



## ÓXIDO DE TITÂNIO PRODUZIDO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA A MICROARCO PARA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES

Amanda dos Santos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Carlos Alberto Achete  
Lidia Ágata de Sena

Rio de Janeiro  
Outubro de 2013

ÓXIDO DE TITÂNIO PRODUZIDO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA A MICROARCO  
PARA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES

Amanda dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

---

Prof. Carlos Alberto Achete, D.Sc.

---

Dr<sup>a</sup>. Lidia Ágata de Sena, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Renata Antoun Simão, D.Sc.

---

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Mônica Diuana Calasans Maia, D.Sc.

---

Prof. Estevam Augusto Bonfante, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2013

Santos, Amanda dos

Óxido de titânio produzido por oxidação anódica a microarco para superfície de implantes / Amanda dos Santos.

– Rio de Janeiro: UFRJ/ COPPE, 2013.

XIX, 100 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Carlos Alberto Achete

Lidia Ágata de Sena

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 83-96.

1. Óxido de titânio. 2. Oxidação anódica a microarco. 3. Implantes. I. Achete, Carlos Alberto *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

*À minha mãe Conceição, pelo total apoio emocional  
e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.  
Nunca deixou de acreditar no meu sucesso, me incentivando  
principalmente nos momentos de maior fragilidade emocional.  
Sem você presente, jamais conseguiria chegar até aqui.  
Sem você tudo isso seria impossível!  
Ao meu pai Amaury, por me permitir crescer na  
minha profissão, não medindo esforços para que  
meus sonhos se realizassem.  
Pai, muito obrigada por tudo que  
sou e serei, pois sem seu apoio e compreensão este  
sonho não se realizaria.  
À memória da minha eterna “Tia Néa”.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a **Deus**, que me concedeu força e perseverança para continuar caminhando sempre em busca dos meus objetivos. Por me amparar nos momentos difíceis, me dar alento para superar as dificuldades, mostrar o caminho a seguir nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador, **Prof. Carlos Alberto Achete**, por acreditar e apostar no meu potencial. Agradeço a oportunidade e o privilégio de poder fazer parte do seu grupo de orientados. Agradeço também por jamais desistir de mim e ter me incentivado a percorrer este caminho nada fácil, por vezes tortuoso. Expresso aqui minha profunda gratidão pela orientação segura, pelos ensinamentos sempre muito bem fundamentados, pelas cobranças que me impulsionaram sempre a fazer o melhor e o apoio incondicional em todos os momentos que precisei, além de disponibilizar toda infraestrutura e suportes técnico e científico necessários para a concretização desta tese. Eu tenho inigualável e inquestionável respeito e admiração pelo meu “eterno orientador”.

Registro aqui a minha elevada estima, consideração e apreço à minha querida co-orientadora e amiga **Dra. Lidia Ágata de Sena**, que durante todo o período do meu doutorado sempre esteve disponível, indiscutivelmente atenciosa, inesgotavelmente paciente e que me transmitiu vastos conhecimentos e ensinamentos. Diversas vezes foi uma “psicóloga” me ajudando em diversas questões, tanto pessoais quanto profissionais. Agradeço sua compreensão e, principalmente, suas observações e orientações precisas ao longo da formulação desta tese. Sem dúvida, sem a sua preciosa e objetiva ajuda esta tese não teria nem a forma nem a consistência que apresenta. Por tudo isto quero manifestar o meu mais especial e sincero agradecimento.

Ao **Prof. José Mauro Granjeiro** quem viabilizou a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* desta tese. Pessoa ímpar, sempre disponível a ajudar e colaborar, com soluções concretas e imediatas. É exemplo de dinamismo e entusiasmo. Se puder, “move montanhas” para dar solução a um problema quando solicitado. Professor, sou muito grata por todo seu empenho em fazer com que esta tese acontecesse. A sua colaboração foi fundamental neste estudo e na finalização do mesmo.

Agradeço de maneira muito carinhosa à **Profª. Renata A. Simão** por sempre acreditar e me fazer crer que sou capaz, além da constante força e estímulo. Nossos encontros durante o período do doutorado foram escassos, porém o carinho e admiração

que tenho por você continuam os mesmos. Além de ser excelente profissional, é amiga nos momentos oportunos. Muito obrigada por tudo!

Ao **Prof. Estevam A. Bonfante**, primeiramente por aceitar de forma inequívoca e objetiva o convite para compor a minha Banca da minha tese. Além disso, agradeço toda atenção, orientação e cooperação na fase de realização do ensaio de torque de remoção.

Por falar em ensaio de torque de remoção, aproveito a oportunidade para agradecer a colaboração e empenho do **Dr. Charles Marin**, que juntamente com o Prof. Estevam ajudou de forma muito atenciosa e profissional na realização e obtenção dos resultados do ensaio de torque de remoção, inclusive na utilização do tão falado e esperado “torquímetro digital”.

À minha irmã **Andréa**, ao meu cunhado **Luiz Ricardo** e aos meus sobrinhos **Rian** e **Iago** pelo apoio, incentivo, companheirismo, paciência e pela alegria de todos os momentos. A família é a base de tudo! Quando se tem uma família unida e companheira tudo acontece mais sereno. Os conselhos da minha irmã foram muito importantes em diversas decisões tomadas durante este doutorado. Obrigada por me fazerem feliz! Amo vocês!

Gostaria de agradecer de forma especial à **Profª. Mônica D. Calazans Maia** que deu todo apoio e suporte necessários na fase dos ensaios *in vivo*. Agradeço carinhosamente ao cirurgião **Rodrigo Resende** e aos anestesistas, médicos veterinários **Douglas Castro** e **Alice Gress**. Também agradeço ao técnico do laboratório da UFF **Marco Antônio**, que muito me ajudou na fase de processamento das amostras, período em que me encontrava com dificuldades de andar por conta de uma hérnia de disco.

Agradeço ao querido e especial amigo **Dr. Jailton Carreteiro Damasceno** por quem tenho profundo carinho e admiração. Pessoa ímpar, de uma calma invejável! A qualquer hora que eu precisar, sei que poderei contar com ele. Agradeço pelas palavras de incentivo, pela paciência, pela compreensão, pela força e estímulo ao longo da elaboração desta tese. Amigo que tenho muito orgulho de fazer parte do seu círculo de amizades. Valeu Jájá!!!

Outra pessoa a quem quero agradecer nominalmente é o amigo **Ronaldo P. Miloski** que, sem sua atuante, influente e incansável colaboração e contribuição no desenvolvimento de sistemas e dispositivos eletroeletrônicos, eletroquímicos e mecânicos necessários para que o processo de oxidação anódica a microarco se

consolidasse com a alta qualidade que dispomos hoje inclusive com a possibilidade de serialização do processo, certamente as dificuldades enfrentadas seriam superlativas. Além disso, a amizade e carinho mútuos são marcas registradas do nosso convívio durante esses anos que passei no Inmetro. Diversas vezes me deu sugestões sempre encapsuladas com soluções técnicas estruturadas e pertinentes. Ronaldo, obrigada por tudo!!!

Ao amigo de todos os momentos **Leandro Reis Lidízio** por sempre estar ao meu lado e me acalmar nas ocasiões em que mais precisei. Também por me ajudar incansavelmente no desenvolvimento das amostras (principalmente no início do doutorado) e até hoje, sempre que solicitado, está pronto a me ajudar. As análises de MEV são fruto do seu precioso trabalho. Valeu Leandro!!!

