

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

FELIPE SILVEIRA MAXIMO DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO DE SUPERFÍCIES
BIOMIMÉTICAS EM IMPLANTES DE TiCP**

**Rio de Janeiro
2016**

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

FELIPE SILVEIRA MAXIMO DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO DE SUPERFÍCIES
BIOMIMÉTICAS EM IMPLANTES DE TiCP**

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 Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Carlos Nelson Elias - D.C.
Prof. Daniel Jogaib Fernandes - D.C.

Rio de Janeiro
2016

c2016

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, microfilmar 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).

620.1 A447d	Almeida, Felipe Silveira Máximo de Desenvolvimento e desempenho de superfícies biomiméticas em implantes de TICIP / Felipe Silveira Máximo de Almeida; orientado por Carlos Nelson Elias e Daniel Jogaib Fernandes – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2016. 82p.: il. Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2016. 1. Curso de Ciência dos Materiais – teses e dissertações. 2. Implantes dentários. 3. Tratamento eletroquímico. I. Elias, Carlos Nelson. II. Fernandes, Daniel Jogaib. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.
----------------	---

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

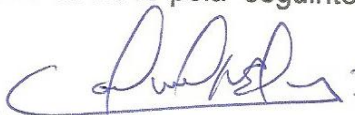
FELIPE SILVEIRA MAXIMO DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E DESEMPENHO DE SUPERFÍCIES BIOMIMÉTICAS
EM IMPLANTES DE TiCP**

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

Orientador: Prof. Carlos Nelson Elias, D.C.
Prof. Daniel Jogaib Fernandes, D.C.

Aprovada em 25 de Janeiro de 2016 pela seguinte Banca Examinadora:



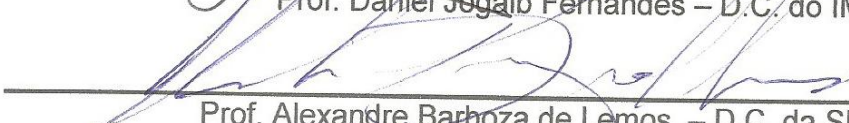
Prof. Carlos Nelson Elias – D.C. do IME



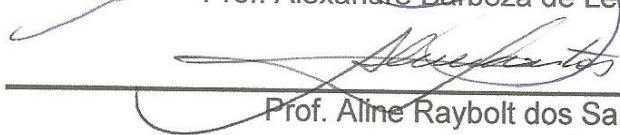
Prof. Eduardo Sousa Lima – D.C. da IME



Prof. Daniel Jogaib Fernandes – D.C. do IME



Prof. Alexandre Barboza de Lemos – D.C. da SLMandic



Prof. Aline Raybolt dos Santos – D.C. da UFRJ

Rio de Janeiro
2016

Dedico este trabalho à minha família, cujo apoio, amor e compreensão foram fundamentais para superar os momentos de dificuldade durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e co-orientador, Prof. Carlos Nelson Elias e Daniel Jogaib Fernandes pelo apoio e incentivos em todos os momentos, respectivamente.

A empresa Conexão[®] Sistema de Prótese por fornecer os implantes de titânio para este trabalho.

Ao Instituto Vital Brazil e seus funcionários por gentilmente prestarem ajuda e forneceram espaço para realização da parte in vivo deste estudo.

Ao CNPq pela bolsa de estudos cedida, a qual deu suporte a minha pesquisa.

À Profa. Mônica Calasans e a Suelen, da UFF, por auxiliar na parte laboratorial desta pesquisa.

Aos meus pais, Rêni Kerscher e Silvio Ari Kerscher pelo apoio e incentivo durante todo o estudo.

À Gabriela de Souza amiga e companheira sempre paciente nos momentos de necessidade, e que a todo instante arrimava meus passos por vezes irresolutos.

Ao Hector Borja e ao técnico de laboratório Joel, pela dedicação e ajuda inestimável na realização das análises de microscopia.

Ao Vitor Ramos, do CBPF, cuja ajuda foi fundamental para realização da parte de DRX e XRF deste trabalho.

Ao Dr. Fábio Monteiro, Dra. Jaqueline Cavalcante e Dr. Raphael Damiani que com muito carinho auxiliaram a parte cirúrgica desta pesquisa.

Ao Daniel Cohen pelo auxílio na parte de histologia.

Aos Profs. Sergio Neves, André Ben Hur e Leila Cruz pela gentileza e atenção em avaliar os pontos ainda parcos do trabalho em questão.

Ao Prof. Marcelo Prado sempre solícito, e que me orientou e apoiou em muitos pontos desta tese.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação do IME Heraldo, Diego, Samir, Simone, Milanese, Rebeca, Igor e Bárbara pelos bons momentos de convívio e cooperação ao longo do curso.

A todos os professores do IME, sempre cordiais, atenciosos e disponíveis, que contribuíram na minha formação e me auxiliaram na realização desse trabalho.

“Impossível um homem aprender aquilo
que ele acha que sabe.”

EPICTETO

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTAS DE SIMBOLOS	13
LISTAS DE SIGLAS	14
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 O titânio	21
3.2 Rugosidade e Molhabilidade	22
3.3 Torque de inserção e de remoção.....	24
3.4 Resposta tecidual nos biomateriais	25
3.5 Tratamento eletroquímico	26
3.6 Superfície com características nanométricas	27
3.7 Superfície tratada com flúor.....	29
3.8 Superfície tratada com cálcio	30
3.9 Superfície tratada com magnésio	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	33
4.2 Tratamento superficial	33
4.3 Tratamento eletroquímico	34
4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.5 Difração de raios-x (DRX).....	35
4.6 Fluorescência de raios-x (XRF)	36
4.7 Rugosidade	37
4.8 Molhabilidade	38
4.9 Ensaio <i>in vivo</i>	39
4.9.1 Comitê de ética.....	39
4.9.2 Amostras	39
4.9.3 Delineamento experimental	40
4.10 Condições de alojamento e alimentação dos animais.....	41
4.11 Procedimento anestésico dos animais	41
4.12 Procedimento cirúrgico dos animais	42
4.13 Torque de inserção e de remoção.....	43
4.14 Microscopia eletrônica de varredura <i>in vivo</i> (MEV- <i>in vivo</i>)	44
4.15 Histologia.....	45

4.15.1	Técnica de preparo e coloração	45
4.15.2	Análise histologia.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
5.2	Difração de raios-x (DRX).....	51
5.3	Fluorescência de raios-x (XRF)	53
5.4	Rugosidade	54
5.5	Molhabilidade	56
5.6	Microscopia eletrônica de varredura <i>in vivo</i> (MEV – <i>in vivo</i>)	58
5.7	Torque de inserção e de remoção	60
5.8	Histologia.....	61
6	CONCLUSÃO	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8	APÊNDICES.....	77
8.1	Dados completos da análise de rugosidade	78
8.2	Dados completos da análise do torque de inserção	80
9	ANEXO.....	81
9.1	Ficha de aprovação do comitê de ética e pesquisa animal (CEP).....	82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 4.1	Esquemática da metodologia utilizada no tratamento eletroquímico das superfícies	34
FIG. 4.2	Modelo Axios mAX (Panalytical) utilizado na análise por fluorescência de raios-x.....	36
FIG. 4.3	Rugosímetro de contato Mitutoyo SJ 201P	38
FIG. 4.4	Goniômetro FTA 100	39
FIG. 4.5A	Face interna da pata esquerda do coelho após tricotomia.....	42
FIG. 4.5B	Anti-sepsia realizada na tíbia do coelho.....	42
FIG. 4.5C	Exposição da tíbia como o auxílio da cureta Molt nº4.....	42
FIG. 4.5D	Preparos com a sequência de brocas do kit de implantes da Conexão® para a inserção dos 3 implantes.....	42
FIG. 4.5E	Instalação dos implantes na tíbia esquerda do coelho	42
FIG. 4.6	Esquemática das áreas de inserção dos implantes avaliados. A) parte proximal do osso tibial; B) terço medial do osso tibial; C) porção distal do osso tibial.	43
FIG. 4.7	Torquímetro digital Lutron (modelo TQ 8800).....	44
FIG. 4.8	(A) Posição para clivagem do conjunto bloco ósseo/implante. (B) Espécime após clivagem pronto para análise em MEV.	45
FIG. 4.9	Corte da amostra implante-osso para obter um fragmento de aproximadamente 200 µm colado na lâmina.....	46
FIG. 4.10	Implante incluído em resina Technovit e cortado no centro do longo eixo.....	46

FIG. 4.11	EXAKT Micro Grinding System 400 CS	47
FIG. 5.1	Morfologia das superfícies dos implantes. Grupo I, Grupo II e Grupo III (10.000x)	49
FIG. 5.2	Morfologia das superfícies dos implantes. Grupo I, Grupo II e Grupo III (50.000x)	50
FIG. 5.3	Espectro de difração de raios X da superfície Porous	51
FIG. 5.4	Espectro de difração de raios X da superfície Porous Nano	52
FIG. 5.5	Espectro de difração de raios X da superfície Porous CaMg	52
FIG. 5.6	Representação 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous. 55	
FIG. 5.7	Representação 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous Nano.....	55
FIG. 5.8	Representação 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous CaMg.....	56
FIG. 5.9	Molhabilidade da superfície dos implantes	57
FIG. 5.10	Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo I em 2 semanas (250x).....	58
FIG. 5.11	Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo II (A e B) em 2 semanas (250x).....	59
FIG. 5.12	Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo III (A e B) em 2 semanas (250x).....	59
FIG. 5.13	Relação tecido ósseo/superfície do implante na região cervical dos implantes (A e B) após 4 semanas de avaliação.....	59
FIG. 5.14	Relação tecido ósseo/superfície Porous Nano após 4 semanas com aumento de 3000x (A) e 10.000x (B).	60

FIG. 5.15	Corte histológico após 2 semanas do grupo Porous (A), Porous Nano (B) e Porous CaMg (C) 40x.....	63
FIG. 5.16	Corte histológico do grupo Porous após 4 semanas (A) e 8 semanas (B).....	64
FIG. 5.17	Corte histológico do grupo Porous Nano após 4 semanas (A) e 8 semanas (B).....	64
FIG. 5.18	Corte histológico do grupo Porous CaMg após 4 semanas (A) e 8 semanas (B).....	65

LISTA DE TABELAS

TAB. 4.1	Divisão dos animais por grupos nos períodos de 2, 4 e 8 semanas para a avaliação do torque de remoção, inserção e MEV	40
TAB. 4.2	Divisão dos animais por grupos nos períodos de 2, 4 e 8 semanas para a avaliação histológica.....	41
TAB. 4.3	Sequência utilizada de lixas d'água para a reduzir a espessura dos fragmentos.....	47
TAB. 5.1	Composição química, obtidas por XRF das superfícies Porous, Porous Nano e Porous CaMg	53
TAB. 5.2	Parâmetros da rugosidade de superfície (μm) dos implantes.....	54
TAB. 5.3	Parâmetros da molhabilidade superficial (μm) dos grupos I, II e III	56
TAB. 5.4	Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes do grupo Porous para 2, 4 e 8 semanas de vida.....	60
TAB. 5.5	Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes do grupo Porous Nano para 2, 4 e 8 semanas de vida	61
TAB. 5.6	Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes do grupo Porous CaMg para 2, 4 e 8 semanas de vida	62

LISTAS DE SIMBOLOS

IM	-	Via de administração Intramuscular
SC	-	Via de administração Subcutânea
IV	-	Via de administração Intravenosa
Ti CP	-	Titânio comercialmente puro
Ti G4	-	Titânio Grau 4
Ra	-	Média aritmética da rugosidade
Rq	-	Média quadrática da rugosidade
Rz	-	Rugosidade média total
Rmax	-	Rugosidade total
PA	-	Pró análise (grau de pureza elevado para análise química)

LISTAS DE SIGLAS

BIC	Bone implant contact
EDS	Energy Dispersive X-ray Detector
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
ISO	International Organization for Standardization
IVB	Instituto Vital Brasil
UFF	Universidade Federal Fluminense

RESUMO

Nas últimas décadas, os tratamentos de superfície dos implantes dentários osseointegráveis sofreram diversas modificações com o objetivo de melhorar tanto a estabilidade primária quanto a estabilidade secundária (osseointegração). Entre as alterações da superfície implantar, chamam a atenção as que recebem deposição de íons, como flúor, cálcio e magnésio. Estes íons possuem baixa taxa de degradação nos fluidos corpóreos e ótima interação biológica com o tecido ósseo periimplantares. No presente trabalho, as superfícies de implantes de Ti G4 foram alteradas mediante a deposição de F, Ca e Mg e através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, avaliaram-se os efeitos destas alterações na osseointegração. Os torques de inserção e remoção após 2, 4 e 8 semanas em tíbias de coelhos foram medidos. Os ensaios *in vivo* foram complementados pela medida da rugosidade, molhabilidade, difração de raios-x, fluorescência de raios-x e análise da superfície em microscopia eletrônica de varredura. Os dados obtidos foram comparados com os obtidos com implantes com a superfície tratada com ácido (superfície Porous[®]). Os resultados encontrados mostraram que o grupo tratado com flúor apresentou melhores resultados quanto ao torque de remoção ($17,93 \pm 4,47$ N.cm) da tíbia de coelhos e que a superfície com Ca e Mg foi a que apresentou a interface osso-implante com menor resistência em todos os tempos após a cirurgia. Além disso, a superfície com Ca e Mg apresentou ligeira modificação na topografia superficial.

ABSTRACT

The surface treatments of osseointegrated dental implants have undergone various modifications in order to improve both the primary stability as the secondary stability. Among the various modifications of the implant surface, they draw attention those receiving deposition of ions, such as fluorine, calcium and magnesium. These ions have a low rate of degradation in body fluids and great biological interaction with the peri-implant bone tissue. This paper, through in vitro and in vivo testings, aims to assess the effects of the presence of F, Ca and Mg in osseointegration. Was defined insertion and removal torque after 2, 4 and 8 weeks by inserting implants into the tibia of rabbits. In vivo testing was complemented by measuring the roughness, wetability, diffraction of x-rays, x-rays fluorescence and surface analysis with scanning electron microscopy. The data obtained were compared with those obtained with implants with the acid treated surface (Porous[®] surface). The results showed that the group treated with fluoride showed better results on the removal torque (17.93 ± 4.47 N.cm) of the tibia of rabbits and that the surface with Ca and Mg was the one with the bone-interface implant with lower resistance at all times after surgery. Furthermore, the surface with Ca and Mg showed slight change in the surface topography.

1 INTRODUÇÃO

Os materiais metálicos são utilizados na fabricação de diversos tipos de implantes desde o século XVI. O primeiro metal desenvolvido especificamente para implantes em seres humanos foi usado na fabricação de placas e parafusos para reparo de fratura óssea (PARK & LAKES, 2007).

O titânio comercialmente puro é o principal biomaterial utilizado na fabricação de implantes dentários osseointegráveis devido a sua excelente biocompatibilidade e ótimas propriedades conhecidas para tal aplicabilidade (ALBREKTSSON & WENNERBERG, 2004). Devido as restrições quanto às propriedades física, químicas e mecânicas para as aplicações em outra área biomédica, outras ligas metálicas têm sido utilizadas, e o Ti CP (comercialmente puro) tem aplicabilidade restringida na área odontológica (PARK & LAKES, 2007).

O professor Per Ingvar Brånemark é conhecido como o precursor da implantodontia e foi o principal divulgador das diferentes técnicas cirúrgicas de implantação. Após a divulgação de seus trabalhos, foram realizados estudos para melhorar as propriedades das superfícies dos implantes dentários osseointegráveis com o objetivo de aumentar o índice de sucesso do tratamento e permitir a instalação de implantes em áreas consideradas críticas devido à qualidade inadequada do osso no local de inserção (ANNUNZIATA et al, 2010; SUBRAMANI et al, 2012; BRESSAN et al, 2013). Paralelamente, surgiram novos desafios, destacando-se as exigências estéticas e funcionais para mimetizar a dentição natural (LEBLEBICIOGLU et al, 2007). Com essas múltiplas exigências dos pacientes, houve a necessidade de redução do tempo de tratamento, através da redução do período cicatricial anterior ao carregamento protético e à longevidade do tratamento (RAGHAVENDRA et al, 2005).

Para melhorar a resposta de cicatrização óssea, diversos tipos de tratamentos de superfícies de implantes foram desenvolvidos. As superfícies dos implantes atuais, são as chamadas de osteoindutoras (KIM et al, 2013; BRESSAN et al, 2013; MINTS et al, 2014; LE GUÉHENNEC et al, 2015). Neste caso, além de ocorrer a formação e crescimento ósseo na direção osso-implante, há deposição de “*novo*

osso”, também, na direção implante-osso; este princípio leva a um reparo mais rápido da interface entre a superfície do implante e o tecido ósseo (MORRA et al, 2003).

Alguns estudos demonstraram que o revestimento e/ou adição de íons na superfície dos implantes aumenta a resistência da interface osso-implante após a cicatrização e osseointegração, melhora a resistência à corrosão (MARIEB, 1995; NELSON et al, 2003), e altera os mecanismos envolvidos na osseointegração (ELLINGSEN et al, 2004).

A estabilidade da interface osso/implante é fundamental para o sucesso do tratamento com implantes, pois favorece a realização de eventos necessários para a reparação óssea, tais como: adsorção de proteínas; liberação de fatores de crescimento; vasoconstrição; interação dos fatores de coagulação; produção de fibrilas; e todas as etapas de neoformação óssea (DAVIES, 2005; ALBERTS et al, 2008). Portanto, a estabilidade da ligação osso/implante depende da rugosidade, da composição química e de outras propriedades da superfície dos implantes.

Grande parte dos estudos de sequenciamento e de natureza descritiva envolve a análise de dados básicos obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (MORRA et al, 2003; MONJO et al, 2008; SUL et al, 2010). Não obstante, mais análises de dados são necessárias para compreender plenamente o significado biológico dos dados e explorar todo o seu potencial.

A resposta dos tecidos na fase de instalação do implante determina o sucesso do processo de cura. Esta resposta não é dependente apenas da morfologia superficial, mas também da molhabilidade e da composição químicas da superfície do implante (RAMIS et al, 2012). Por isso a importância de se estudar a influência de diferentes tratamentos de superfícies na reação tecidual.

Não obstante, as explicações atuais dos mecanismos envolvidos no processo de interação implante/tecido ósseo são insuficientes e a identificação dos fenômenos envolvidos nestas ações é fundamental para o avanço científico (ELIAS, 2011). Além disto, não há na literatura dados que possam ser utilizados para a reprodução dos tratamentos das superfícies mediante a deposição destes íons, uma vez que estas informações são de caráter tecnológico e envolvem interesses comerciais patenteáveis.

