

**MINISTÉRIO DA DEFESA  
EXÉRCITO BRASILEIRO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA  
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**DANIEL JOGAIB FERNANDES**

**DESEMPENHO DE MINI-IMPLANTES DE TI-6Al-4V COM TRATAMENTO DE  
SUPERFÍCIE**

**Rio de Janeiro  
2014**

**INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA**

**DANIEL JOGAIB FERNANDES**

**DESEMPENHO DE MINI-IMPLANTES DE TI-6Al-4V COM  
TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Nelson Elias – D.C.

Rio de Janeiro

2014

c2014

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro - RJ      CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

Sxxx	Fernandes, Daniel Jogaib  Desempenho de mini-implantes de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície, no Rio de Janeiro / Daniel Jogaib Fernandes. - Rio de Janeiro : Instituto Militar de Engenharia, 2014.  115 f. : il., graf., tab. : - cm.  Tese (doutorado) - Instituto Militar de Engenharia, 2014.  1. Titânio 2. Implantes 3. Superfície 4. Biomateriais metálicos 5. Biocompatibilidade
------	---

**INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA**

**DANIEL JOGAIB FERNANDES**

**DESEMPENHO DE MINI-IMPLANTES DE TI-6Al-4V COM TRATAMENTO  
DE SUPERFÍCIE**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Carlos Nelson Elias – D.C.

Aprovada em 26 de março de 2014 pela seguinte Banca Examinadora:

---

Prof. Carlos Nelson Elias – D.C. do IME – Presidente

---

Prof Luis Henrique Leme Louro – Ph.D. do IME

---

Prof Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C. do IME

---

Prof Daniel Cohen Goldemberg – Ph.D. da UFRJ

---

Prof Luis Henrique de Almeida – D.C. da UFRJ

Rio de Janeiro  
2014

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	07
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	11
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1     Posicionamento do Trabalho .....	16
<b>2</b> <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1     O titânio e suas ligas .....	17
2.2     Rigidez do implante .....	19
2.3     Resistência à fadiga .....	20
2.4     Propriedades da superfície do titânio .....	21
2.4.1   Rugosidade.....	23
2.4.2   Molhabilidade.....	24
2.4.3   A camada de óxido de titânio.....	25
2.4.4   Resistência à corrosão .....	27
2.5     Resposta inflamatória à degradação do titânio.....	30
2.6     Influência do tratamento de superfície.....	33
2.6.1   Coberturas de fosfato de cálcio .....	36
2.6.2   Tratamentos com fluoretos .....	37
2.6.3   Jateamento.....	38
2.6.4   Jateamento seguido de tratamento com ácido .....	38
2.6.5   Condicionamento ácido .....	39
2.6.6   Tratamentos por passivação (oxidação).....	41
2.7     Osseointegração.....	42
2.8     O estado da arte .....	47
2.9     Justificativa do trabalho .....	49

<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
4.1	Os mini-implantes temporários .....	52
4.2	O tratamento de superfície .....	52
4.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	53
4.4	Microscopia de força atômica .....	53
4.5	Microscopia de fluorescência por raios-X .....	53
4.6	Molhabilidade.....	54
4.7	Corrosão (perda de massa).....	54
4.8	Preparação das amostras para análise em MET.....	54
4.9	Animais e o procedimento de instalação .....	55
4.10	Obtenção das amostras.....	59
4.11	Análise dos mini-implantes implantados.....	60
4.12	Torque de remoção .....	61
4.13	Microscopia eletrônica de varredura (amostras <i>in-vivo</i> ) .....	61
4.14	Histologia e Histomorfometria.....	62
4.15	Microscopia óptica de transmissão.....	63
4.16	Espectrofotometria de absorção atômica .....	63
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>64</b>
5.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	64
5.2	Microscopia de força atômica .....	68
5.3	Microscopia de fluorescência por raio-X.....	70
5.4	Molhabilidade.....	71
5.5	Corrosão (perda de massa).....	72
5.6	Microscopia eletrônica de transmissão.....	72
5.7	Torques de inserção e remoção .....	74

5.8	Microscopia eletrônica de varredura (amostras <i>in vivo</i> ).....	77
5.81	Morfologia da superfície dos mini-implantes.....	77
5.82	Análise da interface osso/mini-implante .....	84
5.9	Análise histomorfométrica.....	84
5.10	Quantificação dos íons alumínio e vanádio .....	89
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>90</b>
6.1	Morfologia da superfície .....	90
6.2	Espessura da camada de óxido.....	95
6.3	Molhabilidade.....	95
6.4	Corrosão antes e após tratamento de superfície .....	99
6.5	Análise <i>in vivo</i> : liberação de íons metálicos .....	100
6.6	Análise histológica .....	102
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>105</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG.2.1	Curva de polarização da liga Ti-6Al-4V .....	28
FIG.2.2	Crescimento espontâneo da camada de óxido de titânio .....	29
FIG.2.3	Superfície de titânio após recebimento de tratamento de superfície	35
FIG.2.4	Adesão de osteoblastos à superfície de titânio.....	43
FIG.4.1	Animais condicionados em Biotério .....	56
FIG.4.2	Procedimento de anestesia geral .....	58
FIG.4.3	Rebatimento dos tecidos e exposição de perióstio.....	58
FIG.4.4	Coleta de sangue por punção cardíaca .....	60
FIG.4.5	Acesso para remoção dos mini-implantes .....	61
FIG.5.1	Morfologia da superfície do cilindro de Ti-6Al-4V .....	64
FIG.5.2	Morfologia da superfície do Ti-6Al-4V#.....	65
FIG.5.3	Morfologia da interface de um cilindro de Ti-6Al-4V .....	66
FIG.5.4	Mini-implantes de Ti-6Al-4V com marcas de usinagem.....	67
FIG.5.5	Projeção tridimensional por microscopia de força atômica .....	69



FIG.5.6 Espectro com os picos dos elementos Ti, Al e V antes do tratamento de superfície .....	70
FIG.5.7 Ângulo de contato (°) e medida linear da base da gota .....	71
FIG.5.8 Medição da camada de óxido de titânio .....	73
FIG.5.9 Medianas e quartis dos torques (Ncm) após 1 semana.....	75
FIG.5.10 Medianas e quartis dos torques (Ncm) após 4 semana.....	75
FIG.5.11 Medianas e quartis dos torques (Ncm) após 8 semana.....	76
FIG.5.12 Medianas e quartis dos torques (Ncm) de Ti-6Al-4V .....	76
FIG.5.13 Medianas e quartis dos torques (Ncm) de Ti-6Al-4V# .....	77
FIG.5.14 Materiais orgânicos aderidos após 4 semanas em Ti-6Al-4V .....	78
FIG.5.15 Materiais orgânicos aderidos após 4 semanas em Ti-6Al-4V# .....	79
FIG.5.16 Materiais orgânicos aderidos após 8 semanas em Ti-6Al-4V .....	80
FIG.5.17 Materiais orgânicos aderidos após 8 semanas em Ti-6Al-4V# .....	81
FIG.5.18 Interface osso/mini-implante de Ti6Al-4V após 4 semanas .....	82
FIG.5.19 Interface osso/mini-implante de Ti6Al-4V# após 4 semanas .....	83
FIG.5.20 Interface mini-implante Ti-6Al-4V cortical após 1 semana.....	84

FIG.5.21 Interface mini-implante Ti-6Al-4V cortical após 1 semana.....85

FIG.5.22 Interface mini-implante Ti-6Al-4V# cortical após 1 semana.....85

FIG.5.23 Interface mini-implante Ti-6Al-4V# cortical após 8 semanas. ....86

FIG.5.24 Interface mini-implante Ti-6Al-4V cortical após 8 semanas. ....86

FIG.5.25 Interface mini-implante Ti-6Al-4V cortical após 8 semanas. ....87

FIG.5.26 Interface mini-implante Ti-6Al-4V# cortical após 8 semanas. ....87

FIG.5.27 Interface mini-implante Ti-6Al-4V# cortical após 8 semanas. ....88

FIG.5.28 Interface mini-implante Ti-6Al-4V# cortical após 8 semanas. ....88

FIG.5.29 Quantidade de íons alumínio presentes no sangue.....89

FIG.5.30 Quantidade de íons vanádio presentes no sangue.....89

FIG.6.1 Resultado da correção do ângulo de contato proposto. ....99

## LISTA DE TABELAS

TAB.4.1	Composição (% em massa) dos elementos presentes.....	57
TAB.5.1	Grupos de mini-implantes.....	68
TAB.5.2	Descrição não paramétrica da rugosidade .....	71
TAB.5.3	Molhabilidade de discos de Ti-6Al-4V.....	72
TAB.5.4	Perda de massa de cilindros de Ti-6Al-4V.....	71
TAB.5.5	Valores dos torques de inserção e remoção dos mini-implantes, com e sem tratamento de superfície, após 1, 4 e 8 semanas .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### ABREVIATURAS

MEV	-	Microscópio eletrônico de varredura
MET	-	Microscópio eletrônico de transmissão
XRF	-	Microscópio de fluorescência por raios X
DRX	-	Difração por raios X
MPa	-	Mega pascal
GPa	-	Giga pascal
pm	-	picômetro ( $10^{-12}$ m)
PRRs	-	receptores de reconhecimento de antígeno
PAMPs-		patógenos associados a biomoléculas
NALP3-		complexo inibidor de apoptose contendo leucina e piridina com proteína 3
pro-IL-1 $\beta$		pró-interleucina 1- $\beta$
pro-IL-18		pró-interleucina 18
Mreg-		macrófago regulador
M1-		macrófago tipo 1
M2-		macrófago tipo 2
IL-		interleucina
CCL	-	chimoninas
CXCL	-	chimoninas
TNF-		fator de necrose tumoral
PGE-		fator pró inflamatório
CLR	-	fatores de reconhecimento de lectina tipo C
TLR	-	receptor toll
NLR-		receptores de ligação a nucleotídeos com oligo domínio
IFN- $\gamma$ -		interferon
MARCO-		macrófagos com receptores de estruturas em colágeno
Ti cp-		titânio comercialmente puro

## SÍMBOLOS

$\theta$	-	ângulo de contato
$\theta_a$	-	ângulo de contato aparente
$\theta_y$	-	ângulo de contato de Young
$r$	-	coeficiente para rugosidade
$x$	-	fração da área da superfície em contato com o líquido no modelo de Cassie-Baxter
$R_a$	-	valor médio quadrático da rugosidade de uma superfície
$R_z$	-	valor médio de cinco rugosidades unitárias entre os pontos mais altos e baixos
$R_{max}$	-	valor máximo da rugosidade de uma superfície
#	-	indicativo de superfície de titânio tratada pela imersão em ácidos

## RESUMO

Neste trabalho, propõe-se o desenvolvimento de um novo tratamento de superfície para ligas de Ti-6Al-4V, para se limitar a liberação tóxica de íons metálicos. O desempenho para fins biomédicos deste tratamento (Ti-6Al-4V#) foi avaliado pela estabilidade de mini implantes temporários, resistência à corrosão (perda de massa), liberação de íons tóxicos em sangue, molhabilidade, morfologia (MEV), análise química (FRX) e rugosidade (MFA) da superfície. Quatorze coelhos da raça Nova Zelândia foram randomicamente divididos em 4 grupos: 1,4,8 semanas e controle, compostos por dois animais cada. Quatro mini implantes temporários, auto-perfurantes, de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V# foram instalados na porção medial da tíbia esquerda dos 12 coelhos. Os torques de inserção e remoção foram medidos sendo maiores nos grupos com tratamento ( $p < 0.05$ ). Não houve aumento do torque de remoção após 8 semanas ( $p < 0.05$ ). Não houve evidência de íons Al e V na superfície dos materiais e o ângulo de contato aumentou após o tratamento ( $p < 0.0001$ ). A liberação de íons Al e V e a quantidade de massa perdida foram reduzidas após o tratamento ( $p < 0.0001$ ). Microcavidades ( $0.5-2.0\mu\text{m}$ ) com rugosidade nanométrica ( $R_a=341\text{nm}$ ) foram desenvolvidas ( $p < 0.0001$ ) e a área da superfície aumentada em 67% ( $p=0.0272$ ). Houve início de osseointegração após 8 semanas mais significativa no grupo com tratamento, havendo adesão de material biológico (Ca,P) na superfície dos implantes após 4 semanas. O tratamento de superfície proposto aumentou a estabilidade primária dos miniimplantes temporários e reduziu a liberação de íons (Al e V) tóxicos.

## ABSTRACT

In this work, a new surface treatment is proposed and the performance of this surface for biomedical application was evaluated according to stability of Ti-6Al-4V temporary mini implant, corrosion resistance (mass loss), toxic ions release in blood, wettability, and morphological (SEM), chemical composition (XRF) and roughness (AFM) of the surface. Fourteen New Zealand rabbits were randomly divided into 4 groups: 1, 4 and 8 weeks and control, which had two animals. Four temporary mini-implants of Ti-6Al-4V and Ti-6Al-4V# (treated) were placed in the left proximal tibia of 12 rabbits. The animals were submitted to insertion and removal torque peak testing. Values were higher in treated surface groups. There was no increase in removal torque after 8 weeks ( $p < .05$ ). No evidence of Al and V ions on the surface of the material was seen and the contact angle was increased after the surface treatment ( $p < .0001$ ). The release of Al and V ions and the mass loss by corrosion were reduced ( $p < .0001$ ). SEM showed pores in 0.5-2  $\mu\text{m}$  diameter range with nanometer roughness ( $R_a = 341 \text{ nm}$ ;  $p < .0001$ ). Surface area was increased 67% ( $p = .0272$ ). The histomorphometric analysis showed an attempt to osseointegration between the implant and bone interface after 8 weeks, which was more consistent on Ti-6Al-4V#. SEM demonstrated an increase in bone adhesion after 4 weeks and a constant amount of biologic material (Ca and P) was adhered on all group surfaces. The surface treatment developed increased the performance of Ti-6Al-4V temporary mini screws, improving the primary stability and reducing the amount of toxic ions release.

## 1. INTRODUÇÃO

O titânio comercialmente puro (Ti cp) e a liga de titânio contendo alumínio e vanádio (Ti-6Al-4V) são as matérias primas mais utilizadas como biomateriais. O grande sucesso destes materiais resulta da combinação favorável de sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas (aceitável limite de resistência à tração, ductilidade e reduzido módulo de elasticidade) e excelente resistência à corrosão. Apesar da resistência mecânica apresentada pelo Ti-6Al-4V ser superior ao Ti cp, sua biocompatibilidade é questionada pela possibilidade de liberação de elementos neurotóxicos como os íons Al e V.

O tratamento da superfície das ligas metálicas para aplicação biomédica melhora sua biocompatibilidade. Portanto, as pesquisas em desenvolvimento procuram novas metodologias de tratamento destas ligas. O objetivo do tratamento da superfície é modificar a morfologia superficial das ligas metálicas, principalmente do titânio. Através do tratamento da superfície, é possível otimizar o emprego das ligas pela melhoria das propriedades como rugosidade, molhabilidade, resistência à corrosão e biocompatibilidade. Com estas modificações, é possível um melhor desempenho do material quanto às estabilidades primária e secundária que resultam de seu emprego como um implante biomédico.

A excelente resistência à corrosão do titânio e suas ligas é uma propriedade importante e relevante para a biocompatibilidade do material. Tanto a resistência à corrosão como a biocompatibilidade resultam da camada de óxidos nativa que se forma da reação espontânea entre o titânio e o oxigênio. Esta camada de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), apesar de presente nas ligas de Ti-6Al-4V, e ser responsável pela sua resistência à corrosão, não é suficiente em seu estado nativo para impedir a liberação de íons metálicos quando o material ficam em contato com soluções que simulem o ambiente biológico.

Diversas técnicas de tratamento de superfície são descritas na literatura para melhorar a biocompatibilidade do titânio e suas ligas, destacando o processo de imersão



em solução ácida. O emprego desta técnica foi utilizada, no presente trabalho, na liga de Ti-6Al-4V com o objetivo de minimizar a liberação de íons Al e V através de modificações na camada nativa de TiO<sub>2</sub>. O sucesso desta técnica otimizará o uso da liga por agregar a excelente resistência mecânica conferida pelos elementos Al e V à restrição na liberação e difusão dos mesmos no organismos hospedeiro. Analisou-se também a influência do tratamento proposto na estabilidade de implantes temporários devido a alterações na rugosidade superficial mediante ensaios *in vivo* de inserção de implantes temporários em cortical e medular de cobaias

### 1.1 Posicionamento do trabalho proposto

O presente trabalho propõe o tratamento da superfície da liga de titânio ASTM F 136 grau 5 (Ti-6Al-4V) através da imersão em solução ácida para modificar a morfologia superficial de implantes temporários usados para fins biomédicos. Esta proposição enquadra-se na linha de pesquisa que visa analisar as propriedades e o desempenho de biomateriais metálicos após receberem tratamento de superfície, bem como o desenvolvimento de uma superfície com novas características para atender à demanda da área de biomateriais

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O desempenho dos implantes metálicos depende tanto da composição química da liga, das condições de carregamento e das propriedades de sua superfície. Com base nisto, é importante conhecer tanto as propriedades mecânicas e físicas dos materiais, mas também os processos adotados para alterar sua superfície. No presente capítulo serão analisadas as propriedades do titânio e as principais características da superfície que alteram a biocompatibilidade dos implantes.

O emprego do titânio como liga para confecção de implantes osseointegráveis foi acidentalmente descoberto por Branemark em 1960, durante seus experimentos com cães, quando observou que os implantes instalados apresentavam dificuldade de remoção (Brånemark PI, Hansson BO, Adell R , 1977). Examinando-se os fatos em curso, Branemark verificou que, na falta de aço inoxidável para confecção imediata de seus implantes, o torneiro havia feito uso de titânio. Todavia, sem nenhum tipo de motivação específica. O pesquisador então, modificou o curso de seus trabalhos, passando a observar o comportamento bioativo do material e seus esforços são responsáveis por mais de 50 anos de estudo de avaliação da capacidade de osseointegração do titânio e suas ligas.

### 2.1 O titânio e suas ligas

Dentre as ligas metálicas empregadas para fins biomédicos encontram-se o aço inoxidável austenítico, ligas de cobalto-cromo, magnésio, além das ligas de titânio, tântalo e nióbio.

A necessidade de emprego destes materiais varia de acordo com a região biológica em que se necessita o reparo, sendo normalmente áreas de tecido duro com importante demanda funcional como locomoção ou mastigação. Os biomateriais aptos a substituir

os tecidos duros devem apresentar apropriada biocompatibilidade, representada mecanicamente pelo módulo de elasticidade, ductilidade, resistência à tração e à fratura, limite de escoamento e resistência em fadiga.

Entre as diversas ligas usadas como biomaterial, a melhor relação entre a resistência mecânica e à corrosão pertence ao titânio e suas ligas e por isso é justificado sua popularização como principal biomaterial metálico (Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, Crawford RJ, Ivanova E R, 2010). Outras propriedades mecânicas relevantes para aplicação de uma liga como biomaterial são o sinergismo com os tecidos ósseos, alta resistência mecânica, baixa densidade, módulo de elasticidade o mais semelhante possível com o apresentado pelo tecido ósseo medular e inferior ao da cortical externa, resistência à fadiga, tenacidade ao impacto, além de comportamento favorável em ambiente biológico através de boa resistência à corrosão, baixa toxicidade, e susceptibilidade à osseointegração através de um comportamento bioativo ou bioreativo (Adamek G, Jakubowicz J, 2010).

Devido a sua excelente biocompatibilidade, o Ti cp é o material de escolha quando se prioriza a osseointegração, sendo todavia, sua resistência mecânica limitada frente a outras ligas para aplicação biomédica. Apresenta baixa resistência mecânica principalmente em fadiga por carregamento mecânico cíclico (Estrin Y, Ivanova EP, Michalska A, Truong VK, Lapovok R, Boyd R, 2011), reduzida dureza e baixa resistência ao desgaste (Handtrack D, Sauer C, Kieback B, 2008). Estas características exigem um planejamento criterioso do tempo de vida das possíveis próteses, principalmente às submetidas ao carregamento constante como as ortopédicas, para que intervenções cirúrgicas sejam evitadas para substituição de dispositivos resultantes de falhas por fadiga. (Saitova LR, Hoepfela HW, Goeken M, Semenova IP, Raab GI, Valiev RZ, 2009)

Dentre os tipos de titânio e suas ligas utilizados para fins biomédicos, destacam-se o Ti cp e o Ti-6Al-4V. Estas ligas podem ser classificadas com base em sua estrutura cristalina, podendo ser denominadas  $\alpha$  (hexagonal compacto),  $\beta$  (cúbica de corpo centrado) ou  $\alpha + \beta$  (alfa-beta). Apesar das ligas tipo beta serem descritas como mais biocompatíveis e com menor módulo de elasticidade (55-85 GPa), a liga Ti-6Al-4V é ainda a mais utilizada devido as suas propriedades mecânicas superiores às ligas alfa. A liga Ti-6Al-4V apresenta estrutura cristalina alfa-beta, maior resistência em tração (950 MPa)

e limite de escoamento (750 MPa) que a liga Ti cp (550 e 485 MPa, respectivamente). No entanto a liga Ti-6Al-4V apresenta potencial toxicidade neurológica pela possível liberação de íons Al e V (Niinomi, M, 1998) (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009).

## 2.2 Rigidez do implante

A interação existente entre o módulo de elasticidade das ligas metálicas e dos tecidos duros a serem substituídos é um dos principais indicativos da compatibilidade e do sucesso funcional do biomaterial. Discrepâncias acentuadas nestas grandezas induzem reações desfavoráveis no organismo hospedeiro que resultam na falha funcional do biomaterial, seja ele uma prótese, parafuso ou implante nas áreas da medicina ou odontologia.

Dentre as principais consequências das diferenças existentes entre a rigidez do tecido ósseo do hospedeiro e do material dos implantes está o fenômeno denominado *stress-shielding* (Li J, Li H, Shi L, Fok AS, Ucer C, Devlin H, Horner K, Silikas N, 2007) (Huiskes R, Weinans H, Van Rietbergen B, 1992). Trata-se da resposta biológica do tecido ósseo em consequência da falta de transferência de tensão pelo implante ao osso. Quando o implante é mais rígido que o tecido hospedeiro, a transferência das cargas para o tecido suporte fica comprometida. O implante atua como se fosse um escudo para a transferência da tensão funcional decorrente do carregamento. Sem estímulo, o tecido ósseo tem sua remodelação reduzida, não existindo a manutenção constante das características anisotrópicas de sua estrutura. Com isto há a perda progressiva da densidade óssea e decréscimo da estabilidade dos implantes. Este comportamento está em acordo com a lei de Wolff, segundo a qual ocorrem mudanças na arquitetura óssea em função da intensidade do carregamento (Frost HM, 2003).

Com relação a liga de titânio analisada no presente trabalho (Ti-6Al-4V), o módulo de elasticidade é muito superior (90-120 GPa) ao apresentado pelo tecido ósseo humano (10-30 GPa), o que torna esta liga susceptível ao *stress-shielding* (Bauer S, Schmuki P,

von der Mark K, Park J, 2013). Apesar desta limitação, o bom comportamento mecânico desta liga em aplicações ortodônticas e o pequeno tempo de uso dos implantes para ancoragem ortodôntica justificam a melhoria do seu desempenho. Por outro lado, o tratamento de superfície a ser desenvolvido poderá ser usado em implantes ortopédicos.

### 2.3 Resistência à fadiga

Os implantes biomédicos são submetidos a carregamentos cíclicos durante sua permanência no corpo humano. Na maioria das aplicações, na região onde os implantes são instalados existe a aplicação intermitente ou constante de cargas, como no caso de próteses de quadril e implantes odontológicos. Cerca de 90% dos casos de fratura observada das próteses ortopédicas de Ti-6Al-4V resultam da falha por fadiga (Chao J, Lopez V, 2007).

O tratamento mecânico e térmico que as ligas metálicas são submetidos durante seu processamento alteram o comportamento em fadiga, principalmente da liga Ti-6Al-4V, devido às modificações em sua microestrutura. É descrito na literatura que existe uma relação direta entre o número de ciclos e a velocidade de propagação de trincas em condições de carregamento em meio corrosivo, quando a fase alfa se encontra organizada sob a forma de um plano basal na estrutura hexagonal (Antunes RA, Lopes de Oliveira MC, 2012). Este comportamento, decorrente da textura cristalográfica, não é observado em ligas compostas exclusivamente por fase beta ou mesmo, para a própria liga alfa-beta quando este plano basal não é composto exclusivamente pela fase alfa.

Além da falha por fadiga devido ao carregamento cíclico, deve-se também considerar o comportamento das ligas de titânio frente a cargas constantes ou de caráter flutuantes durante o serviço das próteses e implantes (Niinomi M, 2003). A nucleação de trincas encontra-se em muitos casos, associada aos processos de corrosão por pits, devido à exposição dos dispositivos a fluidos fisiológicos contendo íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{HCO}_3^{-2}$ . Neste meio há a quebra da camada passiva e exposição da superfície do material, onde os pits funcionam como sítios preferenciais para a nucleação, crescimento

e propagação das trincas, levando à fratura com características de frágil (Antunes RA, Lopes de Oliveira MC, 2012).

Considerando-se que os dispositivos serão usados e submetidos a carregamento imersos em fluidos biológicos agressivos, o comportamento em fadiga deve ser considerado em associação à corrosão. Qualquer deslocamento dos dispositivos no tecido ósseo de suporte pode resultar na falha por *fretting*. Este tipo de falha é associado ao fato da falta de continuidade entre os implantes e o tecido ósseo, infiltração dos fluidos biológicos e atrito. Nestas condições, há perda de estabilidade da camada de óxido de titânio, resultando na abrasão da liga e liberação de íons metálicos (Mubarak Ali M, Ganesh Sundara Raman S, Pathak S, Gnanamoorthy R, 2010).

A questão do tratamento de superfície torna-se relevante durante o estudo da falha por fadiga pelo fato da maioria das trincas iniciarem-se a partir da superfície, quando o material encontra-se submetido a tensões cíclicas (Long M, Rack HJ, 1998). Não apenas aos carregamentos cíclicos, mas também as áreas submetidas a cargas excessivas ou oscilantes capazes de potencializar a iniciação e propagação de possíveis trincas que podem se amplificar até que o material falhe de modo frágil.

#### 2.4 Propriedades da superfície do titânio

O emprego do Ti cp não é garantia de boa bioatividade. Existem inúmeros outros fatores que interferem na aceitação ou rejeição dos implantes. A resposta biológica depende diretamente do recrutamento de diferentes tipos celulares que devem estar presentes na interface implante-osso para realizarem funções diversas como por exemplo, o estímulo à remodelação da matriz extracelular. (Anselme K, Bigerelle M, 2005)

Considerando-se que se espera observar a melhoria na estabilidade de mini-implantes de Ti-6Al-4V com o tratamento de superfície proposto, não é desejável a formação de tecido fibroso na interface entre o material e o osso hospedeiro. Assim, recomendam-se cuidados quanto aos seguintes fatores relacionados à superfície do parafuso: preparo cuidadoso de sua superfície, carregamento clínico imediato condizente

com a forma do dispositivo e qualidade do tecido suporte e controle da intensidade dos micromovimentos na interface de contato com o tecido suporte. Com relação aos possíveis fatores intrínsecos à superfície do material que podem interferir no sucesso dos implantes, destacam-se a rugosidade, molhabilidade, composição química, energia de superfície, tensão residual e morfologia. Todas estas características participam mutuamente na capacidade da superfície em promover diferentes graus de osseointegração. No caso dos parafusos de Ti-6Al-4V tratados, espera-se um leve aumento na estabilidade secundária do implante, assim como na atração, repulsão ou absorção de proteínas ou biomoléculas participantes dos eventos de sinalização, ativação e recrutamento celular. As superfícies com maior energia são mais eficazes na retenção de proteínas e biomoléculas. Quanto maior a espessura da camada de óxido, a atividade celular local aumenta, apresentando as células melhor adesão e menor grau de modificação em sua arquitetura. (Elias CN, Meirelles L , 2010) (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004) (Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE, 2011)

A estabilidade primária dos dispositivos implantados depende da sua forma e morfologia da superfície. A estabilidade secundária depende das características da superfície do implante como a rugosidade, composição química, energia de superfície, potencial químico, encruamento, presença de íons metálicos ou impurezas, tipo, qualidade e espessura da camada de óxido de titânio. Estes fatores influenciam na interação entre as proteínas plasmáticas e ligantes com a camada de óxido da superfície do titânio e suas ligas (Elias CN, Lima JHC, Valiev RZ, Meyers MA, 2008) (Elias CN, Meirelles L , 2010) (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012).