Ao querido funcionário da secretaria da COPPE/UFRJ **Francisco de Assis**, que tenho profundo carinho e apreço. Sou grata por toda atenção e disponibilidade ao atender meus chamados, sempre tirando dúvidas sobre prazos e datas, além de me acalmar nos momentos que precisei. Fran, verdadeiramente, muito obrigada por toda sua atenção, carinho e profissionalismo. Você é especial!

Agradeço de uma forma muito especial ao **Labit** (Laboratório de Biomateriais e Tribologia), no qual dei meus primeiros passos no desenvolvimento de superfícies para implantes odontológicos e que hoje tenho a certeza de que nada foi em vão. Agradeço também todo carinho, dedicação, profissionalismo e companheirismo à equipe do Labit, meus companheiros: **Dr. Rafael Mello Trommer** e **Ricardo dos Santos**.

Já que entrei no assunto Labit, quero agradecer especialmente à amiga **Dra. Marcia M. Maru** por toda sua atenção, recepção, ajuda, generosidade, paciência e profissionalismo que dedicou a mim durante todos esses anos em que trabalhamos juntas. Sinto-me honrada quando faz suas observações sempre muito pertinentes com relação ao meu trabalho. Maru, obrigada por tudo!

Ao amigo **Dr. Marcos Motta de Souza** pelo incentivo e carinho dedicados a mim durante todo o período de desenvolvimento desta tese. Muitos conselhos foram dados, muitas conversas construtivas realizadas. Sempre se manteve na torcida pelo sucesso deste trabalho. Sua alegria contagiante é algo que faz a diferença! Valeu “Mottinha” por todo apoio moral!!!

À **Dra. Joyce R. Araújo** por seu inesgotável empenho e competência em realizar as análises de XPS, assim como discutir os resultados. Nunca se omitiu, pelo

contrário, sempre esteve disponível para ajudar e elucidar quaisquer questões relativas aos resultados. Muito obrigada, Joyce!

Agradeço também ao **Dr. Alexei Kusnetsov** pelas diversas análises de Difração de Raios X realizadas, sobretudo pelas incansáveis reuniões para revisão do nosso artigo, principalmente no que diz respeito à correção do inglês. Sempre esteve disponível para discutirmos sobre as questões relacionadas às análises de DRX.

À **Dra. Sandra M. Landi** pelas análises de MET e pelos relatórios muito bem desenvolvidos, além de sua presteza em ajudar nas questões relativas à escrita da metodologia das análises e também por me ensinar um pouco mais sobre microscopia de transmissão.

À minha amiga, que não é uma amizade apenas profissional, mas principalmente pessoal: a querida **Dra. Claudia S. Castro**, a quem nomeio carinhosamente de “Ponto fora da curva”! Sou verdadeiramente grata por sua amizade, carinho, por todos os conselhos, pelas nossas conversas dentro do ônibus Recreio (infinitas conversas... rrsrs). Você foi muito importante para que eu seguisse adiante, pois por algumas vezes cheguei a hesitar. Você me deu força! Sempre acreditou e confiou no meu potencial e me fez acreditar e ver que sou capaz. Amiga, obrigada por tudo!!!

À querida amiga **Dra. Marília Beltrão**, que chegou na Dimat já no meu último ano de doutorado, portanto em um momento delicado no qual eu estava muito preocupada, estressada, com alguns problemas técnicos, inclusive de saúde. Sua alegria contagiante e seus conselhos diários foram fundamentais nesta fase da minha vida. Não posso deixar de mencionar que sua ajuda na formatação final da tese foi especial! Valeu Maribel!!!

Agradeço ao **Dr. Gustavo Fernandes** que realizou a análise histomorfométrica das minhas amostras, inclusive “correndo contra o tempo”, sob forte pressão, uma vez que foi o último e um dos mais importantes resultados desta tese, mas no final deu tudo certo e conseguimos os resultados a tempo. Gustavo, muito obrigada pela sua colaboração.

Ao **Prof. Ricardo Tadeu**, da Engenharia Nuclear / Coppe, que muito gentilmente permitiu que as esterilizações necessárias para a realização do ensaio *in vivo* fossem realizadas em seu departamento.

Quero agradecer muito carinhosamente ao **Sr. Wilson Sena** que confeccionou o adaptador para utilização no torquímetro digital, peça que não existe no mercado e que,

sem a qual, o ensaio de torque de remoção não poderia ser realizado. Sua colaboração na fase final desta tese foi imprescindível para a evolução deste trabalho.

À equipe da Dipro (Inmetro) pela execução dos ensaios de citotoxicidade das minhas amostras, liderada pela **Dra. Luciene B. Balottin**.

Não poderia deixar de agradecer às “meninas da secretaria”: **Alcione, Ana Paula, Estefânia e Rosana**, que inúmeras vezes “quebraram meus galhos”, tiraram dúvidas e sempre me trataram com muito carinho e respeito.

Aos **funcionários do Inmetro**, mais precisamente da Dimat, que me acolheram de forma carinhosa e que certamente de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento e realização da minha pesquisa.

Finalmente, faço questão de agradecer a todas as pessoas que torceram ou intercederam por mim, mesmo que de forma anônima ou discreta. É como disse Vinícius de Moraes: **“Você não faz amigos, você os reconhece”**.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## ÓXIDO DE TITÂNIO PRODUZIDO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA A MICROARCO PARA SUPERFÍCIE DE IMPLANTES

Amanda dos Santos

Outubro/2013

Orientadores: Carlos Alberto Achete

Lidia Ágata de Sena

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho foram desenvolvidas superfícies de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) com íons incorporados produzidas pela técnica eletroquímica de oxidação anódica a microarco para utilização em implantes biomédicos com objetivo de avaliar a osseointegração em função da modificação superficial. Foi realizada a caracterização morfológica, composicional, mecânica e biológica dos grupos de superfícies desenvolvidos: grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf (incorporação de íons Ca e P); grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (incorporação de íons P); grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco (incorporação de íons P e Zn). De acordo com o ensaio de citotoxicidade todas as superfícies são atóxicas. Para a avaliação da osseointegração foi selecionado o grupo que apresentou resultados mais satisfatórios em todas as caracterizações, além de apresentar maior resistência ao destacamento, que foi o grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (teste). Realizada a avaliação *in vivo*, após quatro semanas foi procedida a eutanásia. Os resultados da avaliação histomorfométrica permitiram observar que a superfície teste apresentou maior área de neoformação óssea, comprovando que a modificação superficial do titânio pela técnica de oxidação anódica a microarco favorece a osseointegração de implantes biomédicos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