No presente trabalho, foram desenvolvidas metodologias de tratamentos de superfícies de implantes dentários osseointegráveis com mudanças na composição química, rugosidade e molhabilidade. Foram empregados métodos de tratamento com a adição de flúor, magnésio e cálcio na forma de revestimento superficial com características nanométricas.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivos:

- a) Desenvolver, caracterizar e analisar novas superfícies de implantes dentários osseointegráveis;
- b) Analisar a influência da adição de Ca, Mg e F na osseointegração;
- c) Comparar o desempenho com outros tipos de tratamentos superficiais;
- d) Analisar a interação celular com as superfícies.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O TITÂNIO

O titânio é o quarto metal mais abundante na crosta terrestre depois de alumínio, ferro e magnésio. Os principais minérios para obtenção do titânio são a ilmenita (FeTiO_3) e o rutilo (TiO_2) (LÜTJERING G & WILLIAMS JC, 2007). Este metal é muito utilizado, principalmente, nas indústrias aeronáuticas (LÜTJERING G & WILLIAMS JC, 2007).

O titânio comercialmente puro é o biomaterial que apresenta as melhores propriedades para aplicações em implantes dentários osseointegráveis (BRUNETTE et al, 2001). Este comportamento está associado a algumas propriedades importantes que permitem sua aplicação como biomaterial, entre elas estão: a) formação espontânea de uma camada de dióxido altamente biocompatível favorecendo a adesão de células (BRUNETTE et al, 2001); b) resistência à corrosão em ambientes corpóreos (PROBSTER et al, 1992); c) capacidade de atuar nas reações de redox na interface tecidual influenciando no comportamento dos tecidos (BRUNETTE et al, 2001); d) adequada resistência mecânica (RYU et al, 2013) e e) biocompatibilidade (ALLEGRINI et al, 2014).

Quando um material metálico é implantado num corpo humano, imediatamente ocorrem vários eventos em cascata entre a superfície e os tecidos biológicos (WILLIAMS, 2001).

A biocompatibilidade do implante de titânio garante a compatibilidade biológica, evitando assim que haja uma reação de corpo estranho, o que levaria à falha do mesmo (PARK & LAKES, 2007). Não obstante, o conceito de biocompatibilidade está, também, relacionado à capacidade de um material desempenhar uma função específica, podendo esta função variar de acordo com o local implantado (ELIAS, 2011).

A formação da camada de óxido na superfície do implante quando exposta ao ar ou a uma atmosfera oxidante confere ao titânio uma barreira protetora a qual

proporciona excelente resistência à corrosão (TEXTOR, 2001). No entanto, esta camada de óxido de titânio que se forma espontaneamente não apresenta qualidades adequadas para garantir a biocompatibilidade do titânio. Ainda em relação à camada de óxido de titânio, é necessário alterar as propriedades químicas e físicas da superfície do implante para modificar a energia superficial e obter mecanismos adequados nas etapas dos processos celulares, como a adesão (FENG et al, 2004) e sinalização celular (ZREIQAT et al, 2005).

A matéria prima utilizada na fabricação dos implantes devem ter excelente resistência à corrosão, uma vez que esta degradação pode levar à liberação de íons que comprometem o desempenho do implante, e os produtos oriundos desse evento modificam os tecidos na região circunvizinha, resultando em efeitos indesejáveis para o organismo humano, o qual é conhecido como metalose (PARK & LAKES, 2007).

A literatura cita, também, outro fator que influencia na resposta tecidual óssea que é a alteração da estrutura cristalina da superfície dos implantes (SUL et al, 2005). A presença das fases rutilo e anatásio influenciam positivamente na resposta celular quando comparado a presença apenas de anatásio ou fase amorfa (SUL et al, 2001; SUL et al, 2002a; SUL et al, 2002b).

3.2 RUGOSIDADE E MOLHABILIDADE

As influências da morfologia (WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2009), a rugosidade (HE et al, 2011) e a molhabilidade (ELIAS et al, 2008) no processo de osseointegração são parâmetros de constantes estudos. A modificação da superfície é uma alternativa importante para obter um caráter biofuncional dos metais para uso biomédico, incluindo a área da odontologia (HANAWA, 2010).

ELIAS et al, em 2008, analisaram as propriedades que o Ti CP deve apresentar para o uso na implantodontia odontológica, destacando a importância da rugosidade e da molhabilidade na osseointegração. As morfologias e rugosidades de superfície dos implantes (avaliadas através do S_a , que corresponde a média 3D da rugosidade

superficial) são divididas em 4 grupos: usinada ($Sa < 0.5\mu\text{m}$); pouco rugosa ($Sa 0,5-1\mu\text{m}$); moderadamente rugosa ($Sa 1-2\mu\text{m}$) e rugosa ($Sa > 2\mu\text{m}$) (WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2009; ALBERTINI et al, 2015). Superfícies moderadamente rugosas ($Sa 1-2\mu\text{m}$) apresentam algumas vantagens clínicas sobre superfícies mais lisas ou mais rugosas (ALBREKTSSON & WENNERBERG, 2004; WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2009).

Entre os processos de tratamentos para promover a rugosidade adequada das superfícies de implantes destacam-se: ataque ácido, jateamento e anodização. Os mais utilizados são os duplo condicionamentos ácidos (Elias et al, 2012), o jateamento seguido de ataque ácido (KIM et al, 2015); a anodização (SALOU et al, 2015) e os implantes conhecidos como bioativos (aqueles que recebem algum tipo de modificação na superfície como, por exemplo, deposição de elementos químicos com o intuito de aumentar sua interação biológica) (ANIL et al, 2011).

A superfície implantar condicionada com ataque ácido apresenta morfologia superficial que varia de acordo com as condições de tratamento como: tipo de ácido, composições das soluções ácidas usadas nas misturas, tempo e temperatura do tratamento. Através do tratamento ácido é possível controlar a rugosidade, número, tamanho e distribuição dos poros em escalas micrométricas e nanométricas (ELIAS, 2011). Após os tratamentos com ácidos, a rugosidade superficial do implante apresenta uma característica mais homogênea. Além disso, há um aumento da área superficial promovendo uma melhor adesão celular. Um dos tratamentos sugeridos indica a imersão dos implantes durante 72 horas em banhos de soluções contendo $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$, HF/HNO_3 e HNO_3 (LIMA et al, 2003).

O aumento da área de superfície aumenta a energia de superfície dos implantes de titânio, o qual está diretamente relacionado ao grau de molhabilidade superficial. A molhabilidade é considerada pela literatura como o fator de grande influência no BIC (Bone Implant Contact) (ALBREKTSSON et al, 1981; LEE et al, 2015). A quantidade e qualidade de osso peri-implantar em contato com a superfície do implante é avaliada pelo BIC.

Uma das maneiras de quantificar a energia de uma superfície é através do ângulo de contato do líquido com a superfície (HIEMENZ, 1997). Por meio de um modelo matemático, conhecido como método de Young, é possível obter a energia

da superfície. O resultado obtido é representado pela EQ.

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

Nesta equação o termo γ_{SL} indica a energia da interface sólido-líquido, γ_{SV} representa a energia entre sólido e vapor e γ_{LV} representa a energia da interface líquido-vapor (HIEMENZ, 1997).

Os tratamentos superficiais promovem um aumento da rugosidade da superfície dos implantes levando a um aumento da energia superficial. Quando ocorre aumento da energia superficial dos implantes há redução do ângulo de contato (BATHOMARCO, 2004), que é representativo de uma melhor interação com o leito receptor ósseo, principalmente à nível celular (ANIL et al, 2011).

Outro aspecto a ser considerado em relação ao efeito microestrutural da superfície na adesão celular é o tipo de célula estimulada. ELIAS, em 2011, relata a característica de rugofilia apresentada pelas células ósseas. A literatura relata que superfícies rugosas são preferidas por células como osteoblastos, macrófagos, células epiteliais e leucócitos são mais atraídas por superfícies lisas.

3.3 TORQUE DE INSERÇÃO E DE REMOÇÃO

Análises de torque de inserção (TI) e de torque remoção (TR) têm sido comumente utilizados para avaliar a resistência mecânica da interface implante-osso (MARIN et al, 2008, KIM et al, 2013) e da estabilidade mecânica do implante (TABASSUM et al, 2013). O BIC está diretamente relacionado com a resistência à remoção dos implantes ósseos (MARIN et al, 2008) e com a estabilidade implantar (ELIAS et al, 2010).

A estabilidade de um implante depende da ligação mecânica da superfície do implante com o osso circundante. Para fins de estudos a estabilidade é dividida em estabilidade primária, secundária e terciária. Todas elas influenciam a manutenção da osseointegração (ELIAS, 2011). A estabilidade primária dos implantes dentários é determinada imediatamente após a inserção. Ela pode ser mensurada por uma análise de torque de inserção e, em conjunto com a morfologia superficial, auxilia o processo de osseointegração. O tratamento da superfície favorece a realização de

eventos necessários para a reparação óssea, tais como: adsorção de proteínas, liberação de fatores de crescimento, vasoconstrição, interação dos fatores de coagulação, produção de fibrilas e todas as etapas de neoformação óssea (DAVIES, 2005; ALBERTS et al, 2008; TABASSUM et al, 2013).

Alguns pesquisadores demonstraram que a rugosidade superficial de um implante aumenta a ancoragem biomecânica no tecido ósseo (CHO E PARK, 2003; YUAN et al, 2014). Segundo estudo realizado por SANTOS et al, (2011), este travamento é influenciado em parte pelo coeficiente de atrito existente entre a superfície implantar e o osso nativo.

3.4 RESPOSTA TECIDUAL NOS BIOMATERIAIS

O termo biomaterial é definido como sendo qualquer substância ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, utilizada para uma função específica e por um período de tempo determinado ou indeterminado, para melhorar, aumentar e/ou substituir, de maneira parcial ou total, os tecidos ou os órgãos de um indivíduo sem ou com reduzida toxicidade para a função específica (PARK & LAKES, 2007).

A resposta biológica após a implantação de um biomaterial está relacionada à velocidade e à qualidade do processo de reparo da superfície osso/implante. A biologia local, o reparo peri-implantar, e a manutenção e longevidade dos resultados dependem fortemente das propriedades físico-químicas das superfícies implantares (RAMIS et al, 2012).

Os implantes dentários apresentam diversos níveis de escala geométrica, indo desde a macro, que dizem a respeito à forma e dimensões dos implantes, até escalas menores conhecidas como micro e nanométricas que caracterizam a morfologia da superfície. Todos os tipos de escalas influenciam de alguma forma no desempenho dos implantes (ELIAS & MATTOS, 2009).

Após a implantação de um biomaterial, a superfície entra em contato com proteínas, íons e outros componentes presentes no sangue e nos fluidos teciduais (ZHAO et al, 2004).

Múltiplas características superficiais afetam o processo de osseointegração incluindo topografia (ELIAS, 2011), química (ABURAYA, 2011), carga elétrica (PARK et al, 2010), molhabilidade (ISA et al, 2006; PARK et al, 2010) e energia de superfície (PEGUEROLES et al, 2008).

A osseointegração foi definida, segundo o professor BRÅNEMARK (1969), como sendo “a conexão, direta, estrutural e funcional entre o osso vital organizado e a superfície de um implante de titânio, capaz de receber carga funcional”. Este conceito foi alterado após longos anos. Atualmente, a definição de osseointegração esta relacionada “ao íntimo contato de células ósseas com a superfície do implante” (ISO 16443: DENTISTRY – TERMINOLOGY).

A osseointegração tem como principal célula de atuação o osteoblasto. Estas células são responsáveis pela secreção da matriz óssea. As atividades osteoblásticas são essenciais tanto na formação óssea como na manutenção deste tecido (esta segunda característica é realizada pelos osteoblastos maduros, conhecidos como osteócitos) (ALBERTS et al, 2008). As células osteoblásticas podem ser estimuladas de diversos modos, pela superfície dos implantes, tais como: nível adequado de rugosidade (ELIAS, 2011), já citado anteriormente, pela presença de íons (PARK et al, 2010) e pela energia de superfície (PEGUEROLES et al, 2008).

Alguns estudos mostraram que o revestimento do Ti com adição de cálcio (COELHO & LEMONS, 2009), magnésio (SUL et al, 2010) e flúor (ISA et al, 2006; HE et al, 2011) na superfície dos implantes aumenta a resistência da interface osso-implante após a cicatrização, melhora a resistência à corrosão (MARIEB, 1995; NELSON et al, 2003) e altera os mecanismos envolvidos na osseointegração (ELLINGSEN et al, 2004).

3.5 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO

Os métodos dos tratamentos eletroquímicos são utilizados no tratamento da superfície dos implantes para melhorar a osseointegração. Variando o eletrólito e alguns dos parâmetros do processo como: potencial do eletrodo, temperatura (BAN et al, 1996) intensidade e voltagem de corrente, o tratamento induzirá à formação de

superfícies de implantes com características diferentes (LAUSMAA, 2001).

Neste tipo de tratamento, os espécimes a serem tratados são inseridos na posição de anodos em um circuito eletroquímico. Quando a fonte elétrica é ligada, a corrente flui através do circuito devido às reações de oxidação e redução nos eletrodos e condução iônica no eletrólito (DENARO, 1974).

ZHU et al, em 2001, analisaram a influência da densidade de corrente e da voltagem na rugosidade superficial do titânio. Observaram que com o aumento da corrente e/ou da voltagem ocorre uma elevação da rugosidade, sendo que a voltagem tem maior influência. O mesmo foi apresentado pela variação da concentração do eletrólito (glicerofostato de cálcio).

SUL et al (2001) observaram aumento da resposta óssea proporcionalmente ao aumento da espessura da camada de óxido na superfície de implantes de titânio submetidos ao tratamento eletroquímico. Não obstante, os autores perceberam que mudanças de rugosidade e/ou mudanças de cristalinidade parecem ser as razões mais plausíveis para a melhorar a resposta óssea dos implantes com diferentes espessura de óxido. Várias propriedades da superfície como: espessura da camada de óxido, diferença de cristalinidade, rugosidade, morfologia, ou a combinação entre elas (SUL et al, 2002) podem explicar as diferenças no comportamento dos implantes .

A literatura mostra que a utilização da eletrodeposição como método de cobertura de superfícies de titânio é efetiva (HEREDIA et al, 2007) e apresenta bons resultados quando aplicado em estudos de nanotecnologia (WANG et al, 2014; LI et al, 2015). Implantes submetidos a este tipo de tratamento são conhecidos como implantes bioativos por serem capazes de promover uma conexão com o tecido ósseo por meio de pontes de cálcio e fósforo (ELIAS, 2011).

3.6 SUPERFÍCIES COM CARACTERÍSTICAS NANOMÉTRICAS

Além da rugosidade (ELIAS & MEIRELLES, 2010) há necessidade da superfície do implante apresentar características em escala nanométrica, as quais melhoram a osseointegração (SALOU et al, 2015). Características micro/nanométricas,

normalmente, apresentam uma melhor molhabilidade e hidrofiliidade superficial (WANG et al, 2013).

As nanotecnologias englobam a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com controle da forma e tamanho em escala nanométrica. A faixa de tamanho nanométrico de interesse na implantodontia situa-se entre 100 nm até aproximadamente 0,2 nm (DOWLING, 2004).

O tratamento da superfície dos implantes mediante a combinação de ácidos é efetiva na obtenção de morfologias com nanorugosidade com espessura de óxido entre 20-100 nm. Por exemplo, o emprego de soluções contendo H_2SO_4 e H_2O_2 à temperatura constante permite a obtenção de superfícies com nanorugosidades. O número e a profundidade das nanorugosidades podem ser controlados pela alteração dos parâmetros do tratamento (BRESSAN et al, 2013).

As rugosidades nanométricas têm a capacidade de melhorar a adsorção de proteínas (SUBRAMANI et al, 2012), aumentar a energia da superfície, melhorar a bioatividade, promover maior adesão e crescimento de osteoblastos (WANG et al, 2013).

O grande desafio é conseguir controlar as propriedades da superfície dos implantes ao nível das interações protéicas e celulares (escala nano) (SUBRAMANI et al, 2012). Esta comunicação celular é bastante estudada através de pesquisas científicas que utilizam superfícies osteoindutoras como principal ponto de partida (GRAVINA, 2010; RYU et al, 2013; DAVISON et al, 2015).

Superfícies osteoindutoras são capazes de incitar a atividade osteoblástica do tecido ósseo do leito receptor (MARQUES, 2007). Segundo DAVIES (2005) este tipo de resposta óssea é de extrema importância para a redução do tempo de estabilização do implante, este fenômeno é conhecido como osteogênese de contato.

Implantes que apresentam deposição de íons, como por exemplo, de flúor, magnésio e cálcio na superfície possuem características osteoindutoras (ANNUNZIATA et al, 2010; SUL et al, 2010; DERKSEN et al, 2014).

As alterações na composição química da camada de óxido têm, também, a capacidade de influenciar o tipo de íon a ser adsorvido (HANAWA, 1991).

3.7 SUPERFÍCIES TRATADAS COM FLUOR

O uso do flúor é conhecido na literatura por sua capacidade de auxílio na formação óssea devido ao seu estímulo à proliferação osteoblástica (RAMIS et al, 2012). Por isso, a modificação das superfícies pela presença deste íon apresenta melhora na osseointegração (ISA et al, 2006; YEO, 2014). Esta estimulação da diferenciação de células ósseas também foi citado por RAMIS et al, em 2012, em um estudo de análise da resposta gênica neste tipo de superfície.

O fluoreto tem a capacidade de estimular a fosfatase alcalina (FARLEY et al, 1983), a qual por sua vez está envolvida na produção de cristais de apatita (ROBISON, 1923), logo, está relacionada diretamente com o aumento a atividade dos osteoblastos (RAMIS et al, 2012).

Pequenas quantidades de fluoreto facilitam a cinética da formação de cristais de fluorapatita (EANES et al, 1978). Esta forma de apatita é mais estável do que a hidroxiapatita (MORENO et al, 2003). O aumento da taxa de precipitação de fluorapatita pode influenciar favoravelmente a biomineralização óssea (MEIRELLES et al, 2008).

Em uma análise in vivo, a modificação de uma superfície de implante, através da deposição de flúor, aumentou a formação óssea na interface tecido/implante. Uma matriz óssea mais madura e mineralizada também foi observada (MONJO et al, 2008). A ancoragem óssea aumenta (ELLINGSEN et al, 2004) e melhora as propriedades biomecânicas da interface implante-osso (MONJO et al, 2008).