A morfologia da superfície é susceptível a modificações decorrentes de tratamentos químicos, mecânicos e eletroquímicos. Com o tratamento das superfícies dos implantes, é possível reduzir o tempo de reparo ósseo para permitir o carregamento, acelerar o crescimento e a maturação do osso neoformado, aumentar a estabilidade primária do dispositivo e viabilizar a instalação de dispositivos em tecidos ósseos com qualidade e quantidades limitadas. (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008)

A superfície do titânio, devido a sua alta energia de superfície, é capaz de absorver facilmente moléculas de O<sub>2</sub>, as quais se dissociam e formam a camada nativa de óxido de titânio, quase que instantaneamente. Desta forma, as propriedades da camada de

titânia são consideradas mais relevantes no comportamento desta liga do que o próprio material quando se analisa a biocompatibilidade.

#### 2.4.1 Rugosidade

Diversas propriedades da superfície do material são capazes de influenciar na resposta gerada pelo hospedeiro. As respostas celulares são modificadas pela topografia da superfície em que os fibroblastos e células epiteliais aderem. Estas células possuem maior adesão em superfícies lisas, enquanto que os osteoblastos e leucócitos apresentam proliferação mais efetiva e síntese de colágeno em áreas com moderada rugosidade. (Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D, 1998) (Eriksson C, Lausmaa J, Nygren, H, 2001)

Apesar da importância da rugosidade na adesão celular, não existe um consenso de rugosidade ótima para superfície de todos os implantes biomédicos. Normalmente, os implantes usados na Ortopedia possuem maior rugosidade que os empregados na Odontologia. Sabe-se todavia, que a superfície do material após sua usinagem pode apresentar irregularidades que são capazes de influenciar na eficácia dos dispositivos a serem implantados. (Elias CN, Meirelles L, 2010) Estas imperfeições residuais são classificadas como: 1) desvios da superfície, 2) ondulações e 3) rugosidade em si. A rugosidade em si é o componente primário da textura e se refere às irregularidades ( $\mu\text{m}$ ) superficiais. Ondulações são componentes secundários, deformidades sinuosas de ordem milimétrica que também se repetem com acentuada frequência. Já as deformidades de superfície são aquelas mais grosseiras, que não se enquadram no grupo da rugosidade ou ondulações, normalmente resultando de falhas no processo de usinagem do material (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008). Os principais parâmetros associados à rugosidade, que influenciam na osseointegração, são a média aritmética da altura dos picos ( $R_a$ ), valor médio quadrático ( $R_q$ ), rugosidade máxima ( $R_{\text{max}}$ ), valor médio de cinco rugosidades unitárias entre os pontos mais altos e baixos ( $R_z$ ), o número de picos ( $P_c$ ), distância média entre dois sulcos ( $S_m$ ), rugosidade média



dos valores acima do perfil ( $R_{pk}$ ) e o valor médio abaixo do mesmo ( $R_{vk}$ ) (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008).

A rugosidade das superfícies dos implantes pode ser analisada em três escalas distintas sendo elas a macro, micro e manométrica. Cada magnitude propicia contatos de naturezas distintas e influenciam estruturas diferentes. Inicialmente, é esperado que superfícies com maior área de contato viabilizem um sítio mais extenso à interação dos tecidos do hospedeiro. Contudo, esta relação direta não é uma realidade em virtude da diferente interação que as células fazem com as superfícies. Os fibroblastos têm afinidade por superfícies lisas ( $R_a < 1\mu m$ ), ao contrário de macrófagos, células epiteliais, linfócitos que aderem melhor a superfícies com menores graus de rugosidade ( $0.4 < R_a < 2.0\mu m$ ) (Thull R, 2002). Os osteoblastos também apresentam melhor aderência e maior capacidade de secreção em áreas de maior rugosidade ( $R_a > 2.0\mu m$ ) (Wennerberg A, Albrektsson T, 2009) (Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP, 2004).

#### 2.4.2 Molhabilidade

É a habilidade de uma superfície sólida em manter contato com um líquido, estando esta propriedade subordinada em proporção direta com a energia das diferentes superfícies. É quantificada através do ângulo de contato formado entre o líquido e a referida superfície. Para fins biomédicos, existe relação direta entre a capacidade de espalhamento celular e a maior hidrofiliidade (baixo ângulo de contato) da superfície (Elias CN, Meirelles L, 2010) (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008).

Diferentes estudos demonstraram maior proliferação celular em superfícies hidrofílicas, havendo participação direta da camada passiva neste processo. A camada de óxido de titânio é capaz de criar um micro ambiente hidrofílico capaz de facilitar a retenção das bioproteínas precursoras do processo de osseointegração (Bindu S, Sanosh KP, Smetana K, Balakrishnan A, Kim TN, 2009) (Maitz MF, Pham MT, Wieser E, Tsyganov I, 2003).

### 2.4.3 A camada de óxido de titânio

A camada de óxidos formada em alguns metais é conhecida como camada passiva, por inibir a degradação por corrosão. Este tipo de óxido é formado no titânio e suas ligas (óxido de titânio), assim como no aço inoxidável e nas ligas de Co-Cr, através de reações de oxi-redução. As características da camada de óxido dependem das condições do meio (Schmuki P, 2002). O processo de oxidação em fluidos é de natureza eletroquímica e é estabelecido através de reações de oxidação e redução simultâneas. A oxidação ocorre no anodo de onde há a doação de elétrons, estes que são incorporados instantaneamente no catodo onde a redução acontece. É mantida assim, a eletroneutralidade do processo. Os principais fatores que determinam a qualidade da camada passiva em soluções eletrolíticas são a composição dos eletrólitos, concentração e temperatura da solução, a intensidade da corrente utilizada, as condições de redução, além do tempo de exposição do processo (Schmuki P, 2002).

A excelente resistência à corrosão do titânio, sua inércia química e excelente biocompatibilidade podem ser relacionados com a camada de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) presente em sua superfície. Quando o titânio é exposto ao oxigênio há a formação espontânea da camada de óxido, a qual é denominada camada óxido nativo. Quando imerso em solução eletrolítica, a camada de óxido formada possui propriedades diferentes da camada de óxido nativo. Neste caso, as características das camadas variam com a composição dos óxidos formados e com a distância da superfície do material. Imediatamente superposta ao substrato, existe um filme com predominância de  $\text{TiO}$ , a seguir observa-se a presença de  $\text{TiO}_3$  até o estrato mais externo. Em uma maior espessura, observa-se a presença do óxido  $\text{TiO}_2$  ou titânia. Em condições em que não haja exposição do titânio ao meio eletrolítico, mas a exposição ao ar, a diferenciação dos diversos estratos não é clara pela reduzida dimensão do filme espontaneamente formado (3 a 8 nm). As variantes polimórficas dos componentes desta camada são o rutilo, anatase e a broquita. A estrutura cristalina varia de tetragonal (anatase e rutilo) a ortorrômbica (broquita). O rutilo e a anatase são as variantes mais comuns, apresentando o rutilo maior estabilidade e afinidade por células sanguíneas (Pozio A, Palmieri A, Giardi

A, Cura F, Carinci F, 2012) (Drnovsek N, Daneu N, Recnik A, Mazaj M, Kovac J, Novak S, 2009) enquanto a anatase apresenta maior afinidade com células precursoras do tecido ósseo. (Maitz MF, Pham MT, Wieser E, Tsyganov I, 2003) A capacidade de absorção de biomoléculas dos fluidos corporais bem como a proteção do material à corrosão desencadeada por estes mesmos fluidos é desempenhada pela interação entre a camada de óxidos (anatase e rutilo) e as características da superfície do material, como rugosidade e topografia, em associação à composição química da liga (Shah JS, Venkatsurya PKC, Thein-Han WW, Misra RDK, Pesacreta TC, Somani MC, Karjalainen L P, 2011) (Rupp F, Haupt M, Klostermann H, Kim, HS, Eichler M, Peetsch A, Scheideler L, Doering C, Oehr C, Wendel HP, Sinn S, Decker E, von Ohle C, Geis-Gerstorfer J, 2010) (Bernathova I, Bursak M, 2011).

Outra característica importante da superfície dos implantes é sua molhabilidade. (Bindu S, Sanosh KP, Smetana K, Balakrishnan A, Kim TN, 2009). No caso dos implantes biomédicos, a interface sólido-líquido é representada pela interação entre implante-sangue, de onde se considera também a ativação e interação eletroquímica de proteínas sanguíneas como o fibrinogênio com a superfície do material. (Shao H, 2010) (Maitz MF, Pham MT, Wieser E, Tsyganov I, 2003). Outro mecanismo relevante é a capacidade apresentada pela camada de óxido de titânio em interagir com proteínas plasmáticas, absorvendo-as. A camada de titânia é capaz de criar um ambiente próprio, dotado de hidrofiliabilidade acentuada, mantida através da adsorção de íons cálcio, o que aumenta a capacidade de adesão localizada de outras proteínas plasmáticas como a pré-albumina, albumina e imunoglobulinas (Maitz MF, Pham MT, Wieser E, Tsyganov I, 2003). A formação de grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) em sua superfície, tende a capturar e neutralizar diferentes tipos de cátions e, por afinidade com estes últimos, diferentes biomoléculas negativamente carregadas, resultando na criação de precursores sequenciais à neoformação óssea. (Nie FL, Zheng YF, Wei SC, Wang DS, Yu ZT, Salimgareeva GK, Polyakov AV, Valiev RZ, 2013) As dissociações de moléculas de água ocorrem pela ação de íons metálicos livres que saturam ou camuflam sua carga positiva com os grupos ( $\text{OH}^-$ ) gerados. São formados dois grupos hidroxila para cada molécula de água dissociada, e estes grupos atuam como centros ácidos e básicos em regiões opostas da superfície do material, viabilizando a atração de biomoléculas de diferentes naturezas. O ponto de

equilíbrio entre as cargas antagônicas é estabelecido no pH de 6.2. Moléculas de aminoácidos são excelentes elos de ligação primários à camada de óxido de titânio por estabelecerem ligações em diferentes sítios simultaneamente, através de seus grupos ácidos (carboxil) e básicos (amino).

Cabe ressaltar, que as células não são capazes de se aderirem diretamente à superfície do biomaterial, mas através de proteínas secretadas e adsorvidas pela superfície hidrofílica do material. Estas proteínas secretadas são denominadas ligantes e são identificadas por receptores específicos da matriz extracelular (integrinas). A ligação é estabelecida diretamente entre receptores compostos formados por fibronectinas e vitronectinas. (Elias CN, Meirelles L, 2010) (Elias CN, Lima JHC, Valiev RZ, Meyers MA, 2008) (von der Kalaus K, Park J, 2013)

Considerando-se a atividade fotocatalítica do anatase, sua exposição à radiação UV é capaz de produzir alterações na hidrofilinidade de sua superfície resultante da geração de cátions e defeitos que contribuem para a dissociação da água adsorvida, formando grupos básicos Ti-OH que podem participar da nucleação e cristalização da apatita (Rupp F, Haupt M, Klostermann H, Kim, HS, Eichler M, Peetsch A, Scheideler L, Doering C, Oehr C, Wendel HP, Sinn S, Decker E, von Ohle C, Geis-Gerstorfer J, 2010) (Kasuga T, Kondo H, Nogami M, 2002).

#### 2.4.4 Resistência à corrosão

O fenômeno da passividade é baseado na formação de uma camada de óxidos (filme passivo) sob condições específicas do ambiente em que o material se encontra (Figura 2.1). Este filme retarda drasticamente a susceptibilidade do material à corrosão (dissolução), agindo como uma barreira ativa que separa a superfície do material da ação de meios com comportamento agressivo (Schmuki P, 2002).

A formação da camada de óxido tem espessura que varia entre os metais, principalmente no titânio, tântalo e zircônio. Nestes metais, é possível aplicar altos potenciais de anodização antes da ruptura do potencial dielétrico do material (Schmuki

P, 2002). A média da espessura da camada nativa nestes metais não ultrapassa 10 nm.

No caso das ligas de titânio, a formação espontânea da camada de óxido ocorre pela oxidação do metal da superfície do material mediante a doação de elétrons para o

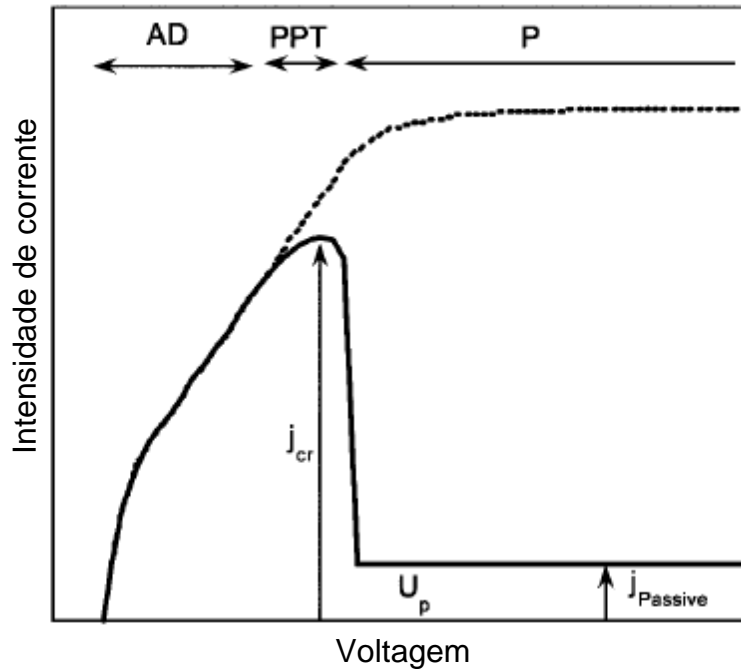


FIG. 2.1 – Curva de polarização da liga Ti-6Al-4V. Está indicado o log da densidade de corrente vs. Voltagem, onde estão indicados o potencial anódico onde é iniciada a passivação ( $U_p$ ), fluxo da corrente no intervalo de passivação ( $j_{Passive}$ ), o fluxo pré-passivação ( $j_{CR}$ ), a simulação do comportamento da liga sem passivação (linha pontilhada) de onde para potenciais muito elevados, a intensidade de corrente torna-se independente do potencial medido. (AD) representa o intervalo sem passividade, (PPT) a zona de transição, e (P) a região de passividade estável (Schmuki P, 2002).

oxigênio em contato, havendo sua redução (Liu X, Chu PK, Ding C, 2004). Conjuntamente ao fluxo de elétrons, ocorre a transferência de massa que resulta na formação espontânea da camada de titânia (Figura 2.2). Para que haja a transferência de massa, é necessário que pelo menos uma das espécies iônicas se difunda através da camada nativa e é durante este processo que a mesma tem sua espessura aumentada (Antunes RA, Lopes de Oliveira MC, 2012) (Schmuki P, 2002) (Liu X, Chu PK, Ding C, 2004). Os elétrons podem advir do catodo, onde há a redução do oxigênio, ou do anodo, onde é

estabelecida a oxidação na superfície do metal. Considerando-se que as reações catódicas e anódicas são separadas espacialmente pelo filme nativo, a condutividade desta camada é uma característica relevante na tentativa de se aumentar a espessura da mesma. A força motriz que governa o processo é estabelecida pela diferença de potencial eletroquímico existente entre os elementos que compõem o catodo e anodo (Liu X, Chu PK, Ding C, 2004). Em ligas de Ti, Ta, Nb, Al e Be, há movimentação de elétrons entre anodo e catodo, existindo cátions e ânions com mobilidade semelhante (Antunes RA, Lopes de Oliveira MC, 2012) (Schmuki P, 2002).

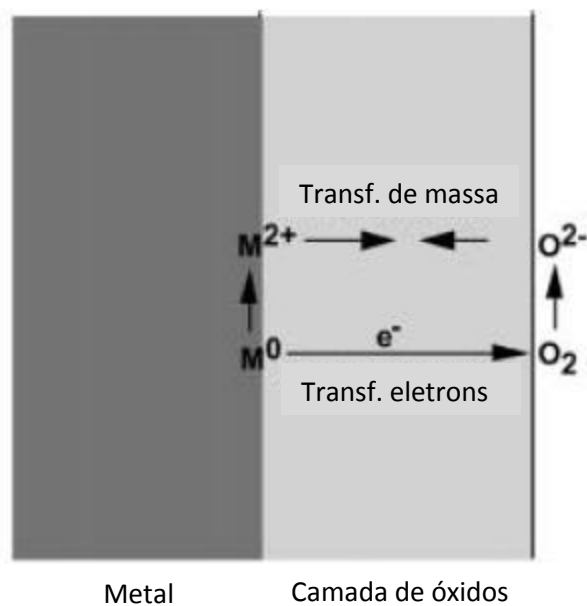


FIG.2.2 – Crescimento espontâneo da camada de óxido de titânio. A transferência de massa é responsável pela geração da camada de óxidos e o fluxo de elétrons resulta da oxidação do metal ( $M^+$ ) na superfície do metal e da redução do oxigênio ( $O^-$ ) do meio (Schmuki P, 2002).

Variando-se as condições externas, a camada de óxido de titânio pode apresentar equilíbrio metaestável, oscilando entre dissolução e crescimento. Nesta situação, ocorrem alterações da composição e espessura, que variam com o meio na qual a

superfície do metal está submetido. Dentre os principais parâmetros capazes de alterar o comportamento da camada, estão o potencial de passivação, o tempo de exposição do metal ao meio, sua composição e a temperatura do mesmo (Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J, 2013).

A resistência à corrosão promovida pela camada de titânia é atribuída a sua grande estabilidade, na maioria dos meios, principalmente em pH entre 2 e 12. Uma medida da capacidade de proteção assegurada pela camada é indicada pela intensidade de corrente de corrosão medida nas curvas de polarização do material (Schmuki P, 2002).

A dissolução do filme é possível em meios contendo HF ou peróxido de hidrogênio. Quando submetida ao aquecimento, mantém-se estável mesmo em soluções salinas até a temperatura de 70°C ou até o limite de 315°C em soluções com menor capacidade corrosiva. Mesmo em situações em que o potencial de passivação do titânio seja inferior ao potencial de equilíbrio do hidrogênio em solução, a intensidade de corrente é reduzida devido à baixa velocidade com que as reações catódicas ocorrem na superfície do titânio. Este comportamento explica também a menor susceptibilidade do material à corrosão por pits, onde no catodo é estabelecida a redução do hidrogênio (Schmuki P, 2002).

## 2.5 Resposta inflamatória à degradação do titânio

Considerando que existe possibilidade de ocorrer a degradação do titânio e de suas ligas após a inserção dos implantes, é importante analisar-se o efeito das partículas e dos íons liberados. A degradação pode ocorrer devido à corrosão e ao desgaste das partes metálicas em movimento.

A abrasão devido aos desgastes e à corrosão das ligas de titânio em fluidos corporais são suficientes para o desencadeamento de respostas inflamatórias no hospedeiro. A degradação de ligas de titânio empregadas em implantes ou próteses biomédicas pode ocorrer devido ao desgaste causado pelo contato metal-metal das diferentes partes da prótese, da corrosão decorrente da permanência do material implantado por longos períodos, ou uma conjunção de ambas as situações (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J,

Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013). A entrada no organismo de íons provenientes da superfície do material da prótese ocorre por meio dos tecidos periprotéticos ou pelo sistema de irrigação local. Ao serem liberados, os elementos são identificados pelas células que desencadeiam respostas e as reações imunológicas têm início.

A reação inflamatória é iniciada através do reconhecimento dos íons e partículas por células da linhagem primária (macrófagos e monócitos) do sistema de defesa do hospedeiro. As partículas ligam-se a diferentes proteínas do organismo hospedeiro, incluindo fibronectinas, vitronectinas, albumina, fibrinogênio, fator de von Willebrand e outros complementos, havendo a formação de um complexo de apresentação variável em tamanho e em eficiência na intensidade da resposta do organismo (Tang L, Hu W, 2005). Apesar do raio iônico de um elemento metálico ser cerca de mil vezes menor (125 a 140 pm para os íons Al, V e Ti) ao tamanho ideal para reconhecimento do sistema inato de defesa (0,3 a 1  $\mu\text{m}$ ), as proteínas de ligação facilitam a identificação dos produtos abrasivos das ligas metálicas (Ingham E, Fisher J, 2005).

Quando o implante é inserido no corpo e entra em contato com os fluidos biológicos, os macrófagos e monócitos são ativados. Os monócitos migram em direção aos tecidos, de onde foram liberados os agentes abrasivos e se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos residentes. Nesta fase, eles liberam inúmeras citocinas e diversos agente pós-inflamatórios capazes de manter a resposta inflamatória ativa, além do recrutamento, multiplicação, diferenciação e maturação de células osteoclásticas (Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K, 2010) (Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG, 2008). A supressão da atividade osteogênica é possível pela inibição dos osteoblastos.

Os macrófagos residentes são dotados de diversos receptores para o reconhecimento de antígenos (PRRs) de espectro exógeno (patógenos associados a biomoléculas: PAMPs) e endógeno (alarminas) (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013). Havendo a liberação de partículas e íons metálicos, estas estimulam uma série de reações desencadeadas pelos agentes NALP3 (complexo inibidor de apoptose contendo leucina e piridina contendo proteína 3) capazes de desencadear a



liberação dos agentes precursores pró-inflamatórios pró-interleucina 1- $\beta$  e 18 (pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18) (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013). A intensidade da resposta dos macrófagos dependerá do tipo, dimensão e toxicidade dos produtos de degradação gerados pelos implantes e próteses, sendo que esta resposta delimitará o número e profundidade dos sítios de reabsorção óssea gerados na região de implantação dos artefatos biomédicos (Goodman SB, 2007).

Os macrófagos polarizam-se entre duas variantes principais denominadas M1 e M2, havendo contudo, uma terceira variante classificada como reguladora (Mreg). Macrófagos M1 participam da expressão gênica, apresentação de antígenos, ação citotóxica, produção de interleucinas 12 e 23 (IL-12, IL-23), quimocinas (CCL2-4, CXCL8-12), além de fatores pró-inflamatórios diversos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, PGE2, fatores de crescimento, dentre outros) (Pajarinen J, Kouri V-P, Jamsen E, Li T-F, Mandelin J, Konttinen Y T, 2013) (Antonios JK, Yao Z, Li C, Rao AJ, Goodman SB, 2013) (Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Wimmer M A, Holinka M, 2013). Macrófagos M2 realizam a supressão de diversos fatores associados à liberação de agentes pró-inflamatórios complementares, além de desenvolverem atuação fagocítica quando sensibilizados por interleucinas (IL-4, IL-12, IL-23) e glicocorticóides (Pajarinen J, Kouri V-P, Jamsen E, Li T-F, Mandelin J, Konttinen Y T, 2013) (Antonios JK, Yao Z, Li C, Rao AJ, Goodman SB, 2013) (Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Wimmer M A, Holinka M, 2013). Todavia, sua ação principal está associada à supressão de inúmeras funções como a liberação de citocinas pró-inflamatórias, capacidade de apresentação de antígenos e ação citotóxica, além do estímulo à produção e liberação complementar de IL-4, IL-10 e IL-13. A última variante de macrófagos é denominada reguladora (Mreg) atuante na regulação ou supressão da resposta inflamatória conjuntamente à liberação de grandes quantidades de IL-10 (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013).

A participação dos macrófagos é importante no reconhecimento dos produtos da degradação dos implantes e próteses através de ações de sensibilização, quimiotaxia, fagocitose e adaptação a estímulos (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo

J, 2013). A ligação dos macrófagos com os complexos formados pelas partículas metálicas e bioproteínas do hospedeiro é estabelecida por meio de integrinas e de diversos receptores presentes em sua superfície que funcionam como fatores de reconhecimento de antígeno (PRRs), dentre os quais estão os fatores de reconhecimento de lectina tipo C (CLRs), receptores toll (TLRs), receptores de ligação a nucleotídeos com oligo domínio (NLRs) e receptores de indução por ácido retinóico (RLRs) (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013). A ação deste conjunto de receptores resulta na liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), interferon (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$ , capaz de mediar tanto a liberação complementar de citocinas e quimocinas, quanto à produção complementar de si mesmo por auto-estimulação direta (Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS, 2008) (Goodman SB, 2007) (Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG, 2008).

Existe um grupo especial de macrófagos detentor de receptores com estruturas em colágeno (MARCO) capaz de amplificar a secreção de IL-12, que são potentes agentes relacionados a processos inflamatórios crônicos (Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao A J, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen Y T, Goodman S B, Gallo J, 2013). Esse grupo de macrófagos é sensível à presença de resíduos metálicos oriundos da degradação de implantes e próteses biomédicas. Dentre os inúmeros produtos que contribuem para o desenvolvimento de lacunas de reabsorção adjacentes a dispositivos implantados está a catepsina-k, secretada por macrófagos quando expostos a partículas e resíduos de titânio (Tamaki Y, Sasaki K, Sasaki A, Takakubo Y, Hasegawa H, Ogino T, Konttinen YT, Salo J, Takagi M, 2008).

## 2.6 Influência do tratamento de superfície

Dentre as principais técnicas de tratamento de superfície dos implantes dentários osseointegráveis de titânio, destaca-se o tratamento com ácido, jateamento, anodização, recobrimento por plasma *spray* de plasma, deposição de nanopartículas e tratamento

com laser.

Um dos principais indicativos do sucesso na instalação dos implantes é sua estabilidade primária. Trata-se de uma medida do sucesso imediato na interação entre a topografia do dispositivo e os tecidos de suporte do hospedeiro. O ponto crucial está na manutenção da integridade dos tecidos periimplantares, uma vez que a remodelação óssea ocorrerá fisiologicamente na região de inserção, independentemente da presença de qualquer artefato implantado (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012). É sabido que, principalmente para dispositivos que receberão carregamento imediato, a estabilidade primária é um indicativo confiável do sucesso e longevidade dos implantes. (Cho SA, Park KT, 2003) (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008) (Anselme K, Bigerelle M, 2005)

A topografia e rugosidade da superfície atuam positivamente no processo de reparo ósseo através de interações de superfície e resposta celular favoráveis. Superfícies mais rugosas permitem uma aderência mecânica mais firme das paredes do dispositivo com os tecidos circundantes (Romanos GE, Toh CG, Siar CH, Swaminathan D, 2002). A estabilidade pode ser quantificada pela resistência à torção durante a instalação do dispositivo e depende da morfologia da superfície do implante, da sua forma, da geometria das roscas, passo dos filetes, e do coeficiente de fricção entre as paredes dos implantes e o sítio de instalação (Santos MV, Elias CN, Cavalcanti Lima JH, 2011).

A realização de tratamentos de superfície dos implantes aumenta a rugosidade superficial e o coeficiente de atrito, havendo diferenças entre os torques de instalação de dispositivos anodizados e condicionados por ácidos. (Elias CN, Meirelles L , 2010) Apesar de existir uma relação direta aparente entre a rugosidade superficial e a taxa de sucesso de implantes, alguns modelos experimentais ainda não foram capazes de comprová-la. (Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE, 2011)

Alguns pesquisadores observaram que existe o aumento da rugosidade e do coeficiente de atrito após o tratamento da superfície, quando comparados a dispositivos apenas usinados (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008) (Elias CN, Meirelles L , 2010). Constatou-se inclusive, melhoria da molhabilidade através da diminuição do ângulo de contato entre a superfície e solução de NaCl (a solução mais hidrofílica avaliada no estudo) sendo que o menor valor foi associado à superfície anodizada. (Elias

CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008) Quando a avaliação envolveu sangue, não foi observada diferença estatística entre as superfícies, com exceção da superfície anodizada que divergiu de todas as demais. (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008)

Outras vantagens do tratamento de superfície são a melhoria da estabilidade secundária, molhabilidade, do contato existente entre o implante e o osso e da resistência na interface osso-implante. Estas características reduzem o tempo de cicatrização e o período necessário para o carregamento do dispositivo (Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE, 2011). A escolha da técnica mais adequada para se tratar uma superfície é iniciada pela definição do grau de rugosidade necessária, uma vez que as metodologias para se obter macro, micro ou nano rugosidade são diferentes (Elias CN, Meirelles L, 2010). O melhor uso das diferentes técnicas de tratamento consiste na combinação de diferentes metodologias com o objetivo de se conseguir uma superfície híbrida. Um exemplo seria uma superfície dotada de micro e nano rugosidade (Elias CN, Meirelles L, 2010).