## TITANIUM OXIDE PRODUCED BY MICRO-ARC OXIDATION FOR IMPLANT SURFACES

Amanda dos Santos

October/2013

Advisors: Carlos Alberto Achete

Lidia Ágata de Sena

Department: Materials and Metallurgical Engineering

In this work titanium oxide ( $\text{TiO}_2$ ) surfaces were developed with ions incorporated produced by electrochemical technique of micro-arc oxidation for use in biomedical implants to evaluate osseointegration due to surface modification. It was performed morphological, compositional, mechanical and biological characterization of the surface groups developed:  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf group (incorporation of Ca and P ions);  $\text{TiO}_2$  Ácidos group (incorporation of P ions);  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco group and  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco group (incorporation of P and Zn ions). According to the cytotoxicity test all surfaces are nontoxic. For the evaluation of osseointegration it was selected the group with most satisfactory results in all characterizations, besides show best detachment resistance, which was  $\text{TiO}_2$  Ácidos group (test). Performed the *in vivo* evaluation, after four weeks euthanasia was proceeded. Histomorphometric results propose that the surface area test showed higher bone formation, demonstrating that the surface modification of titanium by micro-arc oxidation technique favors the osseointegration of biomedical implants.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
INTRODUÇÃO .....	1
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	4
OBJETIVOS.....	4
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	5
REVISÃO DA LITERATURA .....	5
<b>3.1</b> – Oxidação Anódica a Microarco.....	7
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
<b>4.1</b> – Preparação da superfície do titânio .....	17
<b>4.2</b> – Sistema para produção dos recobrimentos.....	17
<b>4.3</b> – Produção dos recobrimentos .....	19
<b>4.4</b> – Caracterização dos recobrimentos .....	20
<b>4.5</b> – Avaliação do desempenho mecânico .....	23
4.5.1 - Ensaio de riscamento .....	24
4.5.2 - Ensaio de torque de remoção .....	24
<b>4.6</b> – Avaliação da citotoxicidade .....	26
<b>4.7</b> – Avaliação <i>In vivo</i> .....	27
4.7.1- Preparo dos animais.....	27
4.7.2- Material.....	28
4.7.3- Procedimentos de anestesia .....	28
4.7.4- Procedimentos cirúrgicos .....	29
4.7.5- Obtenção das amostras.....	30
4.7.6- Processamento das amostras.....	30
- Corte dos corpos de prova.....	31
<b>4.8</b> – Análise histomorfométrica .....	33
- Análise Estatística .....	33

<b>CAPÍTULO 5</b> .....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
<b>5.1</b> – Caracterizações morfológica, estrutural e composicional dos recobrimentos ..	34
- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Corte transversal (FIB) .....	34
- Rugosidade e Espessura .....	36
- Difração de Raios X (DRX).....	39
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	42
- Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) .....	47
- Molhabilidade.....	55
- Ensaio de Riscamento ou “ <i>Scratch test</i> ” .....	57
<b>5.1.1</b> – Recobrimentos de TiO <sub>2</sub> Ácidos contendo zinco incorporado.....	60
- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Corte transversal (FIB) .....	60
- Rugosidade e Espessura .....	61
- Difração de Raios X (DRX).....	62
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	63
- Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) .....	66
- Ensaio de Riscamento ou “ <i>Scratch test</i> ” .....	69
<b>5.2</b> – Ensaio <i>In vitro</i> – Avaliação da Citotoxicidade.....	72
<b>5.3</b> – Avaliação <i>In vivo</i> .....	74
- Ensaio de Torque de Remoção.....	74
- Análise Histomorfométrica .....	76
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	80
CONCLUSÕES .....	80
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	82
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO A .....	97
ANEXO B .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 4.1-</b> Sistema de deposição utilizado para anodização: (a) fonte de tensão DC; (b) circuito em série para anodização de 04 superfícies ao mesmo tempo; (c) eletrodo de platina personalizado e tampa de teflon; (d) béquer encamisado com circulação de água .....	18
<b>Figura 4.2-</b> Ilustração dos fenômenos hidrofobicidade x hidrofiliicidade .....	23
<b>Figura 4.3-</b> Adaptação do bloco ósseo com o implante na morsa sobre a bancada.....	25
<b>Figura 4.4-</b> (a) Torquímetro digital; (b) No retângulo vermelho, adaptador confeccionado para adaptação do torquímetro ao implante .....	26
<b>Figura 4.5-</b> Posicionamento do torquímetro ao implante .....	26
<b>Figura 4.6-</b> Fotos dos implantes inseridos na tíbia do animal (a, b) e suturas (c, d) .....	29
<b>Figura 4.7-</b> (a) Secagem dos corpos de prova; (b) fôrmas selecionadas e vedadas em placa de vidro; (c) acomodação dos copos de prova nas formas selecionadas; (d) corpos de prova incluídos em resina poliéster cristal .....	31
<b>Figura 4.8-</b> (a) Corte longitudinal inicial do corpo de prova visto de frente; (b) Corte longitudinal inicial do corpo de prova visto lateralmente .....	31
<b>Figura 4.9-</b> (a) Corte da lâmina com espessura de aproximadamente 0,3mm; (b) Lâmina após corte com aproximadamente 0,3mm de espessura .....	32
<b>Figura 4.10-</b> Amostra lixada e fixada em placa de vidro, pronta para análise histomorfométrica .....	32
<b>Figura 5.1-</b> Micrografias da topografia dos recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf (a, b) e do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (c, d) com aumentos de 1000x (a, c) e 3000x (b, d) .....	35

<b>Figura 5.2-</b> Corte transversal dos recobrimentos: (a) grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf; e (b) grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos produzidos por FIB .....	36
<b>Figura 5.3-</b> Difratoograma do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf obtido em incidência rasante (linha preta); Padrões de raios X do anatásio (linha azul), do rutilo (linha verde), do titânio (linha marrom) e perfil calculado no método de Rietveld (vermelho). Detalhe: Difratoogramas na geometria Bragg-Brentano (indicação de cores similar) .....	40
<b>Figura 5.4-</b> Difratoogramas do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (preto) obtidos em incidência rasante, padrão anatásio (azul), padrão de titânio (marrom) e perfil calculado no método de Rietveld (vermelho) .....	42
<b>Figura 5.5-</b> Micrografia de MET do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf: (a) A cruz laranja identifica fase cristalina e a cruz azul identifica fase amorfa; (b) Espectros de EDS das fases amorfa e cristalina; e (c) padrão de difração de elétrons (SAED) .....	43
<b>Figura 5.6-</b> (a) Micrografia de MET (HAADF) do corte transversal do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Cálcio; (d) Fósforo e (e) Titânio .....	44
<b>Figura 5.7-</b> (a) Micrografia de HAADF/STEM do corte transversal do recobrimento de TiO <sub>2</sub> Ácidos; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Fósforo e (d) Titânio (Imagens: 20 X 20 pixels Tamanho: (9,21 x 9,21) nm <sup>2</sup> ) .....	45
<b>Figura 5.8-</b> (a) Micrografia de STEM/MET do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos; (b) Espectro de EDS na região cristalina (cruz verde) e na região amorfa (cruz amarela) .....	46
<b>Figura 5.9-</b> Micrografias de MET de alta resolução e padrão de difração de elétrons (SAED) do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos: (a) região cristalina e (b) região amorfa .....	47
<b>Figura 5.10-</b> Concentração atômica dos elementos (at%) no recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf em função do tempo de bombardeamento .....	48
<b>Figura 5.11-</b> Espectro <i>survey</i> de XPS do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf e percentual atômico (at.%) para cada elemento .....	49