ANNUNZIATA et al (2010) compararam a resposta de células da medula óssea em superfícies de titânio jateadas e modificadas com flúor com a superfície de titânio jateada. Diversas diferenças foram observadas (fosfatase alcalina, osteocalcina, osteoprotegerina, matriz mineralizada e colágeno tipo I) e todos os melhores resultados foram obtidos no grupo que recebeu flúor na superfície do implante. Os autores também observaram adesão e proliferação celular superior no grupo contendo flúor.

3.8 SUPERFÍCIES TRATADAS COM ADIÇÃO DE CÁLCIO

A cobertura das superfícies de implantes com cálcio tem sido estudada em virtude da sua similaridade química com o osso mineral (YANG, 2001; PARK et al, 2005; HAGI et al, 2010; DERKSEN et al, 2014). Este elemento é encontrado em grandes proporções na hidroxiapatita [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] presente no tecido ósseo, que é o principal componente deste tecido (KARAPILIS, 2008). A deposição de Ca nas superfícies de titânio é indicada para mimetizar o ambiente *in vivo* e favorecer a osseointegração (PARK et al, 2005).

A adição de Ca apresenta bons resultados em relação à melhora na osseointegração (SUL, 2002; PARK et al, 2005; DERKSEN et al, 2014) tanto na neoformação óssea (RIBEIRO et al, 2015) quanto no que diz respeito ao aumento da estabilidade do implante (ISA et al, 2006).

Além disso, a resistência às forças de cisalhamento em ensaios de inserção de implantes é superior em implantes revestidos com cálcio e fosfato de Ca em relação ao não revestido (HAGI et al, 2010).

Existem indícios de que a presença de íons de cálcio na superfície do implante está diretamente relacionada ao aumento da capacidade de atração e de ligação de proteínas à superfície do titânio (HAGI et al, 2010). Estudos como o de SUL (2002), XUEREB et al (2015), RIBEIRO et al (2015) e LE GUÉHENNEC et al (2015) comprovam esta melhora efetiva no emprego de íons de cálcio nos resultados *in vitro* e *in vivo*.

ABRAHAMSSON et al (2013) avaliaram, em cães, a cicatrização de tecidos ósseos e mucosa ao redor de implantes com superfície tratadas com duplo ataque ácido e com deposição de fosfato de Ca (NanoTite) e sem fosfato de Ca (Osseotite). Após quatro semanas o grau de contato osso/implante foi maior em implantes com fosfato de cálcio.

3.9 SUPERFÍCIES TRATADAS COM MAGNÉSIO

Outro possível elemento químico que pode ser usado nas superfícies bioativas do titânio é o magnésio. O magnésio é um dos elementos mais abundantes no tecido ósseo humano, e tem grande importância na absorção de cálcio e do sódio (SUL et al, 2010). O Mg não é somente essencial para o metabolismo humano, como também inibe a cristalização da apatita em solução. Vários estudos in vivo (SUL et al, 2006; PARK et al, 2010; SUL et al, 2010) mostraram que a incorporação de íons de Mg no Ti melhora significativamente as respostas ósseas em relação aos implantes usinados.

Assim como o flúor (RAMIS et al, 2012) e o cálcio (RIBEIRO et al, 2015), a presença do magnésio (SUL et al, 2006) apresenta ótimos resultados quando se trata de estimular células do tecido ósseo. E a associação entre íons, similarmente, promove uma aceleração da resposta tecidual comparado com superfícies não bioativas (LOZANO et al, 2013).

PARK et al (2010) investigaram as características superficiais e a osteocondutividade em ensaios in vitro de uma superfície de Ti CP contendo Mg incorporado por processo hidrotérmico. Foram avaliadas a adesão e a proliferação de células pré-osteoblásticas, a atividade da fosfatase alcalina e a análise quantitativa dos genes de expressão osteoblástica. Foi concluído neste estudo que o tratamento com Mg promove aumento da atividade das células osteoblásticas, aumento na diferenciação de células pré-osteoblásticas, crescimento das células com maior atividade da fosfatase alcalina, assim como da expressão de várias integrinas, maior expressão do Dlx5 (regulador da osteogênese) que induz a diferenciação osteoblástica pelo controle da expressão dos genes do fenótipo osteoblástico.

Implantes contendo Mg na superfície apresentam melhor resposta óssea em relação aos implantes que as superfícies anodizadas e/ou com duplo ataque ácido. A modificação da composição química da superfície através da adição deste elemento indica aumento da velocidade e da resistência ao torque de remoção da osseointegração do Ti CP (SUL et al, 2006). Os resultados dependem das proporções de magnésio na solução eletrolítica, os quais são capazes de modificar a

superfície quanto ao caráter morfológico e em relação a homogeneidade da cobertura (HEREDIA et al, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

No presente trabalho foram utilizados 30 discos de 15,0 mm de diâmetro (10 para cada grupo) e 45 implantes de Ti CP (ASTM G4) (15 para cada grupo) com 2,0 mm de diâmetro, 5,0 mm de comprimento e 1,0 mm de perfil transmucoso.

Os discos foram utilizados na realização dos ensaios *in vitro* (medida da rugosidade, molhabilidade, análise DRX, XRF e em MEV) e os implantes nos ensaios *in vivo* mediante a instalação e remoção cirúrgica de tíbias de coelhos (histologia, torque de inserção e remoção).

Os implantes e discos foram cedidos pela empresa Conexão[®] Sistemas de Prótese.

4.2 TRATAMENTO SUPERFÍCIAL

Os tratamentos das superfícies dos implantes foram iniciados pelo duplo ataque ácido. Esse tratamento é feito pela imersão das amostras em um primeiro banho de solução contendo $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HCl}$ e uma segunda imersão em HNO_3 . No preparo da amostra, a solução é mantida em agitação para garantir que o oxigênio liberado na reação com o titânio não forme uma película protetora. Este tratamento é o mesmo adotado pela empresa Conexão[®] Sistemas e Prótese (Arujá, SP) para preparar as superfícies dos implantes odontológicos, o qual possui a designação comercial superfície Porous[®]. Este tratamento proporciona melhor condição para a proliferação celular. Além disso, há aumento da área superficial e induz melhor estabilidade primária e bioadesão celular.

Após os tratamentos com ácido, foram realizados os tratamentos eletroquímicos das superfícies dos implantes e discos mediante a deposição de íons de Ca, Mg e F para que uma nova superfície fosse desenvolvida.

As amostras foram divididas em três Grupos, a saber:

Grupo I: somente com tratamento com ácido (Porous[®])

Grupo II: Porous + tratamento com fluoretos (Porous Nano[®])

Grupo III: Porous + tratamento com Ca e Mg (Porous CaMg)

Através do tratamento da superfície dos implantes e dos discos, foi possível modificar a rugosidade, o tamanho e a distribuição das porosidades em escala micro e nanométrica.

Os desempenhos dos novos tratamentos das superfícies foram comparados com o tratamento com ácido.

4.3 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO

Neste método, os espécimes (implantes e discos) a serem tratados foram colocados na posição de anodo e uma placa de platina foi utilizada como catodo, em um circuito eletroquímico (FIG. 4.1).

Soluções eletrolíticas contendo flúor (grupo Porous Nano) e/ou contendo cálcio e magnésio (grupo Porous CaMg) foram utilizadas neste estudo como eletrólito.

O tratamento CaMg está em fase de estudo e possivelmente será solicitado o pedido de patente.

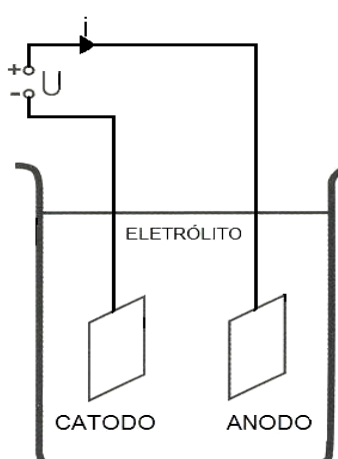


FIG. 4.1: Esquematização da metodologia utilizada no tratamento eletroquímico das superfícies.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Antes dos ensaios *in vivo*, as morfologias das superfícies das amostras dos diferentes grupos foram analisadas no MEV (FEI Quanta FEG250).

Duas amostras de cada grupo foram selecionadas para esta análise em alto vácuo no microscópio eletrônico de varredura. Não houve nenhum tipo de recobrimento prévio dos implantes e placas.

4.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A influência dos tratamentos das superfícies nas fases presentes nas superfícies dos discos foi determinada pela técnica de incidência rasante por difração de raios-X ou GIXRD (do inglês, *grazing incidence x-ray diffraction*). O emprego desta técnica teve como objetivo melhorar o sinal difratado pela camada superficial de óxido. Foram analisados os ângulos de incidência até 5°. Dessa forma os raios-x incidem paralelamente à superfície da amostra intensificando apenas o material depositado no revestimento do óxido de Ti. Para escolher o melhor ângulo de incidência, fez-se ensaios preliminares com várias posições de ângulo incidente. A faixa de ângulos que apresentou sinal difratado pela camada depositada maior que o sinal difratado pelo substrato foi a escolhida para as análises (melhor ângulo = 3°).

As análises de difração de raios-X foram feitas no difratômetro do CBPF, modelo Panalytical PRO XPD, equipado com espelho intensificador para análises de filmes finos com máscara de 4mm, fenda incidente de 0,5°, colimador de 0,27° para filmes finos e monocromador de placa plana de grafite. O tubo de raios-x usado foi o de anodo de cobre (1,54Å). As varreduras foram realizadas com parâmetro de 2 θ (20-100°) com tempo de coleta de 2 segundos e passo de 0,05°.

Foi utilizado o programa HighScore v 3.0e (3.0.5) PANalytical 2012 (licenciado para a UERJ) para análise qualitativa das amostras e o programa TOPAS-Academic V5 (Licenciado para o CBPF) para avaliação quantitativa pelo método de Rietveld.

4.6 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF)

Como o objetivo de identificar os elementos químicos nas amostras foi utilizada a técnica de fluorescência de raios-X com o equipamento do CBPF, modelo Axios mAX da Panalytical (FIG. 4.2). Esse espectrômetro sequencial é baseado em análises de espalhamento dispersivo por comprimento de onda (WDS), com tubo de raios-X com anodo de ródio (Rh), que pode chegar a uma potência máxima de 3kW.



FIG. 4.2: Modelo Axios mAX da Panalytical utilizado para análise por fluorescência de raios-x.

O diferencial do equipamento do CBPF é possuir ampla capacidade de análise. Este é capaz de identificar e quantificar elementos químicos do flúor ao urânio com a técnica WDS. A técnica de WDS é baseada na dispersão dos sinais dos cristais analisados e cada um pode analisar diferentes tipos de elementos. O equipamento utilizado apresenta quatro cristais analisadores:

- cristal LIF200: tem alta eficiência para analisar elementos de peso atômico maior que 18 (potássio);
- cristal de Ge111: adequado para a análise com eficiência P, S e Cl;
- cristal PE002: adequado para a análise do Al e Si;
- cristal PX1: adequado para a análise do Mg, Na, F e O.

O equipamento apresenta dois tipos de detectores de radiações, um tendo a função de detectar Raios-x fluorescente de elementos leves e outro para elementos pesados: Flow (Proporcional a gás) e Scintillation counter (Cintilador). O CBPF não possui o cristal que analisa elementos mais leves que o nitrogênio e mais pesados que o urânio.

4.7 RUGOSIDADE

Alguns parâmetros que caracterizam a rugosidade da superfície, como Ra, Rq, Rz e Rmax foram determinadas em discos com tratamento de superfície idêntico ao dos implantes estudados.

- i) Ra representa a rugosidade média aritmética (μm), cuja medida é a média aritmética das áreas acima e abaixo da linha média do perfil dentro do percurso de medição l_m (ou comprimento de avaliação). Este parâmetro é insensível a variação de perfil.
- ii) Rq é a rugosidade média quadrática, cuja medida é a média quadrática das áreas acima da linha média do perfil, dentro do percurso de medição l_m . Este parâmetro apresenta maior sensibilidade a variação de perfil que o Ra.
- iii) Rz é a rugosidade média total, a qual compreende a média aritmética das alturas e vales das asperezas Z_i medidas em cada comprimento amostral do perfil. Corresponde à diferença em altura (ordenada) das médias dos 10 valores de rugosidade parcial (5 maiores picos e 5 vales mais profundos), sendo que rugosidade parcial (Z_i) é a soma dos valores absolutos das ordenadas (eixo y) dos pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, existentes dentro de um comprimento de amostragem.
- iv) Rmax é a rugosidade total. Corresponde à distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo no comprimento de avaliação (l_m), independentemente dos valores de 24 rugosidades parciais (Z_i).

A rugosidade foi determinada com o rugosímetro de contato (Mitutoyo SJ 201P) (FIG. 4.3). Para esta análise foram avaliados 5 perfis de rugosidade para cada uma

das 10 amostras analisadas de cada grupo. Foi obtido e plotado, somente, a média dos 5 perfis de cada disco.



FIG. 4.3: Rugosímetro de contato Mitutoyo SJ 201P.

As medidas das rugosidades com o perfilômetro Mitutoyo foram complementadas pela do perfil de rugosidade 3D dos espécimes estudados. O perfil de cada grupos foi determinado por interferometria com o equipamento NewView 7100 (Zygo UMI 807).

4.8 MOLHABILIDADE

A molhabilidade foi determinada através do ângulo de contato de uma gota de 8 μL de água deionizada (Sistema purificador de água Osmose Reversa, GEHAB OS10 LX) com a superfície dos discos.

Foi utilizado o goniômetro FTA 100 (First Ten Angstroms) (FIG. 4.4) para análise das amostras. Em cada disco foi determinado 1 ângulos de contato.

A leitura da gota foi realizada imediatamente após a colocação da mesma sobre a superfície. Não foi realizado nenhuma limpeza prévia dos discos. A avaliação foi realizada no centro do disco.



FIG. 4.4: Goniômetro FTA 100 (First Ten Angstroms).

4.9 ENSAIOS *IN VIVO*

4.9.1 Comitê de ética

O presente estudo envolveu ensaios *in vivo* que foram realizados com a colaboração do Instituto Vital Brasil (IVB – Niterói/RJ). Para tanto, a tese foi submetida à avaliação e aprovada pelo Comitê de Ética Animal do IVB no dia 14/01/2014, através do número de protocolo 002/2014.

4.9.2 Amostra

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em 9 coelhos, fêmea Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com peso entre 2900g a 3400g, todos com 6 meses, selecionados aleatoriamente como modelo animal. O metabolismo do coelho, por ser mais acelerado que o dos seres humanos, permite uma análise em

menor tempo da resposta dos eventos *in vivo*.

Todos os coelhos utilizados neste trabalho foram doados pelo IVB, local onde a parte experimental foi desenvolvida nas dependências do IVB (Instituto Vital Brasil, Niterói/RJ).

Os animais foram mantidos em gaiolas, no biotério do IVB, sendo uma gaiola para cada animal. A eutanásia foi realizada pelo método de saturação do ar inspirado com CO₂ em câmara de CO₂.

4.9.3 Delineamento Experimental

Um total de 9 implantes para cada grupo foram instalados (TAB.ela 4.1). Nas tíbias do lado direito, os implantes foram instalados com os objetivos de: avaliar o torque de inserção (no ato da cirurgia) e o torque de remoção (após a eutanásia); e analisar a região de contato osso/implante no MEV, nos períodos de 2, 4 e 8 semanas.

Para a histologia foram analisadas amostras inseridas nas tíbias esquerdas dos animais e após a eutanásia nos diferentes tempos após a inserção (2, 4 e 8 semanas). Para cada semana foram avaliados dois animais. Foram usados 6 implantes por grupo (TAB.ela 4.2).

A posição de inserção de cada grupo de implante (grupo I, grupo II e grupo III) foi realizada a partir de um sorteio do sítio operatório.

TAB.ela 4.1: Divisão dos animais por grupos nos períodos de 2, 4 e 8 semanas para a avaliação do torque de remoção e inserção e MEV.

GRUPOS	Animais por semana	Semanas	Total de Implantes
I – Implantes Porous (duplo ataque ácido)	3	2, 4 e 8	9
II – Implantes Porous + Flúor	3	2, 4 e 8	9
III – Implantes Porous + Ca e Mg	3	2, 4 e 8	9

TAB.ela 4.2: Divisão dos animais por grupos nos períodos de 2, 4 e 8 semanas para a avaliação histológica.

GRUPOS	Animais por semana	Semanas	Total de Implantes
I - Implantes Porous (duplo ataque ácido)	2	2, 4 e 8	6
II – Implantes Porous + Flúor	2	2, 4 e 8	6
III – Implantes Porous + Ca e Mg	2	2, 4 e 8	6

4.10 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Todos os coelhos receberam água filtrada e clorada. A dieta alimentar foi baseada na oferta de ração industrializada balanceada para a espécie em questão, sendo oferecida por demanda assim como a ingestão de água potável.

A lotação foi do tipo um animal por gaiola com intuito de minimizar o estresse durante a manipulação pós-operatória. Não houve contato direto do animal com as fezes ou urina. Foi utilizada exaustão do ar constante e o ambiente foi mantido em temperatura variando de 21°C à 24°C (SOUZA, 2010).

4.11 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO DOS ANIMAIS

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral utilizando cetamina 50mg/kg (DOPALEN®), administrado intramuscularmente (IM).

O isoflurano à 1,5% foi inalado no transcorrer do procedimento para auxiliar na anestesia. Como medicação pré-anestésica para reduzir a secreção do trato respiratório e para bloquear o reflexo inibitório vagal no coração, o sulfato de stropina 0,1 mg/kg, IV, foi aplicado.

Foi administrada xilazina 5 mg/kg (ANASEDAN®), IM, com finalidade sedativa, relaxante muscular e principalmente analgésica. O fármaco meloxicam foi utilizado durante o procedimento para alívio da dor e para o controle inflamatório na dosagem

de 0,1mg/kg, por via subcutânea (SC).

Para analgesia transoperatória foi empregado o citrato de fentanila à 0,005 mg/kg, IV. Após a cirurgia, os animais receberam para analgesia, meloxican gotas durante 2 dias de 24/24h, por via SC (TRANQUILLI et al, 1996; HEARD ,2001; CARPENTER, 2005).

4.12 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DOS ANIMAIS

Foi realizada a tricotomia da tíbia dos coelhos (FIG. 4.5A) e, em seguida, foi realizada a anti-sepsia da região com solução de povidona (FIG. 4.5B).

As incisões lineares de 5 cm, nas porções internas dos membros inferiores dos animais (lados direito e esquerdo), foram realizadas com cabo de bisturi nº 3 (Schwert, Tuttlingen) e com lâmina 15 C (Swann Morton-Sheffield).