Mostra-se na Figura 2.3, a morfologia de implantes submetidos a diferentes tratamentos de superfície. Através do tratamento da superfície dos implantes, é possível otimizar a capacidade da superfície em reter bioproteínas para início do processo de integração ao organismo hospedeiro. Alterações da composição na superfície do material

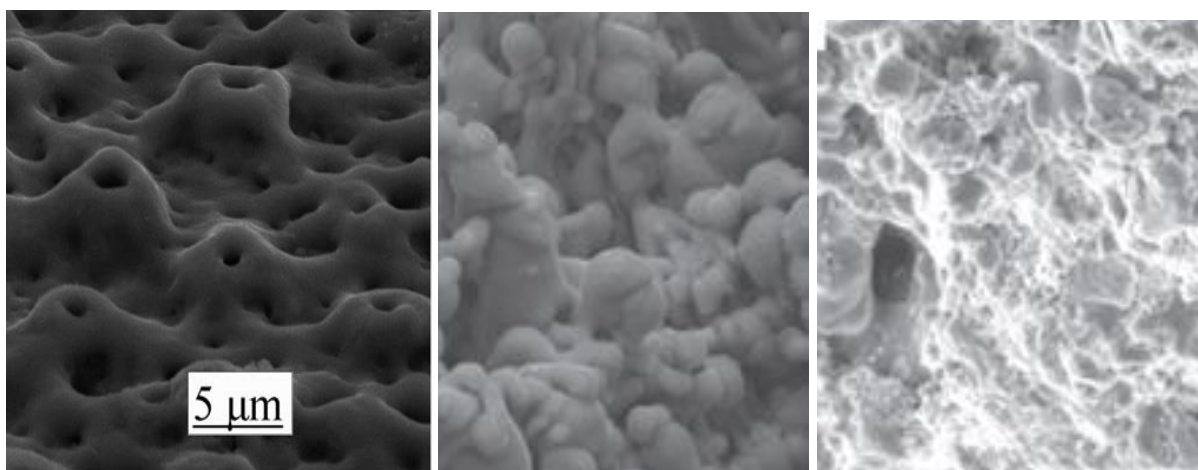


FIG.2.3- Superfície de titânio após recebimento de tratamento de superfície por anodização (esquerda), laser (centro) e plasma *spray* (direita). (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012)

são realizadas pela adição de cálcio, fósforo e flúor (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004) (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012). Modificações na proporção titânio/oxigênio, variação da espessura da camada de titânia, incorporação de elementos bioativos, adição de fluoretos e revestimentos com CaP são exemplos destes procedimentos.

### 2.6.1 Coberturas de fosfato de cálcio

O fosfato de cálcio foi proposto como material de revestimento de biomateriais pela sua similaridade com diversos minerais presentes no organismo, incluindo os tecidos ósseos e dentes. Dentre os materiais inorgânicos mais empregados está a hidroxiapatita (HA) pela grande biocompatibilidade e possibilidade de alterações de suas características (composição, cristalinidade e porosidade), de acordo como as diferentes aplicações a que possa ser submetida. O objetivo de seu uso como cobertura é devido à sua bioatividade com possibilidade de estabelecer ligações químicas entre os implantes biomédicos e o tecido ósseo do hospedeiro. As principais técnicas descritas para criação da cobertura inorgânica são plasma *spray*, cobertura por sol-gel, precipitação biomimética e deposição por pulverização catódica (Geurs NC, Jeffcoat RL, McGlumphy EA, Reddy MS, Jeffcoat MK, 2002) (Mendes VC, Moineddin R, Davies JE, 2007) ( Kim MH, Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY, 2011) (Shi J, Chen C, Yu H, Zhang S, 2008).

Por meio do plasma *spray* é possível a aplicação de uma camada de HA na superfície do titânio com alteração da rugosidade (Geurs NC, Jeffcoat RL, McGlumphy EA, Reddy MS, Jeffcoat MK, 2002). A camada tem a espessura de micrômetros a milímetros, sendo todavia sua adesão à superfície do implante limitada, o que restringe sua ampla utilização no campo biomédico. Outras restrições seriam limitações decorrentes da porosidade da cobertura, tensão residual na interface implante-cobertura, dificuldade no controle na espessura da cobertura, bem como alterações na estrutura da HA em função das altas temperaturas necessárias para a deposição.

A cobertura por sol-gel permite a deposição de camadas de CaP com espessura

nanométrica, através da imersão de implantes de titânio em suspensões de CaP com cristais com dimensões de 20-100 nm. Cerca de metade das porosidades das superfícies são facilmente ocupadas por partículas de fosfato (Mendes VC, Moineddin R, Davies JE, 2007).

Um dos processos de deposição biomimética consiste na deposição de CaP na superfície do titânio após a imersão dos implantes em fluidos biológicos, em pH fisiológico à 37°C ( Kim MH, Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY, 2011). Produz-se uma camada de apatita que mimetiza a estrutura óssea, viabilizando a incorporação de biomoléculas orgânicas como fatores de crescimento, proteínas plasmáticas ou mesmo drogas.

Depósitos na superfície do titânio podem ainda ser realizadas por pulverização catódica, o que permite o recobrimento com CaP em espessuras variantes entre 0.5-5 µm. A deposição é realizada em vácuo e a pulverização resulta do bombardeamento por íons de alta energia do alvo catódico por feixe plasmático magnetizado (Shi J, Chen C, Yu H, Zhang S, 2008).

## 2.6.2 Tratamentos com fluoretos

A técnica de tratamento da superfície do titânio para deposição de fluoretos segue o mesmo princípio da cobertura com CaP. Diversos íons são preconizados na tentativa de aumentar a bioatividade da superfície do titânio, seja pela tentativa de reproduzir a composição de HA de cálcio  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  original dos tecidos ósseos, pelo emprego de íons cálcio e fósforo, ou pela modificação específica na camada de titânia realizada por íons flúor (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004).

Sabe-se que o tratamento com fluoretos é capaz de aumentar a capacidade de adsorção de íons cálcio e fosfato, porém não existe consenso se esta absorção é exclusiva para estes íons. Observou-se que existe a possibilidade de nucleação de cristais de fosfato de cálcio na superfície dos implantes ou o aprisionamento de íons flúor na camada de óxido de titânio (Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen

A, Ellingsen, JE, 2006). Baixas concentrações de fluoreto durante o evento de neoformação óssea são capazes de aumentar a síntese de colágeno em matriz óssea, potencializar a nucleação de cristais de apatita, proliferação diferencial de osteoblastos pela indução de fosfatases ácidas sensíveis aos fluoretos, efeitos sobre a adsorção de bioproteínas e de fosfato de cálcio na superfície de titânio (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004) (Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, Ellingsen, JE, 2006).

### 2.6.3 Jateamento

O jateamento da superfície dos implantes pode ser feito com partículas de óxido de alumínio, óxido de titânio, HA ou fosfato tricálcico do tipo beta ( $\beta$ -TCP) para alteração da rugosidade das superfícies ou imposição de tensões compressivas. Os implantes com superfícies de titânio jateadas, apresentam maior estabilidade primária e secundária que os usinados, bem como maior superfície de contato implante/osso após o jateamento. Apresentam rugosidade da ordem de  $1.5\mu\text{m}$  (Wennerberg A, Albrektsson T, 2009).

### 2.6.4 Jateamento seguido de tratamento com ácido

Trata-se de uma técnica mista onde o jateamento prévio produz a rugosidade desejada que poderá ser suavizada pela imersão em soluções ácidas com diferentes concentrações e composições, por diferentes intervalos de tempo, sob diversas temperaturas. Este processo tem o objetivo da retirada de possíveis resíduos tóxicos (alumina) ou mesmo para que a região jateada apresente uma rugosidade mais regular. É capaz de gerar superfícies com rugosidade média de aproximadamente  $1.2\mu\text{m}$ , com adesão e estabilidade adequadas em implantes biomédicos (Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD, 2008) (Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J,

Wieland M, Landolt D, 2005) (Perrin D, Szmukler-Moncler S, Echikou C, Pointaire P, Bernard JP, 2002).

A concentração da solução de ataque e a temperatura influenciam diretamente na rugosidade da superfície. A imersão em misturas ácidas mais agressivas produzem zonas de reduzida rugosidade (Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, 1999). O tratamento com ácido dos implantes pode ser realizado em diferentes faixas térmicas, as quais também influenciam na rugosidade e na homogeneidade da superfície. (Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, 2002) (Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, 2004)

#### 2.6.5 Tratamento com ácido

O tratamento com ácido é a técnica mais simples para modificar a superfície dos implantes. O tratamento é feito pela imersão em soluções ácidas com concentrações e composições variadas, como de ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e fluorídrico. Através de diferentes intervalos de imersão e de temperaturas variadas, o processo é capaz de criar superfícies com diferentes rugosidades em escala micrométrica (0.5-2  $\mu\text{m}$ ) (Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E, 1995).

Diversos autores desenvolveram estudos com a utilização de soluções contendo ácido sulfúrico (Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A, 1997). Soluções mistas contendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  63.6% e HCl 10.6% sob imersão de amostras de titânio por 5 minutos a 70°C demonstraram melhor estabilidade em avaliações com modelos animais e em pacientes a receberem implantes biomédicos (Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A, 2000). O sucesso do tratamento em comparação ao grupo controle (desprovido de qualquer tratamento) foi atribuído a microrugosidade criada que facilitou a adesão dos tecidos neoformados (Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A, 2000) (Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS, 2003) (Butz F, Aita H, Wang CJ, Ogawa T, 2006). Os tratamentos com ácido sulfúrico também foram realizados de forma sequencial e descritos em duas etapas distintas (Att W, Tsukimura N, Suzuki T,



Ogawa T, 2007). A primeira etapa foi realizada com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 67% a 120°C por 75 segundos enquanto o procedimento em duas etapas foi precedido por uma solução de HF 20% (Att W, Tsukimura N, Suzuki T, Ogawa T, 2007). Apesar da capacidade de adesão de células osteogênitoras não ter sido alterada, o tratamento em duas etapas produziu uma superfície com rugosidade média de 0.6µm enquanto a etapa única gerou uma rugosidade de 0.9µm (Att W, Tsukimura N, Suzuki T, Ogawa T, 2007). O uso do ácido sulfúrico é capaz de gerar modificações na microrugosidade da superfície sem alteração na topografia obtida pela usinagem dos dispositivos biomédicos.

Soluções contendo ácido fosfórico são capazes de promover alterações promissoras na superfície do titânio para fins biomédicos. Existe a possibilidade de incorporação de fosfatos na camada de óxido de titânio, o que pode vir a aumentar consideravelmente a molhabilidade da superfície (Park JW, Kim YJ, Jang, JH, Kwon TG, Bae YC, Suh JY, 2010) (Park JW Jang JH Lee CS Hanawa T, 2009). Alterações na microrugosidade (1.2µm) da superfície também são produzidas pela solução fosfórica, estando em intensidade inferior a superfícies jateadas e condicionadas (1.5µm), apenas jateadas (1.6µm) ou anodizadas (1.8µm) (Park JW, Kim YJ, Jang, JH, Kwon TG, Bae YC, Suh JY, 2010) (Park JW Jang JH Lee CS Hanawa T, 2009). Acredita-se que a presença de fosfatos seja promissora na facilitação de adesão de osteoblastos, além da possibilidade de potencializar o aprisionamento de íons cálcio, promovendo a precipitação de apatitas (Liu Q, Ding J, Mante FK, Wunder SL, Baran GR, 2002).

O uso do ácido fluorídrico com concentração de 0.2%, pH de 2.1 e tempo de imersão de 120 a 150 segundos apresenta bons resultados quanto à neoformação óssea (Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, 2009). Os autores defenderam que a imersão por intervalos superiores a 120 segundos é suficiente para a incorporação de fluoretos na superfície do material, otimizando a osseointegração do material associada a rugosidades topográficas em escala micro e nanométrica (Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, 2009) (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004). Defende-se, em outro estudo, que a incorporação de fluoretos torna a superfície mais susceptível a precipitação de fosfatos de cálcio para formação de flúorapatita e hidroxiapatita fluoretada (Li Y, Zou S, Wang D, Feng G, Bao C, Hu J, 2010).

## 2.6.6 Tratamentos de anodização

É uma técnica que tem como objetivo obter uma superfície mais inerte devido ao aumento da espessura da camada de óxido de titânio. Com seu espessamento, há o aumento na resistência do material à corrosão e degradação, reduzindo a possibilidade de liberação de íons metálicos em ambientes biológicos. A passivação induz a formação ou aumento da espessura da camada passiva, além de remover possíveis agentes contaminantes. A passivação pode ser realizada através de oxidação por ácidos, oxidação anódica e tratamento térmico.

A oxidação por ácidos consiste na imersão do material em soluções de ácidos fortes a fim que haja interações do elemento sobre a camada nativa de solução ácida. A norma ASTM-F86 recomenda a imersão em  $\text{HNO}_3$  34% por 30 minutos à temperatura ambiente. Apesar de haver o espessamento da camada nativa, a passivação com ácido nítrico não é capaz de inibir e até pode, segundo referência citada, potencializar a liberação de íons metálicos em ligas Ti-6Al-4V (Callen BW, Lowenberg BF, Lugowski S, Sodhi RN, Davies JE, 1995).

A técnica de oxidação anódica (anodização) é uma variação da oxidação por imersão em ácidos, onde o material funcionaria como o anodo da reação. A solução eletrolítica, não necessariamente ácida, é capaz de criar, pela ação de corrente elétrica, alterações na rugosidade da superfície do material e possível espessamento da camada passiva (Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T, 2001) (Burgos PM, Rasmusson L, Meirelles L, Sennerby L, 2008). Adicionalmente à ação do  $\text{HNO}_3$ , imersões em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5-1M sob voltagem de 155V por 60 segundos, demonstraram sucesso na geração de um nova superfície com topografia e rugosidade únicas (Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T, 2004). Elementos com potencial bioativo (Ca, P, Mg, S, F) podem ser adicionados à solução para que sejam incorporados à camada de óxidos, além da possibilidade de deposição adicional de cristais de anatase e rutilo para espessamento da camada de  $\text{TiO}_2$  (Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T, 2001).

O tratamento térmico também é uma alternativa possível para passivação do material. Variações na temperatura e no tempo de imersão de amostras de titânio são

capazes de alterar a espessura da camada nativa de óxidos. O comportamento da camada de óxidos foi avaliado após tratamento à 400 °C e 800 °C, por uma e duas horas, e produziu espessuras crescentes da camada nativa até o tamanho máximo de 300 nm (Kim YH, Koak JY, Chang IT, Wennerberg A, Heo SJ, 2003).

## 2.7 Osseointegração

Trata-se de um conceito biológico onde existe a incorporação de agentes externos ao sítio hospedeiro com fixação e estabilidade quando submetido a cargas funcionais. A ligação da superfície do material bioativo ao tecido do hospedeiro é mantida por pontes de cálcio e fósforo, estando a qualidade da união subordinada a características microestruturais da superfície do biomaterial. Inicia-se com a aderência de células, devendo a superfície estar apta a absorver diferentes íons, proteínas e biomoléculas presentes no fluido biológico ou tecidos do hospedeiro. (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012) (Elias CN, Lima JHC, Valiev RZ, Meyers MA, 2008) A adesão inicial é uma situação crítica por delimitar qual a linhagem celular que será capaz de aderir aos núcleos de ligação formados. (Anselme K, Bigerelle M, 2005) As células da linhagem osteoblástica estão aptas a modificarem sua forma e sua capacidade de adesão através de alterações e rearranjos em proteínas de seu citoesqueleto. O contato da célula com a superfície a ser povoada resulta na geração de estímulos à matriz extracelular, resultando na ativação de genes específicos para a remodelação e adesão da célula focalmente. (Thull R, 2002) A regulação dos efeitos sofridos pela matriz extracelular são mediados através de proteínas transmembranares denominadas integrinas. As integrinas são capazes de se ligarem a ligantes (íon ou molécula que se liga diretamente a um átomo de um metal por meio de ligações covalentes ou iônicas, originando um complexo de ligação). (Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M, Amédée J, 2002) Algumas integrinas estão aptas a se relacionarem com diversos ligantes incluindo lamininas, colágeno, fibronectina e outros receptores, estando todas estas interações dependentes das propriedades da superfície do biomaterial. (Verrier S, Pallu S, Bareille

R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M, Amédée J, 2002)

Tanto a topografia quanto a rugosidade da superfície do biomaterial são capazes de influenciar a proliferação, diferenciação e síntese de matriz extracelular, produzindo uma possível resposta adequada por meio de fatores locais ou até mesmo da diferenciação de linhagens celulares ósseas (Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP, 2004). Mostra-se, na Figura 2.4, que a rugosidade da superfície do titânio pode controlar a direção de crescimento e espalhamento das células osteoblásticas (Menezes GC, Elias CN, Attias M, Silva Filho FC , 2003).

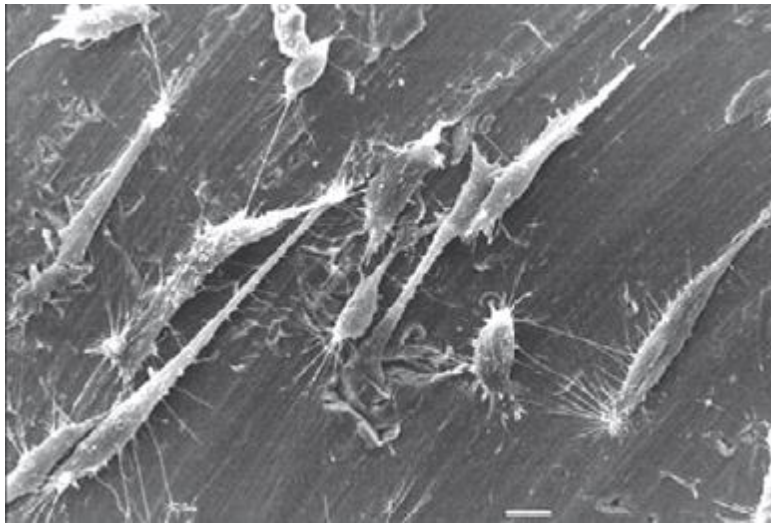


FIG.2.4 - Adesão de osteoblastos à superfície de titânio contendo macrorrugosidade (Menezes GC, Elias CN, Attias M, Silva Filho FC , 2003).

Após a instalação dos parafusos, sua superfície interage com íons e proteínas do fluido do hospedeiro, e a energia de superfície do material (traduzido por sua molhabilidade) é capaz de modular proteínas plasmáticas e ativar diferentes receptores de membrana (Tend and present state of titanium alloys with body centered structure for biomedical applications, 2010). A cascata de coagulação é iniciada e existe ativação plaquetária que inicia o processo inflamatório pelo recrutamento de monócitos e neutrófilos. Diferentes citocinas oriundas da ativação plaquetária como IgF, TGF-B e PDGF potencializam a resposta osteogênica e neoformação óssea através do estímulo à migração e proliferação da linhagem celular osteogênica, capaz de se diferenciar em

osteoblastos e secretar matriz óssea. (Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE, 2005) Desta forma, a cascata de eventos envolve resumidamente a ativação plaquetária, liberação de fatores quimiotáticos e mitóticos que aumentam a produção de trombina.

A identificação da quantidade de osseointegração existente entre a interface do miniparafuso/tecido ósseo do hospedeiro pode ser realizada mecanicamente através da resistência apresentada para inserção e remoção dos dispositivos por torção (torque), ou histologicamente por meio de lâminas que evidenciem a mesma interface através de uma visão histo-citológica.

A medida dos torques é um indicativo da estabilidade do implante, podendo referir-se à resistência imediata dos dispositivos, adquirida por meio da conformação anatômica do implante e do atrito gerado na interface dispositivo/osso, ou do somatório das interações dos implantes com o organismo do hospedeiro, sendo a medida desta estabilidade denominada secundária. A osseointegração é alcançada quando existe a união dos tecidos ósseos neoformados tanto próximo ao leito ósseo perfurado para inserção do implante, quanto na própria superfície do dispositivo (Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J, 2003). Após uma semana de implantação, já existe a projeção de osso imaturo lateralmente ao leito preparado para implantação. Após 4 semanas, o osso imaturo começa a ser substituído por tecido lamelar por meio de remodelação óssea e o osso perfurado responsável pela estabilidade primária dos implantes é também totalmente substituído, havendo a união dos tecidos provenientes da maturação do leito ósseo e do tecido neoformado na superfície do implante. Esta união caracteriza, histologicamente, a osseointegração (Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J, 2003).

A análise da interface de contato entre o parafuso e o tecido ósseo demonstra o intercâmbio de elementos de onde são observados íons titânio no tecido ósseo do hospedeiro até uma profundidade de 0.5  $\mu$ m de distância do parafuso, assim como estão presentes quantidades substanciais de íons Ca e P na superfície do biomaterial. Esta troca em escala constante é descrito na literatura como um atestado de que a micromecânica da osseointegração é estabelecido em nível molecular (Elias CN, Meirelles L, 2010).

A interface implante/osso é de vital importância na dinâmica da osseointegração e a

evolução dos eventos que se iniciam com a perfuração do osso para instalação do dispositivo e que termina com a biointegração do material ao tecido ósseo do hospedeiro, depende de inúmeros fatores a citar: técnica cirúrgica, qualidade do osso suporte, condição de carregamento do dispositivo, e a características intrínsecas dos implantes como anatomia e material (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012).

A primeira etapa na sequência de eventos que compõem a osseointegração é exatamente a capacidade dos tecidos do hospedeiro em se reorganizar após o trauma gerado pela implantação das próteses e implantes biomédicos. Tecidualmente, a permanência do coágulo inicia a cascata de eventos subsequentes. O coágulo é substituído por um tecido de granulação, a sofrer reposição por uma matriz multifuncional composta por vasos sanguíneos, fibras colágenas e células mesenquimais indiferenciadas (Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J, 2003). Paralelamente a estes eventos construtivos, todo o grupo de tecidos danificados durante a perfuração e implantação devem ser removidos para que se inicie o reparo tecidual. No osso cortical, há um predomínio de remodelação com reabsorção dos tecidos não vitais e reposição por componentes a serem mineralizados. Na região medular, o reparo pode ser dividido em etapas que se confundem quanto à sequência com que ocorrem. Inicia-se com a deposição de tecido na superfície dos implantes, ou osteoindução (Elias CN, Meirelles L, 2010). Inicia-se com a ativação plaquetária, capazes de secretar sinalizadores pró-inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento (ver seção sobre resposta inflamatória), células indiferenciadas se especializam localmente e o coágulo é mantido inicialmente. A síntese óssea é marcada pela secreção de matriz proteica ainda livre de colágeno que funciona como sítio para mineralização de fosfato de cálcio (CaP). Ocorre o crescimento de cristais e há a deposição de fibras colágenas a serem mineralizadas posteriormente. O processo de remodelação acontece concomitantemente, tanto na região medular quanto em cortical e se mantém ativo por toda a vida do tecido ósseo, de acordo com a demanda funcional existente.

Descrevendo-se os fatores relacionados com o sucesso da osseointegração, deve-se considerar a influência de características tanto intrínsecas quanto extrínsecas. A qualidade do sítio a sofrer implantação depende de características próprias do tecido ósseo, a ser classificado em 4 variáveis de acordo com sua espessura e densidade (Mish

CE, 2008). Somente a existência de uma cortical óssea homogênea, espessa e densa caracteriza o tecido do tipo I. Os tipos subsequentes de II a IV apresentam a mesma cortical homogênea, porém em espessura variável em associação com trabeculado denso (tipo II), com um núcleo trabecular de densidade intermediária (tipo III) ou um trabeculado de baixa densidade associado a uma cortical muito delgada (tipo IV) (Mish CE, 2008). Dependendo-se da demanda funcional de cada sítio, apenas o tipo IV é totalmente contra indicado para a maioria das necessidades biomédicas em função da baixa densidade e espessura tanto de sua cortical como de seu trabeculado ósseo.

A técnica cirúrgica é considerada como uma variável no sucesso da osseointegração por haver a possibilidade de implantação de dispositivos com dano reduzido aos tecidos suporte, bem como a prevenção de fraturas de implantes e parafusos quando a técnica é realizada adequadamente. Dentre as variáveis envolvidas estão aquelas que possam resultar na necrose ou fratura do tecido ósseo em função de seu aquecimento ou da aplicação de torques excessivos (Elias CN, Meirelles L , 2010). Cuidados também são necessários para instalação de implantes com dimensões reduzidas, pois alterações no eixo de inserção durante a implantação pode resultar na fratura dos dispositivos.

Diversos protocolos clínicos são possíveis quando tenta-se estimar em qual momento os implantes e parafusos estão aptos a receber cargas. Inicialmente, o debate se estende entre o carregamento imediato ou não dos dispositivos uma vez ser sabido que a geração de micro movimentos pode influenciar na capacidade de integração óssea a ser realizada pelo organismo hospedeiro. Sabe-se também, que diferentes técnicas como o tratamento de superfície, são capazes de reduzir o tempo de espera para o carregamento por serem capazes de influenciar o processo de reparo e de osteoindução dos artefatos. Dentre os períodos de espera para carregamento existem as modalidades de carga imediata (1 semana após a instalação), carga precoce a ser aplicada de 2 a 8 semanas e o modelo convencional que indica a espera de no mínimo 8 semanas após a instalação dos implantes (Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N., and Bosshardt, D.D, 2011).

Algumas características dos implantes são passíveis de influenciarem na qualidade da integração promovida pelo hospedeiro. Diferentes variações são possíveis de serem projetadas (formato, conexão, perfil de rosca, ranhuras, passe) na anatomia dos

implantes de modo que se obtenha a maior estabilidade primária possível através do alcance da máxima interface de contato entre os dispositivos e o tecido ósseo de suporte (Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N., and Bosshardt, D.D, 2011) (Elias CN, Meirelles L , 2010). A influência do tipo de material está descrita em seções anteriores que explicitam o uso do titânio para fins biomédicos.

## 2.8 O estado da arte

Metais são materiais inorgânicos dotados de ligações metálicas não-direcionais com elétrons de alta mobilidade. Os dispositivos metálicos para fins biomédicos são empregados com duas finalidades principais: a confecção de próteses ortopédicas de (joelho, quadril, ombro e coluna) ou dispositivos para fixação pós fratura, e a substituição funcional de elementos ou de sua arquitetura com parafusos, *stents* e implantes (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009).

Algumas ligas são utilizadas para confecção de implantes e parafusos em função de sua boa resistência mecânica, permitindo a transmissão de cargas por longos períodos e um módulo de elasticidade que se aproxima do tecido ósseo. A resistência à corrosão em ambiente biológico é um dos pré-requisitos do material a fim de que sua degradação com liberação de íons metálicos ocorra em um patamar que não seja tóxico ao hospedeiro. (Elias CN, Meirelles L , 2010) (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009).

O titânio é uma das ligas mais utilizadas para fins biomédicos. O Ti cp é um dos materiais mais comercializados, seguido por sua liga Ti-6Al-4V, contendo alumínio e vanádio. A principal limitação destas ligas é seu módulo de elasticidade muito superior (Ti cp: 105-110 GPa e Ti-6Al-4V:100-110) ao apresentado pelo tecido ósseo (10-30GPa), sendo todavia, o Ti cp ainda muito empregado por sua excelente resistência à corrosão. (Long M, Rack HJ, 1998) Uma grande preocupação no campo biomédico é a toxicidade que possa advir dos produtos da degradação do Ti-6Al-4V. (Long M, Rack HJ, 1998) (Black J, 1998) Os efeitos cumulativos no organismo, principalmente do V, impulsionaram as pesquisas por ligas que apresentassem o limite de escoamento do Ti-6Al-4V (800-



1000MPa) que é superior ao Ti cp (200-500Mpa) porém, sem a liberação de íons tóxicos, (Niinomi M, 2003) e com o módulo de elasticidade inferior ao das atuais ligas de titânio. (Long M, Rack HJ, 1998) (Niinomi M, 2007) Estes novos materiais incluem Ti6Al7Nb (Semlitsch MF, Weber H, Streicher RM, Schon R, 1992) e Ti5Al2.5Fe sendo que, os melhores resultados foram observados na última geração de ligas ortopédicas contendo zircônio, tântalo, nióbio e molibdênio. Esta geração é composta inclui Ti12Mo6Zr2Fe, Ti15Mo5Zr3Al, Ti15Sn4Nb2Ta0.2Pd e a Ti13Nb13Zr (Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J, 2013) (von der Kalasus K, Park J, 2013) (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009). Alguns fabricantes encontram-se empenhados em desenvolverem novas ligas a partir da fase  $\beta$  do material dentro do sistema TiNbTaZr, devido a seu reduzido módulo de elasticidade (em torno de 70 GPa) e boa biocompatibilidade. (Niinomi M, 2003) (Adamek G, Jakubowicz J, 2010) O que foi descrito, até o presente momento, como resultado desta tentativa é a liga Ti29Nb13Ta4.6Zr (Long M, Rack HJ, 1998) (Niinomi M, 2003) (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009).

