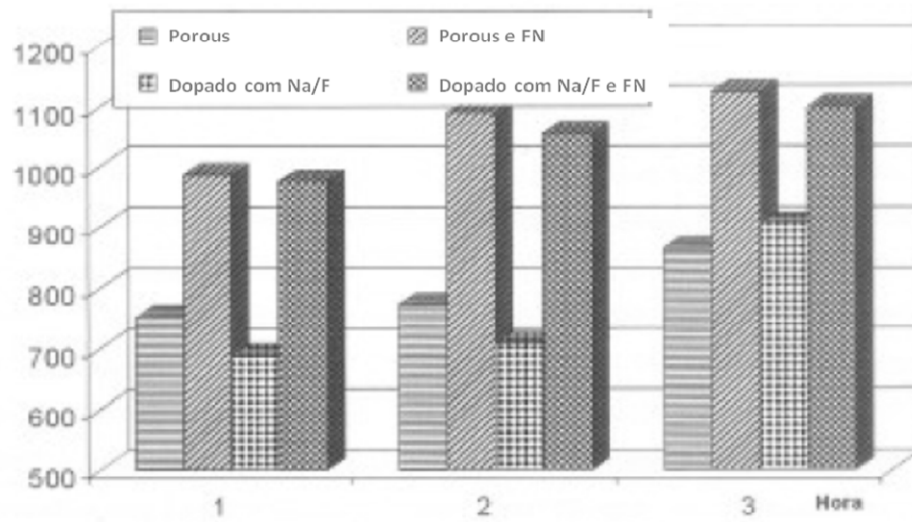


Figura 4.21 Radioatividade associada às superfícies Porous, Porous com FN, Dopado com Na e F, Dopado com Na e F com FN, num intervalo de tempo de três horas.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que os três tratamentos de superfície (ataque ácido, anodização e dopada com Na e F) provocaram diferentes alterações topográficas e microestruturais no titânio.

A morfologia da superfície dopada com nanopartículas de Na e F é semelhante à superfície Porous®, porém apresenta picos menores, arredondados e mais homogêneos e crateras rasas. A superfície Vulcano Actives apresenta superfície com óxido espesso e porosidade em forma de vulcões.

As análises das composições químicas das superfícies mostram que há somente titânio na superfície Porous®, Ca, P e O na superfície Vulcano Actives®, enquanto a superfície dopada mostra pequenas quantidades de Na e F.

Observou-se a presença de Ti e O na superfície Porous®, na forma de óxido,  $TiO_2$ . O mesmo aconteceu com a superfície dopada com nanopartículas de Na e F. O implante Vulcano Actives® mostra superficialmente a presença de óxido de titânio enriquecido com Ca e P. A porcentagem relativa de óxido de titânio é de (15%) enquanto a concentração de Ca e P é de (49% e 36%), respectivamente.

O difratograma mostra a presença do óxido tipo rutilo tanto na superfície do implante com superfície Porous®, quanto na superfície dopada com nanopartículas de Na e F. Estas apresentam também a presença das fases cristalinas de hidreto de titânio e titânio metálico. A superfície Vulcano Actives® mostra a presença de óxidos de titânio na forma estrutural de rutilo e anatase, com maior porcentagem de anatase.

Não foi possível utilizar a técnica espectroscopia RAMAN na superfície Porous® e dopada com nanopartículas de Na e F. A superfície anodizada (Vulcano Actives®) mostrou que a fase anatase é a predominante na superfície deste implante.

A superfície Vulcano Actives® apresenta maior nível de rugosidade. Os discos com ataque ácido, Porous® e dopados com nanopartículas de Na e F,

apresentaram níveis de rugosidade próximos e menores do a superfície anodizada.

Os ângulos de contato em solução salina de todas as amostras é inferior ao ângulo em água destilada. As amostras anodizadas apresentam molhabilidade significativamente superior às demais, seguida pela superfície dopada com nanopartículas de Na e F e por último pela superfície Porous®. As superfícies Na/F e Porous apresentam ângulos de contato muito próximos.