Os tecidos foram afastados, com o auxílio de uma cureta Molt nº 4 (Medesy, Maniago - Itália) e de uma pinça Dietrich (Medesy, Maniago - Itália), expondo o osso tibial (FIG. 4.5C) (HEARD ,2001; HE et al, 2011; MAXIMO, 2011; RESENDE, 2014; SALOU et al, 2015).

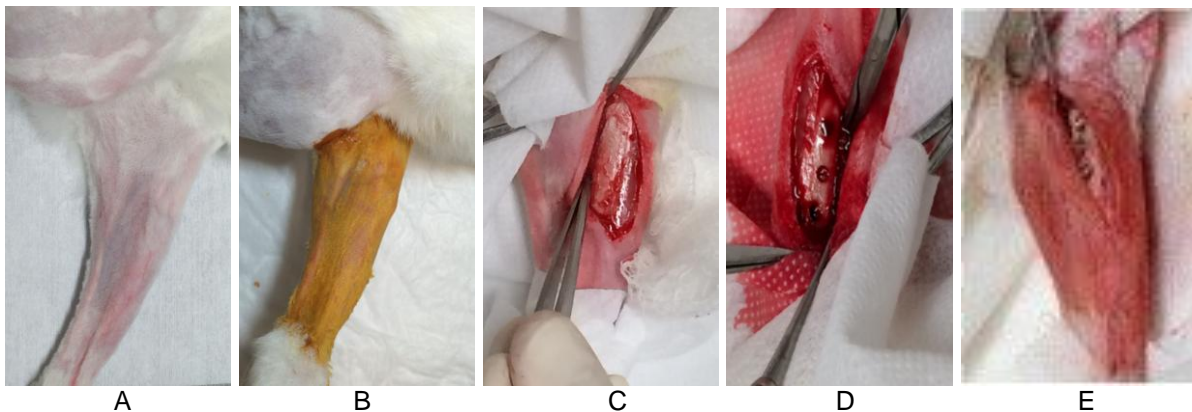


FIG. 4.5: A) Face interna da pata do coelho após tricotomia; B) Anti-sepsia realizada na tíbia do coelho; C) Exposição da tíbia como o auxílio da cureta Molt nº 4; D) Preparos realizados com a sequência de brocas para a inserção dos implantes; E) Implantes instalados na tíbia do coelho.

Foram, então, preparados os leitos ósseos bicorticais, nas tíbias dos coelhos (FIG. 4.5D), por intermédio de sequência de brocas do kit cirúrgico da empresa Conexão[®], onde, posteriormente foram instalados os implantes (FIG. 4.5E).

Os preparos dos leitos dos implantes foram realizados por intermédio de um contra-ângulo 20:1 e motor cirúrgico, à 600 rpm, e irrigação abundante, com soro fisiológico à 0,9%.

Um grupo de 9 coelhos receberam na tíbia do lado direito, 3 implantes com diferentes tratamentos de superfície, um com duplo ataque ácido (grupo I) (FIG. 4.6A), um com duplo ataque ácido e tratado com flúor (grupo II) (FIG. 4.6B) e o terceiro implante com duplo ataque ácido contendo deposição de cálcio e magnésio (grupo III) (FIG. 4.6C).

Estes mesmos 3 tipos de implantes foram inseridos nas tíbias esquerdas dos animais, porém em apenas 6 dos 9 coelhos para avaliação histológica.

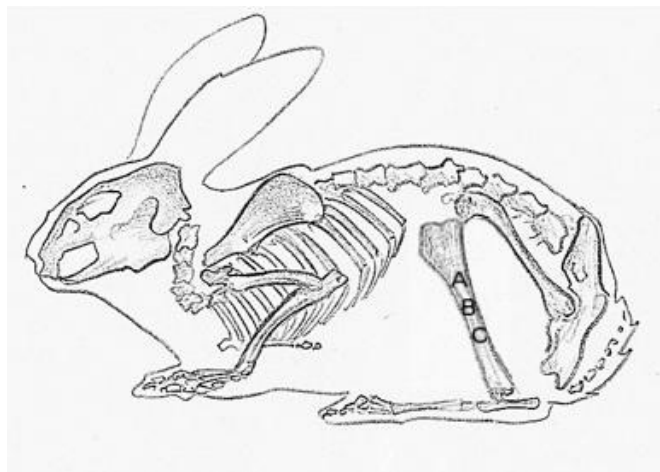


FIG. 4.6: Esquematização das áreas de inserção dos implantes avaliados. A) parte proximal do osso tibial; B) terço medial do osso tibial; C) porção distal do osso tibial.

4.13 TORQUES DE INSERÇÃO E DE REMOÇÃO

Um dos métodos para quantificar o desempenho dos novos tratamentos de superfície foi através da inserção e remoção de implantes na tíbia de coelhos. Foram determinados os torques de inserção e remoção (Ncm) (SUZUKIA EY & SUZUKI B, 2011).

Foram determinados os torques máximos (picos) tanto na inserção quanto na

remoção dos implantes após 2, 4 e 8 semanas. Foram usadas 9 amostras de cada grupo. Os torques foram quantificados com o torquímetro digital Lutron (TQ 8800) (FIG. 4.7).



FIG. 4.7: Torquímetro digital Lutron (modelo TQ 8800).

Os torques de inserção e de remoção foram medidos durante os procedimentos cirúrgicos. Os torques de remoção dos implantes foram avaliados imediatamente após a eutanásia dos animais.

Os testes com cobaias foram realizados nas instalações do Instituto Vital Brasil (IVB – Niterói/RJ).

4.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA *IN VIVO*

Após a remoção das tíbias, os blocos ósseos com implantes dos 3 grupos em análise foram mantidos em hipoclorito de sódio à 10% por 24 horas, e após armazenado em álcool 70% até o momento da análise no MEV. Após limpeza, as amostras receberam uma sequência de desidratação através de imersão total por 15 minutos em soluções com porcentagem crescente de álcool (30, 50, 75, 80 e 95%). A última parte dessa etapa foi a imersão em álcool anidro PA durante 30 minutos.

Em seguida, foi realizada a clivagem do conjunto bloco ósseo/implante (FIG. 4.8). A clivagem foi realizada no sentido do longo eixo do implante com o objetivo de

expor a interface osso/implante. Nesta etapa, buscou-se analisar, em MEV, o aspecto superficial do implante e a interação tecido orgânico/implante. Os espécimes não receberam nenhum tipo de recobrimento prévio.

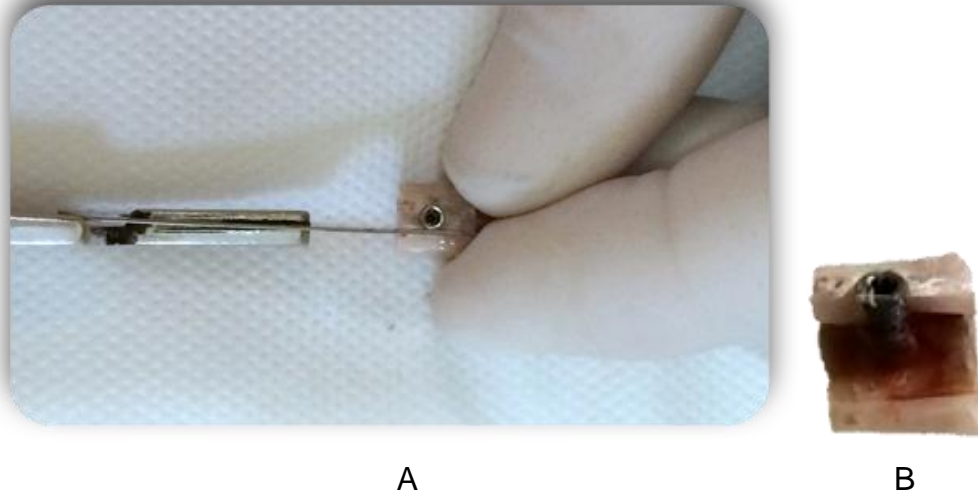


FIG. 4.8: (A) Posição para clivagem do conjunto bloco ósseo/implante. (B) Espécime após clivagem pronto para análise em MEV.

4.15 HISTOLOGIA

4.15.1 Técnica de Preparo e Coloração

Os implantes foram trefinados com cuidado para conter tecido peri-implantar. As amostras foram mantidas em potes plásticos contendo formol tamponado à 4% durante 48 horas para a fixação. Após o período de fixação, as amostras foram desidratadas através de trocas diárias de soluções com concentração crescente de álcool (etanol 60, 80, 96, 100%) (SARTORETTO et al, 2015).

Finalizada a desidratação, as amostras foram submetidas ao processo de infiltração com resina Technovit (7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co., Wehrheim, Germany) através de trocas diárias das soluções com concentração crescente de resina (30, 50, 70 e 100%).

Após o processo de infiltração, as amostras foram colocadas em bases plásticas

e cobertas com resina Technovit (7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH & Co., Wehrheim, Germany) para o corte implante-osso.

Após o corte no longo eixo do bloco (FIG. 4.9) foi possível expor a superfície central do implante (FIG. 4.10), essa região foi, então, colada numa segunda lâmina, a qual foi posicionada no centro da plataforma inferior da máquina de colagem (EXAKT-precision adhesive system; Apparatebau, Germany) e a cola (Technovit Light Hardening Adhesive 7210) foi espalhada na superfície do bloco.



FIG. 4.9: Corte da amostra implante-osso para obter um fragmento de aproximadamente 200 μm colado na lâmina.

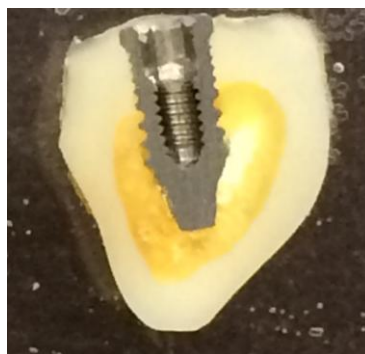


FIG. 4.10: Implante incluído em resina Technovit e cortado no centro ao longo do comprimento da amostra.

A espessura do conjunto lâmina–cola–fatia foi mensurada com paquímetro digital com o intuito de facilitar a obtenção de fatias com espessuras precisas

durante a etapa de lixamento.

Após a obtenção do conjunto bloco de resina/lâminas, o mesmo foi adaptado na máquina de corte (FIG. 4.11) com o objetivo de reduzir para a segunda lâmina um fragmento da amostra de aproximadamente 200 μm . Os fragmentos obtidos foram lixados até a espessura final de $\sim 30 \mu\text{m}$ através de polimento usando uma série de lixas abrasivas, como mostrado na TAB.ela 4.3 (EXAKT 310 CP series; Apparatebau, Germany) (SARTORETTO et al, 2015).

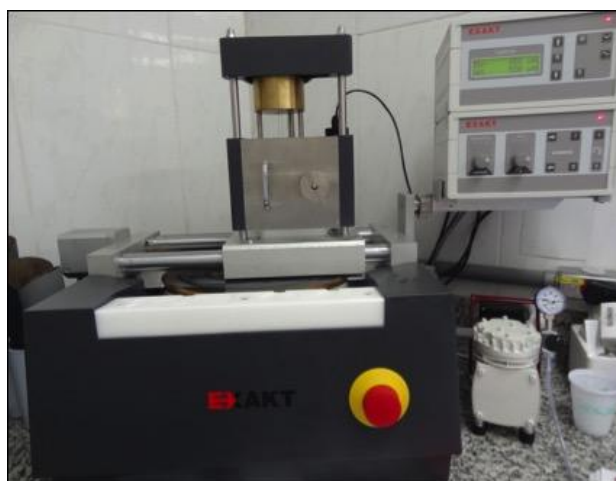


FIG. 4.11: EXAKT Micro Grinding System 400 CS. Equipamento em que os fragmentos foram lixados com auxílio de lixas d'água com granulação decrescente, com o objetivo de reduzir a espessura dos fragmentos e polir a superfície.

Os cortes histológicos obtidos foram corados com azul de toluidina e cobertos com lamínula de vidro aderidas com Entellan® (Merck©, Darmstadt, Alemanha).

TAB.ela 4.3 – Sequência utilizada de lixas d'água para reduzir a espessura dos fragmentos.

Espessura da Amostra	Lixa	Limite de Desgaste
250 μm	K800	130 μm
120 μm	K1000	40 μm
80 μm	K1200	40 μm
40 μm	K2500	10 μm
30 μm	P4000	3 μm

4.15.2 Análise Histológica

As análises foram realizadas em microscópio ótico de luz High Power Scholar da empresa Apex Microscopes para avaliação do reparo tecidual na região ao redor da junção osso/implante. Foram analisados os 3 primeiros filetes de rosca dos implantes.

Foi utilizado um sistema de análise de imagem computadorizada que consiste de microscópio de luz acoplado com uma câmera Fotográfica, DEM 130 eyepiece, CMOS chip (ScopeTek), conectada a um microcomputador que utiliza o software de análise de imagem MiniSee e ScopePhoto (ScopeTek). Foram determinadas as espessuras (μm) do tecido ósseo neoformado e a quantidade de medula óssea remanescente.

As seções foram avaliadas individualmente utilizando objetiva de 4x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à quantidade de dados, ainda insuficientes, e divergência de resultados encontrados na literatura em relação aos mecanismos de osseointegração, este estudo desenvolveu e investigou o tratamento da superfície dos implantes e suas influências sobre a rugosidade, molhabilidade e biocompatibilidade.

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Mostra-se na FIG. 5.8 as morfologias das superfícies dos implantes Porous (A), Porous Nano (B) e Porous CaMg (C), previamente a inserção dos mesmos nas tíbias de coelhos.

Esta morfologia e rugosidade com a relação do tamanho pico/vale é mais adequada a osseointegração em relação ao implante usinado ou submetido apenas a imersão em um ácido. Nesta avaliação, ficou evidente uma leve alteração na morfologia superficial das amostras do grupo Porous CaMg em relação as outras duas superfícies (FIG. 5.1).

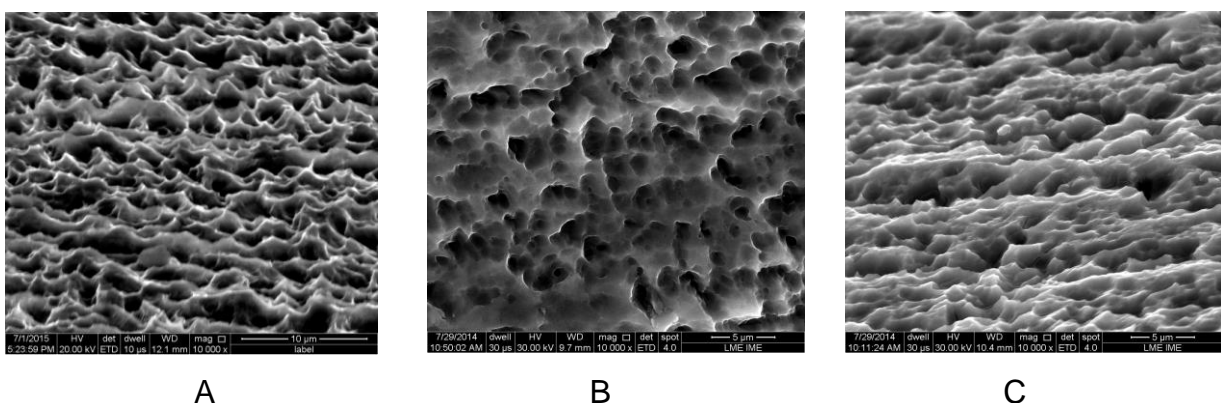


FIG. 5.1: Morfologias das superfícies dos implantes. (A) Grupo I, (B) Grupo II e (C) Grupo III (10.000x).

Nestas mesmas FIG.s, observa-se que a morfologia da superfície Porous Nano (FIG. 5.1B) mesmo após imersão em solução contendo flúor, apresenta cavidades com bordas proeminentes e agudas como no grupo controle (FIG. 5.1A).

Em maior aumento, como observado na FIG. 5.2, é possível perceber outros detalhes sobre a morfologia dos grupos estudados como micro e nanorugosidades apresentadas nas amostras dos grupos II e III. Nota-se, também, a deposição de elementos químicos no interior das microcavidades (FIG.s 5.2 B e 5.2 C).

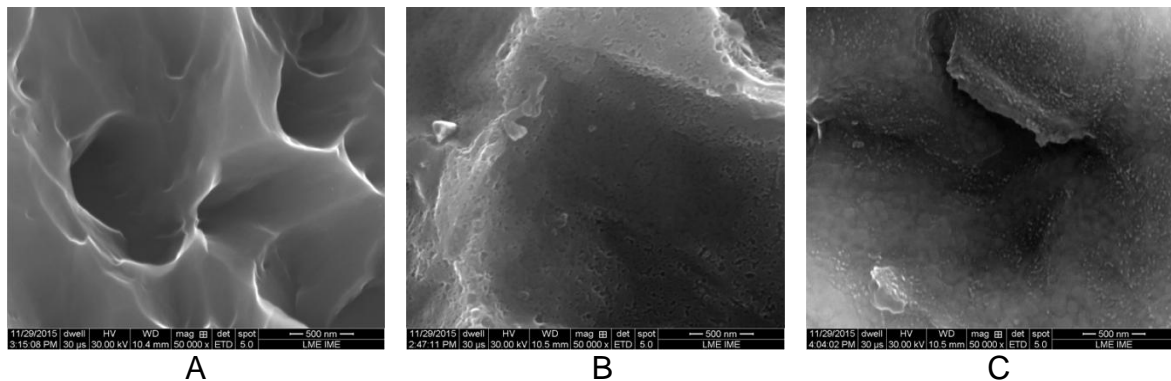


FIG. 5.2: Morfologias das superfícies dos implantes. (A) Grupo I, (B) Grupo II e (C) Grupo III (50.000x).

O problema experimental é que, quando as superfícies são alteradas nanometricamente com diferentes técnicas, ocorre simultaneamente alteração microestrutural, por isso, é difícil analisar a contribuição individual dos dois níveis de rugosidade separadamente (WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2009). Além disso, embora os resultados in vitro sejam de interesse científico, têm aplicabilidade, por vezes, limitada, uma vez que frequentemente contrastam com as observações in vivo (ABRAHAMSSON et al, 2013).

Ainda em relação à micrografia, pode-se afirmar que as superfícies avaliadas apresentaram semelhança morfológica superficial. Contudo, este aspecto ficou mais evidente entre os grupos Porous e Porous Nano. O grupo Porous CaMg apresentou ligeiro arredondamento dos picos e das arestas das microcavidades. Estas modificações podem estar relacionadas à boa reatividade dos íons flúor, cálcio e magnésio e a susceptibilidade química da camada de óxido de titânio a estes íons. Estes resultados corroboram com os encontrados em trabalhos de ELLINGSEN et al (2004), FENG et al (2004) e SUL (2006), que demonstraram que superfícies de

titânio tratadas com estes íons apresentam microtopografias mais lisas e redução nos valores de rugosidade.