<b>Figura 5.12-</b> Picos de energias de ligação de XPS do Titânio (Ti 2p) no recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf .....	50
<b>Figura 5.13-</b> Picos de energias de ligação de XPS do Cálcio (Ca2p) no recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf .....	51
<b>Figura 5.14-</b> Picos de energias de ligação de XPS do Oxigênio (O1s) no recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf .....	52
<b>Figura 5.15-</b> Picos de energias de ligação de XPS do Fósforo (P2p) no recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf .....	53
<b>Figura 5.16-</b> Concentração atômica dos elementos (at%) em função do tempo de bombardeamento com íons Ar <sup>+</sup> para o recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos .....	54
<b>Figura 5.17-</b> Espectros de XPS em alta resolução do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos: (a) titânio (Ti 2p), (b) oxigênio (O 1s) e (c) fósforo (P 2p) .....	55
<b>Figura 5.18-</b> Comparação da molhabilidade das superfícies de Ti puro polido e os recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf e grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos .....	57
<b>Figura 5.19-</b> Evolução do molhamento na superfície anodizada com gota de água destilada (900s) .....	57
<b>Figura 5.20-</b> Micrografia por MEV das trilhas após ensaio de riscamento no recobrimento: (a) do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf e (b) do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos. As setas indicam a posição onde o destacamento do recobrimento foi iniciado. Retângulo preto na parte superior representa o percurso da trilha .....	58
<b>Figura 5.21-</b> Micrografias por MEV por elétrons retroespalhados das trilhas após ensaio de riscamento nos recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf (superior) e do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (inferior): (a, c) região de início de destacamento do recobrimento; (b, d) ampliação de 2500x .....	59
<b>Figura 5.22-</b> Micrografias por MEV da topografia dos recobrimentos (a) TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco com aumento de 3000x .....	61

<b>Figura 5.23-</b> Micrografias por MEV do corte transversal dos recobrimentos preparados por FIB: (a) grupo TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco.....	61
<b>Figura 5.24-</b> Padrões de difração de raios X dos recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco (vermelho), grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco (azul) e grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (preto) .....	63
<b>Figura 5.25-</b> Micrografia de MET do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco: (1) fase amorfa e (2) fase cristalina .....	64
<b>Figura 5.26-</b> Espectros de EDS das fases amorfa e cristalina do recobrimento do grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco .....	64
<b>Figura 5.27-</b> (a) Micrografia de MET (HAADF) do corte transversal do recobrimento de TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Fósforo; (d) Titânio e (e) Zinco .....	65
<b>Figura 5.28-</b> Concentração atômica dos elementos (at%) nos recobrimentos: (a) grupo TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco em função do tempo de bombardeamento com íons Ar <sup>+</sup> .....	67
<b>Figura 5.29-</b> Picos de XPS em alta resolução para os elementos: (a) titânio (Ti 2p), (b) oxigênio (O 1s), (c) fósforo (P 2p) e (d) zinco (Zn 2p) .....	68
<b>Figura 5.30-</b> Ensaio de riscamento dos recobrimentos: (a) TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco. As setas indicam o primeiro destacamento em cada trilha. Retângulo preto na parte superior da figura representa o percurso da trilha.....	69
<b>Figura 5.31-</b> Gráficos de (1) posição e (2) carga crítica dos conjuntos de amostras dos grupos TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf; TiO <sub>2</sub> Ácidos; TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco.....	71
<b>Figura 5.32-</b> Comparação dos resultados dos métodos XTT e NRU para o grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf .....	72
<b>Figura 5.33-</b> Comparação da citotoxicidade pelo método NRU para todos os grupos .....	73

<b>Figura 5.34-</b> Blocos ósseos.....	74
<b>Figura 5.35-</b> Torque de remoção (Ncm) para os grupos controle e teste.....	75
<b>Figura 5.36-</b> Análise histomorfométrica da área de tecido ósseo nos filetes de rosca dos implantes do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (tratado) e grupo Controle. As barras representam o intervalo de confiança, considerando alfa = 0,05 .....	76
<b>Figura 5.37-</b> Análise histomorfométrica da área de tecido conjuntivo nos filetes de rosca dos implantes do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos (tratado) e grupo Controle. As barras representam o intervalo de confiança, considerando alfa = 0,05 .....	77
<b>Figura 5.38-</b> Fotomicrografias das lâminas dos grupos Controle (a, b) e TiO <sub>2</sub> Ácidos (c, d), obtidas por microscópio de luz de campo claro (a, c) com filtro polarizador (b, d), com aumento de 10x .....	78

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1-</b> Condição de anodização (ABDULLAH, 2010) .....	13
<b>Tabela 4.1-</b> Parâmetros utilizados na produção dos recobrimentos de TiO <sub>2</sub> .....	19
<b>Tabela 4.2-</b> Parâmetros utilizados para a realização das medidas de rugosidade das amostras .....	21
<b>Tabela 5.1-</b> Rugosidade a média (Ra) e espessura média dos recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO <sub>2</sub> Ácidos .....	37
<b>Tabela 5.2-</b> Percentual atômico (at%) para cada pico dos elementos do recobrimento de TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf.....	49
<b>Tabela 5.3-</b> Média dos valores de rugosidade e espessura nos recobrimentos do grupo TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e do grupo TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco.....	62
<b>Tabela 5.4-</b> Valores das médias e desvios padrões da posição e força do primeiro destacamento na trilha dos recobrimentos: (a) TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco.....	70

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A implantodontia é uma das especialidades da odontologia que mais cresceu nos últimos anos. A difusão da reabilitação oral por meio de implantes odontológicos é cada vez mais crescente, assim como a quantidade de profissionais habilitados para desenvolver o procedimento. A disponibilidade de implantes no mercado, o custo do tratamento, a estética proporcionada e a propaganda maciça nos meios de comunicação são pontos importantes na escolha do tratamento pelo paciente. Em relação à parte clínica, podemos encontrar uma variedade de produtos comerciais com diferentes modificações superficiais, entre outras características, e que alcançam uma boa resposta de osseointegração.

Apesar do alto percentual de sucesso em longo prazo, a reabilitação oral por meio de implantes odontológicos ainda tem suas limitações. Pelo protocolo convencional em duas etapas, após a cirurgia de inserção do(s) implante(s), o período de osseointegração varia de 3 a 6 meses e só após este período pode-se colocá-lo em função (MISCH, 2000). Este é o tempo necessário para que uma união estável e funcional entre o osso e a superfície do implante seja estabelecida. A osseointegração é caracterizada pela ancoragem direta e estável do implante proporcionada pela formação de tecido ósseo circundante sem crescimento de tecido fibroso interfacial (ALBREKTSSON & WENNERBERG, 2004a).

Intensificam os estudos nas áreas de Implantodontia e de Engenharia de materiais para o desenvolvimento de estratégias que acelerem os mecanismos de osseointegração, a fim de conferir maior estabilidade no processo de remodelação óssea e permitir um carregamento precoce do implante. Aceleração na osseointegração é um dos grandes objetivos a serem alcançados nas pesquisas atuais. Dentre os biomateriais utilizados na implantodontia, o titânio comercialmente puro e suas ligas destacam-se devido à sua excelente biocompatibilidade, propriedades biomecânicas superiores, facilidade de modificação superficial do implante, baixo módulo de elasticidade, facilidade no processo de esterilização e excelente resistência à corrosão (ABDULLAH, 2010; LIU *et al.*, 2004; WILLIAMS, 1994).