Uma das maiores preocupações da falha de implantes é o seu comportamento em fadiga. A comparação da vida em fadiga de diversos materiais metálicos é alvo de pesquisa. (Niinomi M, 2007) Para nosso interesse, cabe a descrição da vida em fadiga da liga Ti64 que apresenta valores baixos quando comparado a ligas de Co-Cr, mas pertinentes com outras ligas utilizadas para mesma aplicação como o aço inoxidável AISI 316L (ASTM F138). (Niinomi M, 2007) Ambas as ligas possuem, todavia, resistência à fadiga muito superior ao osso bovino.

Sobre os diferentes métodos de tratamento superfície descritos na literatura, algumas vantagens foram creditadas ao tratamento com ácido como: facilidade de execução por não necessitar de indução por corrente elétrica, o que previne possíveis alterações nos variantes polimórficos do óxido de titânio, como ocorre na anodização (Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T, 2004) (Rocci A, Martignoni M, Gottlow J, 2003); não há incorporação de resíduos tóxicos como ocorre após o jateamento; e as alterações na camada passiva induzida por tratamento com ácido são mais estáveis que as coberturas depositadas por spray de plasma. (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009) (Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J, 2013) Apesar de coberturas de alumina e zircônia serem mais resistentes ao desgaste que coberturas de titânia, a ligação destas

a tecidos duros não ocorre diretamente, o que pode dificultar a eficiência da osseointegração. (Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J, 2013)

As imersões ácidas mais utilizadas envolvem a mistura de HF por sua capacidade de dissolução da camada passivadora, expondo a superfície para o subsequente condicionamento com outros ácidos, que agirão diretamente sobre o material como o HNO<sub>3</sub>, HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (Cho SA, Park KT, 2003) (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004) (Ellingsen JE, 1995) Ajustes referentes à temperatura e o tempo de tratamento dependem da demanda, por macro ou micro rugosidade, ou ainda pela espessura da camada passivadora. É demonstrado, que imersões à 100°C, por alguns minutos, já são suficientes para produzir alterações na microrugosidade do material (Cho SA, Park KT, 2003). Cabe porém ressaltar que, a rugosidade mais propícia ao crescimento de estruturas osteogênicas encontra-se em dimensões macros entre 100-500 um (Schenk RK, Buser D, 1998) (Cook SD, Thomas KA, Dalton JE, Volkman TK, Whitecloud 3rd TS, Kay JF, 1992) e que dimensões inferiores a este intervalo, normalmente obtidos por spray de plasma, viabilizam apenas a aderência (*interlocking*) de tecidos suporte ao invés da possibilidade de deposição de material ósseo neoformado (Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J, 2013).

## 2.9 Justificativa do trabalho

O desenvolvimento de uma superfície com propriedades otimizadas pode melhorar o comportamento do titânio para uso biomédico, sua compatibilidade e funcionalidade. Apesar da liga Ti-6Al-4V ser rotineiramente empregada para confecção de implantes devido a sua excelente resistência mecânica, superior a do titânio comercialmente puro, sua biocompatibilidade é limitada pela liberação íons metálicos tóxicos como o alumínio e o vanádio que, mesmo em concentrações reduzidas, apresentam índice cumulativo e alta toxicidade neurológica quando absorvidos pelo hospedeiro.

Os elementos de liga adicionados no Ti-6Al-4V são detectados na camada de óxido nativa, influenciando a capacidade de absorção protéica da mesma (Chen Y, Webster TJ,

2009). O tratamento de superfície proposto pode limitar a liberação destes íons. Além disto, o tratamento da superfície pode aumentar a estabilidade primária quantificada imediatamente após sua instalação e a estabilidade secundária quantificada algumas semanas após a cirurgia. Em consequência, o sinergismo da camada nativa de óxidos e a topografia do material podem permitir que ligas de titânio contendo elementos potencialmente tóxicos possam ser empregados por intervalos de tempo mais prolongados sem que seu hospedeiro sofra com a liberação sistêmica destes elementos químicos. Esta situação é a condição em estudo nesta proposta, onde preconiza-se o uso de ligas de Ti que possui maior resistência mecânica que o Ti cp, mas submetida a um tratamento que limite a liberação dos íons tóxicos que aumentam sua resistência mecânica.

Devido ao tratamento de superfície do implante, serão criadas microrugosidades que podem influenciar no comportamento mecânico do implante. Além da alteração desta propriedade, poderão ocorrer alterações na molhabilidade, rugosidade superficial e coeficiente de atrito, modificando a estabilidade dos implantes, grandeza determinada pelos torques de inserção e remoção dos mini-parafusos.

Desta forma, o tratamento de superfície proposto, pode alterar a biofuncionalidade do implante dependendo da estabilidade primária a ser alcançada. O objetivo do tratamento é aumentar a resistência à corrosão da liga quando utilizada como implante biomédico, o que possivelmente permitirá, mesmo que ainda sob uma aplicação temporária, um maior tempo de permanência em fluidos corporais sem sofrer degradação significativa.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar o desempenho de mini-parafusos de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície, para o uso como implante biomédico temporário. O desempenho dos mini-parafusos, com superfície tratada, foi comparado com implantes sem tratamento da superfície. Foram realizados ensaios e análises *in vivo* para determinar:

1. a estabilidade primária e secundária (torques de inserção e remoção);
2. caracterização da morfologia e topografia superficial antes e após a remoção de cobaias (coelhos);
3. quantificação da perda de massa por corrosão;
4. correlação entre o tempo de permanência e a quantidade de íons metálicos presentes no sangue e urina dos coelhos;
5. avaliação histológica e biomecânica quanto à compatibilidade óssea;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Os mini-implantes temporários

Quarenta e oito mini-parafusos (mini implantes temporários) autoperfurantes de Ti-6Al-4V (ASTM grau 5) com 6 mm de comprimento, 1,5 mm de diâmetro, 1,0 mm de perfil transmucoso (região de acomodação do tecido periimplantar) e cabeça sextavada, foram divididos em 6 grupos (n=8) conforme descrito na tabela 4.1. Os grupos diferem pelo tempo em que permaneceram implantados (1,4 e 8 semanas) e pela realização de tratamento de superfície. O grupo controle (grupo 7) foi usado como referência para determinação dos níveis de titânio, alumínio e vanádio no sangue e urina das cobaias, funcionando como parâmetro para comparação com os animais dos grupos experimentais após 8 semanas.

### 4.2 O tratamento de superfície

Para medida de algumas propriedades, foram usados discos com o mesmo tratamento de superfície dos mini-implantes. O tratamento da superfície consistiu na imersão em solução ácida, composta pela mistura de ácido nítrico e sulfúrico. Durante a imersão, a solução foi mantida agitada para garantir que o oxigênio liberado na reação com o titânio não formasse uma película protetora. A metodologia descritiva completa deste procedimento encontra-se sob análise para possível depósito do pedido de patente.

#### 4.3 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras dos mini implantes e de cilindros da liga Ti-6Al-4V, com e sem tratamento de superfície, foram analisados no microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 ESEM, com voltagem de 10kV e distância de trabalho de 20 mm (WD 20). Analisou-se a topografia e morfologia da superfície antes e após o tratamento com ácidos.

#### 4.4 Microscopia de força atômica

Discos cilíndricos com 5.35 mm de diâmetro e 5 mm de espessura da liga Ti-6Al-4V com e sem tratamento de superfície foram analisados no microscópio de força atômica (Veeco Scanning Probe Microscopy; Plainview, NY, USA) em modo de varredura superficial sem contato. As áreas de varredura foram de 5 a 10  $\mu\text{m}^2$  com escala de aquisição de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ , frequência de aquisição de 1.04 Hz e de ressonância de 250-320 kHz. Esta técnica foi utilizada com objetivo de analisar possíveis porosidades e a morfologia da camada de óxido de titânio após a realização de tratamento com ácidos.

#### 4.5 Microscopia de fluorescência por raios X

A análise teve como objetivo identificar a presença de íons metálicos na camada de óxido de titânio antes e após o tratamento de superfície, uma vez que o espessamento da camada de óxidos pode prevenir a liberação de íons tóxicos. Contaminantes também poderiam ser identificados.

A composição química das superfícies antes e após o tratamento foi analisada por microscopia de fluorescência de raios X (X-Ray Analytical Microscope Horiba XGT 5000).

O processamento ocorreu durante 60 segundos com feixe de diâmetro de 100µm. Foram utilizadas a voltagem (50Kv) e amperagem (0.07 a 0.1 mA) mínimas disponíveis para que na análise ocorresse penetração reduzida do feixe.

#### 4.6 Molhabilidade

A molhabilidade foi determinada através do ângulo de contato do líquido com a superfície dos discos. Foi utilizada uma gota de 8 µL de água deionizada. Utilizou-se o goniômetro FTA 125 (First Ten Angstroms, Portsmouth, VG, EUA) para análise das amostras. Em cada disco, foram determinados 5 ângulos de contato.

#### 4.7 Corrosão (perda de massa)

Cilindros com 8 mm de diâmetro e 5 mm de altura da liga Ti-6Al-4V com e sem tratamento de superfície foram imersos em 10 mL de solução de HCl 1 M e armazenados em temperatura ambiente por 30 dias. A área total dos cilindros foi de 226.19 mm<sup>2</sup>. As amostras foram pesadas em balança de precisão, antes e após a imersão, e os resultados comparados e convertidos em porcentagens de massa perdida.

#### 4.8 Preparação das amostras para análise no microscópio eletrônico de transmissão

Barras cilíndricas foram cortadas em máquina de corte de precisão (Struers Accutom-5, Dinamarca) com lâminas diamantadas sob refrigeração para prevenir o aquecimento do material. Nos cortes foram obtidos discos com 0.5 mm de espessura. Após os cortes, os discos foram desgastados em lixas com granulação crescente até a espessura de 0.1

mm. Os discos foram polidos eletroliticamente (Struers TenuPol-5, Dinamarca) em solução contendo ácido perclórico, butanol e etanol sob corrente de 1A até a obtenção de um orifício que permitiu a avaliação do material no microscópio eletrônico de transmissão.

#### 4.9 Animais e o procedimento de instalação

Quatorze coelhas brancas da raça Nova Zelândia, com 6 meses de idade e pesando aproximadamente 3 kgf foram selecionadas como modelo animal devido a sua grande semelhança com a fisiologia humana. Os coelhos foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais do Instituto Vital Brazil e foram divididos entre os 6 grupos experimentais (n=2). A parte dos ensaios com animais foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE, FCM-UERJ). Os animais foram alimentados com ração livre de contaminação por metais e água filtrada em filtro de carvão granular. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG-UERJ) sob o processo CEUA/047/2012. Mostra-se na Figura 4.1, algumas cobaias nas gaiolas.





FIG.4.1- Animais no Biotério durante período de adaptação. Placas de polietileno garantiram o isolamento dos animais para evitar a contaminação externa por íons metálicos, principalmente alumínio.

Mostra-se na tabela 4.1, a distribuição dos animais, o número de implantes e os tempos de inserção nas cobaias.

TAB.4.1 - Grupos de mini-implantes, materiais, número e total de coelhos e mini-implantes a serem utilizados no estudo. Mostra-se os tempos de permanência dos mini-implantes (em semanas) nos coelhos e a realização ou não de tratamento de superfície. Nos coelhos pertencentes ao controle (grupos 7) não foram instalados mini-implantes.

<b>Grupo</b>	<b>Material</b>	<b>Coelhos</b>	<b>Implantes</b>	<b>Tempo (semanas)</b>	<b>Tratamento superfície</b>
<b>1</b>	Ti-6Al-4V#	2	8	1	Sim
<b>2</b>	Ti-6Al-4V	2	8	1	Não
<b>3</b>	Ti-6Al-4V#	2	8	4	Sim
<b>4</b>	Ti-6Al-4V	2	8	4	Não
<b>5</b>	Ti-6Al-4V#	2	8	8	Sim
<b>6</b>	Ti-6Al-4V	2	8	8	Não
<b>7</b>	sem implante	2	0	8	Controle
<b>Total</b>		14	48		

Os animais foram mantidos sob anestesia durante todos os procedimentos de instalação dos mini-implantes, os quais foram inseridos na tíbia esquerda dos grupos de um a seis (tabela 4.1). Os pêlos da superfície anterior da tíbia esquerda foram tricotomizados, e o restante foi removido da região cirúrgica com auxílio de uma lâmina.

Mostra-se, na figura 4.2, as etapas realizadas para anestesia e preparo pré-cirúrgico das cobaias.



FIG.4.2 - Procedimento de anestesia geral (esquerda) e tricotomia da tibia esquerda para acesso e instalação dos miniimplantes (direita).

Os animais permaneceram em jejum prévio por 8 horas. Antes da cirurgia, foi administrado cloridrato de cetamina 10% (0.2 a 0.3 mg/kg) e xilasina (3mg/kg) por aplicação intramuscular. O período de latência no procedimento anestésico foi de 5 a 10 minutos. A analgesia perdurou de 30 a 45 minutos.

Realizou-se incisão de 5 cm sob assepsia local, no tecido mole da porção anterior da tibia esquerda, com extensão do joelho à pata dos animais. O tecido muscular foi dissecado com cuidado tomado se evitar a laceração do periosteio. Uma seção da tibia, de aproximadamente 2,5 cm de comprimento, foi selecionada sob a qual foram feitas as instalações dos quatro mini-implantes. Os dispositivos foram instalados por um mesmo

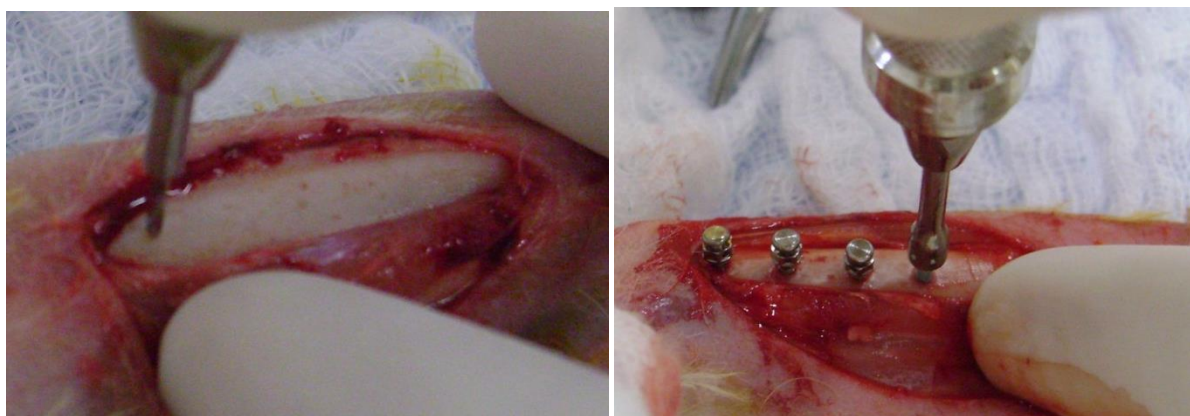


FIG.4.3- Rebatimento dos tecidos e exposição de periosteio para instalação dos mini-implantes (esquerda) e instalação dos 4 mini-implantes em cada segmento da tibia esquerda dos animais (direita).

operador, perpendicularmente à superfície óssea, com auxílio de uma chave manual de instalação. A perfuração da cortical externa foi feita por meio de uma fresa lança de 1.0 mm de diâmetro, a fim de se evitar a deformação dos parafusos durante seu auto rosqueamento (Figura 4.3). O rosqueamento foi conduzido com mínimo possível de carga axial, sendo finalizado no momento em que apenas a porção sextavada do implante ficava aparente. O periósteo, o tecido muscular e a pele foram suturados. O mesmo procedimento de instalação foi empregado após a eutanásia, para a medição do torque de inserção dos mini-implantes com auxílio de um torquímetro manual (Lutron, modelo TQ 8800, Taiwan).

#### 4.10 Obtenção das amostras

Após os tempos determinados, os coelhos foram anestesiados e submetidos à eutanásia por sangria através de injeção intracardíaca. Para cada coelho, 40 ml de sangue venoso foram coletados (Figura 4.4) em tubos sem traços metálicos BD Vacutainer (BD Brasil, São Paulo, SP). Após a coleta, os sangues foram centrifugados para separação do plasma sanguíneo, o qual foi transferido para novos tubos de mesmas especificações. Todo o material foi mantido refrigerado e enviado para análise laboratorial em até 48 horas após sua coleta.



FIG.4.4 - Coleta de sangue por punção cardíaca.

#### 4.11 Análise dos mini-implantes implantados

As amostras de cada grupo ( $n=8$ ) foram subdivididas, sendo 5 destinadas ao ensaio de torque, 2 para as análises histológicas e 1 para análise em microscopia eletrônica de varredura. A seleção dos subgrupos foi realizada por meio de sorteio para garantir a aleatoriedade dos dados aferidos. A Figura 4.5 mostra os mini-implantes após a realização da eutanásia das cobaias.



FIG.4.5 - Acesso para remoção dos mini-implantes após os períodos de 1, 4 e 8 semanas.

#### 4.12 Torque de remoção

A estabilidade dos mini-implantes foi avaliada por meio do ensaio de torque de remoção em 30 amostras. Os torques máximos determinados na remoção (picos) foram medidos com uso do torquímetro digital (Lutron, modelo TQ 8800, Taiwan), imediatamente após a eutanásia. A tensão cisalhante aplicada na remoção variou com a ruptura da interface mini-implante/osso.

#### 4.13 Microscopia eletrônica de varredura (amostras *in-vivo*)

Após a remoção das tíbias, dois mini-implantes de cada grupo foram submetidos à limpeza com ultra-som por 1 hora. Para limpeza, os mini-implantes foram imersos em solução diluída 10:1 de hipoclorito de sódio, detergente líquido 10:1 e acetona. Dois mini-implantes semelhantes aos implantados foram utilizados como controle, sendo

submetidos às mesmas etapas de limpeza. Os mini-implantes foram analisados no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 FEG (Hillsboro, OR, USA).

Após a fixação dos tecidos em glutaraldeído 3.0% por 3 horas, as amostras foram imersas em PBS, por 10 minutos, repetindo o procedimento pelo mesmo intervalo de tempo em nova solução. A desidratação foi feita por imersão total por 15 minutos em soluções com porcentagem crescente de álcool (30, 50, 75, 80 e 95%). A última etapa foi a imersão em álcool anidro (PA) por 30 minutos. As amostras foram preparadas até o ponto de substituição do etanol por CO<sub>2</sub> em câmara fechada por 45 minutos.

As peças foram clivadas no sentido do longo eixo. Tentou-se a manutenção de pelo menos 1mm de tecido circundante à superfície dos mini-implantes. Os fragmentos ósseos foram metalizados com ouro (Bal Tec, SCD 050, Alemanha), obtendo a cobertura de uma camada com cerca de 30 nm. Em seguida, a análise da morfologia superficial na região da interface osso/mini-implante foi feita por microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.14 Histologia e Histomorfometria

Foram cortadas peças do osso da tíbia contendo mini-implantes. Após o corte, as peças foram embutidas em cilindros contendo historesina. Em seguida, fizeram-se os cortes das lâminas, às quais foram processadas no Histon Laboratory (Everett, WA, USA). As lâminas foram destinadas à análise histomorfométrica. Após os cortes, as lâminas contendo osso e mini-implante foram coradas com azul de Stevenel e submetidas à secagem por 5 minutos. As análises histomorfométrica e histológica foram realizadas por microscopia óptica de transmissão (Zeiss AXO, Oberkochen, Alemanha). O erro do método foi minimizado pela remedição dos parâmetros pelo mesmo operador.

#### 4.15 Microscopia óptica de transmissão

Duas secções ósseas de cada grupo foram preparadas para as análises histológicas, totalizando 12 amostras. Os blocos ósseos foram submetidos às mesmas etapas de desidratação procedidas para as amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura, até a imersão em álcool absoluto. Em seguida, foram submetidos à pré-infiltração por imersão total em solução composta por resina e álcool absoluto na razão 1:1. As amostras foram incluídas em cilindros de historesina e foram cortados em micrótomo.

#### 4.16 Espectrofotometria de absorção atômica

Os teores de íons alumínio e vanádio das amostras de sangue foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica no Laboratório VetLab Análises Clínicas Veterinárias Ltda (Petrópolis, RJ). Os parâmetros do espectrofotômetro de absorção (corrente da lâmpada, abertura, condições de atomização, comprimento de onda, correção de radiação de fundo) bem como possíveis correções foram ajustadas para cada elemento. Os ajustes são necessários para a otimização da curva de absorbância de cada amostra.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Mostra-se nas Figuras 5.1 a 5.3, a superfície dos discos de Ti-6Al-4V após a realização do tratamento de superfície, podendo ser observados os poros criados pelo tratamento desenvolvido.

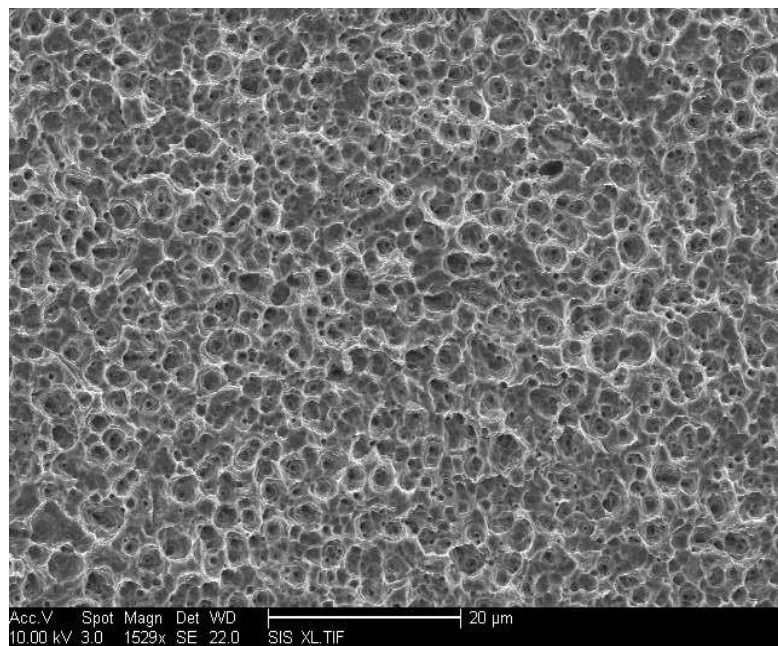


FIG. 5.1 – Morfologia da superfície do cilindro de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície.

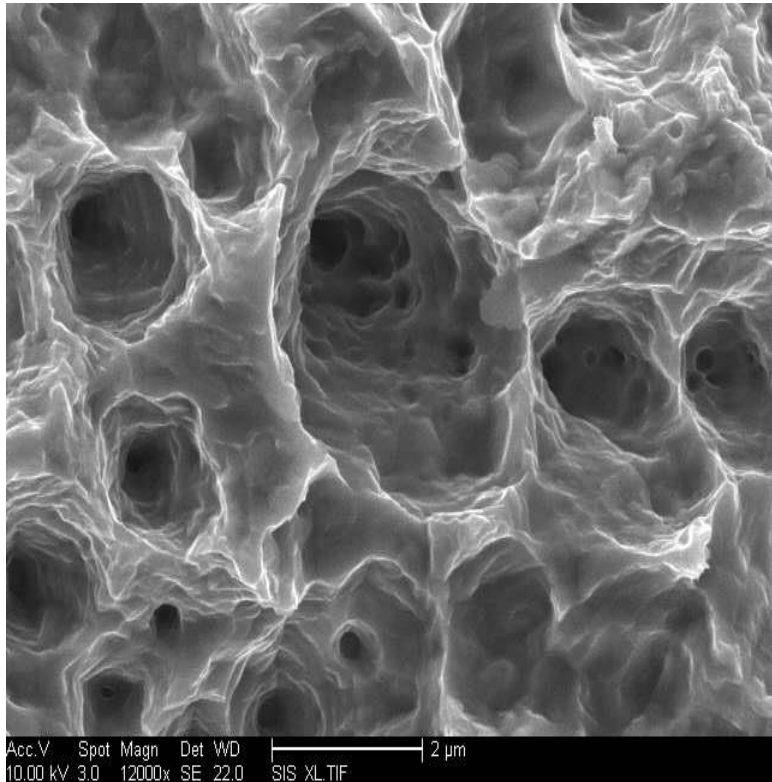


FIG.5.2 - Morfologia da superfície do cilindro de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície. Observar os poros com intercomunicações e rugosidade em escala micrométrica. Trata-se da mesma região da Figura 5.2, em maior aumento.

Observou-se também a região de interseção das superfícies tratada e não tratada, para fins de análise do tratamento da superfície de Ti-6Al-4V (Figura 5.3).

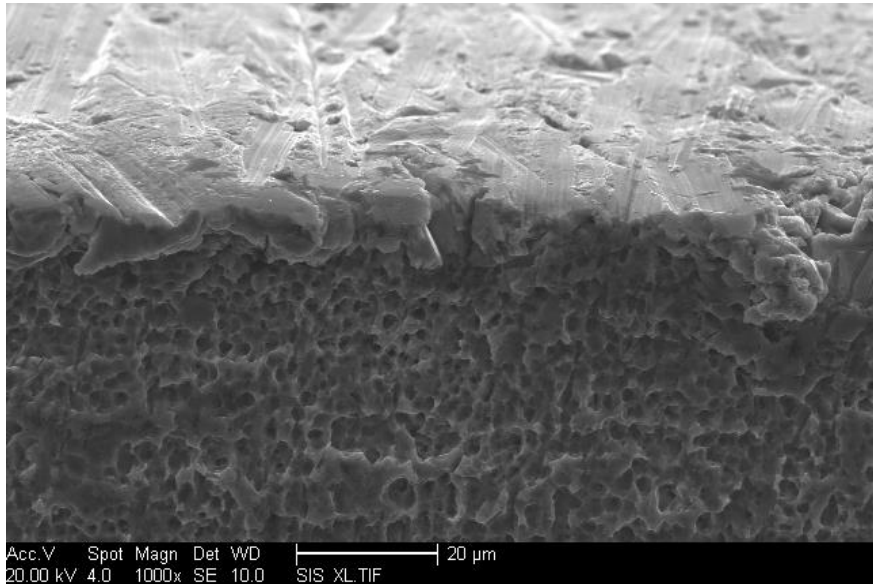


FIG.5.3 - Morfologia da interface de um cilindro de Ti-6Al-4V. Pode-se observar a interseção entre as superfícies com (região inferior) e sem tratamento (região superior) da

Examinou-se, em seguida, a morfologia da superfície dos mini-implantes de Ti-6Al-4V após o tratamento de superfície, comparando-se a superfície com mini-parafusos análogos sem condicionamento (figura 5.4).

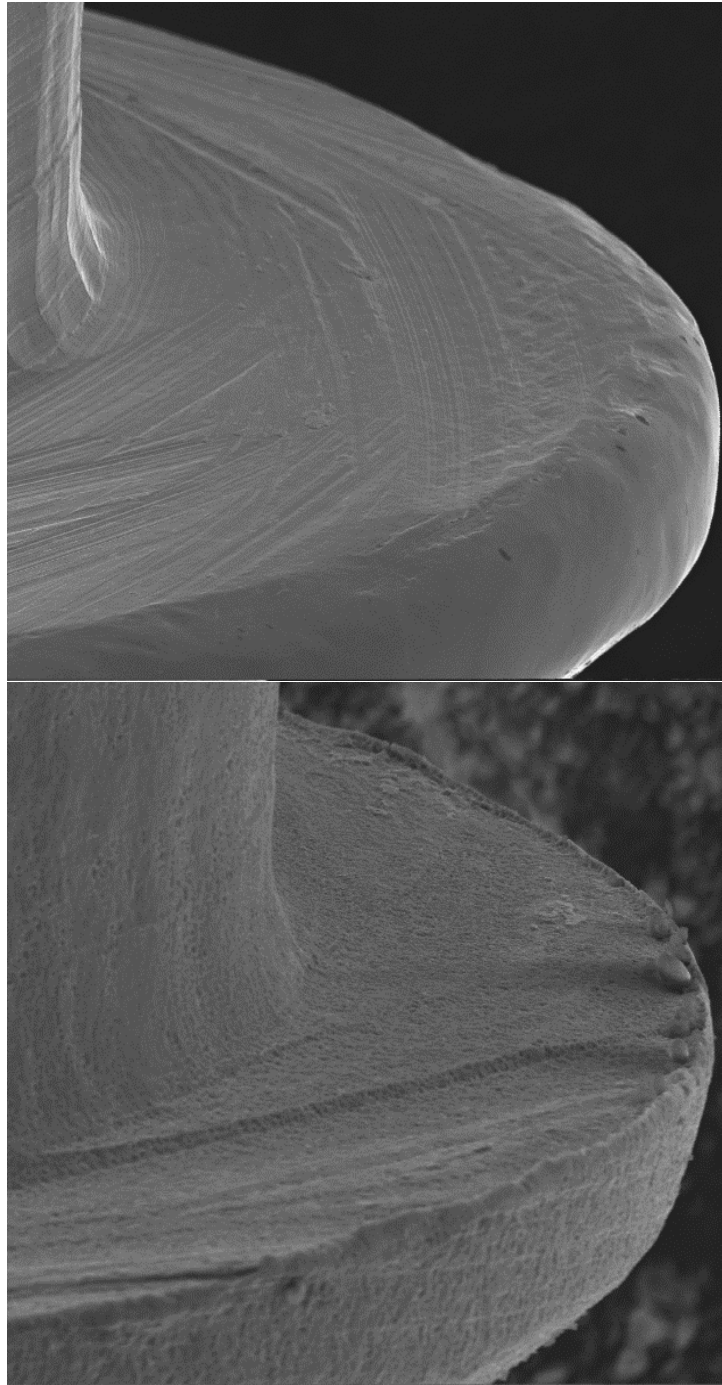


FIG.5.4 – Mini-implantes de Ti-6Al-4V com marcas de usinagem (superior) e após receberem o condicionamento ácido experimental (inferior).