Os resultados mostraram que a alteração topográfica (rugosidade) e a variação da energia de superfície (molhabilidade) não apresentam um efeito sinérgico entre si. Resultado que se divergem dos achados obtido por ZHAO et al em 2007.

5.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Mostra-se na FIG. 5.3 à 5.5 os espectros obtidos através de difração de raios X. Foi possível identificar as fases cristalinas da superfície das pastilhas de titânio após os tratamentos Porous (FIG. 5.3), Porous Nano (FIG. 5.4) e Porous CaMg (FIG. 5.5).

Nas análises dos espectros de difração não foi encontrado, nos espécimes avaliados, o óxido de titânio na forma anatase e/ou rutilo, com o programa de refinamento pelo método de rietveld (TOPAS[®]). Estes resultados sugerem não haver presença ou quantidade acima do limite de detecção (inferior à $\pm 1\%$) destes compostos.

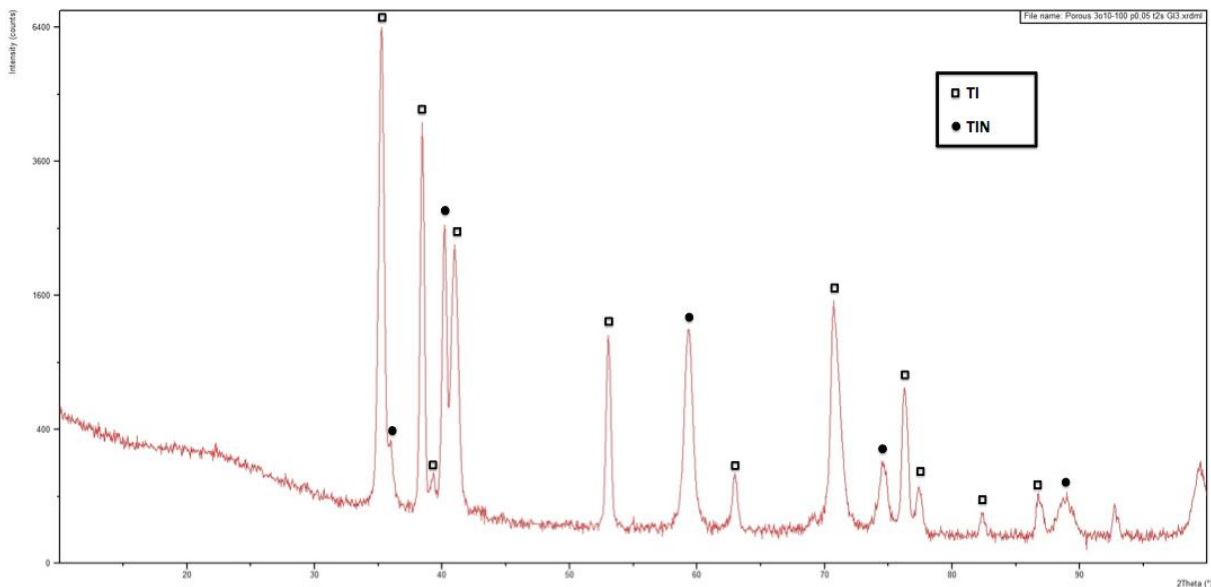


FIG. 5.3: Espectro de difração de raios X da superfície Porous.

A presença de duas fases cristalina do óxido de titânio (Ti e Ti_4N_4) foi identificada pela difração de raios X nas amostras Porous, Porous Nano e Porous CaMg.

Em $35,30^\circ$, $40,99^\circ$ e $59,36^\circ$ foi identificado um provável composto Ti_4N_4

(Osbornite). Este composto foi sugerido após análise qualitativa no programa Highscore. O nitrogênio (N), por sua vez, não foi identificado pela análise XRF devido à limitação do equipamento.

O composto TiN, identificado pela difração de raios-X, nas superfícies estudadas é oriundo do processamento dos espécimes. Os parâmetros e os meios utilizados para o processamento dos implantes utilizados neste estudo são sigilosos pois fazem parte de um processo de pedido de patente.

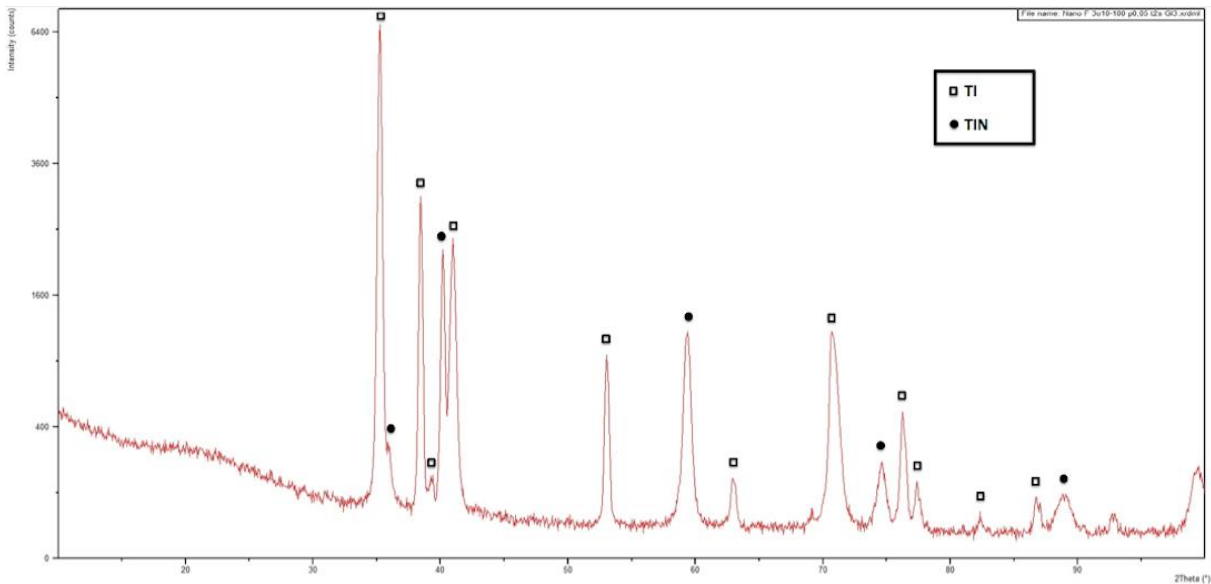


FIG. 5.4: Espectro de difração de raios X da superfície Porous Nano.

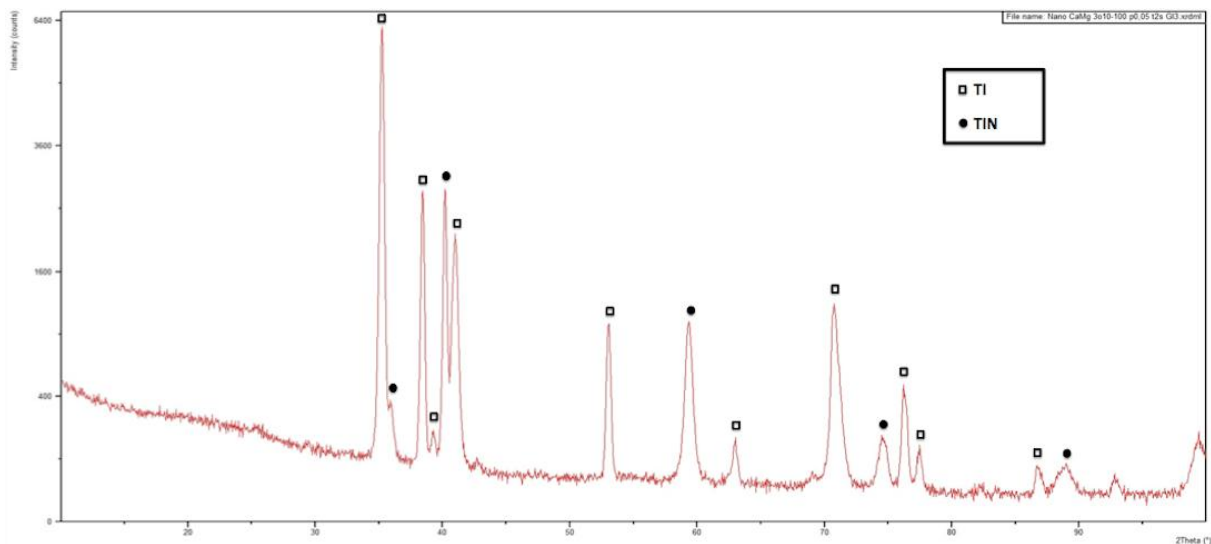


FIG. 5.5: Espectro de difração de raios X da superfície Porous CaMg.

Os espectros de difração de raios-X obtidos no presente trabalho foram realizados com o objetivo de verificar o sucesso da deposição de íons nas

superfícies de titânio com duplo ataque ácido. Por apresentar uma camada de deposição aumentada, esperava-se encontrar alguma fase do titânio.

Provavelmente, o tratamento, por imersão em solução contendo íons de flúor, cálcio e magnésio por adicionar pequena quantidade destes elementos à superfície de titânio, torna-se impossível a detecção do titânio pela técnica de DRX (técnica de incidência rasante).

5.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR (XRF)

Os valores das composições químicas semiquantitativas (%) obtidas por difração de Raios-x por fluorescência estão apresentados na TAB.ela 5.1.

Nesta análise, ficou evidente a diferença do percentual de oxigênio (O) na superfície dos implantes avaliados. O grupo CaMg apresentou percentual de O superior aos demais grupos.

TAB.ela 5.1: Composição química, obtidas por XRF das superfícies Porous, Porous Nano e Porous CaMg.

	Composição Química (% atômico)						
	Ti	O	F	Mg	Ca	Na	Fe
Porous	97,43	2,57	-	-	-	-	-
Porous Nano	96,80	3,03	0,09	-	-	0,08	-
Porous CaMg	74,71	24,90	-	0,27	0,08	-	0,04

A análise de XRF confirmou a presença de íons de flúor nas amostras do grupo Porous Nano e a presença de íons de cálcio e magnésio nos espécimes do grupo Porous CaMg, comprovando assim, a eficácia das deposições realizadas em ambos os grupos.

Nas superfícies dos implantes Porous Nano e Porous CaMg foram encontrados o sódio e o ferro, respectivamente. O Na e o Fe são considerados contaminantes provavelmente oriundos do eletrólito usado no tratamentode superfície. Estes

contaminantes são oriundos do processo de manipulação e confecção das amostras.

A presença do nitrogênio não foi identificada na análise de XRF devido a limitações do equipamento. Ainda assim, foi observado na DRX e confirmado a presença deste por intermédio de programas específicos de refinamento.

5.4 RUGOSIDADE

Os valores dos parâmetros da rugosidade Ra, Rq, Rz e Rmax dos diferentes grupos são mostrados na TAB.ela 5.2. Os parâmetros de rugosidade entre os três grupos avaliados apresentaram-se muito similares. Foram realizadas cinco medidas de cada parâmetro e calculada a média e o desvio padrão.

TAB.ela 5.2: Parâmetros da rugosidade de superfície (μm) dos implantes.

	Porous	Porous Nano	Porous CaMg
Ra	1,60 \pm 0,04	1,53 \pm 0,02	1,54 \pm 0,02
Rq	1,94 \pm 0,04	1,86 \pm 0,03	1,88 \pm 0,03
Rz	9,40 \pm 0,45	9,05 \pm 0,35	9,39 \pm 0,36
Rmax	11,01 \pm 0,87	10,94 \pm 0,97	11,43 \pm 0,28

Apesar de existir uma diferença de rugosidade entre os grupos, a redução foi muito infime. Este aspecto está relacionado com a morfologia superficial que apresentou poros em escala micro e nanométrica, e, devido à deposição ter sido realizada no interior dos poros em escala micro e nanométrica (GRAVINA, em 2010).

A rugosidade obtida, com os tratamentos deste estudo, foi de 1,5 à 1,6 μm , a qual literatura classifica como uma microrugosidade moderada (SALOU et al, 2015). A superfície Porous CaMg apresentou amplitude de rugosidade menor dentre as avaliadas. O tratamento com íons de flúor, cálcio e magnésio influenciou na redução

da altura dos micropicos. Estes resultados corroboram com os estudos de GRAVINA em 2010.

Os perfis de rugosidade 3D dos grupos Porous, Porous Nano e Porous CaMg são mostrados nas FIG.s 5.6, 5.7 e 5.8, respectivamente. Após os tratamentos ácidos, a rugosidade superficial do implante é mais homogênea em relação à superfície usinada (LIMA et al, 2012). O tratamento superficial utilizado é um dos mais adequados, segundo a literatura (ELIAS, 2012), para melhorar a homogeneidade superficial dos implantes dentários.

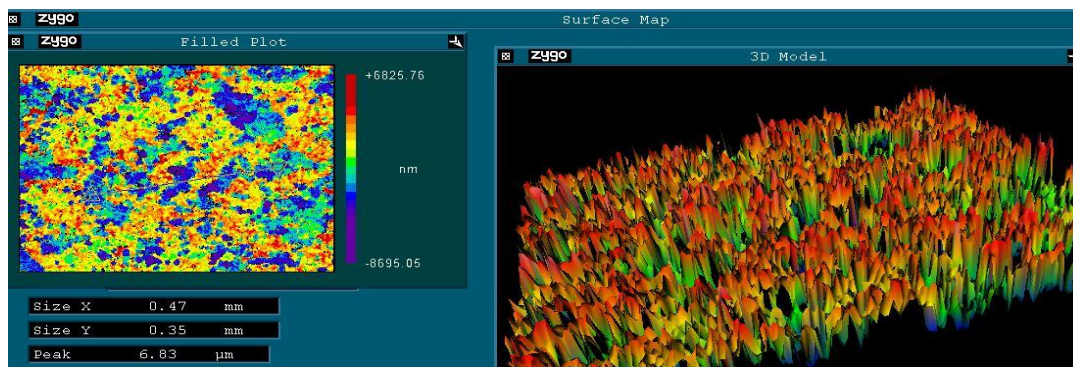


FIG. 5.6: Representação em 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous.

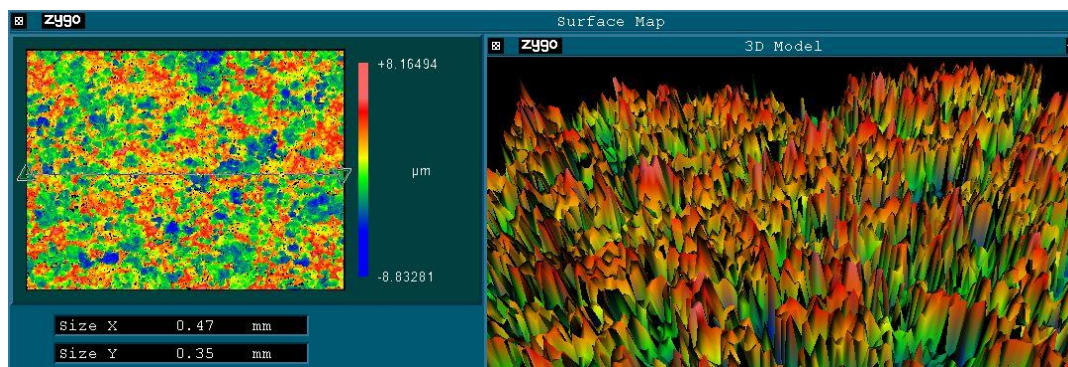


FIG. 5.7: Representação em 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous Nano.

Rugosidades nanométricas têm sido consideradas de grande importância, embora pouco se saiba além de dados de observações in vitro (WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2009).

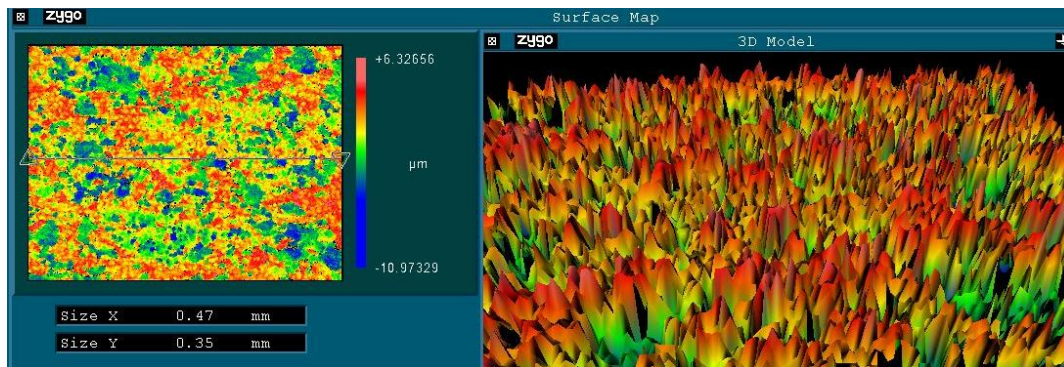


FIG. 5.8: Representação em 3D da rugosidade superficial dos implantes Porous CaMg.

5.5 MOLHABILIDADE

Os dados relativos a molhabilidade das superfícies estudadas neste estudo estão plotados na TAB.ela 5.3 abaixo.

TAB.ela 5.3: Parâmetros da molhabilidade superficial (μm) dos grupos I, II e III.

Disco	Porous	Porous Nano	Porous CaMg
1	125,76	119,83	78,33
2	108,88	123,96	75,71
3	103,89	124,24	87,41
4	110,35	125,42	98,92
5	99,92	123,07	68,27
6	110,88	113,45	79,32
7	132,52	121,86	64,94
8	131,63	100,72	76,02
9	130,72	98,24	82,48
10	132,34	88,91	69,21
Média/ D. Padrão	118,69 \pm 13,07	113,97 ^o \pm 13,20	78,06 ^o \pm 9,99

A média de ângulo de contato apresentada pelo grupo I ($118,69^\circ \pm 13,07$) e pelo grupo II ($113,97^\circ \pm 13,20$) foram superiores ao do grupo III que apresentou menores médias do ângulo de contato ($78,06^\circ \pm 9,99$) (FIG. 5.9).

As FIG.s a seguir são representativas dos grupos estudados e foram selecionada de maneira aleatória.