A superfície do biomaterial apresenta papel crucial na resposta dos tecidos subjacentes aos dispositivos médicos artificiais, pois constitui contato direto com o fluido corpóreo. Modificações composicionais e/ou topográficas são realizadas a fim de

umentar o grau de biocompatibilidade da interface implante-osso (LIU *et al.*, 2004). Na busca por superfícies que promovam uma rápida e eficaz osseointegração, estudos têm sido desenvolvidos de forma a modificar a superfície do titânio pelos mais variados processos. Através do uso isolado ou combinação de processos mecânicos, químicos e físicos é possível alcançar composições e texturas superficiais diferenciadas (SILVA *et al.*, 2005; XUANYONG *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004 ).

Um dos primeiros recobrimentos cerâmicos estudados para aplicações biomédicas foi de hidroxiapatita (HA), principalmente devido à sua grande similaridade com o componente inorgânico dos ossos e dentes, sendo a forma de fosfato de cálcio mais estável e a menos solúvel. Embora tenham sido desenvolvidas metodologias simples, rápidas e de baixo custo para produção de recobrimentos de HA, a consolidação destes processos não ocorreu devido à sua natureza frágil, baixa tenacidade à fratura e baixa aderência na interface do recobrimento. Uma alternativa que tem recebido considerável interesse é o desenvolvimento de recobrimentos de óxido de titânio -  $TiO_2$  (BRANDÃO *et al.*, 2010; HANAWA, 2010; COSTA *et al.*, 2009; RAVAGLIOLI & KRAJEWSKI, 1992).

Empregada no presente estudo, a técnica de oxidação anódica a microarco é uma técnica simples, bem estabelecida, reproduzível, de baixo custo, que proporciona melhora na resistência à corrosão, produz recobrimentos uniformes com superfície porosa homogênea, rugosa e com grande variabilidade de espessura (na faixa entre 10nm e 40 $\mu$ m). Estas características são alcançadas pelo controle dos parâmetros do processo, como: voltagem, tempo, composição e concentração do eletrólito, temperatura e intensidade de corrente (OMIDVAR *et al.*, 2011).

Outra abordagem que vem apresentando resultados clínicos promissores é o desenvolvimento de recobrimentos de óxido de titânio com íons incorporados (WEI, 2007). A incorporação iônica no recobrimento pode estar associada ao tipo de eletrólito empregado. O mais bem sucedido recobrimento de óxido de titânio disponível comercialmente possui íons P (fósforo) incorporados, que ao serem liberados nas primeiras etapas do remodelamento ósseo, entram em contato com o fluido biológico e maximizam o processo de mineralização. Uma abordagem muito pesquisada é verificar se a adição de íons cálcio à superfície de óxido de titânio contendo íons P possa vir a acelerar ainda mais este processo, potencializando assim a resposta óssea (SHIBUYA, 2009).

O estudo desenvolvido anteriormente mostrou que o processo de anodização a microarco produz recobrimentos de óxido de titânio contendo cálcio e fósforo incorporados com características topográficas e de bioatividade pelo ensaio *in vitro* promissoras a uma osseointegração bem sucedida (SANTOS, 2008). O presente trabalho visou aprimorar o processo de produção de recobrimentos de óxido de titânio pelo processo de anodização a microarco. Duas diferentes soluções eletroquímicas foram empregadas e a caracterização composicional, morfológica, estrutural, biomecânica e de biocompatibilidade *in vitro* pelo ensaio de citotoxicidade dos recobrimentos produzidos foi realizada. A incorporação de metais no recobrimento foi avaliada pelo uso de duas concentrações de nitrato zinco ao eletrólito (0,04M e 0,1M) a um dos eletrólitos utilizados. Por fim, uma das superfícies foi avaliada pelo ensaio *in vivo* por 30 dias, análise histomorfométrica e ensaio de torque de remoção foram realizados para avaliar a osseointegração.

## CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal desenvolver, caracterizar e avaliar a biocompatibilidade de recobrimentos de óxido de titânio produzidos pela técnica eletroquímica de oxidação anódica a microarco sobre substrato de titânio puro para utilização em implantes biomédicos.

Para alcançar o objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

1 - Produção e caracterização de recobrimentos de óxido de titânio contendo: 1) cálcio e fósforo; 2) fósforo e 3) fósforo e zinco produzidos pela técnica eletroquímica de oxidação anódica a microarco. Nesta etapa foi estabelecido procedimento otimizado a fim de garantir reprodutibilidade e qualidade das superfícies produzidas.

2 - Avaliação da citotoxicidade dos recobrimentos produzidos, conforme norma ISO 10993-5 (2009). A superfície de titânio puro usinada foi utilizada como controle.

3 - Avaliação da resposta biológica através dos ensaios *in vivo* dos recobrimentos de óxido de titânio contendo fósforo. A caracterização foi conduzida pelo ensaio de torque de remoção e pela análise histomorfométrica.

4 - Correlação das propriedades físico-químicas, mecânicas e de superfície com a resposta biológica para os acabamentos superficiais.

### CAPÍTULO 3 – REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente as pesquisas na área de biomateriais para uso em implantes odontológicos têm direcionado seus esforços na busca de uma superfície que promova osseointegração rápida e duradoura (SAMMONS *et al.*, 2005). A terapia com implantes odontológicos está cada vez mais difundida na sociedade moderna, acarretando numa constante necessidade de desenvolvimento e aprimoramento das superfícies e técnicas de modificação superficial existentes. O grande desafio nesta área de pesquisa é o desenvolvimento de uma superfície que promova aceleração na osseointegração.

Com o objetivo de substituir de forma parcial ou total um tecido, órgão ou função do corpo, o uso de um biomaterial visa promover melhora da qualidade de vida do paciente (MONTENEGRO, 2007). O biomaterial deve ser compatível com o organismo vivo de forma a provocar mínima reação adversa ao organismo. O desafio atual é a biofuncionalidade, ou seja, capacidade de exercer a função que lhe é atribuída como se fosse próprio do organismo. Um biomaterial ideal deveria induzir uma rápida, previsível e controlada cicatrização dos tecidos hospedeiros (OLIVEIRA & NANJI, 2004).

O sucesso ou fracasso da terapia com implantes dentários é principalmente baseado nos princípios da criação e manutenção de uma interface entre o implante e osso circunjacente. Isto é conseguido pelo fenômeno chamado osseointegração, que consiste no estabelecimento de uma união estável e funcional entre o osso e a superfície do implante. A ancoragem direta e estável do implante é alcançada pela formação de tecido ósseo circundante sem crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (ALBREKTESSON & WENNERBERG, 2005; BRÅNEMARK *et al.*, 1977, 1969).

Fatores sistêmicos e locais influenciam na obtenção de uma interface osseointegrada e, por conseguinte, na estabilidade do implante. Características composicionais, morfológicas e superficiais, como a rugosidade do implante, têm recebido grande atenção em estudos atuais, com o objetivo de conseguir uma interação ainda mais favorável entre o implante e os tecidos circunjacentes (ALLA *et al.*, 2011). Para isto, é necessário que sejam desenvolvidos biomateriais que atendam a estes requisitos e, desta forma, haja a osseointegração.