## 5.2 Microscopia de força atômica

Foram determinados os parâmetros de rugosidade Ra, Rq, Rmax e a diferença entre as projeções da superfície tratada e não tratada (Tabela 5.1). Nesta análise, foi possível determinar a porcentagem de aumento da rugosidade em função das alterações na morfologia da superfície do material, devido ao tratamento com ácidos (Figura 5.5).

TAB. 5.1 – Parâmetros da rugosidade das superfícies dos discos de Ti-6Al-4V com e sem tratamento de superfície. Medidas com o microscópio de força atômica incluem a média entre a altura de picos (Ra), componente média quadrática (Rq), componente máximo (Rmax) e a porcentagem de aumento na área de superfície em função do aumento da rugosidade superficial (Dif Sup). O símbolo (#) indica o grupo tratado.

	Ti-6Al-4V			Ti-6Al-4V#		
	25%	Mediana	75%	25%	Mediana	75%
<b>Ra (nm)</b>	52.6	60.6*	62.9	298.8	341*	399
<b>Rq (nm)</b>	61.3	78.2**	78.3	372.8	421**	489.8
<b>Rmax (nm)</b>	311	766***	953	2024	2216***	2604
<b>Dif Sup</b>	4.27%	4.62%****	5.15%	46.1%	67.1%****	125.8%

Mann-Whitney test: (\*) (\*\*)  $p < 0.0001$ ; (\*\*\*)  $p = 0.0023$ ; (\*\*\*\*)  $p = 0.0272$

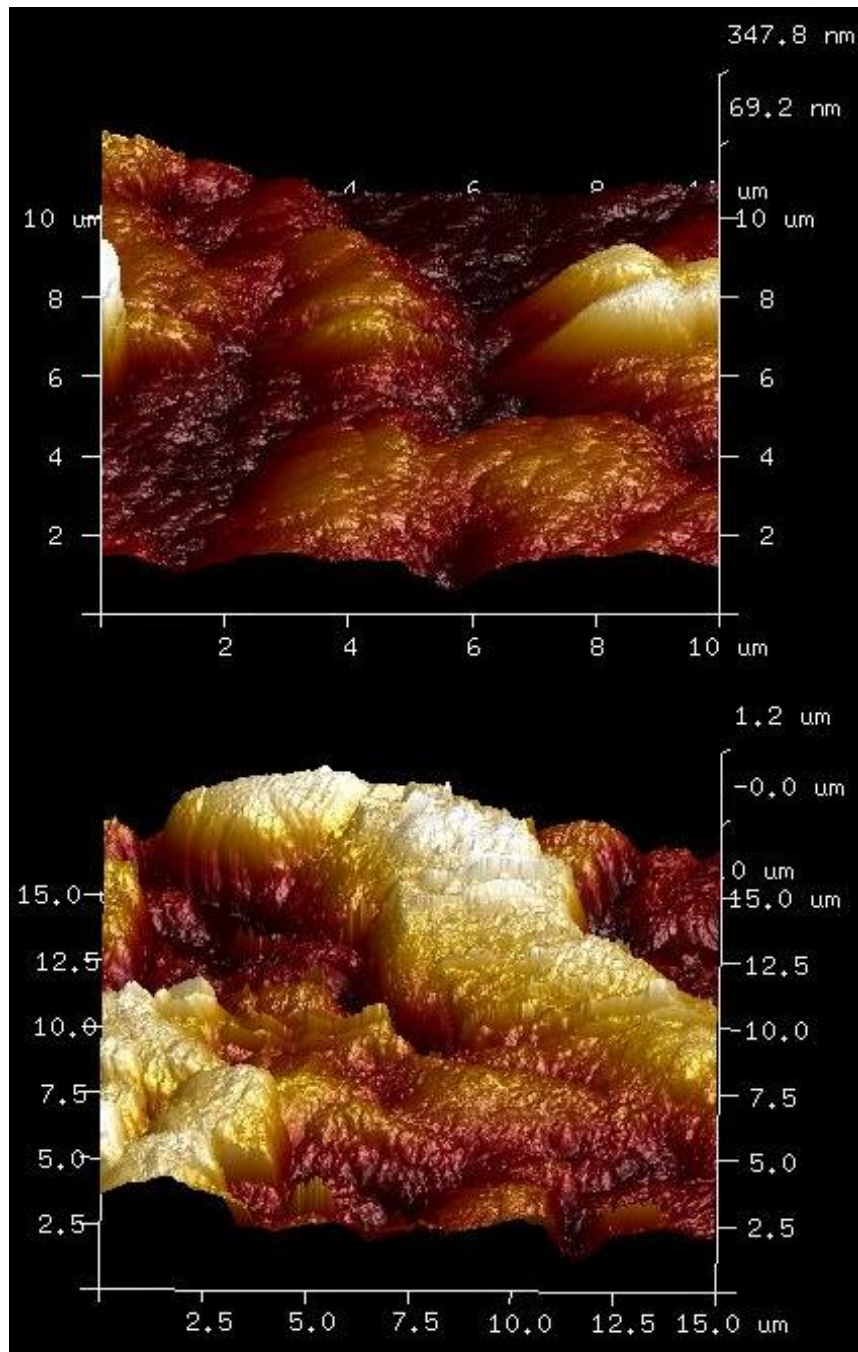


FIG 5.4 – Projeção tridimensional da superfície de discos de Ti-6Al-4V por microscopia de força atômica. Acima, é mostrada a superfície sem tratamento com extensão de varredura de 10 µm e profundidade aproximada de 350 nm. Abaixo, a superfície após o tratamento com ácido. Análise com extensão de varredura de 15 µm e profundidade de leitura de 1,2 µm.

### 5.3 Microscopia de fluorescência por raios X

Os espectros (Figura 5.6), a identificação e composição dos elementos presentes na superfície dos mini-implantes estão descritos a seguir.

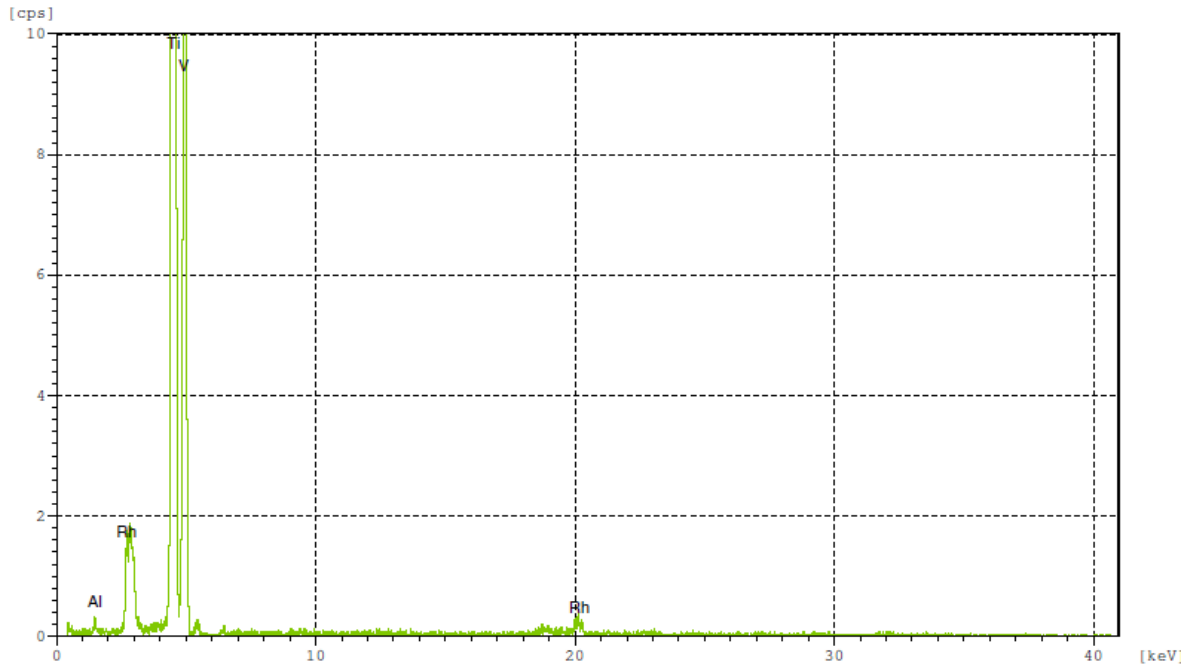


FIG.5.6- Espectro com os picos dos elementos Ti, Al e V na liga Ti-6Al-4V antes do tratamento de superfície. O elemento Rh refere-se ao alvo utilizado.

Mostra-se, na Tabela 5.2, as composições (% massa) dos elementos químicos detectados nas amostras.

TAB.5.2 – Composição (% em massa) dos elementos presentes na liga Ti-6Al-4V antes e após a realização do tratamento de superfície. Análise por microscopia de fluorescência por raios X.

<b>Composição (% em massa)</b>		
	<b>Sem tratamento</b>	<b>Após tratamento</b>
<b>Ti</b>	91.1	99.83
<b>Al</b>	5.86	0.13
<b>V</b>	3.04	0.04

#### 5.4 Molhabilidade

O ângulo de contato das superfícies foi determinado nos discos (n=5) de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície. Os resultados foram comparados com discos idênticos sem tratamento (Figura 5.7). O valor dos ângulos de contato medidos, são mostrados na tabela 5.3.

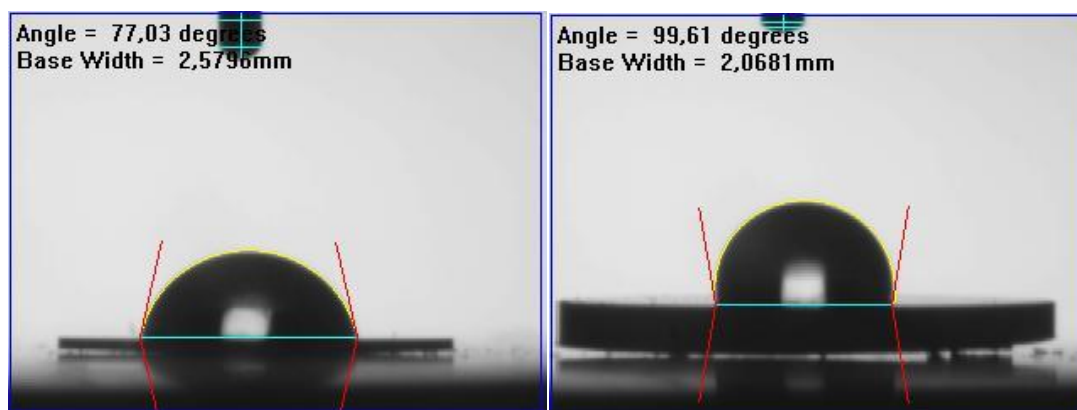


FIG.5.7 – Ângulo de contato ( $^{\circ}$ ) e medida linear da base da gota (mm) de água deionizada nos discos de Ti-6Al-4V sem tratamento (esquerda) e com tratamento (direita).



TAB.5.3 – Molhabilidade dos discos de Ti-6Al-4V com e sem (#) tratamento de superfície. As medidas do ângulo de contato, comprimento da base da gota (mm) e área da base da gota (mm<sup>2</sup>) são apresentados. Três comparações (\*), (\*\*) e (\*\*\*) pelo teste t foram realizadas entre os pares (Ti5 e Ti5#) para os diferentes componentes da molhabilidade analisados.

	Ti5		Ti5#	
	Média	DP	Média	DP
<b>Contato (°)</b>	76.23*	4.566	99.01*	1.16
<b>Base (mm)</b>	2.625**	0.157	2.063**	0.034
<b>Base (mm<sup>2</sup>)</b>	5.428***	0.643	3.342***	0.113

(\*), (\*\*), (\*\*\*) : (teste t: p<0.0001)

#### 5.5 Corrosão (perda de massa)

Cilindros com área de superfície total de 226.18 mm<sup>2</sup> de Ti-6Al-4V com e sem tratamento de superfície, foram pesados (n=5) em balança de precisão antes e após a imersão em 10 mL solução de HCl 1M por 30 dias. As medidas da massa do material bem como a porcentagem de perda de massa são apresentados na Tabela 5.4.

TAB.5.4 – Perda de massa dos cilindros de Ti-6Al-4V com e sem (#) tratamento de superfície. As medidas foram realizadas antes e após 30 dias de imersão em solução de HCl 1M. Duas comparações (\*) e (\*\*) pelo teste t pareado foram realizadas para os diferentes intervalos de tempo.

	Dia 0		Dia 30		% variação
	Média	DP	Média	DP	
<b>Ti-6Al-4V</b>	17.7614*	0.0007	17.7604*	0.0008	0.005%
<b>Ti-6Al-4V#</b>	17.6958**	0.0005	17.6952**	0.0006	0.003%

Teste t pareado: (\*) p=0.0001; (\*\*):p<0.0001

## 5.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A medida da espessura da camada de óxido de titânio foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão das amostras (n=9) de Ti-6Al-4V. Utilizou-se o software Image J v1.47 (National Instruments of Health, Tx, EUA) para realização das medidas com uso da escala fornecida pelo microscópio. Para reduzir o erro do método, foram realizadas emedições pelo mesmo operador. Os valores da média e desvio padrão estão assinalados na Figura 5.8.

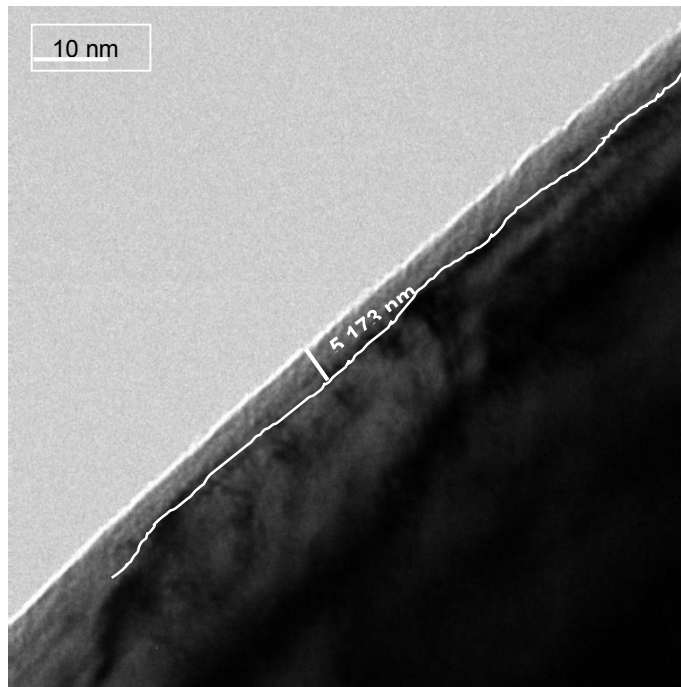


FIG 5.8 – Camada de óxido de titânio (identificada em branco) na amostra de Ti-6Al-4V, sem tratamento. Microscopia eletrônica de transmissão. A média e desvio padrão estão representados na figura.

## 5.7 Torques de inserção e remoção

As medidas dos torques de inserção e remoção dos mini-implantes são apresentadas na Tabela 5.5. A estatística não paramétrica é apresentada nas Figuras 5.9 a 5.13. Os valores foram organizados a fim de facilitar a comparação e observação da influência das variáveis tempo de permanência nos animais e tratamento de superfície nos intervalos de 1,4 e 8 semanas (Tabela 5.5). Como os grupos foram compostos por dois animais, os valores dos torques de inserção (Ins 1 e Ins 2) e remoção (Rem 1 e Rem 2) referem-se a mini-implantes instalados em diferentes coelhos (Figuras 5.9 a 5.13).

TAB. 5.5 - Torque de inserção e remoção (medianas) de mini-implantes com (Ti-6Al-4V#) e sem (Ti-6Al-4V) tratamento de superfície após 1,4 e 8 semanas

<b>Tempos (semanas)</b>	<b>Sem Tratamento</b>		<b>Com Tratamento</b>	
	Inserção (Ncm)	Remoção (Ncm)	Inserção (Ncm)	Remoção (Ncm)
<b>1</b>	10	8.9*	12.5	14.1*
<b>4</b>	10.15	9*	13.25	13.3*
<b>8</b>	10.65	8.2*	11.05	9.8*

Kruskal-wallis:  $p < 0.05$ ;

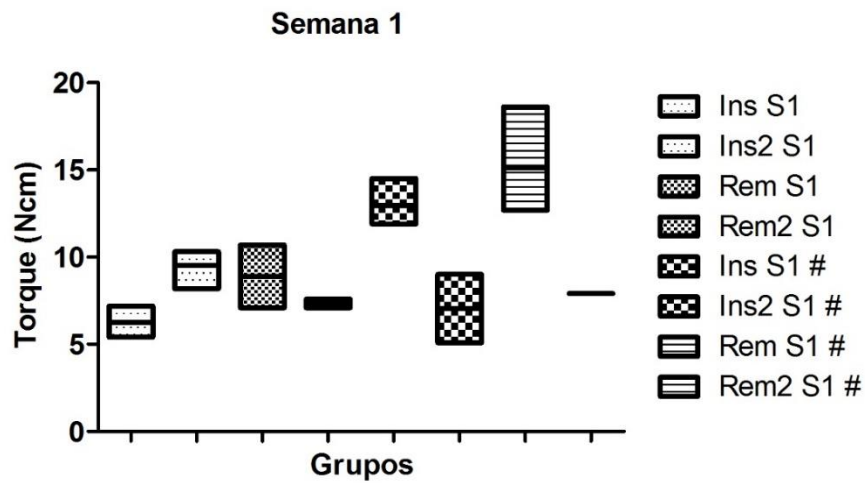


FIG.5.9 – Medianas e quartis dos torques (Ncm) de inserção (Ins) e remoção (Rem) após 1 semana (S1), dos mini-implantes de Ti-6Al-4V com (#) e sem tratamento de superfície, instalados em diferentes coelhos (variantes 1 e 2).

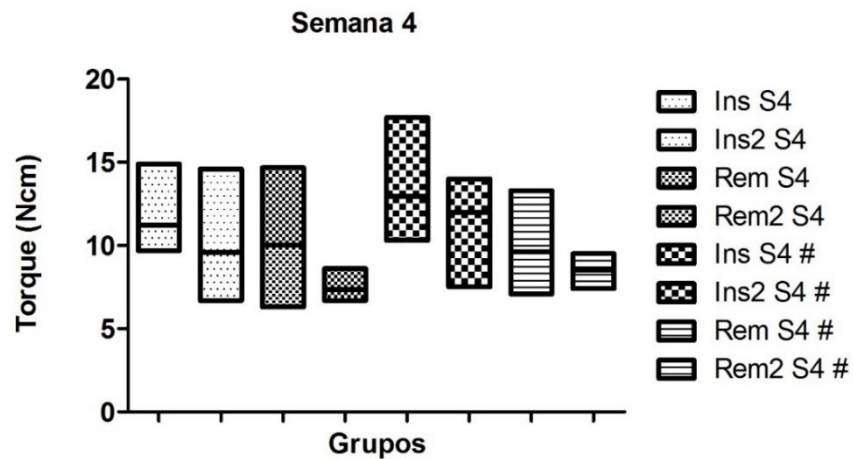


FIG.5.10 - Medianas e quartis dos torques (Ncm) de inserção (Ins) e remoção (Rem) após 4 semanas (S4), de mini-implantes de Ti-6Al-4V com (#) e sem tratamento de superfície, instalados em diferentes coelhos (variantes 1 e 2).

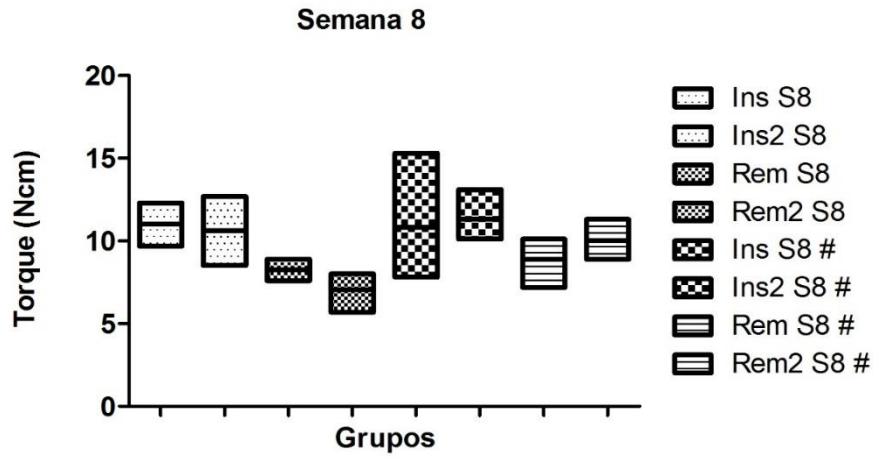


FIG.5.11 - Medianas e quartis dos torques (Ncm) de inserção (Ins) e remoção (Rem) após 8 semanas (S8), de mini-implantes de Ti-6Al-4V com (#) e sem tratamento de superfície, instalados em diferentes coelhos (variantes 1 e 2).

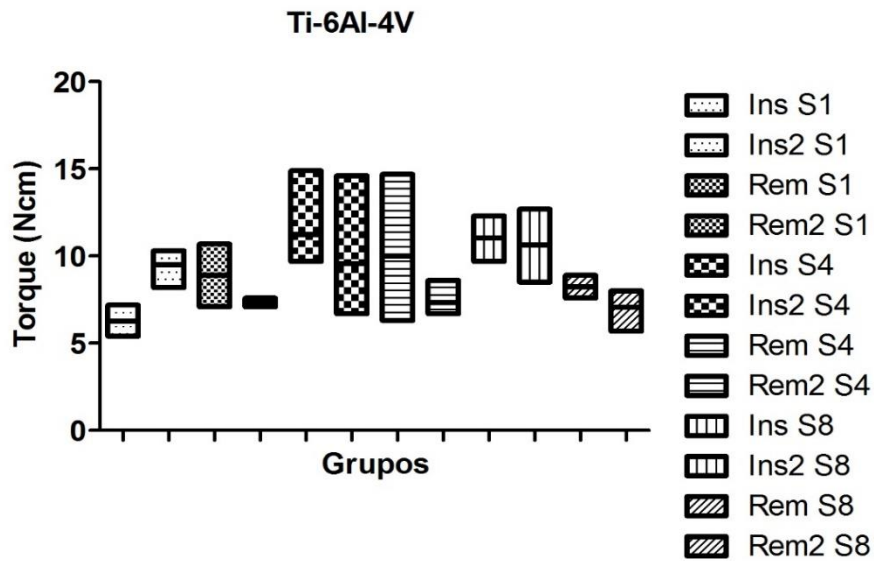


FIG.5.12 – Medianas e quartis dos torques (Ncm) de inserção (Ins) e remoção (Rem) após 1 (S1), 4 (S4) e 8 (S8) semanas, de mini-implantes de Ti-6Al-4V, instalados em diferentes animais (variantes 1 e 2).

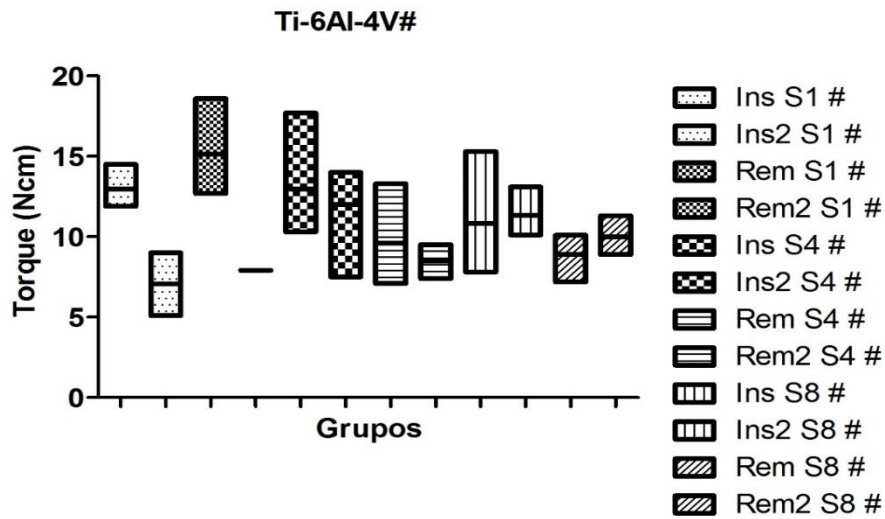


FIG.5.13 – Medianas e quartis dos torques (Ncm) de inserção (Ins) e remoção (Rem) após 1 (S1), 4 (S4) e 8 (S8) semanas, de mini-implantes de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície (#), instalados em diferentes animais (variantes 1 e 2).

## 5.8 Microscopia eletrônica de varredura (amostras *in vivo*)

Foram realizadas análises da superfície e da interface tecido ósseo-mini-implantes após a sua remoção dos animais nos diferentes tempos de implantação.

### 5.8.1 Morfologia da superfície dos mini-implantes

Após a medição dos torques de remoção, os dispositivos foram analisados no microscópio eletrônico de varredura. As morfologias da superfície dos mini-implantes antes e após a remoção dos animais foram semelhantes. Não foi identificada deformação

macroscopia. Pode-se observar a presença de material biológico sobre a superfície das amostras (Figuras 5.14 a 5.17).