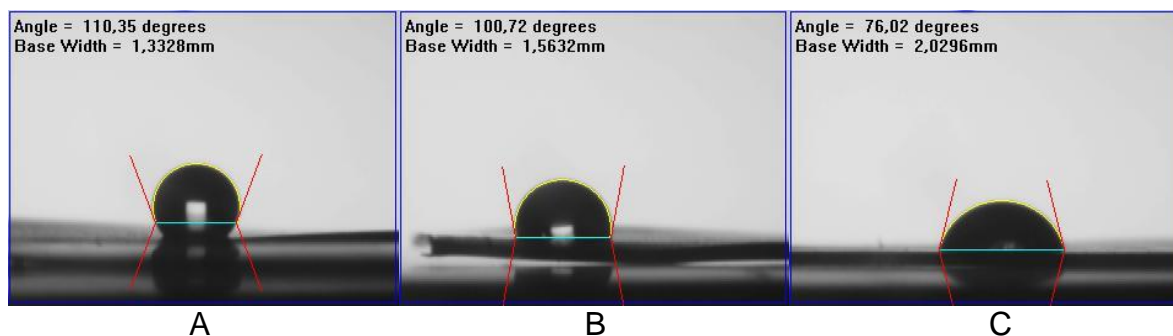


FIG. 5.9: Molhabilidade da superfície dos implantes. (A) Porous; (B) Porous Nano e (C) Porous CaMg.

A presença dos elementos depositados (F, Ca e Mg) sobre os implantes aumentou a molhabilidade, corroborando os resultados de LOZANO et al 2013 e ANIL et al (2011).

Pôde-se observar que os ângulos de contato dos espécimes estudados, utilizando com parâmetro a água destilada, tiveram valores maiores do que os obtidos em trabalhos anteriores (ELIAS et al, 2011). Comparando os valores de molhabilidade das superfícies tratadas com ácido, flúor, cálcio e magnésio verifica-se que as superfícies tratadas apenas com ácido e as tratadas com flúor são menos hidrofílicas que as superfícies que receberam Ca e Mg, as quais possuem baixos ângulos de contato.

Uma superfície que apresente um ângulo de contato superiores ao limite de 90° é citado, na literatura, como hidrofóbica. Já a superfície que produza um ângulo de contato inferior à 90° é considerada hidrofílica (SARTORETTO et al, 2015).

Os grupos I e II apresentaram característica hidrofóbica na análise de molhabilidade. Do outro lado, o grupo III demonstrou cunho hidrofílico. Entretanto, apesar da superfície do grupo III apresentar hidrofílicidade em relação aos demais grupos e rugosidade moderada (similar ao grupo I e II), não foi possível observar aumento da resistência da interface osso-implante nos 3 períodos considerados.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - *IN VIVO* (MEV - *IN VIVO*)

Após a remoção das cobaias, os espécimes contendo osso aderido na superfície foram analisados em alto vácuo no MEV (Jeol, JSM-5800LV, Tóquio, Japão).

O objetivo foi comparar as morfologias superficiais e a região da interface osso/implante. Nas FIG.s 5.10 A, 5.11 A e 5.12 A pode-se observar que a morfologia do tratamento superficial foi mantido após a remoção dos implantes com contra-torque.

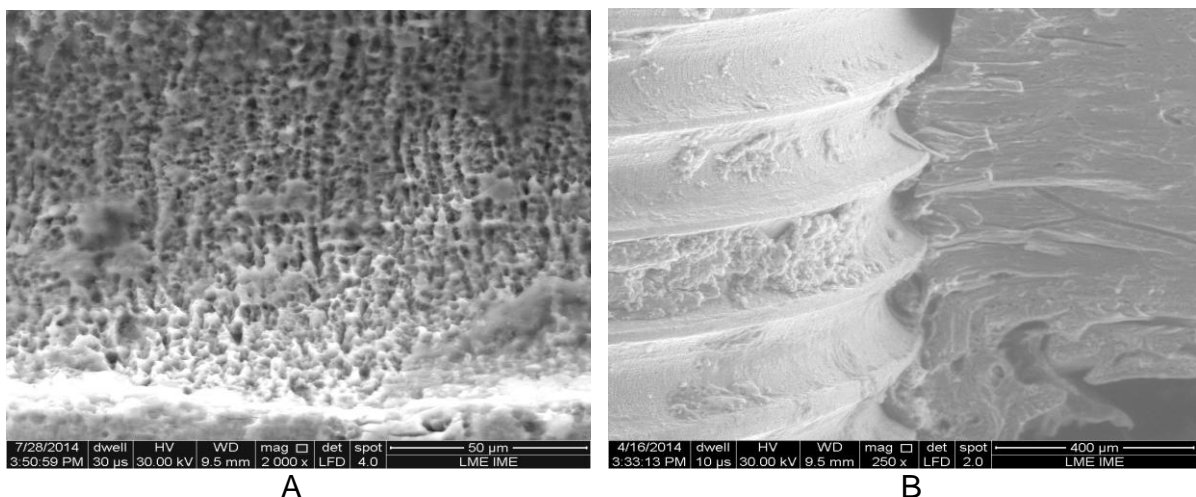
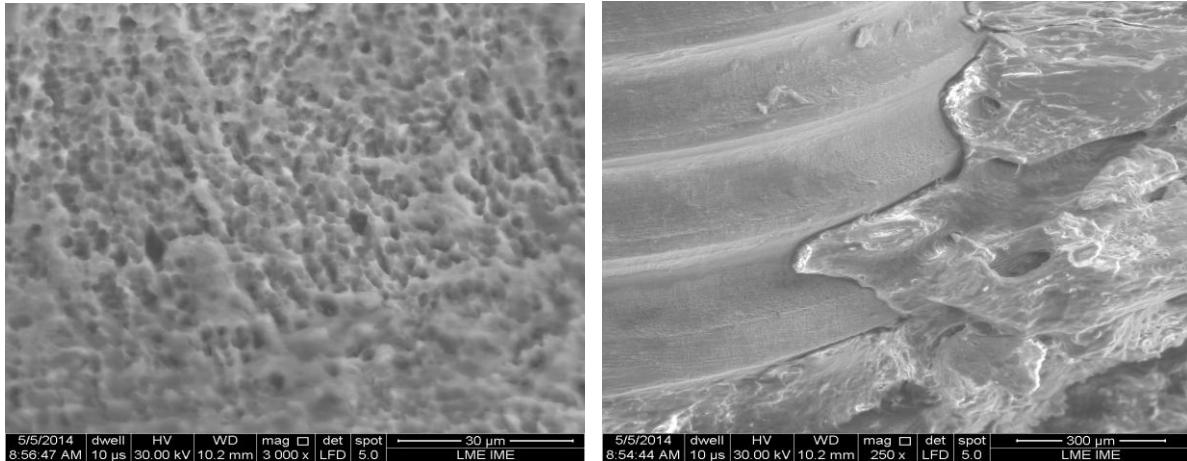


FIG. 5.10: Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo I em 2 semanas (250x).

As superfícies apresentaram material orgânico aderido nas regiões que foram inseridas nas corticais e medulares.

É notória a grande afinidade do biomaterial com o tecido ósseo (FIG.s 5.10B, 5.11B e 5.12B). A presença deste tecido sobre a plataforma do implante demonstra a ótima relação entre as duas estruturas após 4 semanas (FIG.s 5.13 A e B).

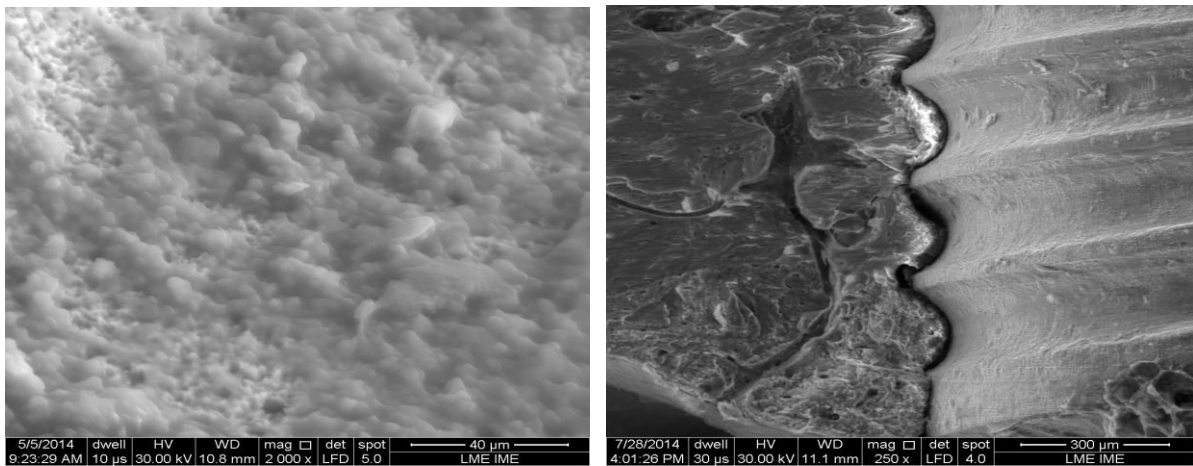
Superfícies de implantes com características micrométrica e sub-micrométricas têm uma maior probabilidade de formação de osso novo (ALBERTINI et al, 2015).



A

B

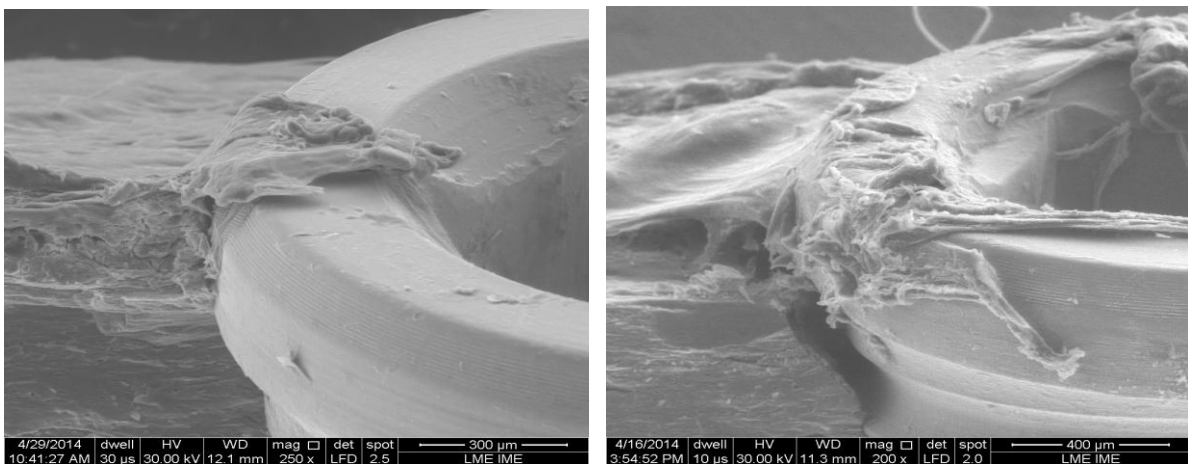
FIG. 5.11: Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo II (A e B) em 2 semanas (250x).



A

B

FIG. 5.12: Morfologia das superfícies (A) (2000x) e relação da interface osso/implante (B) do grupo Porous CaMg (A e B) em 2 semanas (250x).



A

B

FIG. 5.13: Relação tecido ósseo/superfície do implante na região cervical dos implantes (A e B) após 4 semanas de avaliação.

Tanto os implantes Porous quanto os Porous Nano apresentaram boa interação óssea na parte cortical e ótima comunicação com o tecido ósseo medular ao serem analisados por microscopia eletrônica de varredura. Não obstante, a superfície com flúor apresentou diversos traços de interação biológica como pode ser observado nas FIG.s 5.13 e 5.14 A e B.

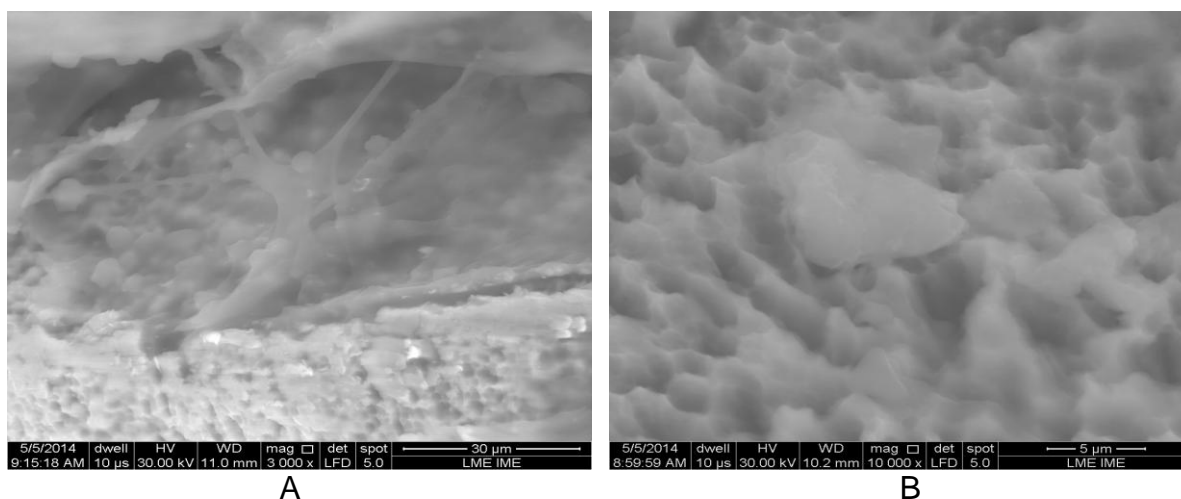


FIG. 5.14: Relação tecido ósseo/superfície Porous Nano após 4 semanas com aumento de 3000x (A) e 10.000x (B).

5.7 TORQUE DE INSERÇÃO E DE REMOÇÃO

Os valores dos torques de inserção e remoção das amostras do grupo controle com a superfície Porous® para os períodos de análise (2, 4 e 8 semanas) são mostrados na TAB.ela 5.4.

TAB.ela 5.4: Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes Porous (grupo I) para 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia.

	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Torque de Inserção	10,4 ± 0,53	10,23 ± 0,12	10,10 ± 0,17
Torque de Remoção	6,56 ± 1,86	15,63 ± 1,58	16,96 ± 1,32

O grupo I apresentou torque de inserção médio de $10,4 \pm 0,53$ Ncm em 2 semanas, $10,23 \pm 0,12$ Ncm em 4 semanas e média de $10,10 \pm 0,17$ Ncm em 8 semanas. O torque de remoção dos implantes com superfície Porous foi de $6,56 \pm 1,86$ Ncm em 2 semanas, $15,63 \pm 1,58$ Ncm em 4 semanas e $16,96 \pm 1,32$ Ncm em 8 semanas.

TAB.ela 5.5: Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes com tratamento nano com Flúor (grupo II) para 2, 4 e 8 semanas de vida.

	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Torque de Inserção	$10,26 \pm 0,30$	$10,33 \pm 0,21$	$10,06 \pm 0,05$
Torque de Remoção	$12,15 \pm 0,32$	$15,83 \pm 3,07$	$17,93 \pm 4,47$

Os torques de inserção e remoção para o grupo II são apresentados na TAB.ela 5.5. Os implantes Porous Nano após 2 semanas foram inseridos com torque de $10,26 \pm 0,30$ Ncm, média de $10,33 \pm 0,21$ Ncm em 4 semanas e média de $10,06 \pm 0,05$ Ncm após 8 semanas.

Na análise do torque de remoção, a superfície Porous Nano apresentou média de $12,15 \pm 0,32$ Ncm em 2 semanas, $15,83 \pm 3,07$ Ncm em 4 semanas, em 8 semanas o valor médio geral foi de $17,93 \pm 4,47$ Ncm.

Os torques do grupo tratado com CaMg são mostrados na TAB.ela 5.6. A média dos torque de inserção do grupo CaMg para os implantes que foram inseridos após 2 semanas foi de $10,43 \pm 0,60$ Ncm, média de $10,56 \pm 1,87$ Ncm em 4 semanas e $9,20 \pm 1,21$ Ncm em 8 semanas.

O torque de remoção dos implantes com cálcio e magnésio foi de $5,43 \pm 0,32$ Ncm em 2 semanas, $5,73 \pm 0,15$ Ncm em 4 semanas e $10,83 \pm 1,20$ Ncm em 8 semanas. Este grupo apresentou uma redução no desempenho biomecânico em relação ao grupo II e ao grupo I ,

TAB.ela 5.6: Torque de inserção e de remoção (Ncm) dos implantes do grupo Porous CaMg (grupo III) para 2, 4 e 8 semanas de vida.

	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Torque de Inserção	10,43 ± 0,60	10,56 ± 1,87	9,20 ± 1,21
Torque de Remoção	5,43 ± 0,32	5,73 ± 0,15	10,83 ± 1,20

Após 4 semanas de cicatrização, os implantes de teste do grupo II mostraram equivalente desempenho biomecânico ao do controle, apesar de um valor de Ra menor. O grupo III apresentou um atraso no processo de reparo ósseo, provavelmente, devido a quantidade de material depositado que influencia diretamente na concentração de íons local.

Após 8 semanas, observou-se aumento do torque de inserção em relação ao torque de remoção de 67,98%, 78,14% e 17,75% para os grupos I, II e III, respectivamente. Este resultado indica que a neoformação do sítio com o implante Porous foi mais rápida que a do implante CaMg.

A presença de cálcio e magnésio na superfície do implante e sua relação com a baixa resistência da interface osso-implante parece estar relacionado a quantidade desses íons na superfície, pois a concentração desses é capaz de promover um atraso no processo de reparo ósseo (COOPER et al, 2005).

Os valores obtidos dos torques de remoção dos implantes Porous e Porous Nano estão na ordem de grandeza considerada adequada para a osseointegração. (SUZUKIA & SUZUKI, 2011).

Os resultados deste estudo mostraram que após as primeiras semanas a superfície com a presença de flúor em escala nanométrica na superfície do implante foi capaz de aumentar o torque de remoção em relação ao torque de inserção, confirmando os dados obtidos por HE et al (2011). Estes resultados indicam que em relação aos demais grupos, a adição de flúor aumenta a resistência da interface osso/implante, principalmente duas semanas após a cirurgia. Estudos realizado por ELLINGSEN et al (2004), com estes mesmos tipos de análises, mostraram resultados semelhantes.

Ainda sobre o grupo que recebeu tratamento com deposição de flúor observou-se que após a inserção dos implantes, apesar da perda da estabilidade primária nas primeiras semanas, a remodelação óssea nos sítios deste grupo apresentou-se acelerada, ou seja, a estabilidade secundária inicia em tempos menores e a estabilidade total (primária mais a secundária) aumenta.

Considerando que não foi observada diferença entre a rugosidade dos implantes entre os grupos e, houve diferença no torque de remoção, é possível afirmar que a rugosidade não foi a responsável na diferença do torque de remoção entre os grupos, logo, a interferência está relacionada à presença dos íons associados ou não a cada superfície analisada. Fato este também observado por HE et al (2011), SALOU et al (2015) e DERKSEN et al (2014). Estas alterações da composição química da camada de óxido têm a capacidade de influenciar o tipo de íon adsorvido sobre a superfície implantar (HANAWA, 1991).