De acordo com a composição química, os biomateriais são classificados em: poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos. Os biomateriais metálicos são

utilizados principalmente na reposição de tecidos duros como ossos e dentes, na forma de próteses de quadril e implantes dentários. Dentre os materiais empregados na substituição de órgãos que são constantemente submetidos a cargas funcionais destaca-se o titânio, por apresentar módulo de elasticidade relativamente baixo quando comparado ao aço inoxidável e às ligas de Co-Cr-Mo, boa resistência à fadiga, usinabilidade e conformidade, além de elevada resistência à corrosão quando em contato com fluidos corpóreos e biocompatibilidade. O módulo de elasticidade do titânio (100 GPa) é de 2 a 4 vezes maior que o osso humano (10 a 30 GPa) (ABDULLAH, 2010; ALMEIDA, 2008; WILLIAMS, 1994).

O uso do titânio como biomaterial para implante foi iniciado em meados da década de 60, na Suécia, por Brånemark. Somente a partir de 1980, com os resultados destes estudos, aumentou o interesse pelos sistemas de implantes osseointegrados, tornando-os amplamente difundidos na Odontologia.

Embora nenhum material seja totalmente biocompatível, sabe-se que diversos fatores influenciam na osseointegração do titânio, principalmente as propriedades de superfície, composicionais, morfológicas, estruturais, mecânicas, biológicas e, portanto o biomaterial pode ter um desempenho altamente satisfatório se estes requisitos forem atendidos de forma apropriada (GEBRAN & WASSAL, 2007). No que diz respeito à resistência à corrosão do titânio, pode-se dizer que esta é a característica que o diferencia entre outros metais empregados para aplicação como biomaterial, pois o mesmo reage instantaneamente quando em contato com o ar formando uma camada de óxido de titânio com espessura de 2 a 10 nm (DONLEY & GILLETTE, 1991). Esta camada superficial de óxidos é reportada como provedora da biocompatibilidade do titânio (LAUTENSCHLAGE & MONAGHAN, 1993).

O óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) pode se apresentar em três diferentes formas alotrópicas: anatásio (estrutura cristalina tetragonal), rutilo (estrutura cristalina tetragonal) e broquita (estrutura cristalina ortorrômbica). Geralmente em temperaturas abaixo de  $350^\circ\text{C}$  o óxido de titânio existe em sua forma amorfa (ABDULLAH, 2010). Enquanto o rutilo é a fase mais estável do  $\text{TiO}_2$ , o anatásio e broquita são metaestáveis em todas as temperaturas. Algumas propriedades do  $\text{TiO}_2$  são sensíveis à sua forma cristalina. A fase cristalina anatásio é termodinamicamente menos estável que o rutilo, mas sua formação é cineticamente mais favorável a baixas temperaturas ( $<600^\circ\text{C}$ ). A transformação de anatásio para rutilo é uma transição irreversível de uma fase termodinamicamente metaestável para uma fase estável, por exemplo, quando

submetido a tratamento térmico (HERRMANN *et al.*, 1999; LINSEBIGLER *et al.*, 1995). Diversos estudos *in vitro* comprovam a efetividade do anatásio e do rutilo na formação de apatita favorecendo a diferenciação de osteoblastos (PARK *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2004; XIONG *et al.*, 2004; ROHANIZADEH, *et al.*, 2004; JOHANSSON *et al.*, 1989).

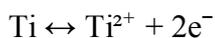
### 3.1- Oxidação Anódica a Microarco

A oxidação anódica a microarco é uma técnica eletroquímica de modificação superficial que tem sido estudada na área de biomateriais com objetivo de melhorar a biocompatibilidade da camada de óxidos e sua estrutura. Diferentes estruturas morfológicas são obtidas (densas, rugosas e/ou porosas) além de permitir a obtenção de recobrimentos de alta qualidade, alta microdureza, excelente aderência ao substrato, resistência mecânica e resistência à corrosão. Como eletrólitos são utilizadas soluções diluídas de ácidos, bases e sais, como acetato de cálcio, ácido acético, betaglicerofosfato de sódio (Bgf), ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, dentre outros (LIU *et al.*, 2005).

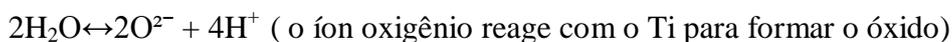
A oxidação anódica a microarco compreende na produção artificial de um recobrimento de óxido sobre a superfície do anodo decorrente da aplicação de corrente elétrica entre dois eletrodos quando imersos em uma solução eletrolítica. Um campo elétrico é formado entre metal (anodo) e o catodo. A difusão iônica com oxigênio leva à formação de um recobrimento de óxido sobre a superfície do anodo (LIU *et al.*, 2005). Nesse processo, o anodo representado pelo titânio, é imerso na solução aquosa e uma voltagem alternada é aplicada entre o anodo e o catodo. O catodo é representado por um fio ou tela de platina (LIU *et al.*, 2005).

As reações envolvidas no processo (LIU *et al.*, 2005) podem ser descritas da forma abaixo:

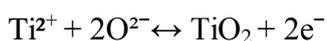
1) Na interface Ti/ óxido de titânio:



2) Na interface óxido de Ti/eletrólito:



3) Em ambas superfícies:



Íons de titânio e de oxigênio formados nas reações de redox levam à formação de óxidos pelo campo elétrico externo aplicado, resultando na formação do recobrimento de óxidos sobre o substrato de titânio. O óxido de titânio formado apresenta alta resistividade relativa em relação ao eletrólito e às partes metálicas do circuito elétrico. A presença do recobrimento de óxido no anodo não permite que a diferença de potencial seja aplicada. Enquanto o campo elétrico aplicado for suficientemente forte para manter o direcionamento dos íons, o fluxo de corrente elétrica se manterá e o óxido continuará crescendo. A espessura final do recobrimento de óxidos é linearmente dependente: da voltagem aplicada, do tempo de anodização, do tipo de eletrólito e da corrente aplicada. Em altas voltagens o processo de anodização leva a um aumento da evolução do gás e, devido à interrupção da corrente elétrica causada pelo crescimento da camada de óxidos, ocorrerão descargas elétricas. Este tipo de anodização é conhecido por oxidação anódica a microarco e forma recobrimentos muito porosos (LIU *et al.*, 2005).

A qualidade do recobrimento produzido pela oxidação anódica a microarco é determinada por parâmetros como composição do eletrólito, temperatura do eletrólito, composição da liga, voltagem, densidade de corrente e tempo. Tais parâmetros influenciam diretamente na espessura, cristalinidade, rugosidade, tamanho dos poros, topografia, morfologia e composição química do recobrimento (SANTOS *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2005).

Neste contexto, Sonoda e cols. com o objetivo de avaliar os efeitos da voltagem no processo de anodização, observaram que os recobrimentos formados acima da voltagem em que se observa-se emissão de faíscas com quebra do recobrimento - *sparking voltage* - (160 V) são por volta de 10 vezes mais espessos que os recobrimentos produzidos abaixo desta voltagem. Além disso, apenas o anatásio foi formado tanto com voltagens superior (220 V) quanto inferior (110 V) em um eletrólito composto por ácido sulfúrico 3% e ácido fosfórico 3%, durante 20 minutos de anodização em uma fonte DC a temperatura de 27°C (SONODA *et al.*, 2007).