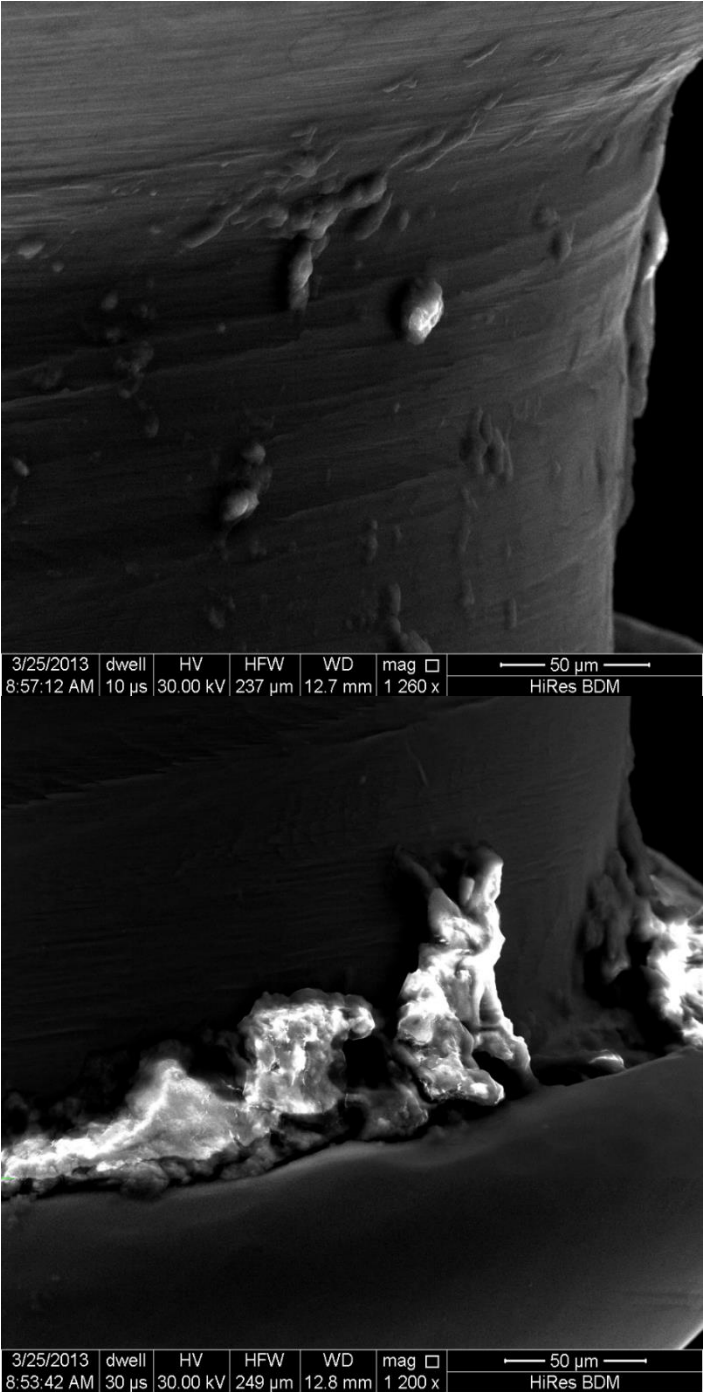


FIG.5.14 – Materiais biológicos aderidos na superfície de mini-implantes de Ti-6Al-4V após 4 semanas

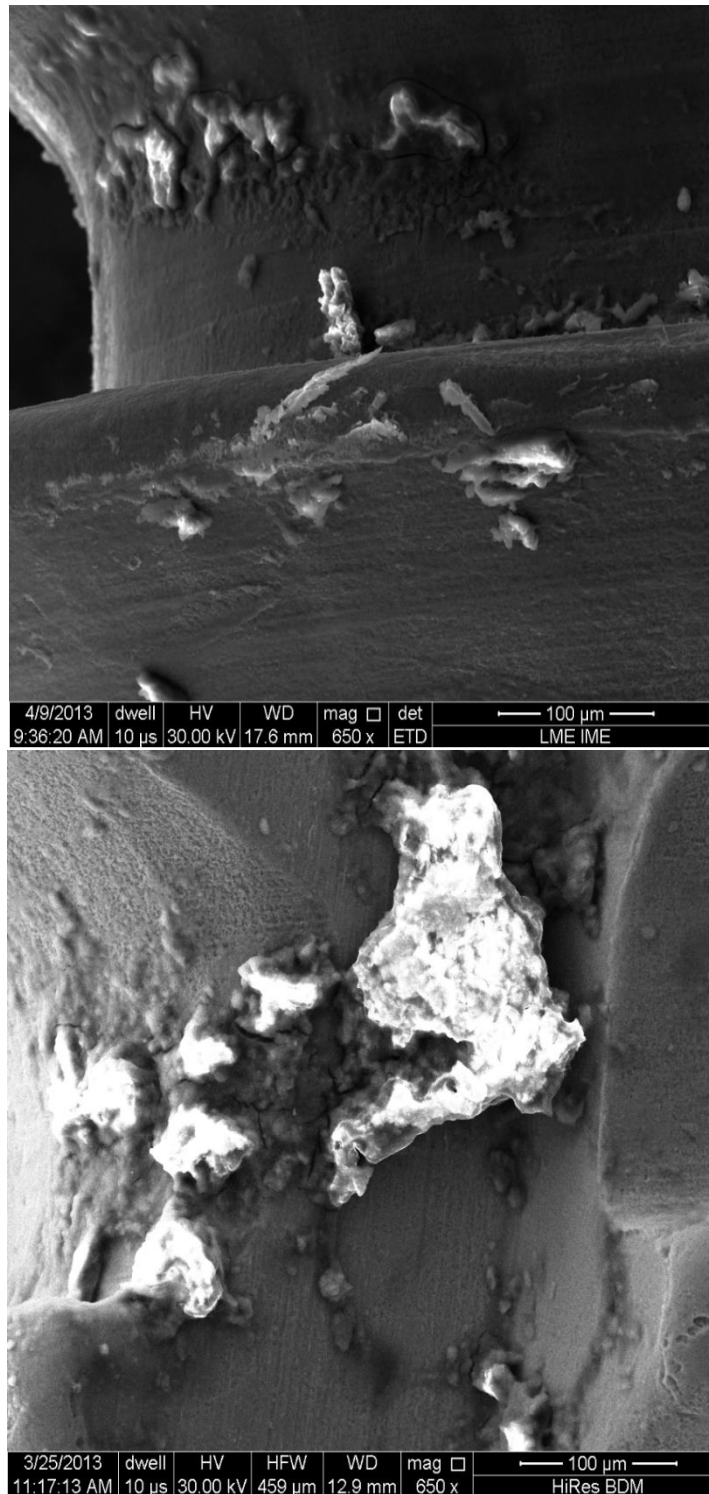


FIG.5.15 - Materiais biológicos aderidos na superfície dos mini-implantes de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície após 4 semanas.



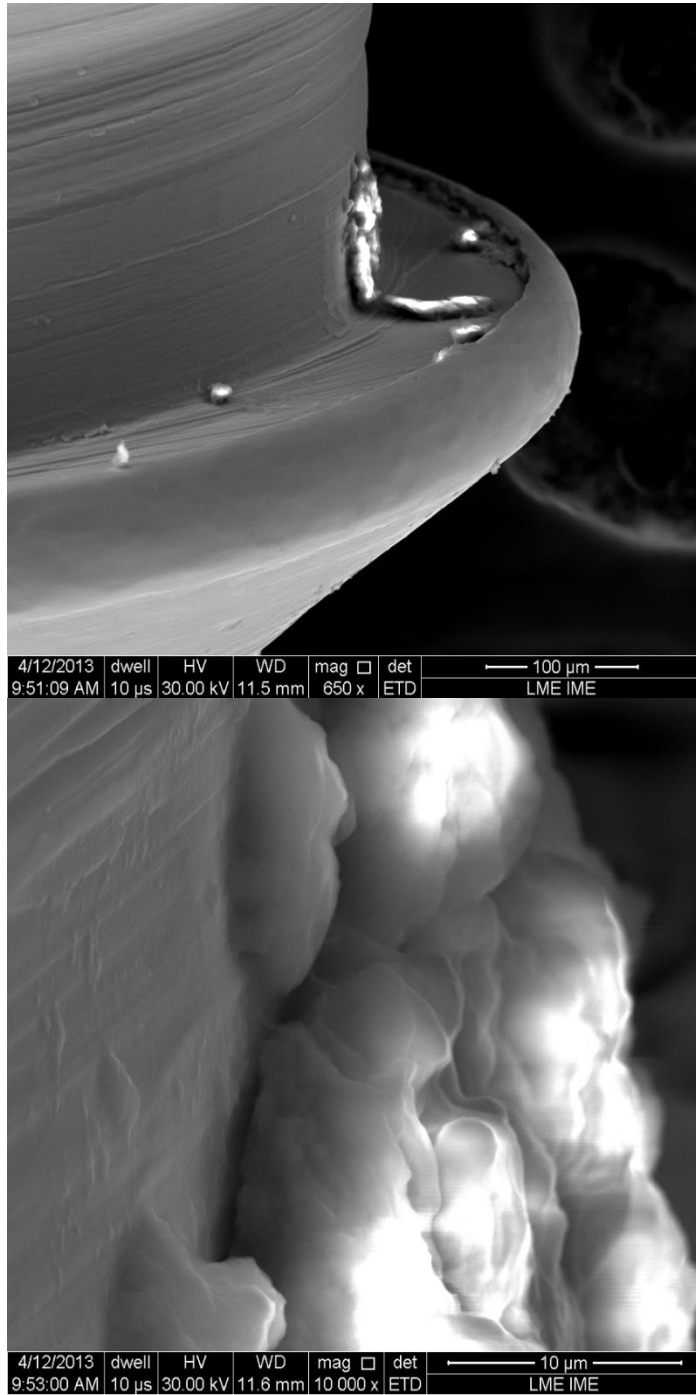


FIG.5.16 - Materiais orgânicos aderidos na superfície de mini-implantes de Ti-6Al-4V após 8 semanas. Notar em maior aumento, a aderência de material biológico.

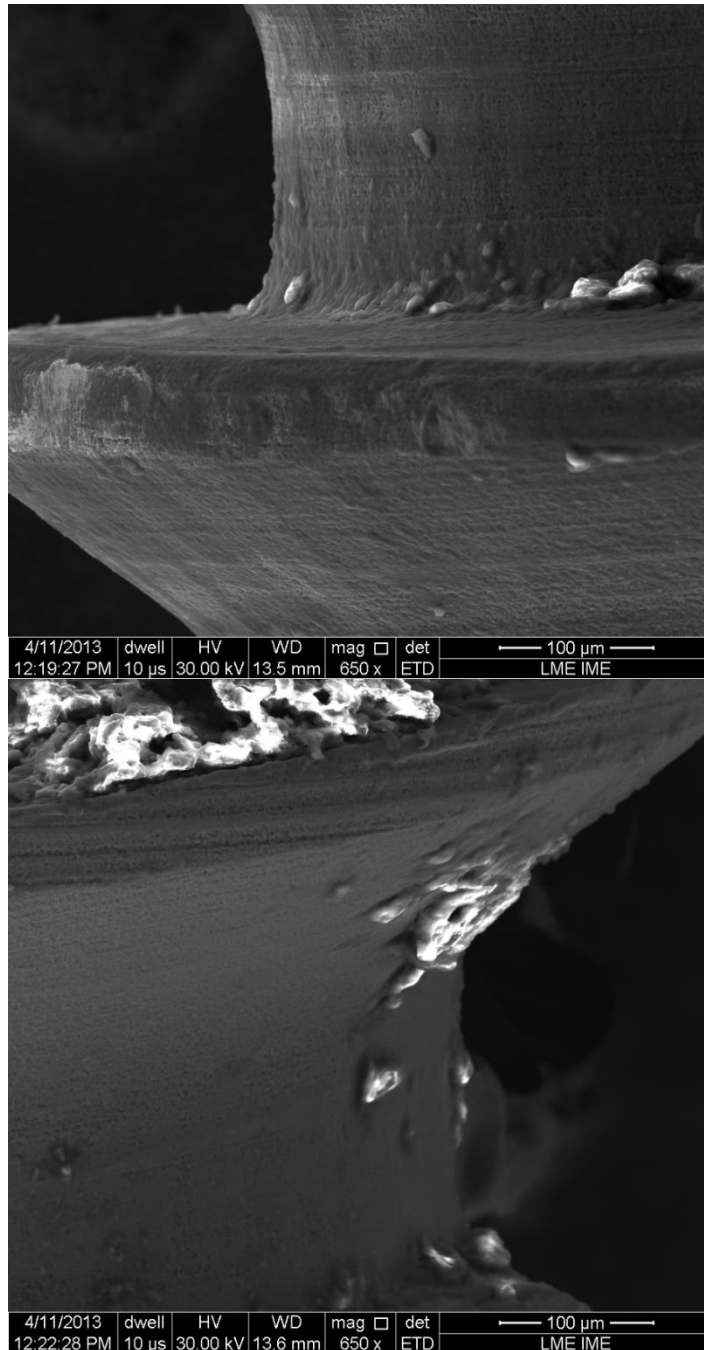


FIG.5.17 - Materiais orgânicos aderidos aos poros da superfície de mini-implantes de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície após 8 semanas.

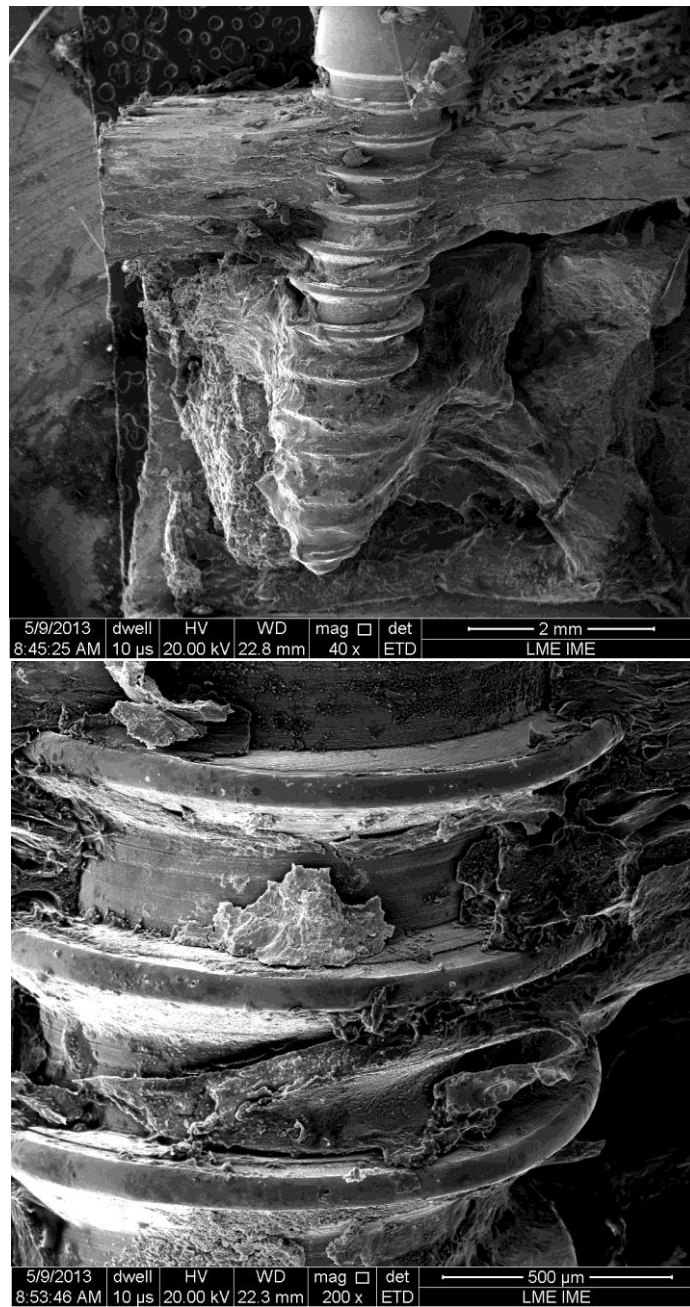


FIG.5.18 – Interface osso/mini-implante de Ti6Al-4V após 4 semanas. Observar em maior aumento a presença de tecido ósseo aderido ao dispositivo.

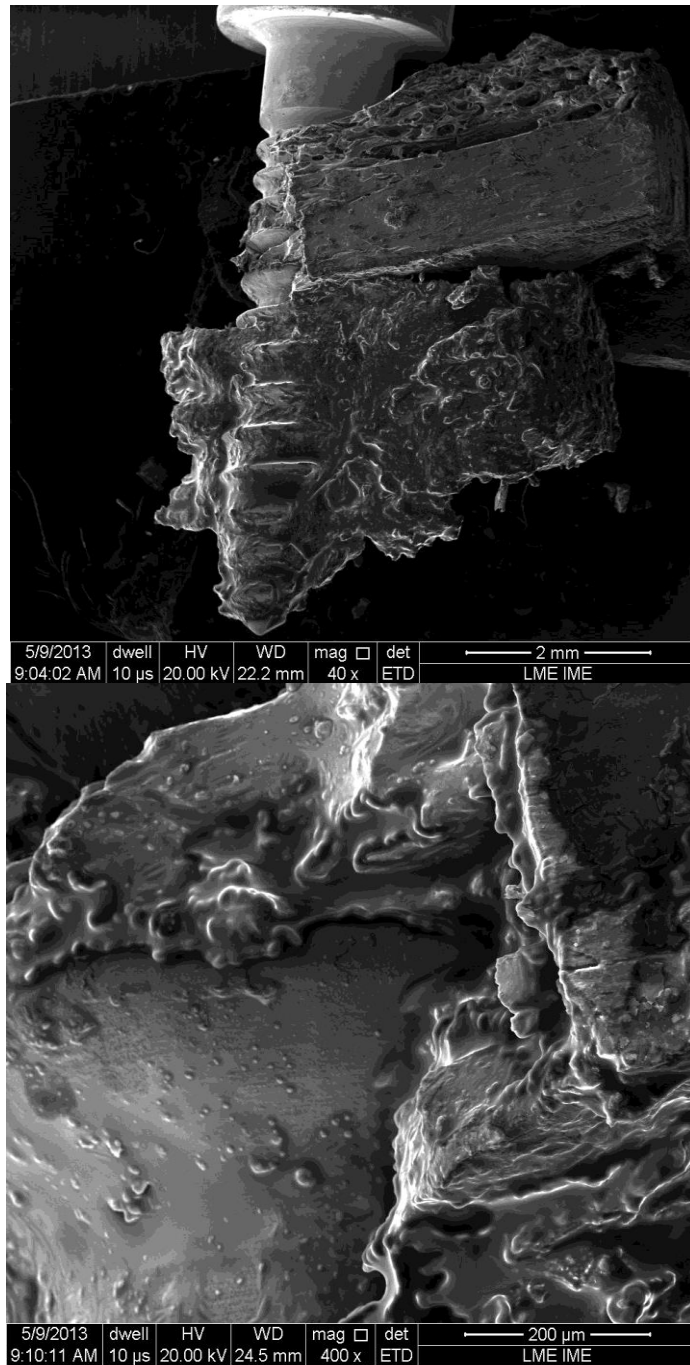


FIG.5.19 - Interface osso/mini-implante de Ti6Al-4V com tratamento de superfície após 4 semanas. Notar no maior aumento a presença de tecido ósseo aderido ao dispositivo e também aos poros da superfície do material.

### 5.8.2 Análise da interface osso/mini-implante

Realizou-se a avaliação qualitativa da interface mini-implante/osso a partir dos blocos seccionados (Figuras 5.18 e 5.19).

### 5.9 Análise histomorfométrica

As lâminas histológicas foram preparadas e representam cortes da interface de contato entre o tecido ósseo (principalmente o cortical) e o mini-implante de Ti-6Al-4V. É possível a observação estrutural dos tecidos adjacentes aos implantes bem como identificar os elementos celulares e vasculares que ali se encontram (Figuras 5.20 a 5.28). O corante utilizado foi o azul de Stevenel, conforme descrito por Delcerro et al. (Delcerro M, Cogen J, Cerro CD, 1980).

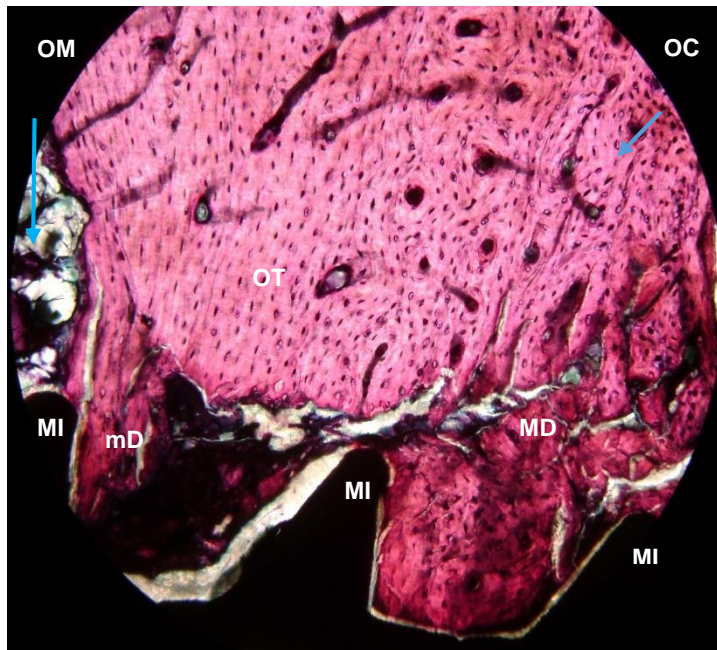


FIG. 5.20 – Interface mini-implante Ti-6Al-4V e osso cortical após 1 semana. Observar as micro (mD) e macro deformações (MD) decorrentes do processo de instalação de dispositivos por autoperfuração. Os elementos estruturais estão indicados como (MI)mini-implante, (OM)osso medular, (OC)osso cortical, (OT) osteócito. Aumento de 20x.

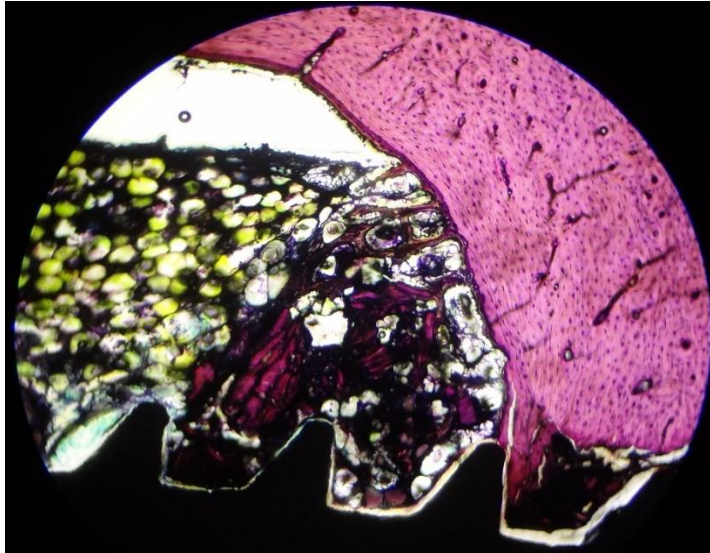


FIG.5.21 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V e osso cortical após 1 semana. Observar a grande desorganização tecidual após a instalação do dispositivo por autoperfuração. Já são observados indícios da tentativa de reorganização do tecido ósseo. Aumento de 20x.

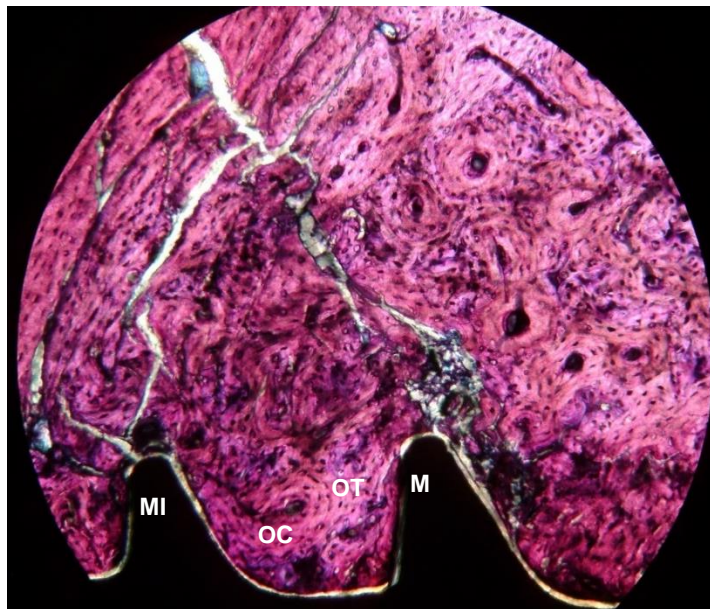


FIG.5.22 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V# e osso cortical após 1 semana. (MI)mini-implante, (OT)osteócito, (OC)osteoclasto. Aumento de 20x.

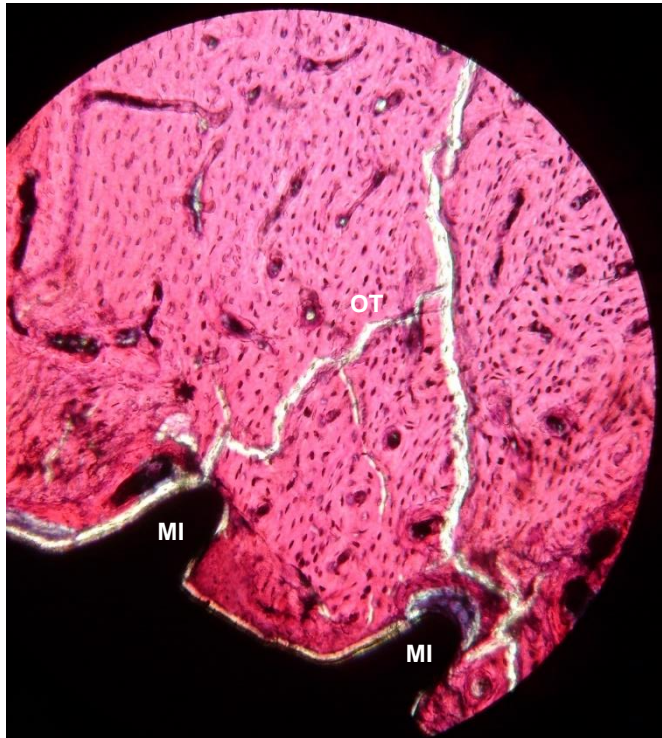


FIG.5.23 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V e osso cortical após 8 semanas. Observar o tecido melhor estruturado com processo de remodelação ainda em curso. (MI)mini-implante e (OT)osteócito. (IN) infiltrado inflamatório. Aumento de 20x.

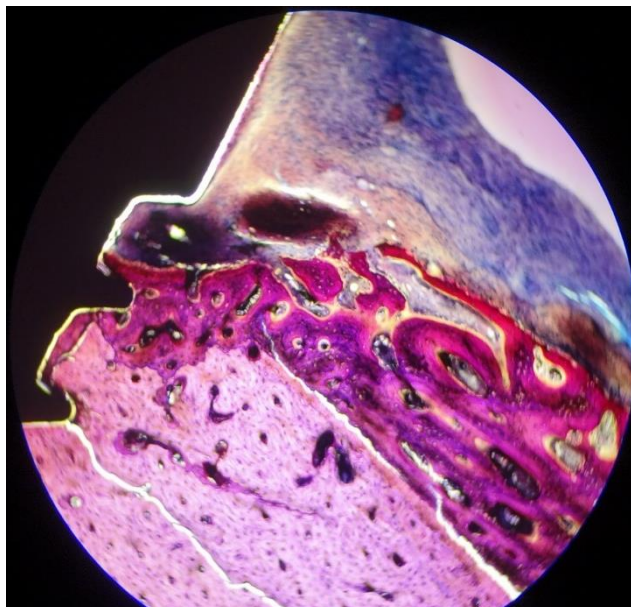


FIG.5.24 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V e osso cortical após 8 semanas. Observar o osso neoformado (mais corado) indicando a reorganização do tecido ósseo advindo do tecido conjuntivo adjacente. Notar que houve sucesso na osseointegração (seta) porém em uma região muito restrita da superfície do implante.

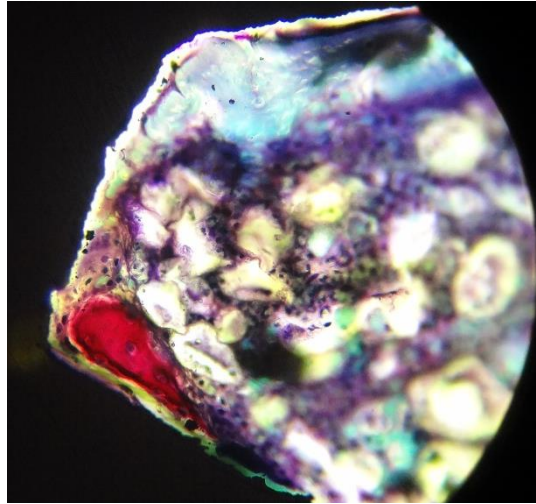


FIG.5.25 – Interface Ti-6Al-4V e osso cortical após 8 semanas. Observar a ilha osteóide (seta) em meio ao tecido medular indicando a dificuldade encontrada do tecido em se reorganizar/aderir à superfície do implante. Aumento de 40x.