Quanto ao torque de remoção os implantes menos rugosos, Porous®, são mais facilmente removidos em relação aos implantes com outras superfícies. Apesar dos implantes anodizados apresentarem maior torque médio de remoção, não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos implantes tratados com ácido ou com sódio e flúor após 12 semanas de implantação em tíbias de coelhos.

A incubação de neutrófilos nas diferentes superfícies mostra que em tempos curtos de interação (15 minutos) não foi possível identificar qual efeito é mais importante, a morfologia da superfície ou a composição química, enquanto em tempos maiores (60 minutos) a composição química apresentou um efeito positivo na interação celular. A superfície Vulcano Actives apresenta um estado mais avançado de ativação, com presença de pseudópodes e invaginações entre células. A superfície Porous® e a dopada com Na e F apresentam morfologias muito parecidas e menor diferenciação celular, quando comparadas com a superfície Vulcano Actives®.

A espectrofotometria revelou que a adsorção da fibronectina (FN) nas superfícies Porous® e Dopada com Na e F é semelhante (80%). Os índices de associação de células osteoblásticas nas amostras com e sem FN e os valores de radioatividade das amostras sugerem que a incorporação de FN é determinante na citocompatibilidade das superfícies. O recobrimento da superfície de titânio com FN mostrou ser uma ótima opção de tratamento dos implantes dentários para otimizar e acelerar o processo de osseointegração.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Desenvolver e utilizar metodologias que permitam o estudo isolado das propriedades da superfície, relacionando os resultados entre si para determinar o papel desempenhado por cada uma dessas propriedades no processo de osseointegração.

2) Realizar ensaios *in vivo* com tempos mais curtos de implantação, 30 e 60 dias e comparar os resultados.

3) Realizar estudo histológico após implantação com tempos diferentes de implantação, visando quantificar a porcentagem de contato osso/implante.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 – TEXTOR, M., SITTIG, G., FRAUCHIGER, V., TOSATTI, S., et al. Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. **In titanium in Medicine**. Springer Edited. Berlin-Heidelberg: p. 172-224, 2001.

2 – ELLINGSEN, J. E. On the properties of surface-modified titanium. **In Bone Engineering. Primeira edição**. Toronto – Canada: J. E. Davies University of Toronto Press: p. 183-189, 2000.

3 – HANAWA, T. Titanium and its oxide film: A substrate for formation of apatite. **In The Bone-biomaterial Interface. Primeira edição**. Toronto – Canada: J. E. Davies University of Toronto Press: p. 49-51, 1991.

4 – LI, P., DUCHEYNE, P. Quasi-biological apatite film induced by titanium in a simulated body fluid. **Journal Biomed. Mater Res.**, v. 41, p. 341-348, 1998.

5 – GUÉHENNEC L.L. *et al.*, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, **Dental Materials**, v.23, p.844-854, 2007.

6 – ELLINGSEN J.E. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.6, n.12,p.749-753, 1995.

7 – PARK JY, DAVIES JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. **Clin Oral Impl Res.** v. 11: p. 530–539, 2000.

8 – YOKOYAMA K, ISHIKAWA T., MURAKAMI H, MYIAMOTO H. Frature mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant. **Biomaterials**. v. 23, p. 2459–2465, 2002.

9 – CHO AS, PARK, KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. **Biomaterials**. v. 24, p.3611–3617, 2003.

10 – NOVAES AB JR, PAPALEXIOU V, GRISI MFM, SOUZA SSLS, TABA M JR, KAJIWARA JK. Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed into periodontally infected sites. A histomorphometric study in dogs. **Clin Oral Impl Res**. v.15, p. 34–43, 2004.

11 – BAGNO A, BELLO C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p. 935-949, 2004.

12 – BRANEMARK, P.I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTROM, J.; HALLEN, O. et al. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg**., v.11, supl. 16, p.1-132, 1977.