Sul e cols. investigaram as propriedades das superfícies dos recobrimentos de óxidos produzidos por oxidação anódica a microarco sobre substrato de titânio comercialmente puro e foi observado que com o aumento da voltagem (100 até 380 V) houve diferença substancial na espessura dos recobrimentos, que variou na faixa de 200 a 1000 nm. As propriedades microestruturais e a cristalinidade do óxido de titânio variaram de acordo com a espessura do recobrimento. Os recobrimentos mais finos

eram constituídos de anatásio e os recobrimentos mais espessos apresentaram as fases anatásio e rutilo (SUL *et al.*, 2002).

De forma parecida, Kim e Ramaswamy desenvolveram recobrimentos com eletrólito à base de acetato de cálcio 0,1M e betaglicerofosfato de cálcio (0,02M a 0,05M) a 350 V por 30 minutos. Foi verificado um aumento no diâmetro dos poros com o aumento do conteúdo de betaglicerofosfato de cálcio no eletrólito. No que diz respeito à cristalinidade dos recobrimentos, o aumento da voltagem (100 V a 500 V) proporcionou a mudança da estrutura do recobrimento de óxidos de amorfa para cristalina. Outro parâmetro que influenciou o aumento da cristalinidade foi o aumento da concentração de cálcio incorporada no recobrimento de óxidos. A camada de óxidos produzida a 250 V é fundamentalmente composta por anatásio. Com o aumento da voltagem, rutilo começou a aparecer gradualmente, obtendo-se uma mistura de anatásio e rutilo. A 450 V, a presença de titânio apresenta-se reduzida no difratograma de raios X, indicando a obtenção de recobrimentos mais espessos e novos compostos contendo Ca, P, Ti e O foram formados em adição ao anatásio e rutilo. Esses fosfatos de cálcio e rutilo se tornaram dominantes a 500 V (KIM & RAMASWAMY, 2009).

Com o mesmo propósito, Simka e cols. utilizaram como eletrólitos as misturas de  $20\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  em 4,3M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $20\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$  em 4,3M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  com voltagens de 100 e 150 V. Foi confirmada por EDS a incorporação de cálcio e fósforo nos recobrimentos produzidos. Para o primeiro eletrólito foi observada a presença de fósforo; para o segundo: cálcio e fósforo. Os autores afirmam que as propriedades físico-químicas das camadas de óxidos, como espessura, morfologia, composição química e grau de cristalinidade são relativamente fáceis de programar através da aplicação do eletrólito, densidade de corrente e voltagem apropriados (SIMKA *et al.*, 2009).

Zhu e cols. avaliaram topografia, composição e estrutura dos recobrimentos de óxido de titânio, utilizando em seus experimentos eletrólito de betaglicerofosfato de cálcio em acetato de cálcio. A condição de produção de recobrimento otimizada foi de betaglicerofosfato de cálcio 0,02M em acetato de cálcio 0,15M, com densidade de corrente de  $70\text{ A/m}^2$ , voltagem final de 350 V utilizando-se uma fonte DC. Os recobrimentos produzidos possuíam rugosidade média de  $0,98\text{ }\mu\text{m}$  ( $R_a$ ) e espessura de 5-7  $\mu\text{m}$ , assim como a adesão entre substrato e camada de óxidos foi considerada boa e a razão molar Ca/P de 1,67 no recobrimento de óxidos (ZHU *et al.*, 2001).

Os biomateriais para terem aplicação clínica como implantes não devem provocar reação adversa ou qualquer dano ao paciente. Para minimizar o número de animais em um ensaio *in vivo*, ensaios *in vitro* são os primeiros empregados na avaliação da biocompatibilidade de um material para uso como dispositivo médico. Ensaio com utilização de culturas celulares são realizados por permitirem a obtenção de dados sobre a resposta tecidual. Esta metodologia experimental é utilizada no estudo das várias etapas da resposta biológica e das interações celulares aos biomateriais, num ambiente específico e bem controlado.

O ensaio de citotoxicidade é um ensaio rápido, padronizado e sensível, capaz de fornecer dados se o material apresenta quantidades significativas de elementos tóxicos extraíveis. A sensibilidade do ensaio está no fato de que as culturas celulares permanecem em ambiente controlado e sem a presença dos mecanismos de defesa celular existentes no sistema biológico. Existe uma correlação bastante razoável entre os ensaios *in vivo* e os ensaios de citotoxicidade para materiais implantáveis. Porém estes últimos são apenas indicadores primários de biocompatibilidade biológica e não eliminam a necessidade dos ensaios *in vivo*.

De acordo com a norma ISO 10993-5 (2009), os métodos utilizados para a determinação da citotoxicidade podem ser agrupados em quatro categorias: as avaliações da morfologia celular; as determinações dos danos celulares; a avaliação do crescimento celular; e a avaliação de aspectos referentes ao metabolismo celular. Os ensaios validados para a avaliação do metabolismo celular são: NRU (*Neutral Red Uptake* – Ensaio de captação do corante vermelho neutro), ensaio de citotoxicidade para formação de colônias, MTT/MTS e XTT (*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide*) (ICCVAM, 2006; NIH, 2001).

O percentual de contato entre osso e implante necessário para gerar uma ancoragem suficientemente eficaz para permitir que um implante receba carga funcional permanece incerto (LÓPEZ, 2007; BUSER *et al.*, 1991). Os dois métodos mais empregados para analisar a interface entre osso e implante são os testes biomecânicos, como por exemplo, o teste de torque de remoção e análise histomorfométrica (SYKARAS *et al.*, 2000).

Além de eletrólitos à base de sais, como alguns citados anteriormente, diversos estudos são realizados com eletrólitos à base de ácidos. Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é o ácido mais comumente utilizado para anodização do titânio (KIM & RAMASWAMY, 2009). Park e cols. avaliaram o efeito da voltagem aplicada em recobrimentos

produzidos com eletrólito composto de ácido sulfúrico 0,25M em ácido fosfórico 0,25M na resposta osteogênica. Foram utilizadas numa fonte DC voltagens de 220 e 320 V, densidade de corrente  $380 \text{ A/m}^2$  e tempo de 1 hora de deposição. A resposta celular foi avaliada via microscopia eletrônica de varredura (MEV) e coloração de F-actina, enquanto que a osteogênese das células do estroma da medula óssea (BMSC) foi avaliada pela atividade de fosfatase alcalina (ALP). A rugosidade média ( $R_a$ ) variou entre 0,22 e 0,73  $\mu\text{m}$  e o diâmetro médio dos poros foi de 5,5  $\mu\text{m}$ . As fases cristalinas presentes eram constituídas de anatásio e rutilo. Com o aumento da voltagem houve aumento no tamanho dos poros e na espessura do recobrimento. Concluiu-se que os recobrimentos produzidos a 320 V apresentaram melhores condições para osteogênese no óxido de titânio. Com isso, acredita-se que a rugosidade e a morfologia dos poros afetaram diretamente na osteogênese facilitando a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos (PARK *et al.*, 2005).