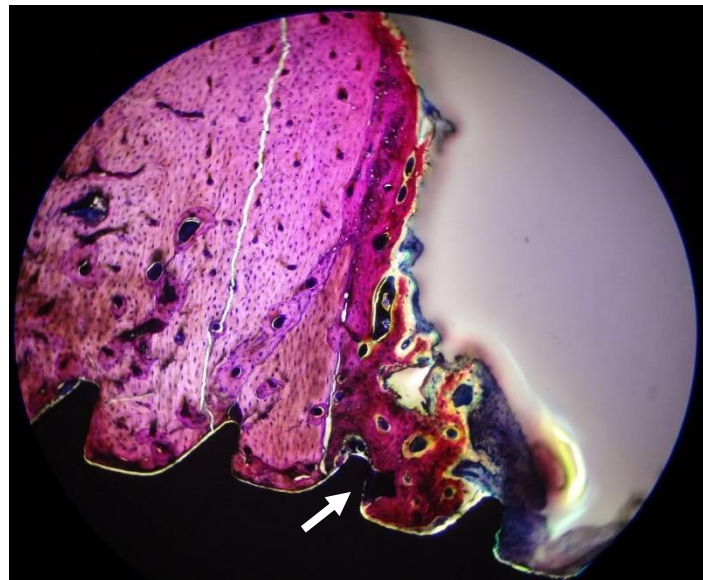


FIG.5.26 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V# após 8 semanas. Observar o tecido imaturo neoformado (mais corado) adjacente a tecido conjuntivo. Notar a adesão sendo iniciada entre o osso imaturo e a superfície do implante (seta). Aumento de 20x



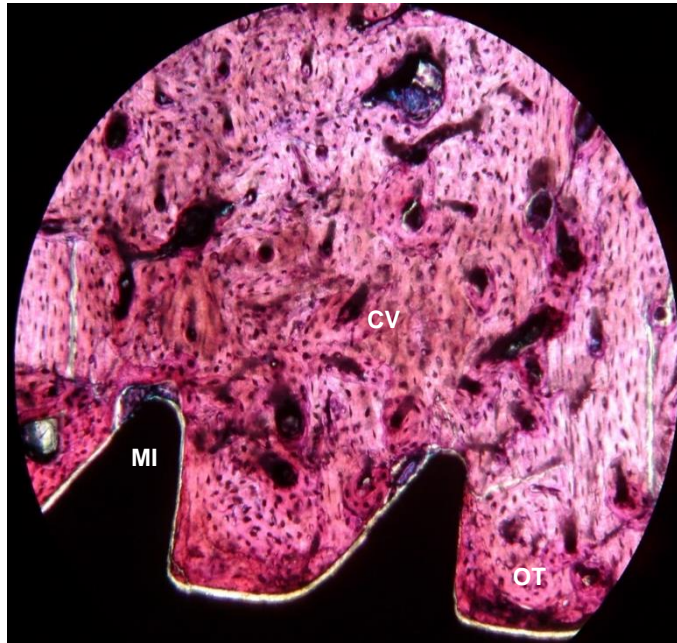


FIG.5.27 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V# e osso cortical após 8 semanas. Os elementos estruturais estão indicados como (MI)mini-implante, (CV)canal vascular e (OT)osteócito. Notar a melhor estruturação do tecido em comparação com período de 1 semana. Aumento de 20x.

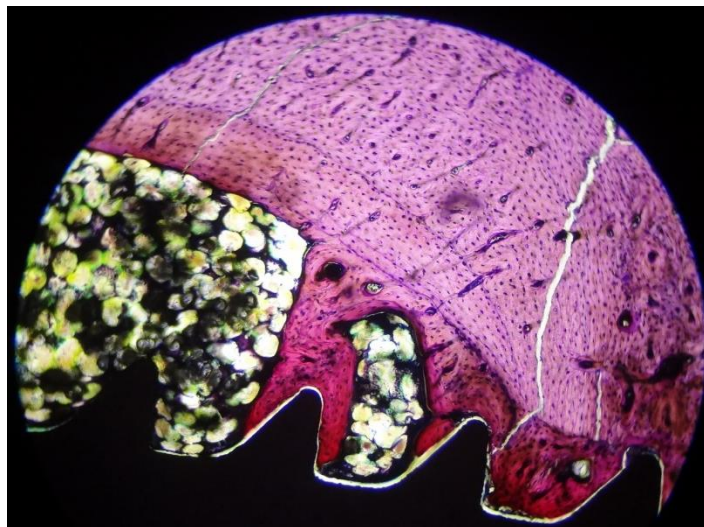


FIG.5.28 - Interface mini-implante Ti-6Al-4V# após 8 semanas. Notar a grande extensão de tecido ósseo depositado na região interna de osso medular. Já existe osso maduro em continuidade com a cortical óssea. Comportamento diferente da ilha osteóide observada no grupo sem tratamento de superfície. Aumento de 20x

## 5.10 Quantificação dos íons alumínio e vanádio

A quantificação dos íons Al e V presente no sangue dos coelhos foi realizada após os períodos de 1,4 e 8 semanas de instalação dos mini-implantes de Ti-6Al-4V com e sem tratamento de superfície. O grupo controle consistiu em um animal, mantido sob as mesmas condições de condicionamento onde não foram instalados mini-implantes. As variações dos percentuais de íons são mostradas nas Figuras 5.29 e 5.30.

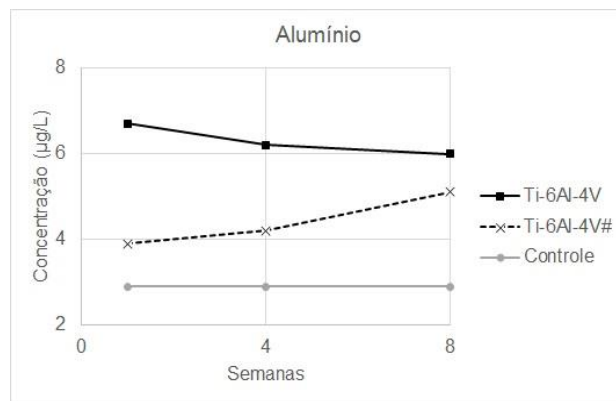


FIG.5.29 – Concentração de íons alumínio presentes no sangue dos coelhos após 1,4 e 8 semanas de instalação dos mini-implantes de Ti-6Al-4V com (#) e sem tratamento de superfície.

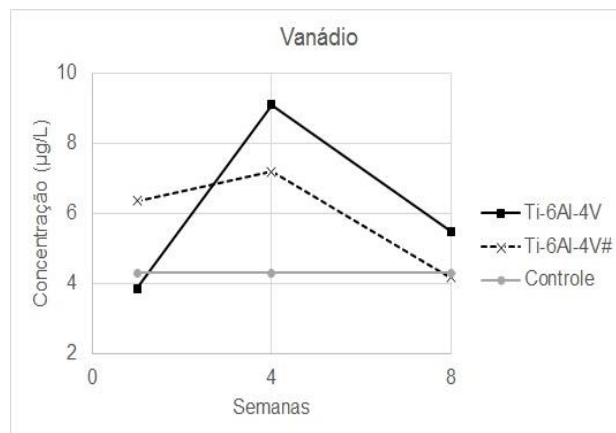


FIG.5.30 - Concentração de íons vanádio presentes no sangue dos coelhos após 1,4 e 8 semanas de instalação dos mini-implantes de Ti-6Al-4V com (#) e sem tratamento de superfície.

## 6. DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos seguirá a mesma ordem dos tópicos apresentados na seção anterior, podendo haver a avaliação conjunta de mais de uma técnica experimental quando o mesmo for necessário.

### 6.1 Morfologia da superfície

As amostras tratadas com ácido apresentaram morfologia da superfície caracterizada pela presença de microcavidades com diâmetros entre 0.5 e 2.0  $\mu\text{m}$ . Observou-se também a existência de intercomunicação das microcavidades menores com as maiores. As microcavidades no interior das maiores apresentaram diâmetros entre 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ .

As características da morfologia da superfície são importantes para o sucesso dos dispositivos implantados. A morfologia superficial influencia não somente a estabilidade primária dos dispositivos, medida pelo torque no final da inserção, mas também o comportamento das células do hospedeiro. Variando-se as propriedades da superfície, entre elas a textura cristalográfica, composição química, tipo de óxido e a rugosidade em escala micro e manométrica, os mecanismos envolvidos na osseointegração são alterados. No presente trabalho, foi observada a presença de cavidades em escala micrométrica, a qual garante ao implante maior estabilidade primária pelo aumento do coeficiente de atrito na interface implante/osso (Figura 5.1). A rugosidade na escala micrométrica exerce influência na osseointegração após a adesão das proteínas na superfície do implante. A rugosidade em escala micrométrica é essencial para a adesão de proteínas e a diferenciação osteoblástica. Portanto, a superfície dos implantes deve ter rugosidade tanto na escala micro como nanométrica. No presente trabalho, as superfícies dos implantes tratados com ácidos apresentaram a predominância da rugosidade na escala micrométrica. Outras propriedades como aumento da energia de

superfície, da espessura da camada de óxido de titânio e a capacidade de adesão de bioproteínas precursoras do processo de osseointegração devem ser controlados durante o desenvolvimento de novas superfícies.

Considerando-se a morfologia da superfície desenvolvida, foram criados porosidades caracterizadas por microcavidades intercomunicantes sem a presença de nanorugosidade. Não foi observada a existência de uma orientação preferencial à disposição das cavidades, o que garante à superfície características morfológicas isotrópicas. Os antigos implantes dentários osseointegráveis usinados apresentavam marcas de usinagem radiais, caracterizando uma superfície anisotrópica.

A superfície desenvolvida no presente trabalho possui características diferentes das usadas em mini-implantes comerciais, não existindo estudos que possam ser confrontados. Todavia, os trabalhos com implantes de titânio comercialmente puro, que analisam os tratamentos das superfícies por imersões em soluções ácidas, mostram que ocorre a formação de micro cavidades com distribuição homogênea e tamanho micrométrico (Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho, PG, 2012). Este padrão de microcavidades é comum em superfícies tratadas com ácido, jateamento e anodização. Nas superfícies anodizadas, observam-se picos agudos, com a interposição de depressões na superfície e alta rugosidade. O tratamento é feito com soluções oxidantes contendo cálcio e fluoretos. A adição de sódio à solução oxidante permitiu o desenvolvimento de crateras com maiores dimensões, mais heterogêneas e com picos de extremidades arredondadas. O aumento da densidade da corrente aplicada reduz consideravelmente a altura dos picos e há grande arredondamento de suas extremidades. As elevações na superfície podem se unir e a mesma torna-se mais plana. Os melhores resultados dos tratamentos de anodização foram conseguidos por soluções mistas de cálcio/fósforo e sódio/flúor. A alteração da composição química dos eletrólitos da solução influencia na morfologia da superfície tratada, principalmente quando existe a presença de fluoretos (Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T, 2001). Os íons flúor são altamente reativos, proporcionando um ataque mais intenso à superfície do titânio, o que resulta em picos mais arredondados e topografia mais plana (Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A, 2004) (Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, Ellingsen, JE, 2006).

Todas as características das superfícies anodizadas descritas no parágrafo anterior foram levadas em consideração no desenvolvimento da superfície proposta por este trabalho. A superfície criada é capaz de reunir porosidade isotrópica, com diâmetros de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  e intercomunicação entre os mesmos. Esta característica confere vantagem à nova superfície em relação a sem tratamento. Resultado semelhante só foi possível por anodização com aplicação de alta intensidade corrente, pois é necessária a liberação de  $\text{H}_2$  e  $\text{O}_2$  para que as porosidades comunicantes sejam criadas. No entanto, a aplicação de altas correntes induz a formação de uma camada de óxido com pequena aderência e baixa dureza. Durante a inserção do implante no leito cirúrgico, a camada de óxido de titânio pode ser danificada e reduz a indução da diferenciação osteoblástica. Além disto, a liberação dos íons do eletrólito inseridos na superfície durante a anodização são liberados de modo heterogêneo. Este evento foi descrito por outros autores que fizeram o uso de soluções contendo cálcio, sódio, fosfato e fluoretos com alta densidade de corrente (Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T, 2001).

Relatos na literatura definem que o tamanho mínimo dos poros para que haja crescimento de tecido ósseo em superfícies osseointegráveis é de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . O diâmetro médio ideal para obtenção de boa aceitação e compatibilidade com tecido ósseo deve ser entre 250-500 $\mu\text{m}$  e 500-1500 $\mu\text{m}$  (Chen Y, Webster TJ, 2009) (Barbas A, Bonnet AS, Lipinski P, Pesci R, Dubois G, 2012). No entanto, o desejável não é a deposição de tecido mineralizado na superfície dos implantes, mas o contato de células ósseas, o que caracteriza o fenômeno da osseointegração. O conceito inicial da osseointegração em que era essencial o contato de tecido mineralizado com a superfície do implante é constatado apenas nas análises da interface osso-implante com menor aumento. Portanto, a superfície desenvolvida neste trabalho, apresenta características adequadas para a osseointegração, uma vez que os poros produzidos pelo tratamento proposto possuem o diâmetro de 0.5 a 2 $\mu\text{m}$ . Outra informação relevante que se encontra amplamente divulgado na literatura e confirmada em revisões sistemáticas, é que superfícies com baixa rugosidade ( $R_a < 0.5\mu\text{m}$ ) apresentam limitado sucesso na promoção de deposição óssea quando comparas a superfícies com rugosidade entre ( $0.5\mu\text{m} < R_a < 1\mu\text{m}$ ) (Wennerberg A, Albrektsson T, 2009). Todavia, os resultados disponíveis na literatura mostram que as cavidades na escala nanométrica influenciam no

comportamento celular, o que fez com que o intervalo tido como pouco rugoso ( $0.5\mu\text{m}$ ) ganhasse relevância em escala nanométrica ( $500\text{nm}$ ). A capacidade de mimetização das superfícies que apresentem características mistas (micro e nanométrica) está em sua habilidade de reproduzir as lacunas de reabsorção óssea (escala micrométrica) criadas por osteoclastos durante o processo de remodelação óssea, enquanto que a topografia nanométrica mimetiza as fibras colágenas que são expostas durante a ação dos osteoclastos sob a matriz óssea (Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD, 2012). Estas características foram reproduzidas pelo tratamento desenvolvido, uma vez que os poros foram criados em escala sub micrométrica ( $0.5\text{-}2.0\ \mu\text{m}$ ) enquanto que a distâncias entre os picos da superfície ao redor dos poros e no interior dos mesmos foi caracterizada por microscopia de força atômica como sendo de aproximadamente  $340\ \text{nm}$  (Tabela 5.1 e Figura 5.5). Logo, a superfície desenvolvida pelo tratamento proposto está apta a reproduzir a topografia de lacunas de reabsorção desenvolvidas durante o processo de remodelação óssea.

As pesquisas recentes desenvolvidas por grupos que também tentaram encontrar uma maneira de aumentar a biocompatibilidade de ligas de Ti-6Al-4V, demonstraram que superfícies com porosidades reduzidas, muitas vezes em escala nanométrica, viabilizaram a adesão de osteoblastos diferenciados na superfície da liga de titânio. Esta diferenciação ocorre a partir de precursores osteoblásticos, havendo adesão e deposição óssea na primeira hora de exposição à cultura da linhagem pré-osteoblástica (Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD, 2012) (Zhao C, Ji W, Han P, Zhang J, Jiang Y, Zhang X, 2011). Existem dados que mostram que a nanorugosidade pode ser até mais importante do que a modificação da composição química da superfície com relação à adesão e maturação de osteoblastos (Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD, 2012). Por este motivo, não foi objetivo deste trabalho biofuncionalizar a superfície pela adição de elementos bioativos como cálcio, fósforo, fluoretos ou magnésio. Preferiu-se, inicialmente, analisar o desempenho da superfície criada com tratamento com ácido sem deposição de nanopartículas ou outros elementos químicos.

Analisando-se os resultados obtidos na microscopia de força atômica (AFM), observa-se que os valores do parâmetro  $R_a$  da rugosidade, após o tratamento de superfície, foram de aproximadamente 340 nm, comprovando-se que o tratamento condicionamento foi capaz de criar a rugosidade em escala manométrica. A eficiência do tratamento proposto é corroborada por dados presentes na literatura, os quais estabelecem as condições essenciais para se obter a adesão de osteoblastos à superfície de ligas de Ti com alumínio e vanádio.

Ainda sobre o desafio de se desenvolver uma superfície com maior biocompatibilidade, em ligas de Ti-6Al-4V, o objetivo do trabalho foi reduzir a liberação de elementos tóxicos (Al e V) com o tratamento proposto. Na literatura existem dados que citam que entre os fatores que inviabilizam a osseointegração das ligas Ti-6Al-4V, um deles é a presença dos elementos Al e V na superfície da camada de óxido de titânio, fazendo com que a mesma adquira composição mista e de alguma forma influencie negativamente na adesão e ativação celular (Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD, 2012).

Analisando-se os resultados obtidos por microscopia de fluorescência, não foi observada a presença de íons alumínio ou vanádio na superfície do material (Tabela 4.1). Estes elementos participam do aumento da resistência mecânica da liga através do endurecimento por solução sólida substitucional e pela estabilidade da fase fase beta, aumentando a resistência à fratura em relação ao Ti cp (Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK, 2009) (Niinomi, M, 1998) (Niinomi M, 2003). A não existência destes íons na superfície do material pode significar que o tratamento foi eficaz na retirada destes elementos da superfície após o tratamento por imersão em ácido, o que tornaria a liga Ti-6Al-4V passível de apresentar osseointegração. Contudo, análises complementares são necessárias para avaliação da possível contaminação da camada de óxido de titânio pelos mesmos elementos. Tentou-se a avaliação da camada passiva modificada por difração de raios-X. Todavia, a análise não foi viável face à reduzida espessura da camada de óxidos.

## 6.2 Espessura da camada de óxido

Cogitou-se a avaliação da espessura da camada de óxidos, bem como a identificação das variantes polimórficas de  $\text{TiO}_2$  presentes, mas os diferentes difratômetros utilizados possuíam tubos de cobre ou cobalto, não dispondo de energia suficiente para avaliar camadas de dimensões sub-nanométricas. Foram realizadas medidas da espessura da camada passiva por meio da microscopia eletrônica de transmissão. Para a liga de Ti-6Al-4V, a camada passiva apresenta espessura média de aproximadamente 5.2 nm (Figura 5.8). Apesar do tratamento proposto ser capaz de aumentar a espessura da camada em oito vezes, mesmo com a espessura de 40 nm, a angulação necessária dos feixes deveria ser da ordem de  $0,4^\circ$ , o que tornaria muito reduzida a intensidade do sinal oriundo dos feixes difratados, inviabilizando a aquisição de um difratograma adequado.

## 6.3 Molhabilidade

Outro parâmetro relevante na análise da superfície desenvolvida é sua molhabilidade. A relevância desta propriedade está no fato da molhabilidade da superfície influenciar no contato das células com a superfície do implante. Quanto maior a molhabilidade, maior a capacidade da liga em ser biocompatível por permitir o contato das biomoléculas que participam dos eventos iniciais de osseointegração. Deve-se considerar as propriedades da camada de óxido de titânio, a qual por ser um filme capaz de criar um ambiente de hidrofilinidade ou hidrofobicidade própria na superfície do titânio, pode facilitar ou dificultar o contato das células (Elias CN, Meirelles L, 2010). Analisando-se os ângulos de contato encontrados, surpreendentemente, o ângulo de contato para a superfície tratada foi superior à superfície sem tratamento. Este comportamento é contrário a todos os trabalhos publicados que visaram explicar a relação existente entre molhabilidade e rugosidade (Wennerberg A, Albrektsson T, 2009) (Att W, Tsukimura N, Suzuki T, Ogawa T, 2007) (Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS,



2003) (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008). Estes autores realizaram inúmeras medições do ângulo de contato para identificação da molhabilidade das superfícies de materiais implantáveis e relacionaram estes dados com a rugosidade dos mesmos materiais (Wennerberg A, Albrektsson T, 2009) (Att W, Tsukimura N, Suzuki T, Ogawa T, 2007) (Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS, 2003) (Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller CA, 2008). O comportamento anômalo observado está no fato de uma superfície de alta energia como a do titânio, com grande aumento da área superficial (67.1%) em função da rugosidade desenvolvida pelo tratamento com ácido, ter produzido a redução da hidrofilicidade da superfície (Figura 5.7 e Tabela 5.3).

A molhabilidade é determinada quantitativamente pelo ângulo de contato que é estabelecido pelo equilíbrio entre as tensões da superfície do titânio com o ar e o somatório das tensões entre a superfície e o líquido e o líquido e o ar. Este comportamento é previsto pela equação de Young. Aceitar que o ângulo de contato foi reduzido seria considerar que um aumento nas tensões entre as interfaces sólido-líquido e líquido-ar tornaram-se maiores ou que as tensões na interface sólido-ar foram reduzidas. Esta alteração nas tensões resultantes da modificação da superfície contudo, não poderiam ser suportadas uma vez que a energia de superfície do material não foi reduzida pelo condicionamento proposto.

Existem modelos que preveem correções no ângulo de contato em função de alterações na rugosidade do material. Uma vez que as alterações na molhabilidade são imperativamente fruto de alterações na composição ou na rugosidade da superfície e que, apenas mudanças foram propostas na rugosidade pelo condicionamento proposto, estes modelos parecem adequar-se bem ao comportamento anômalo observado. São basicamente dois modelos propostos para alterações no ângulo de contato em função de mudanças na rugosidade do material. O primeiro é o modelo de Wenzel que prevê a existência de um fator de rugosidade ( $r$ ) para correção do ângulo de contato medido experimentalmente através da deposição de uma gota de líquido na superfície do material. O fator  $r$  relaciona o ângulo de contato aparente ( $\theta_a$ ) determinado nas medições experimentais e o ângulo verdadeiro ( $\theta_y$ ) que se ajustaria à equação de Young. A equação (equação 6.1) expressa este modelo (Tuteja A, Choi W, Ma M, Mabry JM, Mazzella SA, Rutledge GC, McKinley GH, Cohen RE, 2007).

$$\theta_a = r \theta_y \quad (6.1)$$

O coeficiente (r) pode ser calculado através de dados obtidos por ensaios de rugosidade, como por exemplo a razão entre a área da superfície medida e sua análoga projetada. Entretanto, este modelo considera a redução do ângulo de contato aparente face à penetração do líquido nas rugosidades desenvolvidas, não se ajustando ao comportamento hidrofóbico observado pela superfície nanorugosa desenvolvida no presente trabalho.

O segundo modelo, expresso pela equação de Cassie (equação 6.2) prevê correção semelhante e reconhece a mesma necessidade de ajuste da medida do ângulo de contato. Neste modelo a correção é função de alterações químicas na superfície de onde cada componente teria influência na rugosidade e conseqüentemente no ângulo de contato. A equação proposta pelo modelo está abaixo descrita (Tuteja A, Choi W, Ma M, Mabry JM, Mazzella SA, Rutledge GC, McKinley GH, Cohen RE, 2007).

$$\cos \theta_a = x_1 \cos \theta_{y1} + x_2 \cos \theta_{y2} \quad (6.2)$$

Onde (x) representa a fração da área da superfície em contato com o líquido, os índices (1) e (2) referem-se à influência dos materiais com composição químicas diversas na rugosidade total da superfície em avaliação e (y) as variáveis que atendem à equação de Young. Uma explicação plausível para o fenômeno seria a permanência de bolhas de ar aprisionadas nas microcavidades da superfície de alta energia com rugosidade nanométrica, que impediria a entrada da água para medida do ângulo de contato, resultando no comportamento hidrofóbico aparente verificado neste trabalho. As equações foram modificadas por Cassie e Baxter que propuseram um ajuste na equação de Cassie quando a atmosfera é o ar.

$$\cos \theta_a = x_1 (\cos \theta_y + 1) - 1 \quad (6.3)$$

Esta equação (equação 6.3) conhecida como de Cassie-Baxter é um ajuste à equação original de Cassie, na qual o índice (2) referir-se-ia ao ar de forma que o ângulo formado entre o ar e o líquido ( $\theta_2$ ) seria de  $180^\circ$  e assim ( $\cos \theta_2 = -1$ ) e, o índice da fração área (2) em função da (1) seria ( $x_2 = 1-x_1$ ).

TUTEJA (2007) desenvolveu superfícies superhidrofóbicas e fez a análise termodinâmica do material descrito pela equação de Cassie-Baxter. Verificou que a condição metaestável do equilíbrio descrito pelas equações ocorre quando o sistema recebe o aporte de energia necessário para alcançar sua estabilidade (Tuteja A, Choi W, Ma M, Mabry JM, Mazzella SA, Rutledge GC, McKinley GH, Cohen RE, 2007). Na parte experimental do trabalho, a imersão de superfícies superhidrofóbicas em colunas de líquido foi suficiente para que a pressão imposta removesse as bolhas de ar retidas, permitindo que a molhabilidade da superfície voltasse a ser descrita pela equação de Young (Tuteja A, Choi W, Ma M, Mabry JM, Mazzella SA, Rutledge GC, McKinley GH, Cohen RE, 2007).

Possivelmente serão necessários esforços para se idealizar uma forma de doação de energia para que haja a transição do estado hidrofóbico metaestável descrito pela equação de Cassie-Baxter para o estado de Wenzel que ainda considera a rugosidade da superfície mas com a possibilidade de molhamento da rugosidade superficial. A condição de maior estabilidade seria capaz de explorar todo o potencial de aumento da área da superfície descrito pelos ensaios ao AFM e que resultam do desenvolvimento da superfície com características superhidrofílicas.

Com a aplicação do modelo desenvolvido por Cassie-Baxter para os dados coletados em AFM, no presente trabalho e após a correção, o valor do ângulo de contato é alterado de  $99.61^\circ$  para  $60^\circ$ . Desta forma, a superfície seria mais hidrofílica que sua análoga sem tratamento ( $77,03^\circ$ ), o que é um comportamento mais pertinente em função do aumento da área de superfície do material ter aumentado aproximadamente 67% após o condicionamento com ácidos. Os dados para a simulação da correção realizada pela equação de Cassie-Baxter são apresentados na figura 6.1.

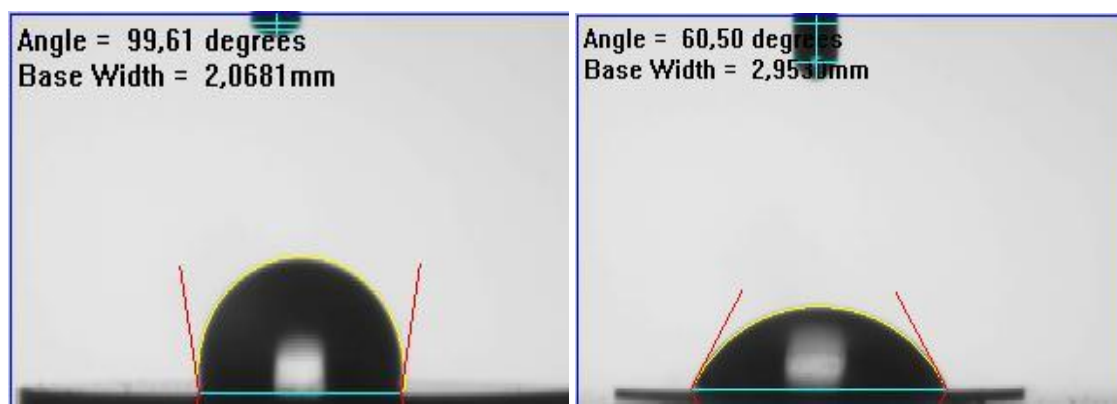


FIG.6.1 – Resultado da correção do ângulo de contato proposto pelo modelo de Cassie-Baxter. Observa-se a superfície de Ti-6Al-4V# antes da correção (esquerda) e após a aplicação da equação (direita).

#### 6.4 Corrosão antes e após tratamento de superfície

A resistência à corrosão foi determinada pela perda de massa após o tratamento da superfície em relação às amostras sem tratamento. Comparando-se em porcentagem a quantidade de massa perdida por corrosão, os valores não ultrapassam 0.005% após 30 dias de imersão em solução de HCl 1 M. Outros autores analisaram as ligas de titânio imersas na mesma solução porém com intervalos de tempo superiores (50 e 90 dias) aos utilizados neste trabalho (Balyanov A, Kutnyakova J, Amirkhanova NA, Stolyarov VV, Valiev RZ, Liao XZ, Zhao YH, Jiang YB, Xu HF, Lowe TC, Zhu YT, 2004) (Kim HS, Yoo SJ, Ahn JW, Kim DH, Kim WJ, 2011), o que resultou em maior perda de massa que o presente estudo. Contudo, analisando as superfícies tratadas por anodização, outros autores identificaram o aumento da resistência da corrosão em função do aumento da espessura da camada de óxido de titânio, o que se acredita ser a causa do aumento da resistência à corrosão após o tratamento de superfície proposto (Bhola R, Mishra B, 2012).

Uma das causas da liberação de íons metálicos é a degradação das ligas para uso biomédico por corrosão (Balyanov A, Kutnyakova J, Amirkhanova NA, Stolyarov VV,

Valiev RZ, Liao XZ, Zhao YH, Jiang YB, Xu HF, Lowe TC, Zhu YT, 2004) (Bhola R, Mishra B, 2012) (Kim HS, Yoo SJ, Ahn JW, Kim DH, Kim WJ, 2011).

### 6.5 Análise in vivo: liberação de íons metálicos

Apesar da perda de massa, nos ensaios de corrosão, ter sido reduzida, identificou-se o aumento na quantidade de íons alumínio e vanádio nos coelhos que receberam implantes com superfície tratada em comparação com o grupo controle.