13 – GEHRKE, S.A. **Bases clínicas e cirúrgicas em Implantodontia**. Santa Maria: Editora Bioface, 2006.

14 – ESPOSITO, M.; HIRSCH, J.M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II) Etiopathogenesis. **Eur J Oral Sci**, v.106, n.3, p.721-764, 1998.

15 – FRANCIO L. et al. Tratamento da periimplantite: revisão da literatura. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**. v. 5, n. 2, 2008.

- 16 – ABRAHAMSSON, I.; ZITZMANN, N., U., BERGLUNDH, T., WENNERBERG, A., et al. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: An experimental study in the dog. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 16, p.323-332, 2001.
- 17 – PINTO, L. E. S. C., ELIAS, C. N. SEM analysis of dental implants surface after fluoride treatment. **Brazilian Journal of Morphological Science. Supplement**. p. 289-290, 2005.
- 18 – SUL, Y. T., BYON, E. S., JEONG, Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: Effect of calcium surface chemistry of a novel implant. **Clin Implant Dent Relat Res**. v.6, p.101-110, 2004.
- 19 – SMITH DE, ZARB GA, Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. **J Prosthet Dent**. v. 62, p. 567-572, 1989.
- 20 – LEE JH, Effect of implant size and shape on implant success rates, **J Prosthet Dent**. v.94(4), p.337-381, 2005.
- 21 – DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, v. 67, p.932-949, 2003.
- 22 – WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T. Bone response to surface roughness: Measurements and results from experimental and clinical studies. In *Bio-Implant Interface, Improving Biomaterials and Tissue Reactions*. **Primeira Edição. Boca Raton: CRC Press**, p. 59-72, 2003.

23 – SZMUKLER-MONCLER S, et al. Timing of loading and effect of micro-motion on bone-implant interface: a review of experimental literature, **J Biomed Mater Res**; v. 43, p.193-203, 1998.

24 – SUL Y. T.; On the response to oxidized titanium implants, **PhD Thesis**, Göteborg University, 2002.

25 – SENNERBY, L. and ERICSON L.E. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.4, p.494-502, 1993.

26 – DELIGIANNI, D.D. et al. Effect of surface roughness of titanium alloy Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V on human bone marrow cell response and protein adsorption. **Biomaterials**. v.22, p.1242-1251 2001.

27 – SANTOS M.V. Efeito da rugosidade superficial e da conicidade na estabilidade primária de implantes. **Dissertação de Mestrado**, Instituto Militar de Engenharia, 2007.

28 – WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T., LINDHE, J. Surface topography of titanium implants. In **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 4ª edição, editado por Jan Lindhe. p. 821-825, 2003.

29 – HÖSTNER, C. H. On the bone response to different implant textures. A 3D analysis of roughness, wavelength and surface pattern of experimental implants. **PhD Dissertation**, Göteborg University, 2002.

30 – ECKERT, S. E., PAREIN, A., MYSHIN, H. L., PADILLA, J. L. Validation of dental implant system through a review of literature supplied by system manufactures. **J. Prosthet Dent**, v. 77, p. 1-279, 1997.

- 31 – ALBREKTSSON, T., WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1 – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **The International Journal of Prosthodontics**. v.17, p. 536-543, 2004a.
- 32 – PALMER, R., PALMER, P., SMITH, B. A prospective study of Astra single tooth implants. **Clin. Oral Implants Res.**, v.8, p. 173-179, 1997.
- 33 – NORTON M R. Marginal bone levels at single tooth implants with a conical fixture design. The influence of surface macro and micro-structure. **Clin. Oral Implants Res.**, v.9, p. 91-99, 1998.
- 34 – NOVAES, Jr. A. B., PAPALEXIOU, V., GRISI, M. F. M., SOUZA, S. S. L. S., et al. Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites. **Clin Oral Implants Res**, v.15, p. 34-43, 2004.
- 35 – SHIBLI J.J. et. al. Human Peri-Implant Bone Response to Turned and Oxidized Titanium Implants Inserted and Retrieved After 2 Months. **Implant Dentistry**. v.16, n.3, p.252-259, 2007.
- 36 – SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., JEONG, Y., ROSER, K., et al. Oxidized implants and their influence on the bone response. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v.12, p.1025-1031, 2001a.
- 37 – LAUSMAA, J. Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. **In titanium in Medicin. Primeira Edição**. Berlin-Heidelberg: Springer. p. 232-266, 2001.
- 38 – SUL, Y. T. On the bone response to oxidized titanium implants: The role of microporous structure and chemical composition of the surface oxide in enhanced osseointegration. **PhD Dissertation**, Göteborg University, 2002f.
- 39 – PINTO L.E.S.C., ELIAS C.N. Análise química e topográfica de implantes de titânio após tratamentos químicos de superfície. **4º Congresso Latino**

**Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais.** 8 -11 de Agosto, Caxambu-MG, 2006.

40 – ELIAS et.al., Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **Journal Mechanical Behavior Biomedical Materials**, Vol X, n.X, 2007.

41 – AMARANTE ES *et al.*, Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – Estado atual, **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.2, p. 166-173, 2001.

42 – ELIAS *et al.* Importância da qualidade da superfície dos implantes osseointegráveis na biofixação **Rev Bras Implant.** v.6, p. 3-5, 2000.

43 - ZHU X *et al.*, Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses , **Biomaterials.** V.25, n.18, p.4087-4103, 2004.

44 –LI LH et al, Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation, **Biomaterials.** v. 25, n.14, p.2867-2875, 2004.

45 – LI J.-G., ISHIGAKI T., SUN X. Anatase, Brookite, and Rutile Nanocrystals via Redox Reactions under Mild Hydrothermal Conditions: Phase-Selective Synthesis and Physicochemical Properties. **Journal of Physical Chemistry.** v.111, p.4969-4976, 2007.

46 – SUL Y. T., JOHANSSON C. B., ALBREKTSSON T. Oxidized titanium screws coated with calcium and their performance in rabbit bone”, **International Journal Oral Maxillofacial Implants.** v.17, p.625-634, 2002.



47 – ELLINGSEN JE, *et al.*, Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants, **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.19. n.5, p. 649-666, 2004.

48 – JOHANSSON, C. B., *et al.* Enhanced fixation of bone to fluoride-modified implants. Sixth World Biomaterial Congress, 2000. In Bio-Implant Interface, Improving Biomaterials and Tissue Reactions. **Primeira edição, Boca Raton, Fl. CRC Press.** p.323-340, 2003.

49 - ELLINGSEN, J. E., LYNGSTADAAS, S. P. Increasing biocompatibility by chemical modification of titanium surfaces. In Bio-Implant Interface: Improving Biomaterials and Tissue Reactions. **Primeira edição. Boca Raton: CRC Press,** p.323-340, 2003.

50 - ANDERSON, P. A., COPENHAVER, J. C., TENCER, A. F., CLARK, J. M. Response of cortical bone to local controlled release of sodium fluoride: The effects of implant insertion site. **Journal Orthop Res.** v. 9, p. 890-901, 1991.

51 – COOPER, L. F., ZHOU Y., TAKEBE, J., GUO, J., *et al.* Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. **Biomaterials**, v.27, p. 926-936, 2006.

52 – ELIAS CN, CAVALCANTI JHL. Importância da qualidade da superfície dos implantes osseointegráveis na biofixação. **Revista Brasileira de Implantologia**, v.7, n.1, p. 21-25, 2001.

53 – BRANDÃO M.L., ESPOSTI T.B.D., BISOGNIN E.D., HARARI N.D., VIDIGAL JR M.D., CONZ M.B. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. **Implant News.** v.7, n.1, p.95-101, 2010.