5.8 HISTOLOGIA

Não houve, clinicamente, exposições ao meio externo dos materiais implantados em nenhum dos animais durante o período de análise até a eutanásia.

Após 2 semanas, as amostras apresentaram neoformação incipiente e parcial. Nas quais observou-se tecido ósseo imaturo mais evidente no grupo Porous Nano como observado nas FIG.s a seguir (FIG.s 5.15A, 5.15B e 5.15C).

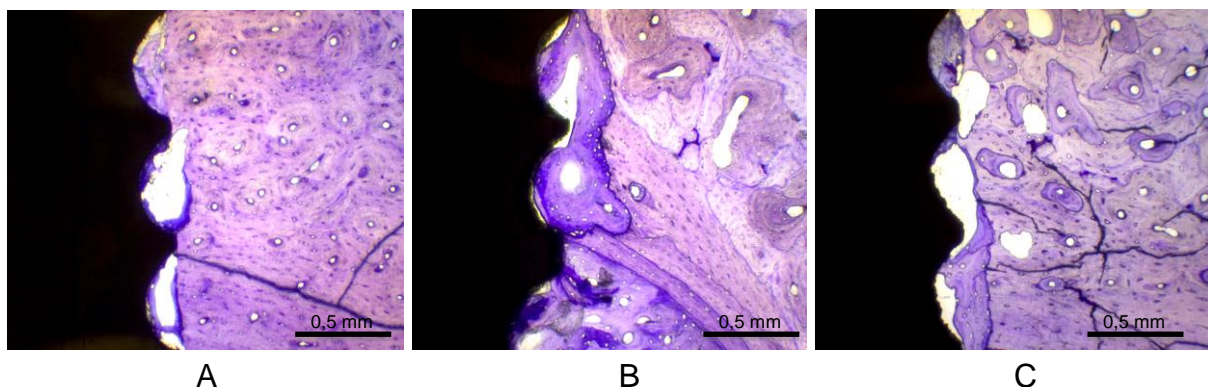


FIG. 5.15: Corte histológico após 2 semanas do grupo Porous (A), Porous Nano (B) e Porous CaMg (C) 40x.

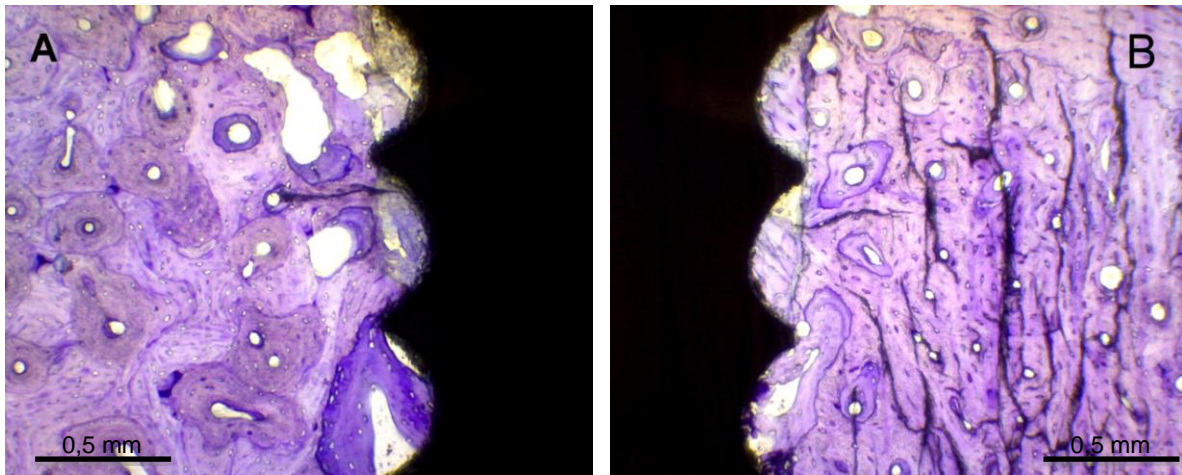


FIG. 5.16: Corte histológico do grupo Porous após 4 semanas (A) e 8 semanas (B) 40x.

Após 4 semanas de análise, os espécimes mostraram-se parcialmente preenchidos por tecido ósseo imaturo (FIG.s 5.16A, 5.17A e 5.18A). Neste período, foi observada a presença de células ósseas (osteoblastos) em contato com a superfície do implante, de maneira discreta para o grupo Porous e mais sutil ainda para o grupo Porous CaMg.

Observou-se um preenchimento ósseo maior relacionado à superfície dos implantes com deposição de flúor em 4 semanas (FIG. 5.17A) em relação as amostras de 2 semanas.

Não foram encontrado células inflamatórias em nenhuma das amostras de nenhum dos grupos. Este evento se repetiu nas análises realizadas após 8 semanas.

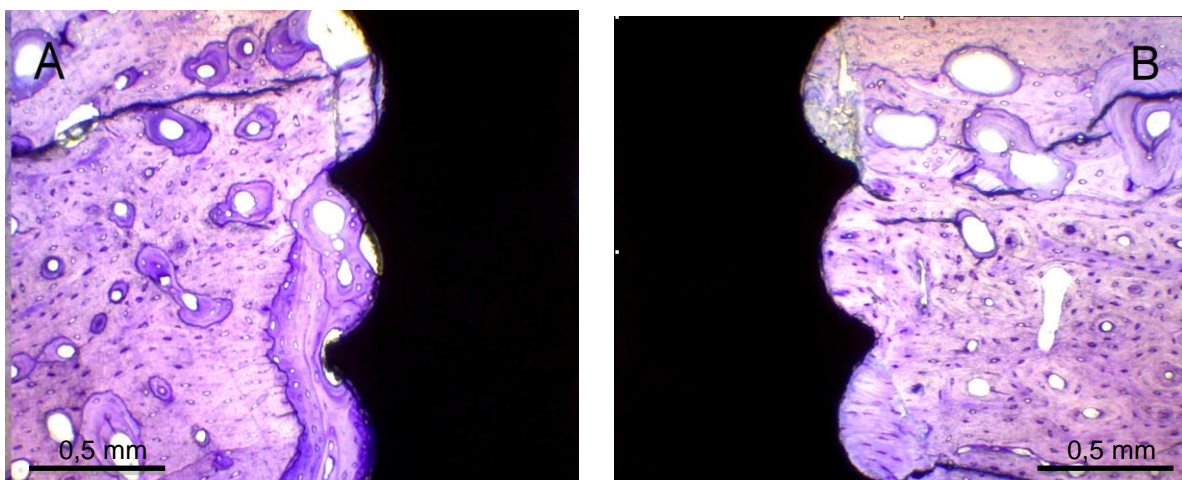


FIG. 5.17: Corte histológico do grupo Porous Nano após 4 semanas (A) e 8 semanas

(B) 40x.

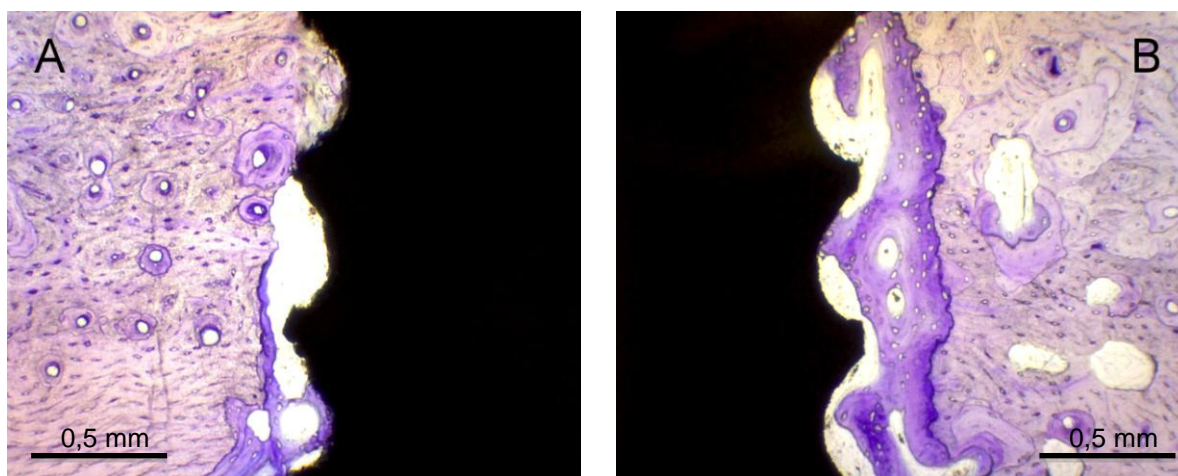


FIG. 5.18: Corte histológico do grupo Porous CaMg após 4 semanas (A) e 8 semanas (B) 40x.

No grupo Porous CaMg de 8 semanas, o defeito mostrou-se parcialmente preenchido por tecido ósseo imaturo e com maior presença de osteoblastos na borda do defeito ósseo do que na superfície do implante (FIG. 5.18B).

As superfícies dos implantes Porous, neste mesmo período, apresentaram uma menor presença de tecido neoformado (FIG. 5.16B), comparados com o grupo Porous Nano. Não obstante, demonstraram neoformação óssea com um tecido ósseo maduro. Este grupo apresentou maior quantidade de reparo ósseo do que o grupo que recebeu cálcio e magnésio (FIG. 5.18B).

O tecido ósseo, no grupo Porous Nano, apresentou-se com preenchimento quase que total da área medular (FIG. 5.17B) após 8 semanas.

Em síntese, observou-se um preenchimento parcial em períodos mais incipientes para todos os grupos. Observou-se um neoformação óssea mais efetiva na superfície que recebeu deposição de íons fluor, o que reforça os dados da literatura (YEO, 2014).

Os dados favoráveis apresentados pelo grupo Porous com flúor, relativos a cicatrização, provavelmente estão relacionados ao fato desse íon favorecer uma maior proliferação celular, além de apresentar uma maior expressão de BMP-2 e sialoproteína óssea (COOPER et al, 2005).

O flúor promove, de modo mais precoce, uma diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos tornando possível uma maior densificação óssea; reduzindo, com isso, o tempo de permanência do osso imaturo. Além disso, esse íon pode promover uma precipitação de fosfato de cálcio o que leva a uma modificação do comportamento celular devido a alteração da concentração local de cálcio (COOPER et al, 2005).

Os resultados deste estudo indicam que a cicatrização do sítio com o implante Porous é significativamente mais rápida que a do implante CaMg. Já a superfície Porous com flúor apresentou, nesta análise, um nível de estabilidade/travamento superior ao grupo controle neste mesmo período cicatricial.

Os resultados deste trabalho mostram que o período mais crítico para carregamento do implante com superfície Porous ocorre até a segunda semana após a cirurgia (em coelhos), o que está de acordo com os encontrados na literatura (GRAVINA, 2010). Por isso, deve-se evitar colocar em função os implantes com este tipo de tratamento de superfície quando utilizados para reabilitações em osso de baixa densidade ou quando a estabilidade primária foi inadequada.

Apesar dos mecanismos que envolvem a interação das células com a superfície do implante não serem totalmente explicados, existem evidências que as características nanométricas influenciam na energia de superfície e, portanto, na interação superfície/proteínas. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os disponíveis na literatura (COELHO & LEMON, 2009).

Por existir uma lacuna na literatura sobre a influência da nanoestrutura, bem como os mecanismos envolvidos na osseointegração dos implantes com estas características, são necessários novos estudos para determinar a melhor combinação das características da superfície em escala macro, micro e nanométrica. Alguns tipos de resposta óssea ainda precisam ser esclarecidas, e novas modificações de rugosidade, com diferentes técnicas, podem acelerar a aposição óssea para os implantes.

6 CONCLUSÃO

Com base no desenvolvimento e análise realizada entre superfícies com tratamento de duplo ataque ácido (Porous), duplo ataque ácido mais flúor (Porous Nano F) e duplo ataque ácido mais cálcio e magnésio (Porous Nano CaMg) é possível concluir que:

- a) Foram desenvolvidas superfícies de implante através da eletrodeposição de íons de Ca e Mg. Esta apresentou características similares nas análises de DRX, rugosidade e molhabilidade. A superfície com Ca e Mg (Porous Nano CaMg) apresentou características morfológicas distintas das outras superfícies analisadas. Sua principal modificação foi o arredondamento das arestas dos microporos.
- b) A adição em escala nanométrica de flúor (Porous Nano F) na superfície do implante tratado com ácido apresentou maior resistência à remoção das tíbias dos coelhos, principalmente 2 semanas após a cirurgia. Já a adição de Ca e Mg não melhorou a osseointegração em relação a superfície Porous e Porous Nano F. Fato este demonstrado pelos resultados de torque de remoção e pela análise histológica.
- c) As superfícies das amostras dos três grupos (ataque ácido – Porous, Porous Nano - flúor e Porous + CaMg) avaliadas apresentam rugosidade superficial (R_a , R_q , R_z e R_{max}) semelhantes. Entretanto, a deposição de Ca e Mg aumentou a molhabilidade da superfície em relação as amostras Porous e Porous Nano.
- d) As análises histológicas confirmam os achados do torque de remoção os quais apontam uma interação celular superior no grupo Porous Nano F em relação aos de mais (principalmente nas 2 primeiras semanas) e uma pior formação de tecido ósseo ao final do período de 8 semanas de análise apresentada pelo grupo Porous Nano CaMg.
- e) Diante do exposto, novos trabalhos devem ser realizados para determinar a influência dos diferentes parâmetros para melhor elucidar tais questionamentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON I, LINDER E, LARSSON L & BERGLUNDH T. **Deposition of nanometer scaled calcium-phosphate crystals to implants with a dual acid-etched surface does not improve early tissue integration.** Clin Oral Implants Res., 2013. 24(1):57-62.
- ABURAYA JH. **Modificação Superficial de Titânio para Promoção de Osseointegração.** Tese de doutorado. USP. São Paulo. 2011.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WALTER P. **Molecular Biology of the Cell.** 5th edition. New York: Garland Science, 2008. 1725 p.
- ALBERTINI M, YAGUE MF, LÁZARO P, CLIMENT MH, SANTOS JVR, BULLON P et al. **Advances in surfaces and osseointegration in implantology. Biomimetic surfaces.** ed Oral Patol Oral Cir Bucal. 2015. 20(3):316-25.
- ALBREKTSSON T, BRANEMARK PI, HANSSON HA & LINDSTROM J. **Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.** Acta orthopaedica Scandinavica. 1981. 52(2):155-170.
- ALBREKTSSON T & WENNERBERG A. **Oral implant surfaces: Part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them.** Int J Prosthodont. 2004. 17(5):536-543.
- ALLEGRI NI JR S, YOSHIMOTO M, SALLES MB & BRESSIANI AHA. **Biologic Response to Titanium Implants with laser treated surface.** JOMI. 2014. 29(1):67-70.
- ANIL S, ANAND PS, ALGHAMDI H & JANSEN JA. **Dental Implant Surface Enhancement and Osseointegration.** In: Implant Dentistry □ A Rapidly Evolving Practice. Rijeka: INTECH. 2011, 83-109p.
- ANNUNZIATA M, OLIVA A, ROCCI A, RULLO R & GUIDA L. **Bone marrow stromal cells response to fluoride-modified implant surfaces.** 19th Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration, 2010.
- BAN S, MARUNO S, HARADA A, HATTORI M, NARITA K & HASEGAWA J. **Effect of Temperature on Morphology of Electrochemically-Deposited Calcium Phosphates.** Dental Materials Journal. 1996. 15 (1):31-38.
- BATHOMARCO RV, SOLORZANO G, ELIAS CN & PRIOLI R. **Atomic force microscopy analysis of different surface treatments of Ti dental implant**

- surfaces.** Applied Surface Science. 2004. 233(1-4):29-34.
- BIVER E, THOUVEREY C, MAGNE D & CAVERZASIO J. **Crosstalk between tyrosine kinase receptors, GSK3 and BMP2 signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells.** Molecular and Cellular Endocrinology. 2014; 382(1):120–130.
- BRESSAN E, SBRICOLI L, GUAZZO R, TOCCO I, ROMAN M, VINDIGNI V, et al. **Nanostructured surfaces of dental implants.** Int J Mol Sci. 2013; 14(1):1918-31.
- BRUNETTE DM, TEXTOR M, TENGVALL P & THOMSEN P. **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological responses and Medical applications.** Springer Edited. Berlin-Heidelberg: 2001.
- CARPENTER JW. **Exotic animal formulary.** 3rd ed. W.B. Saunders. 2005. 427-432p.
- CHENG X, TSAO C, SAUL JM, SYLVIA V, CORNET M & CHRISTY R. **Comparison of Two Nanoparticle Formulations for Localized Delivery of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) from Aligned Collagen Fibers.** Pharmaceutical Nanotechnology. 2013; 1(2):105-114.
- CHO SA & PARK KT. **The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching.** Biomaterials. 2003. 24(20):3611–3617.
- COELHO, P.G. & LEMONS, J.E. **Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces.** J Biomed Mater Res A. 2009. 90(2):351-61.
- DAVIES, J. E. **Understanding Peri-Implant Endosseous Healing.** Journal of Dental Education; 2005; 67(8):932-949.
- DAVISON NL, SU J, YUAN H, VAN DEN BEUCKENN JJ, DE BRUIJN JD & BARRÈRE-DE GROOT F. **Influence of surface microstructure and chemistry on osteoinduction and osteoclastogenesis by biphasic calcium phosphate discs.** Eur. Cell. Mater. 2015. 20(29):314-329.
- DENARO AR. **Fundamentos de Eletroquímica.** Trad. J.H. Maar. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp. 1974. 59 p.
- DERKSEN RB, KONTOGIORGOS ED, DECHOW PC & OPPERMAN LA. **A Pilot Histologic Comparison of Bone-to-Implant Contact Between Phosphate-Coated and Control Titanium Implants in the Canine Model.** JOMI. 2014. 29(1):203–210.
- DOWLING A. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties.** Reino Unido: The Royal Society & The Royal Academy of

- Engineering, 2004. 127 p.
- ANES ED & MEYER JL. **The influence of fluoride on apatite formation from unsaturated solutions at pH 7.4.** J Dent Res 1978. 57:617–624.
- ELIAS CN & MEIRELLES L. **Improving osseointegration of dental implants.** Expert review of medical devices, 2010. 7(2):241-256.
- ELIAS CN & MATTOS PR. **Tratamentos das superfícies dos implantes para melhorar a qualidade e a osseointegração.** In: CARVALHO PSP. Osseointegração – 20 anos: Visão contemporânea da implantodontia. 1a Edição. São Paulo: Quintessence, 2009. 257 p.
- ELIAS CN. **Factors Affecting the Success of Dental Implants.** In: Implant Dentistry □ A Rapidly Evolving Practice. Rijeka: INTECH. 2011, 319-365 p.
- 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.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2012. 16():169-180.
- ELLINGSEN JE, JOHANSSON CB, WENNERBERG A & HOLMÉN A. **Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants.** JOMI 2004;19(5):659–666.
- FARLEY JR, WERGEDAL JE & BAYLINK DJ. **Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells.** Science 1983. 222:330–332.
- FENG B, WENG J, YANG BC, QU SX & ZHANG XD. **Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion.** Biomaterials. 2004 25(17):3421-3428.
- GRAVINA PA. **Biomimetização de diferentes superfícies de titânio com fibronectina.** Tese de Doutorado. IME. 2010.
- GUERRIERI GL, MIGUEL RC. **Implantodontia oral.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1982. 177 p.
- HANAWA T. **Titanium and its oxide film: A substrate for formation of apatite.** In: **The Bone-biomaterial Interface.** Primeira edição. Toronto – Canada: J. E. Davies. University of Toronto Press, 1991. 49-61 p.
- HANAWA T. **Biofunctionalization of titanium for dental implant.** Japanese Dental Science Review. 2010. 46(2):93—101
- HAGI TT, ENGGIST L, MICHEL D, FERGUSON SJ, LIU Y & HUNZIKER EB. **Mechanical insertion properties of calcium-phosphate implant coatings.** Clin. Oral Impl. Res. 2010. 21(11):1214–1222.