Quanto ao grupo controle, foi observada a presença de íons metálicos nestes animais. Possivelmente, houve incorporação de íons nos animais durante seu período de crescimento até o período de 6 meses de idade, quando foram inseridos os implantes para as análises do presente trabalho. Além disto, há a possibilidade de ter ocorrido a contaminação nos biotérios onde foram criados. Os íons metálicos, principalmente o alumínio, é de fácil contaminação através da alimentação e gaiolas, tornando difícil sua prevenção em qualquer plantel em função da grande quantidade de animais acomodados. Este relato foi observado em outros trabalhos que fizeram uso de modelos animais para análise de diferentes ligas contendo alumínio e vanádio para aplicação biomédica (Uban RM, Jacobs JJ, Tomilson MJ, Gavrilovic J, Black J, Pech M, 2000) (Liu P, Yao YN, Wu SD, Dong HJ, Feng GC, Yuan XY, 2005). Observa-se inclusive, que os níveis de alumínio se mantiveram constantes no grupo durante as 8 semanas analisadas, evidenciando o sucesso do controle de contaminação no biotério.

Analisando-se a concentração dos íons alumínio nos tempos de 1, 4 e 8 semanas, é verificado uma maior concentração dos íons, já na primeira semana, nos animais que receberam implantes sem o tratamento de superfície. A concentração de íons neste grupo mantém-se praticamente constante com suave queda e variação inferior a 0.5 µg/L. O grupo com tratamento de superfície apresentou concentrações menores e relativamente constantes até a quarta semana, confirmando a menor perda de massa por corrosão. Contudo, após o período de 4 semanas, a curva demonstrou uma tendência ascendente com aumento próximo a 1 µg/L em 4 semanas, o que ainda assim é inferior a todos níveis

medidos para o grupo sem tratamento. É relevante relatar também, que a variação observada para os grupos com e sem tratamento são inferiores à metade da quantidade de contaminação inicial apresentada pelo grupo controle. Desta forma, apesar da grande toxicidade do alumínio circulante na corrente sanguínea, pode-se minimizar a importância da variação ascende da curva com tratamento de superfície.

O vanádio é um elemento presente nas células dos mamíferos e sua toxicidade ao organismo é muito inferior à creditada ao alumínio. Contudo, sua concentração tóxica pode ser alcançada a partir de pequenos aumentos na concentração (Heinemann G, Fichtl B, Vogt W, 2003) (Morais LS, Serra GG, Muller CA, Andrade LR, Palermo EFA, Elias CN, Meyers M, 2007). Na curva apresentada nas Figuras 5.29 e 5.30, observou-se um comportamento semelhante para os grupos com e sem tratamento de superfície sendo que os níveis produzidos pelos parafusos com tratamento foram inferiores aos sem tratamento. Notou-se um aumento da concentração dos íons na 4ª semana seguido de queda no período entre 4ª a 8ª semanas. Este aumento foi relatado por outros autores, em experimentos também com coelhos mas o acúmulo dos íons se deu em órgão distantes (Heinemann G, Fichtl B, Vogt W, 2003) (Morais LS, Serra GG, Muller CA, Andrade LR, Palermo EFA, Elias CN, Meyers M, 2007). Sabendo-se que a tendência do organismo é de retirar os íons da corrente sanguínea, entende-se que nestes estudos comparativos, possivelmente a concentração de íons vanádio foi também grande na corrente sanguínea antes que os mesmos fossem direcionados para os órgãos distantes, onde foram identificados pelos autores (Heinemann G, Fichtl B, Vogt W, 2003) (Uban RM, Jacobs JJ, Tomilson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoch M, 2000). Observou-se esta mesma tendência no período de 4 a 8 semanas, quando há uma queda acentuada na concentração de vanádio, para os grupos com e sem tratamento, o que pode sinalizar o transporte destes íons da corrente sanguínea para órgãos como fígado, pulmões e rins. Esse transporte de íons vanádio da sangue para os órgãos mais distantes foi descrita por outros autores previamente (Heinemann G, Fichtl B, Vogt W, 2003) (Uban RM, Jacobs JJ, Tomilson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoch M, 2000) (Morais LS, Serra GG, Muller CA, Andrade LR, Palermo EFA, Elias CN, Meyers M, 2007).

## 6.6 Análise histomorfométrica

A avaliação histológica da interface tecido ósseo/implante apresentou resultados promissores quanto ao efeito do tratamento de superfície. Após uma semana de implantação, foram evidenciadas zonas extremamente desorganizadas tecidualmente, principalmente nos grupos sem tratamento de superfície, porém sem nenhuma evidência de remodelação óssea ou novo osso neoformado. Os grupos com tratamento de superfície apresentaram uma maior região de contato entre o tecido ósseo e o implante, podendo indicar que o maior atrito resultante da nanorugosidade desenvolvida podem ter resultado em uma maior interferência mecânica. Esta possibilidade foi comprovada pelos torques aferidos, principalmente quando comparados os torques de inserção com os de remoção. Os torques de remoção foram sempre superiores nos grupos com tratamento em comparação aos dispositivos que não receberam tratamento de sua superfície (Tabela 5.5).

Após 8 semanas, foi observado um tecido mais bem organizado (Figuras 5.23 e 5.24, com tecido ósseo neoformado, ainda imaturo, com linhas de ossificação reversa (Figura 5.24). No grupo sem tratamento, há a tendência do organismo se reorganizar na interface do implante, mas há uma limitação que talvez seja imposta por características do material (Morais LS, Serra GG, Muller CA, Andrade LR, Palermo EFA, Elias CN, Meyers M, 2007). Observou-se uma ilha de osteóide em meio ao osso medular que permaneceu isolada, sem que o processo de remodelação óssea, que pudesse resultar em osseointegração, progredisse (Figura 5.25). Essa tentativa poderia ser explicada também pela análise da superfície dos implantes no MEV após sua remoção. Foram observadas no MEV, uma grande quantidade de material orgânico aderido com composição contendo cálcio e fosfato (Figuras 5.14 a 5.17). Estes elementos medidos por análise química semiquantitativa com EDS, é mais um indício da tentativa do hospedeiro em estabelecer uma zona de continuidade de tecido ósseo na interface do implante. Foi identificada uma interface definida implante/osso no MEV, com o contato entre os parafusos e o organismo, mesmo nos implantes instalados sem tratamento de superfície (Figura 5.24).

Ainda na avaliação histológica, do grupo 8 semanas sem tratamento, observou-se

uma região de ossificação clássica proveniente do tecido conjuntivo adjacente. Há indícios do recrutamento e organização de células mesenquimais indiferenciadas, às quais poderão se diferenciar em osteoblastos e fibroblastos. Esta região possui tecido imaturo adjacente a uma área de tecido já maduro, havendo a continuidade do crescimento do tecido imaturo até a interface com implante (Figura 5.24). Porém, a adesão à superfície do parafuso é vista apenas em uma reduzida porção da superfície, sinalizando para a possibilidade de não manutenção dessa adesão à longo prazo. Esta suposição estaria em acordo com os torques aferidos. O grupo sem tratamento, após 8 semanas, apresentou torques de remoção inferiores aos medidos na inserção dos dispositivos, indicando não ter havido aumento da estabilidade secundária.

No grupo que recebeu tratamento de superfície após 8 semanas, o mesmo padrão de ossificação adjacente a uma região de tecido conjuntivo foi vista, porém a extensão de osso maduro na interface com implante foi superior (Figura 5.26 e 5.27). Observou-se também, uma grande extensão de osso neoformado, imaturo, linhas de ossificação reversa e uma região de osso maduro, recém ossificada tentando se aderir ao parafuso (Figura 5.27 a 5.29). Apesar de ter sido identificada no MEV uma adesão consistente de tecido ósseo à superfície do implante tratado após 4 semanas, não é possível a extrapolação para citar que existe uma tendência de osseointegração progressiva nas próximas semanas, ou se o resultado seria o mesmo observado no grupo sem tratamento de superfície. A análise dos torques no grupo com tratamento de superfície não evidenciou indícios de aumento significativo da estabilidade secundária por não ter havido aumento dos torques de remoção em relação aos de inserção. Não foram localizados estudos comparativos *in vivo* para esta liga após este tratamento de superfície, que pudesse nortear possíveis comparações sobre os resultados obtidos neste trabalho. Apenas estudos *in vitro* foram localizados (Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD, 2012) (Zhao C, Ji W, Han P, Zhang J, Jiang Y, Zhang X, 2011).



## 7. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos com relação ao desempenho dos mini implantes de Ti-6Al-4V com tratamento de superfície, pode-se concluir que:

1. o tratamento da superfície promoveu redução na liberação de íons alumínio e vanádio durante todo o período de avaliação;
2. o tratamento da superfície dos implantes temporários de Ti-6Al-4V aumentou a rugosidade da superfície do material e melhorou sua estabilidade primária;
3. não foi observada consistência no aumento da estabilidade secundária dos implantes até o período de avaliação de 8 semanas;
4. foi identificada adesão de material biológico contendo cálcio e fósforo na superfície dos parafusos e uma excelente continuidade entre os implantes com tratamento de superfície e o tecido ósseo após 4 semanas de implantação;
5. a perda de massa por corrosão foi menor no grupo com tratamento de superfície;
6. nas análises histológicas verificaram-se o início da osseointegração nos grupos com e sem tratamento de superfície, sendo maior a quantidade de osso neoformado adjacente ao implante no grupo com tratamento de superfície. Houve maior formação de osso imaturo adjacente à superfície tratada com reduzida região com efetiva osseointegração.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADAMEK G, JAKUBOWICZ J. Microstructure of the mechanically alloyed and electrochemically etched Ti–6Al–4V and Ti–15Zr–4Nb nanocrystalline alloys. **Mater Chem Phys.** 2010;124:1198–1204.
- ANSELME K, BIGERELLE M. Topography effects of pure titanium substrates on human. **Acta Biomater.** 2005;1:211-222.
- ANTONIOS JK, YAO Z, LI C, RAO AJ, GOODMAN SB. Macrophage polarization in response to wear particles in vitro. **Cell Mol Immunol.** 2013;10:471-482.
- ANTUNES RA, LOPES DE OLIVEIRA MC. Corrosion fatigue of biomedical metallic alloys: Mechanisms and mitigation. **Acta Biomater.** 2012;8:937-962.
- ATT W, TSUKIMURA N, SUZUKI T, OGAWA T. Effect of supramicron roughness characteristics produced by 1- and 2-step acid etching on the osseointegration capability of titanium. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2007;22:719-728.
- BALYANOV A, KUTNYAKOVA J, AMIRKHANOVA NA, STOLYAROV VV, VALIEV RZ, LIAO XZ, ZHAO YH, JIANG YB, XU HF, LOWE TC, ZHU YT. Corrosion resistance of ultra fine-grained Ti. **Scripta Mater.** 2004;51:225-229.
- BARBAS A, BONNET AS, LIPINSKI P, PESCI R, DUBOIS G. Development and mechanical characterization of porous titanium bone substitutes. **J Mech Behav Biomed Mat.** 2012;9:34-44.
- BAUER S, SCHMUKI P, VON DER MARK K, PARK J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. **Prog Mater Sci.** 2013;58:261-326.

BERGLUNDH T, ABRAHAMSSON I, LANG NP, LINDHE J. Denovo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clin Oral Implants Res.** 2003;14:251-262.

BERNATHOVA I, BURSAK M. Properties of Pure Titanium and Ultra Fine Grained Titanium. **Metalurgija.** 2011;50:249-252.

BHOLA R, MISHRA B. Characterization of a Biomedical Titanium Alloy using Various Surface Modifications to Enhance its Corrosion Resistance and Biocompatibility. **Mater Sci Forum.** 2012;706-709:105-112.

BINDU S, SANOSH KP, SMETANA K, BALAKRISHNAN A, KIM TN. An in vivo Evaluation of Ultra-fine Grained Titanium Implants. **J Mater Sci Tech.** 2009;25:556-560.

BLACK J. Does corrosion matter? **J Bone Joint Surg** 1998;70;517-520.

BRÅNEMARK PI, HANSSON BO, ADELL R . Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.** 1977;16:1–132.

BURGOS PM, RASMUSSEN L, MEIRELLES L, SENNERBY L. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2008;10:181-190.

BUSER D, NYDEGGER T, OXLAND T, COCHRAN DL, SCHENK RK, HIRT HP. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. **J Biomed Mater Res.** 1999;45:75-83.

BUTZ F, AITA H, WANG CJ, OGAWA T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. **J Dent Res.** 2006;85:560-565.

CALLEN BW, LOWENBERG BF, LUGOWSKI S, SODHI RN, DAVIES JE. Nitric acid passivation of Ti6Al4V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. **J Biomed Mater Res.** 1995;29:279-290.

CHAO J, LOPEZ V. Failure analysis of a Ti6Al4V cementless HIP prosthesis. **Eng Fail Anal.** 2007;14:822-830.

CHEN Y, WEBSTER TJ. Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. **J Biomed Mater Res A.** 2009;91A:296-304.

CHO SA, PARK KT. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. **Biomater.** 2003;24:3611-17.

COCHRAN DL, SCHENK RK, LUSSI A, HIGGINBOTTOM FL, BUSER D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. **Journal of Biomed Mat Res.** 1998;40:1-11.

COOK SD, THOMAS KA, DALTON JE, VOLKMAN TK, WHITECLOUD 3RD TS, KAY JF. Hydroxylapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. **J Biomed Mater Res.** 1992;26:989-1001.

COOPER LF, ZHOU Y, TAKEBE J, GUO J, ABRON A, HOLMEN A, ELLINGSEN, JE. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. **Biomater.** 2006;27:926-936.

CORDIOLI G, MAJZOUB Z, PIATTELLI A, SCARANO A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2000;15:668-674.

DELCERRO M, COGEN J, CERRO, CD. Stevenels Blune, na excelent stain for optical microscopical study of plastic embedded tissues. **Microsc Acta.** 1980;83:117-121.

DRNOVSEK N, DANEU N, RECNIK A, MAZAJ M, KOVAC J, NOVAK S. Hydrothermal synthesis of a nanocrystalline anatase layer on Ti6A4V implants. **Surf Coat Tech.** 2009;203:1462-1468.

ELIAS CN, LIMA JHC, VALIEV RZ, MEYERS MA. Biomedical applications of titanium and its alloys. **JOM** 2008;60:46-49.

ELIAS CN, MEIRELLES L . Improving osseointegration of dental implants. **Expert Rev Med Devices.** 2010;7:241–256.

ELIAS CN, OSHIDA Y, LIMAD JHC, MULLER CA. Relationship between surface properties, roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2008;1:234-242.

ELIAS CN, ROCHA FA, NASCIMENTO AL, COELHO, PG. Influence of implant shape, surface morphology, surgical technique and bone quality on the primary stability of dental implants. **J Mech Beh Biomed Mater.** 2012;16:169-180.

ELLINGSEN JE. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. **J Mater Sci: Mater Med.** 1995;6:749-53.

ELLINGSEN JE, JOHANSSON CB, WENNERBERG A, HOLMEN A. Improved retention and bone to implant contact with fluoride modified titanium implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2004;19:659-666.

ERIKSSON C, LAUSMAA J, NYGREN, H. Interactions between human whole blood and modified Ti-O<sub>2</sub>-surfaces: Influence of surface topography and titanium oxide thickness on leukocyte adhesion and activation. **Biomater.** 2001;22:1987-1996.

ESTRIN Y, IVANOVA EP, MICHALSKA A, TRUONG VK, LAPOVOK R, BOYD R. Accelerated stem cell attachment to ultrafine grained titanium. **Acta Biomater.** 2011;7:900-906.

FROST HM. An Update of Bone Physiology and Wolff's Law for Clinicians. **Angle Orthod.** 2003;74:3-15.

GALLO J, GOODMAN SB, KONTTINEN YT, WIMMER M A, HOLINKA M. Osteolysis around total knee arthroplasty: A review of pathogenetic mechanisms. **Acta Biomater.** 2013; 9: 8046-8058.

GEETHA M, SINGH AK, ASOKAMANI R, GOGIA AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review. **Progr Mater Sci.** 2009;54:397-425.

GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science** 2010;327:656–661.

GEURS NC, JEFFCOAT RL, MCGLUMPHY EA, REDDY MS, JEFFCOAT MK. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002;17:811-815.

GITTENS RA, OLIVARES-NAVARRETE R, MCLACHLAN T, CAI Y, HYZY SL, SCHNEIDER JM, SCHWARTZ Z, SANDHAGE KH, BOYAN BD. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. **Biomater.** 2012;33:8986-8994.

GOODMAN SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the. **Biomater** 2007;28:5044–5048.

HANDTRACK D, SAUER C, KIEBACK B. Microstructure and properties of ultrafine-grained and dispersion-strengthened titanium materials for implants. **J Mater Sci.** 2008;43:671-679.

HEINEMANN G, FICHTL B, VOGT W. Pharmacokinetics of vanadium in human after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. **Br J Clin Pharmacol.** 2003;55:241-245.

HUISKES R, WEINANS H, VAN RIETBERGEN B. The Relationship Between Stress Shielding and Bone Resorption Around Total Hip Stems and the Effects of Flexible Materials. **Clin Orthop Relat Res.** 1992;274:124-134.

INGHAM E, FISHER J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. **Biomater.** 2005;26:1271–1286.

JAVED F, ALMAS K, CRESPI R, ROMANOS GE. Implant Surface Morphology and Primary Stability: Is There a Connection? **Imp Dent.** 2011;20:40-46.

JAYARAMAN M, MEYER U, BUHNER M, JOOS U, WIESMANN HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. **Biomater.** 2004;25:625-631.

KASUGA T, KONDO H, NOGAMI M. Apatite formation on TiO<sub>2</sub> in simulated body fluid. **J Cryst Growth.** 2002;235:235-240.

KAUFMAN AM, ALABRE CI, RUBASH HE, SHANBHAG AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. **J Biomed Mater Res A.** 2008;84:464–474.

KIKUCHIA L, PARK JY, VICTOR C, DAVIES JE. Platelet interactions with calciumphosphate-. **Biomater.** 2005; 26:5285-5295.

KIM HS, YOO SJ, AHN JW, KIM DH, KIM WJ. Ultrafine grained titanium sheets with high strength and high corrosion resistance. **Mater Sci Eng A.** 2011;528:8479-8485.

KIM MH, LEE SY, KIM MJ, KIM SK, HEO SJ, KOAK JY. Effect of Biomimetic Deposition on Anodized Titanium Surfaces. **J Dent Res.** 2011;90:711-716.

KIM YH, KOAK JY, CHANG IT, WENNERBERG A, HEO SJ. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. **Int J Oral Maxillofac Imp.** 2003;18:349-356.

KLOKKEVOLD PR, NISHIMURA RD, ADACHI M, CAPUTO A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. **Clin Oral Implants Res.** 1997;8:442-447.

LAMOLLE SF, MONJO M, RUBERT M, HAUGEN HJ, LYGSTADAAS SP, ELLINGSEN JE. The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells. **Biomater.** 2009;30:736-742.

LANG, N.P., SALVI, G.E., HUYNH-BA, G., IVANOVSKI, S., DONOS, N., AND BOSSHARDT, D.D. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. **Clin Oral Implants Res.** 2011;22:349-356.

LI J, LI H, SHI L, FOK AS, UCER C, DEVLIN H, HORNER K, SILIKAS N. A mathematical model for simulating the bone remodeling process under mechanical stimulus. **Dental Mater.** 2007;23:1073-1078.

LI Y, ZOU S, WANG D, FENG G, BAO C, HU J. The effect of hydrofluoric acid treatment on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. **Biomater.** 2010;31:3266-3273.

LIU P, YAO YN, WU SD, DONG HJ, FENG GC, YUAN XY. The efficacy of deferiprone on tissues aluminum removal and copper, zinc, manganese level in rabbits. **J Inorg Biochem.** 2005;99:1733-1737.



LIU Q, DING J, MANTE FK, WUNDER SL, BARAN GR. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. **Biomater.** 2002;23:3103-3111.

LIU X, CHU PK, DING C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Mat Sci Eng R.** 2004;47:49–121.

LONG M, RACK HJ. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. **Biomater.** 1998;19:1621-39.

MAITZ MF, PHAM MT, WIESER E, TSYGANOV I. Blood Compatibility of Titanium Oxides with Various Crystal Structure and Element Doping. **J Biomater Appl.** 2003; 17:303-319.

MASSARO C, ROTOLO P, DE RICCARDIS F, MILELLA E, NAPOLI A, WIELAND M. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. **J Mater Sci Mater Med.** 2002;13:535-48.

MENDES VC, MOINEDDIN R, DAVIES JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomater.** 2007;28:4748-4755.

MENEZES GC, ELIAS CN, ATTIAS M, SILVA FILHO FC. Osteoblast adhesion onto titanium dental implants. **Acta Microsc.** 2003; 12:13-19.

MISH CE. 2008. Bone density: a key determination for treatment planning. [A. do livro] Mish CE. **Comporary implant dentitry.** St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2008.

MORAIS LS, SERRA GG, MULLER CA, ANDRADE LR, PALERMO EFA, ELIAS CN, MEYERS M. Titanium alloy mini-implants for orthodontic anchorage: Immediate loading and metal ion release. **Acta Biomater.** 2007;3:331-339.

MUBARAK ALI M, GANESH SUNDARA RAMAN S, PATHAK S, GNANAMOORTHY R. Influence of plasma nitriding on fretting wear behaviour of Ti-6Al-4V. **Tribol Int.** 2010;43:152-160.

NICH C, TAKAKUBO Y, PAJARINEN J, AINOLA M, SALEM A, SILLAT T, RAO A J, RASKA M, TAMAKI Y, TAKAGI M, KONTTINEN Y T, GOODMAN S B, GALLO J. Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. **J Biomed Mat Res A**. 2013;101:3033-3045.

NIE FL, ZHENG YF, WEI SC, WANG DS, YU ZT, SALIMGAREEVA GK, POLYAKOV AV, VALIEV RZ. In vitro and in vivo studies on nanocrystalline Ti fabricated by equal channel angular pressing with microcrystalline CP Ti as control. **J Biomed Mater Res A**. 2013;101A:1694-1707.

NIINOMI M. Fatigue characteristics of metallic biomaterials. **Int J Fat**. 2007;19:992-1000. 2007.

NIINOMI M. Fatigue performance and cyto-toxicity of low rigidity titanium alloy, Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr. **Biomater**. 2003;24:2673-83.

NIINOMI M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. **Mat Sci Eng A**. 1998;243:231-236.

PAJARINEN J, KOURI V-P, JAMSEN E, LI T-F, MANDELIN J, KONTTINEN Y T. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. **Acta Biomater**. 2013;9:9229-9240.

PARK JW JANG JH LEE CS HANAWA T. Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry. **Acta Biomater**. 2009;5:2311-2321.

PARK JW, KIM YJ, JANG, JH, KWON TG, BAE YC, SUH JY. Effects of phosphoric acid treatment of titanium surfaces on surface properties, osteoblast response and removal of torque forces. **Acta Biomater**. 2010;6:1661-1670.

PERRIN D, SZMUKLER-MONCLER S, ECHIKOU C, POINTAIRE P, BERNARD JP. Bone response to alteration of surface topography and surface composition of sandblasted and acid etched (SLA) implants. **Clin Oral Implants Res**. 2002;13:465-69.

POZIO A, PALMIERI A, GIARDI A, CURA F, CARINCI F. Titanium nanotubes activate genes related to bone formation in vitro. **Dent Res J (Isfahan)**. 2012;9:S164–S168.

ROCCI A, MARTIGNONI M, GOTTLLOW J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. **Clin Implant Dent Relat Res**. 2003;5(Suppl 1):57-63.

ROMANOS GE, TOH CG, SIAR CH, SWAMINATHAN D. Histologic and histomorphometric evaluation of peri-implant bone subjected to immediate loading: an experimental study with *Macaca fascicularis*. **Int J Or Maxillofac Imp**. 2002;17:44-51.

RUPP F, HAUPT M, KLOSTERMANN H, KIM, HS, EICHLER M, PEETSCH A, SCHEIDELER L, DOERING C, OEHR C, WENDEL HP, SINN S, DECKER E, VON OHLE C, GEIS-GERSTORFER J. Multifunctional nature of UV-irradiated nanocrystalline anatase thin films for biomedical applications. **Acta Biomater**. 2010;6:4566-4577.

SAITOVA LR, HOEPELA HW, GOEKEN M, SEMENOVA IP, RAAB GI, VALIEV RZ. Fatigue behavior of ultrafine-grained Ti-6Al-4V 'ELI' alloy for medical applications. **Mater Sci Eng A**. 2009;503:145-147.

SANTOS MV, ELIAS CN, CAVALCANTI LIMA JH. The effects of superficial roughness and design on the primary stability of dental implants. **Clin Imp Dent Rel Res**. 2011;13:215-223.

SCHENK RK, BUSER D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000* 1998;17:22-35.

SCHMUKI P. From bacon to barriers: a review on the passivity of metals and alloys. **J Solid State Electr**. 2002;6:145-164.

SEMLITSCH MF, WEBER H, STREICHER RM, SCHON R. Joint replacement components made of hot-forged and surface-treated Ti–6Al–7Nb alloy. **Biomater**. 1992;13:781-788.

SERBINA NV, JIA T, HOHL TM, PAMER EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Immunology**. 2008;26:421–452.

SHAH JS, VENKATSURYA PKC, THEIN-HAN WW, MISRA RDK, PESACRETA TC, SOMANI MC, KARJALAINEN L P. The role of nanocrystalline titania coating on nanostructured austenitic stainless steel in enhancing osteoblasts functions for regeneration of tissue. **Mat Sci Eng C**. 2011;31:458-471.

SHAO H, YU C, XU X, WANG J,ZHAI R,WANG X. Influence of Ti nanocrystallization on microstructure, interface bonding, surface energy and blood compatibility of surface TiO<sub>2</sub> films. **Appl Surf Sci**. 2010;257:1649-1654.

SHI J, CHEN C, YU H, ZHANG S. Application of magnetron sputtering for producing bioactive ceramic coatings on implant materials. **Bull Mater Sci**. 2008;31:877-884.

SUL YT, JOHANSSON CB, JEONG Y, ALBREKTSSON T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Med Eng Phys**. 2001;23:329-346.

TAMAKI Y, SASAKI K, SASAKI A, TAKAKUBO Y, HASEGAWA H, OGINO T, KONTTINEN YT, SALO J, TAKAGI M. Enhanced osteolytic potential of monocytes/macrophages derived from bone marrow after particle stimulation. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2008;84:191–204.

TANG L, HU W. Molecular determinants of biocompatibility. **Expert Rev Med Devices**. 2005;2:493–500.

NIINOMI M. Tend and present state of titanium alloys with body centered structure for biomedical applications. Japan: **Bull Iron and Steel Inst**. 2010; 15: 661–670.

THULL R. 2002. Physicochemical principles of tissue material interactions. **Biomolec Eng**. 2002;19:43-50.

TRISI P, LAZZARA R, REBAUDI A, RAO W, TESTORI T, PORTER SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. **J Periodontol**. 2003;74:945-956.

- TRUONG VK, LAPOVOK R, ESTRIN YS, RUNDELL S, WANG JY, FLUKE CJ, CRAWFORD RJ, IVANOVA E R. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. **Biomater.** 2010; 31:3674-3683.
- TUTEJA A, CHOI W, MA M, MABRY JM, MAZZELLA SA, RUTLEDGE GC, MCKINLEY GH, COHEN RE. Designing superoleophobic surfaces. **Science.** 2007;318:1618-1622.
- UUBAN RM, JACOBS JJ, TOMILSON MJ, GAVRILOVIC J, BLACK J, PEOCH M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. **J Bone Joint Surg.** 2000;82:457-477.
- VERRIER S, PALLU S, BAREILLE R, JONCZYK A, MEYER J, DARD M, AMÉDÉE J. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. **Biomater.** 2002;23:585-596.
- VON DER KALAUS K, PARK J. Engineering biocompatible implant surfaces Part II: Cellular recognition of biomaterial surfaces: Lessons from cell–matrix interactions. **Prog Mater Sci.** 2013;58:327-381.
- WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res.** 2009;20:172-184.
- WONG M, EULENBERGER J, SCHENK R, HUNZIKER E. Effect of surface-topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. **J Biomed Mater Res.** 1995;29:1567-1575.
- YANG B, UCHIDA M, KIM HM, ZHANG X, KOKUBO T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. **Biomater.** 2004;25:1003-1010.
- ZHAO C, JI W, HAN P, ZHANG J, JIANG Y, ZHANG X. In vitro and in vivo mineralization and osseointegration of nanostructured Ti6Al4V. **J Nanopart Res.** 2011;13:645-654.
- ZHAO G, ZINGER O, SCHWARTZ Z, WIELAND M, LANDOLT D, BOYAN BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. **Clin Oral Implants Res.** 2006;17:258-264.

ZINGER O, ANSELME K, DENZER A, HABERSETZER P, WIELAND M, JEANFILS J. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. **Biomater.** 2004;25:2695-2711.

ZINGER O, ZHAO G, SCHWARTZ Z, SIMPSON J, WIELAND M, LANDOLT D. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. **Biomater.** 2005;26:1837-1847.