- 54 – ELIAS CN, OSHIDA Y, LIMAD JHC, MULLER CA. Relationship between surface properties, roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **J of Mech Behavior of Biomed Mat.** v.1, p.234-242, 2008.
- 55 – COUTINHO M.P., ELIAS C.N. Rugosidade e molhabilidade do titânio usado em implantes dentários com superfícies tratadas. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p.234-8, jul./dez. 2009.
- 56 – HIEMENZ, P. C., RAJAGOPALAN, R. Principles of colloid and surface chemistry. **Terceira edição. New York:** Marcel Dekker Inc. p.125-136, 1997.
- 57 – LIM, Y. J., OSHIDA, Y. Initial contact angle measurements on variously treated dental/medical titanium materials. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 11, p.1-17, 2001.
- 58 - LIM, Y. J., OSHIDA, Y., ANDRES C. J., BARCO, M. T. Surfaces characterizations of variously treated titanium materials. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 16, p.333-342, 2001.
- 59 – PAN, J.; SHIROTA, T.; OHNO, K.; MICHI, K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.58, p.877-882, 2000.
- 60 – ALBREKTSSON T., “The response of bone to titanium Implants”, **Crit. Rev. Biocompatibility**, **8**, 53-84, 1985.
- 61 – KASTEN F.M., “Quantitative evaluation of human gingival epithelial cell attachment to implant surfaces in vitro”, **Int J Periodontics Restorative Dent**, **10**, 69-79, 1970, in Carl E Misch, Contemporary Implant Dentistry, St Louis: Mosby, p.737, 1999.

62 – ELIAS C.N., LIMA J.H.C., MULLER C.A. Influência da Superfície de Implantes Osseointegráveis na Resistência da Interface Implante/Osso. **II-Congresso Latino Americano de Órgão Artificiais e Biomateriais**. Belo Horizonte - MG, CDRom. 12 a 14 de Dezembro, 2001.

63 – SUL Y.T., JOHANSSON C., ALBREKTSSON T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. **International Journal of Prosthodontics**. v.19, p.319-28, 2006.

64 – STRNADA J., STRNADA Z., ŠESTA'KB J., URBAN K., ŠILD C.B. Bio-activated titanium surface utilizable for mimetic bone implantation in dentistry— Part III: Surface characteristics and bone-implant contact formation. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v.68, p.841–845, 2007.

65 – ELIAS C.N., LIMA J.H.C., SANTOS M.V. Modificações na superfície dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica. **Implant News**. v. 5, n.5, p.467-476, 2008.

66 – DAVIES J.E. Mechanisms of Endosseus Integration. **Int. J Prosthodont**. v.11, p.391- 401, 1998.

67 – FENG, B., CHEN, J. Y., QI, S. K., HE, L., et al. Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v.13, p.457-464, 2002.

- 68 – FENG, B., WENG, J., YANG, B. C., QU, S. X., et al. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. **Biomaterials**, v.34, p.4663-4670, 2003.
- 69 – WIELAND, M., SITTIG, C., BRUNETTE, D. M., TEXTOR, M., et al. Measurement and evaluation of the chemical composition and topography of titanium implant surface. In **Bone Engineering. Primeira edição**. Toronto: Editado por Davies J.E. p.163-182, 2000.
- 70 – PULEO, D.A, NANCI, A., Understanding and controlling the bone-implant interface, *Biomaterials* v.20, p.2311-21, 1999.
- 71 – DAVIES, J. E. *Bone Engineering*. **University of Toronto Press**. 2000.
- 72 – BOWERS, K. T., KELLER, J.C., RANDOLPH, B.A., et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast response in vitro. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v.7, p.302-310, 1992.
- 73 - CARINCI, F., PEZZETTI, F., VOLINIA, S., FRANCISCO, F., et al. Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to a new nanoporous implant surface by means of a microarray technology. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 15, p.180-186, 2004.
- 74 – MEIRELLES L. Nanoestruturas e a resposta óssea. Uma alternativa segura para a reabilitação com implantes osseointegráveis? **Revista Implant News**. v.7, n.2, p.169-72, 2010.
- 75 – MENDONÇA G. et.al. Efeito de Superfícies de Implantes Nano-Estruturadas na Expressão de Genes de Osteoblastos e no Contato Osso-Implante In Vivo. **Rev Odontol Bras Central**. v.19, n.50, 2010.