- HE FM, TANG GL, ZHAO SF & CHENG ZP. **Mechanical and Histomorphometric Evaluations of Rough Titanium Implants Treated with Hydrofluoric Acid/Nitric Acid Solution in Rabbit Tibia.** JOMI. 2011. 26(1):115–122.
- HEARD DJ. **The Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice: Analgesia and Anesthesia.** Volume 4. Número 1. 2001. 169-191p.
- HEREDIA MAL, WEISS P & LAYROLLE P. **An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy.** J Mater Sci: Mater Med. 2007. 18:381–390.
- HIEMENZ PC & RAJAGOPALAN R. **Principles of colloid and surface chemistry.** Terceira edição. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. 125-136.
- ISA ZM, SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D & STANFORD CM. **Effects of Fluoride-Modified Titanium Surfaces on Osteoblast Proliferation and Gene Expression.** JOMI. 2006; 21(2):203–211.
- KARAPILIS AC. **Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation.** In: bilezikian jp, Raisz LG, Martin TJ. Principles of bone biology. 3th edition. Volume 1. Elsevier Inc. 2008. 1942 p.
- KIM K, LEE BA, PIAO XH, CHUNG HJ & KIM KI. **Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface.** J Period Imp Sci 2013; 43(4):198-205.
- KIM MH, PARK K, CHOI KH, KIM SH, KIM SE, JEONG CM et al. **Cell Adhesion and in Vivo Osseointegration of Sandblasted/Acid Etched/Anodized Dental Implants.** Int. J. Mol. Sci. 2015. 16(5):10324-10336.
- LAUSMAA, J. **Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium.** In: titanium in Medicin. Primeira Edição. Berlin-Heidelberg: Springer, 2001. 232-266 p.
- LEBLEBICIOGLU B, RAWAL S & MARIOTTI A. **A review of the functional and esthetic requirements for dental implants.** J Am Dent Assoc. 2007. Mar. 138(3):321-9.
- LEE HJ, YANG IH, KIM SK, YEO IS & KWON TK. **In vivo comparison between the effects of chemically modified hydrophilic and anodically oxidized titanium surfaces on initial bone healing.** J Periodontal Implant Sci. 2015 Jun. 45(3):94-100.
- LE GUÉHENNEC L, SOUEIDAN A, LAYROLLE P & AMOURIQ Y. **Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.** Dental Material. 2015. 23(7):844-854.

- LOZANO RM, MACEDA BTP, CARBONERAS M, BUSTAMANTE EO, ALONSO MCG & ESCUDERO ML. **Response of MC3T3-E1 osteoblasts, L929 fibroblasts, and J774 macrophages to fluoride surface-modified AZ31 magnesium alloy.** J Biomed Mater Res. 2013. 101(10):2753–2762.
- LI B, HAO J, MIN Y, XIN S, GUO L, HE F et al. **Biological properties of nanostructured Ti incorporated with Ca, P and Ag by electrochemical method.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015. 51(1):80-86.
- LI D, FERGUSON SJ, BEUTLER T, COCHRAN DL, SITTIG C, HIRT HP & BUSER D. **Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants.** J Biomed Mater Res. 2002. 60(2):325–332.
- LIMA JHC, ELIAS CN & MEIRELLES LA. **A Osseointegração em Diferentes Tipos de Superfícies dos Implantes Osseointegráveis.** In: Cardoso RJA & Machado MEL. Odontologia: Arte e Conhecimento. São Paulo: Ed Artes Médicas, 2003. 334 p.
- LÜTJERING G & WILLIAMS JC. **Titanium.** Second edition. New York. Springer. 2007. 449p.
- MARQUES, C. **Tratamento de superfícies de implantes de titânio.** Dissertação de Mestrado IME, Rio de Janeiro. 2007.
- MARIEB EN. **Bones and Skeletal Tissue.** In: Heyden SJ, Schaefer EM (eds). **Human Anatomy and Physiology.** California: Benjamin/Cummings Pub: 1995.
- MARIN C, GRANATO R, SUZUKI M, GIL JN, PIATTELLI A & COELHO PG. **Removal Torque and Histomorphometric Evaluation of Bioceramic Grit-Blasted/Acid-Etched and Dual Acid-Etched Implant Surfaces: An Experimental Study in Dogs.** J Periodontol 2008; 79(10):1942-1949.
- MAXIMO FS. **Análise histológica e histomorfométrica entre enxerto ósseo autógeno e enxerto xenógeno (Bio-oss) em calvária de ratos.** Dissertação de Mestrado. São Leopoldo Mandic. Campinas/SP. 2011.
- MINTS D, ELIAS CN, FUNKENBUSCH P & MEIRELLES L. **Integrity of Implant Surface Modifications After Insertion.** JOMI. 2014;29(1):97–104.
- MONJO M, LAMOLLE SF, LYGSTADAAS SP, RONOLD HJ & ELLINGSEN JE. **In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants.** Biomaterials. 2008; 29(28):3771–80.
- MORENO EC, KRESAK M & ZAHRADNIK RT. **Physicochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries.** Caries Res 1977. 11(1):142–171.

- MORRA M, CASSINELLI C, CASCARDO G, CAHALAN P, CAHALAN L, FINI M et al. **Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies.** *Biomaterials*. 2003. 24(25):4639-4654.
- MOTOYOSHI M, HIRABAYASHI M, UEMURA M & SHIMIZU N. **Recommended placement torque when tightening an orthodontic -implant.** *Clin. Oral Implants Res*. 2006; 17(1):109-14.
- NELSON CJ, MINEVSKI ZS, URBAN RM, TURNER TM & JACOBS JJ. **Corrosion and wear resistant bioactive surgical implants.** Presented at ASM Materials and Processes for Medical Devices Conference. Anaheim, CA, September 8–10, 2003.
- PARK JW, KIM YJ, JANG JH & SONG H. **Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces.** *Clinical Oral Implants Research*. 2010; 21(11):1278-87.
- PARK J & LAKES RS. **Biomaterials: an introduction.** Third Edition. New York. Springer Scienc. 2007. 535p.
- PARK JH, LEE YK, KIM KM & KIM KN. **Bioactive calcium phosphate coating prepared on H₂O₂-treated titanium substrate by electrodeposition.** *Surface & Coatings Technology*. 2005. 195:252– 257.
- PEGUEROLES M, GIL FJ, PLANELL JA & APARICIO C. **The influence of blasting and sterilization on static and time-related wetTAB.ility and surface-energy properties of titanium surfaces.** *Surf. Coat. Tech*. 2008, 202(15):3470–9.
- QUEIROZ TP. **Estudo de implantes de TiCP com superfícies modificadas por feixe de laser com e sem deposição química de apatitas: análises topográfica, biomecânica e histométrica em coelhos.** Tese de Doutorado. UNESP. 2010.
- RAGHAVENDRA S, WOOD MC & TAYLOR TD. **Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature.** *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2005. May–Jun. 20(3):425–31.
- RAMAZANOGLU M, LUTZ R, RUSCHE P, TRABZON L, KOSE GT, TRECHTL C, et al. **Bone response to biomimetic implants delivering BMP-2 and VEGF: An immunohistochemical study.** *J Craniomaxillofac Surg*, Feb, 2013. 41(8):826-35.
- RAMIS JM, TAXT-LAMOLLE SF, LYNGSTADAAS SP, RESELAND JE, ELLINGSEN JE & MONJO M. **Identification of Early Response Genes to Roughness and Fluoride Modification of Titanium Implants in Human Osteoblasts.** *Implant Dent*. 2012 Apr;21(2):141-9.
- RESENDE CRS. **Implantes ortodônticos e osseointegráveis.** Tese de Doutorado.

- IME. 2014.
- ROBISON R. **The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification.** *Biochem J* 1923. 17:286–293.
- RYU JJ, PARK K, KIM HS, JEONG CM & HUH JB. **Effects of Anodized Titanium with RGD Peptide Immobilized Via Chemical Grafting or Physical Adsorption on Bone Cell Adhesion and Differentiation.** *JOMI*. 2013; 28(4):963–72.
- SALOU L, HOORNAERT A, LOUARN G & LAYROLLE P. **Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: An experimental study in rabbits.** *Acta Biomaterialia*. 2015. 11:494–502.
- SANTOS MV, ELIAS CN & LIMA JHC. **The effects of superficial roughness and design on the primary stability of dental implant.** *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011. Sep.13(3):215-23.
- SARTORETTO SC, ALVES ATNN, RESENDE RFB, CALASANS-MAIA J, GRANJEIRO JM & CALASANS MAIA MD. **Early osseointegration driven by the surface chemistry and wetability of dental implants.** *J Appl Oral Sci*. 2015. May-Jun; 23(3)279-287.
- SOUZA FC. **Avaliação da resposta tecidual ao implante de celulose bacteriana em coelhos: estudos experimentais.** Tese de Doutorado. FCMSC. São Paulo. 2010.
- SUBRAMANI K & MATHEW RT. **Titanium Surface Modification Techniques for Dental Implants—From Microscale to Nanoscale.** *Emerging Nanotechnologies in Dentistry: Processes, Materials and Applications*. 2012. 85-102.
- SUL YT, JOHANSSON C & ALBREKTSSON T. **Which Surface Properties Enhance Bone Response to Implants? Comparison of Oxidized Magnesium, TiUnite, and Osseotite Implant Surfaces.** *Int J Prosthodont* 2006. 19:319–329.
- SUL YT, JOHANSSON C & ALBREKTSSON T. **A novel in vivo method for quantifying the interfacial biochemical bond strength of bone implants.** *J R Soc Interface* 2010; 7(42):81-90
- SUL YT, JOHANSSON CB, JEONG Y, ROSER K, WENNERBERG A & ALBREKTSSON T. **Oxidized implants and their influence on the bone response.** *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2001. 12:1025–1031.
- SUL YT, JOHANSSON CB, JEONG Y, WENNERBERG A & ALBREKTSSON T. **Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides.***Clin. Oral Implants Res*. 2002a. 13:252–259.
- SUL YT, JOHANSSON CB, ROSER K & ALBREKTSSON T. **Qualitative and**

- quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants.** *Biomaterials* 2002b. 23:1809–1817.
- SUZUKIA EY & SUZUKI B. **Placement and removal torque values of orthodontic miniscrew implants.** *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2011. 139(5):669–678,.
- SYKARAS N, LACOPINO AM, MARKER, VA, TRIPLETT RG & WOODY RD. **Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review.** *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2000. 15(5):675-690.
- TABASSUM A, MEIJER GJ, WALBOOMERS XF & JANSEN JA. **Evaluation of primary and secondary stability of titanium implants using different surgical techniques.** *Clin. Oral Impl. Res*. 2013. 25(4):1–6.
- TEXTOR M, SITTIG G, FRAUCHIGER V, TOSATTI SI & BRUNETTE DM. **Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys.** In: *titanium in Medicine*. Springer Edited. Berlin-Heidelberg: 2001. 172-224.
- TRANQUILLI WJ, THURMON JC & GRIMM KA. **Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia.** 3rd ed Philadelphia: Lea and Febiger. 1996. 686-735p.
- WANG F, SHI L, HE WX, HAN D, YAN Y, NIU ZY et al. **Bioinspired micro/nano fabrication on dental implant–bone interface.** *App. Surf. Sci*. 2013. 265:480-488.
- WANG LN, JIN M, ZHENG Y, GUAN Y, LU X & LUO JL. **Nanotubular surface modification of metallic implants via electrochemical anodization technique.** 2014. 9(1):4421-4435.
- WENNERBERG A & ALBREKTSSON T. **On Implant Surfaces: A Review of Current Knowledge and Opinions.** *JOMI*. 2009. 25(1):63–74.
- WILLIAMS DF. **Titanium for medical applications.** In: *titanium in Medicine*. Springer Edited. Berlin-Heidelberg: 2001. 13-23.
- XUEREB M, CAMILLERI J & ATTARD NJ. **Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques.** *Int J Prosthodont*. 2015. 28(1):51-9.
- YANG C. **The effect of calcium phosphate implant coating on osteoconduction.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001. 92(6):606-9.
- YEO IS. **Reality of Dental Implant Surface Modification: A Short Literature Review.** *The Open Biomedical Engineering Journal*. 2014. 8():114-119.

- YUAN K, CHAN YJ, KUNG KC & LEE TM. **Comparison of Osseointegration on Various Implant Surfaces After Bacterial Contamination and Cleaning: A Rabbit Study.** JOMI. 2014. 29(1):32–40.
- ZHAO G, SCHWARTZ Z, WIELAND M, RUPP F, GEIS-GERSTORFER J, COCHRAN DL et al. **High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure.** J Biomed Mater Res. 2005. 74(1):49–58.
- ZHAO G, RAINES AL, WIELAND M, SCHWARTZ Z, BOYAN BD. **Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography.** Biomaterials. 2007. 28(18):2821–2829.
- ZHU X, KIM KH & JEONG Y. **Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial.** Biomaterials. 2001. 22(16):2199-2206.
- ZREIQAT H, VALENZUELA SM, NISSAN BB, ROEST R, KNABE C, RADLANSKI RJ et al. **The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts.** Biomaterials. 2005. 26(36):7579-756.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 8.1: DADOS COMPLETOS DA ANÁLISE DE RUGOSIDADE

AMOSTRA - Ra	POROUS	POROUS F	POROUS MGCA
1	1,583	1,586	1,552
2	1,605	1,559	1,538
3	1,681	1,508	1,575
4	1,547	1,525	1,555
5	1,621	1,537	1,509
6	1,551	1,53	1,531
7	1,612	1,528	1,521
8	1,641	1,509	1,589
9	1,614	1,514	1,578
10	1,573	1,553	1,529

média	1,6028	1,5349	1,5477
desv pad	0,041092849	0,024776557	0,026612654

AMOSTRA - Rz	POROUS	POROUS F	POROUS MGCA
1	9,734	9,279	9,561
2	8,669	9,644	9,601
3	10,011	8,718	9,289
4	9,383	8,673	8,998
5	9,244	8,929	9,652
6	8,833	8,851	9,251
7	9,831	8,596	9,213
8	9,866	9,393	9,488
9	9,114	9,202	10,089
10	9,375	9,301	8,781

média	9,406	9,0586	9,3923
desv pad	0,453422785	0,352924669	0,369076039

AMOSTRA - Rq	POROUS	POROUS F	POROUS CaMg
1	1,923	1,915	1,886
2	1,921	1,908	1,874
3	2,041	1,832	1,902
4	1,908	1,833	1,896
5	1,947	1,855	1,859
6	1,862	1,843	1,855
7	1,978	1,835	1,841
8	1,984	1,842	1,922
9	1,958	1,861	1,927
10	1,924	1,899	1,839

média	1,9446	1,8623	1,8801
desv pad	0,049166836	0,032615777	0,031715576

AMOSTRA - Rzmax	POROUS	POROUS F	POROUS CaMg
1	11,679	11,26	11,139
2	9,389	11,717	11,327
3	11,203	11,154	11,196
4	10,83	9,842	11,257
5	11,792	9,94	11,862
6	10,726	9,95	11,458
7	12,097	9,837	11,589
8	11,882	12,034	11,641
9	10,221	12,333	11,351
10	10,352	11,424	11,554

média	11,0171	10,9491	11,4374
desv pad	0,871395107	0,973250619	0,225648301

APÊNDICE 8.2: DADOS COMPLETOS DA ANÁLISE DE TORQUE DE INSERÇÃO

COELHO	POROUS	POROUS F	POROUS CaMg	SEMANAS
1	10,2	10,2	11	2
2	10	10,6	10,5	2
3	11	10	9,8	2
4	10,3	10,4	9,2	4
5	10,1	10,1	9,8	4
6	10,3	10,5	12,7	4
7	10	10,1	7,8	8
8	10	10	9,8	8
9	10,3	10,1	10	8

8.1 DADOS COMPLETOS DA ANÁLISE DE TORQUE DE REMOÇÃO

COELHO	POROUS	POROUS F	POROUS CaMg	SEMANAS
1	6,8	12,7	5,3	2
2	4,6	12,1	5,2	2
3	8,3	12,2	5,8	2
4	16	17,3	5,6	4
5	13,9	12,3	5,9	4
6	17	17,9	5,7	4
7	16,7	15,3	9,6	8
8	18,4	23,1	12	8
9	15,8	15,4	10,9	8

9 ANEXO

ANEXO 9.1: FICHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ANIMAL



Governo do Estado de Rio de Janeiro
Secretaria de Estado de Saúde
Instituto Vital Brazil


COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA VITAL BRAZIL

Niterói, 14 de janeiro de 2014.

Prezado (o) Felipe Silveira Maximo de Almeida

A comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Vital Brazil – CEUA VITAL BRAZIL, certifica que o projeto sob sua coordenação, intitulado “**Avaliação histológica da proliferação e diferenciação celular de dois tipos de tratamento de superfícies de mini implantes instalados em tíbias de coelhos**”, onde é prevista a utilização de 12 coelhos, foi aprovado por esta comissão no dia 14/01/2014, sob o nº de protocolo 002/2014, tendo validade até 14/01/2016.

Atenciosamente,


Cláudio Maurício de Souza
Coordenador CEUA VITAL BRAZIL