76 – GUOA, J et. al. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO<sub>2</sub> grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. **Biomaterials**. v.28, p.5418–5425, 2007.

77 – MEIRELLES L, CURRIE F, JACOBSSON M, ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants** v.23, n.4, p.641-647, 2008.

78 – DALBY, M. J., BERRY, C. C., RIEHLE, M. O., SUTHERLAND, D. S., et al. Attempted endocytosis of nano-environment produced by colloidal lithography by human fibroblasts. *Experimental cell research*, v. 295, p.387-394, 2004a.

79 – RICE, J. M., HUNT, J. A., GALLAGHER, J. A., HANARP, P., et al. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblast and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro. **Biomaterials**. v. 24, p.4799-4818, 2003.

80 – OLIVEIRA, P. T. & NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, p.403-413, 2004.

81 – DALBY, M. J., MCCLOY, D., ROBERTSON, M., WILKINSON, C. D. W., et al. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. **Biomaterials**, v. 27, p.1306-1315, 2006.

82 – DALBY, M. J., RIEHLE, M. O., SUTHERLAND, S., AGHELI, H., et al. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 83, p.159-169, 2004b.

83 – WHITEHEAD, K. A., COLLIGON, J., VERRAN, J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, p.129-138, 2005.

84 – VOGLER, E. A. Role of water in biomaterials. In **Biomaterials Science. Segunda edição**. China: Editado por Ratner (et al.), Elsevier Academic Press, p.59-65, 2004.

85 – ATKINS, P., JONES, L. **Princípios de química. Questionando a vida moderna e o meio ambiente**; trad. Ignez Caracelli et al. Primeira edição, Porto Alegre: Ed. Bookman. p.200-201, 2001.

86 – THULL, R. Physicochemical principles of tissue material interactions. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p.43-50, 2002.

87 – ZHAO, G., SCHWARTZ, Z., WIELAND, M., RUPP, F. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **J. Biomed Mater Res.**, v. 74A, p.49-58, 2005.

88 – SUL, Y. T., JOHANSSON, C., JEONG, Y., ALBREKTSSON, T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering & Physics**, v. 23, p.329-346, 2001b.

89 – SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., PETRONIS, S., KROZER, A., et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: The oxide thickness, micropore configuration, surface roughness, crystal structure and chemical compositions. **Biomaterials**, v.23, p.491-501, 2002d.

90 – SUL, Y. T., JOHANSSON, C., WENNERBERG, A., CHO, L. R. et al. Optimum surface Properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: Surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v.20, p.349-359, 2005b.

91 - TANG, G. X., ZHANG, R. J., YAN, Y. N., ZHU, Z. X. Preparation of porous anatase titania film. **Materials Letters**, v.58, p.1857-1860, 2004.

92 – SUL, Y. T., JOHANSSON, C., BYON, E., ALBREKTSSON, T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. **Biomaterials**. v. 26, p.6720-6730, 2005a.

- 93 – PINTO L.E.S.C. TRATAMENTO QUÍMICO DA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES DE TITÂNIO. **Tese de Doutorado**, IME, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 2006.
- 94 – BOYAN, B. D., DEAM, D. D., LOHMANN, C. H., COCHRAN, D. L., et al. The titanium-bone cell interface in vitro: The role of the surface in promoting osseointegration. **In titanium in Medicine**. Primeira edição. Berlin-Heidelberg: Springer edited. p:562-579, 2001.
- 95 – SILVA, V.C.. Caracterização morfológica e funcional da adesão de neutrófilos em diferentes superfícies de titânio. **Tese de Doutorado**, Unb, Brasília - DF, Brasil, 2011.
- 96 – <http://www.straumann.cz/soubory/o0000000140.pdf>. Acessado em 16/01/2012.