Em um estudo similar, Ha e cols. avaliaram a resposta de células MG63 quanto à afinidade e proliferação de recobrimentos anodizados produzidos em várias voltagens (220, 300 e 320 V) e solução eletrolítica composta de ácido sulfúrico 0,25M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e ácido fosfórico 0,25M ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). O ensaio MTT foi realizado por 12, 24 e 48 horas. Os resultados demonstraram que, similarmente ao estudo desenvolvido por Park o tamanho dos poros aumentou com o aumento da voltagem. Para 220 V foram obtidos recobrimentos com tamanho de poros de 0,2 - 1,0  $\mu\text{m}$  e para 300 e 320 V a variação foi de 3,0 - 5,5  $\mu\text{m}$ . Porém com o aumento da voltagem, a rugosidade diminuiu. Quanto às fases cristalinas foram identificadas as presenças das fases anatásio, rutilo e óxidos amorfos. Rutilo foi observado apenas em 320 V. A atividade celular no ensaio MTT aumentou significativamente em 300 e 320 V em comparação com os grupos controle e 220 V. A proliferação de células MG63 aumentou substancialmente nos grupos com tamanhos de poros entre 3,0 - 5,5  $\mu\text{m}$  (300 e 320 V) em comparação com os grupos de tamanho entre 0,2 e 1,0  $\mu\text{m}$  (220 V) (HA *et al.*, 2006).

Oh e cols. estudaram o comportamento de eletrólitos de ácido sulfúrico 1,5M, ácido fosfórico 0,3M e peróxido de hidrogênio 0,3M na formação de recobrimentos de óxido de titânio com voltagem constante de 180 V, tempo de 30 minutos e densidade de corrente de  $35 \text{ mA/cm}^2$ . Foi constatado que a adição de ácido fosfórico na solução eletrolítica aumenta significativamente a espessura do recobrimento. Além disto, foi observada a incorporação de P no recobrimento de óxidos e que os mesmos estão presentes predominantemente na fase anatásio. Resultados da avaliação biológica em

SBF (*Simulated Body Fluid*) demonstraram que os recobrimentos apresentaram propriedades bioativas (OH *et al.*, 2005).

Estudo desenvolvido por Abdullah (detalhes na tabela 3.1) avaliou recobrimentos produzidos com diferentes soluções eletrolíticas contendo ácido sulfúrico 1,5M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido fosfórico 0,3M (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e peróxido de hidrogênio 0,3M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na temperatura de 25°C. A bioatividade *in vitro* foi avaliada em SBF e com osteoblastos Saos-2. Para os recobrimentos produzidos a 180 V durante 50 minutos, o tamanho de poros máximo obtido foi < 1 µm para as soluções S, SH e HP; enquanto que ≤ 1,5 µm para as soluções SP e SHP. O tamanho e número de poros aumentaram com o aumento da voltagem. Resultado similar foi obtido com aumento do tempo de deposição. A porosidade mínima alcançada foi para a solução SH (1,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,3M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sugerindo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possa limitar o processo de formação de poros. As porosidades foram em ordem decrescente: SHP>SP>>S>HP>SH. Outro fato importante é que poros maiores foram produzidos quando o eletrólito era constituído por uma mistura de dois ácidos, com ou sem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Poros menores foram formados quando utilizada solução de um ácido, com ou sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permitindo concluir que o tamanho dos poros é fortemente dependente da quantidade de ácido presente na solução. A espessura aumentou de forma proporcional com o aumento da voltagem, porém longos períodos de anodização não levaram a grandes benefícios em espessura. Com relação à fase cristalina, houve apenas formação de anatásio nos recobrimentos de óxido de titânio. O autor defende que tanto a solução eletrolítica como a densidade de corrente são fundamentais na formação de rutilo. Além disso, baixas densidades de corrente podem ser usadas para obter recobrimentos puros de anatásio. Para composição química dos recobrimentos, as análises de EDS mostraram que para os recobrimentos produzidos com solução SHP a 90 V em 50 minutos não apresentam cálcio ou fósforo, diferentemente da condição de 180 V com o mesmo período de anodização, onde se observa presença destes íons. Na análise da cultura de células Saos-2 foi observado, para recobrimentos produzidos a 180 V em 50 minutos, grande desenvolvimento de osteoblastos sobre as superfícies anodizadas com a mistura de eletrólitos – SHP, inclusive com alto grau de adesão celular e penetração celular. Com estes resultados celulares, foi concluído que as superfícies anodizadas oferecem excelente leito para adesão celular.

Tabela 3.1- Condição de anodização (ABDULLAH, 2010)

Solução	Composição do Eletrólito	Parâmetros	Valor
S	1,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Temperatura (°C)	25
SH	1,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0,3M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Voltagem DC (V)	90, 120, 150, 180
HP	0,3M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0,3M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Densidade de Corrente (mA/cm <sup>2</sup> )	5
SP	1,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0,3M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		
SHP	1,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0,3M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0,3M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tempo (minutos)	1,3,5,10,30,50

Abdullah (2010) também comparou o efeito da mistura de eletrólitos acetato de cálcio com betaglicerofosfato de sódio e observou um efeito benéfico no crescimento do tecido ósseo, favorecendo a ancoragem dos implantes no osso. Os parâmetros utilizados foram:

- 1- Voltagem aplicada: 150, 200, 250, 300 e 350 V;
- 2- Tempo de anodização: 1, 3, 5 e 10 minutos
- 3- Densidade de corrente: 10 e 20 mA/cm<sup>2</sup>
- 4- Eletrólitos: Acetato de cálcio 0,2M + Betaglicerofosfato de sódio 0,02M  
Acetato de cálcio 0,4M + Betaglicerofosfato de sódio 0,04M
- 5- Temperatura: ~ 25°C

Para o grupo do eletrólito acetato de cálcio 0,2M + betaglicerofosfato de sódio 0,02M foi observado que o uso de baixa densidade de corrente (10 mA/cm<sup>2</sup>) e baixa voltagem (150 V) apenas anatásio é formado, mesmo com o aumento do tempo de anodização. Apenas a 350 V e a partir de 10 minutos de anodização que o rutilo começa a ser formado. No grupo do eletrólito acetato de cálcio 0,4M + betaglicerofosfato de sódio 0,04M, com baixa densidade de corrente (10 mA/cm<sup>2</sup>) e baixa tensão (150, 200, 250 V), ocorre formação das fases anatásio e rutilo, porém o rutilo tem sua formação somente a partir de 300 V quando o processo tem duração de até 10 minutos e densidade de corrente baixa. Com a densidade de corrente mais alta (20 mA/cm<sup>2</sup>), o rutilo é formado a partir de 150 V para o mesmo tempo de anodização. Com estes dados presume-se que o parâmetro densidade de corrente é significativo para o estudo da formação de do rutilo. Enquanto que para a formação do anatásio o parâmetro mais significativo é a concentração do eletrólito mais alta. Quanto à microestrutura, o

tamanho dos poros aumentou com o aumento da voltagem. As rachaduras resultantes de tensões na superfície e do choque térmico estão presentes quando se aplica voltagens acima de 300 V. Na análise dos ensaios *in vitro* em SBF por 7 dias a 37°C, não houve precipitação de apatita em nenhuma superfície anodizada (ABDULLAH, 2010).

Resultados semelhantes foram reportados por Han e cols. onde nenhuma apatita foi formada nos recobrimentos anodizados em acetato de cálcio 0,2M+ betaglicerofosfato de sódio 0,02M a 250, 350 e 450 V mesmo após 90 dias de imersão em SBF (HAN *et al.*, 2003). Ishizawa e Ogino também mostraram que nenhuma apatita foi formada nos recobrimentos anodizados com voltagens menores que 400 V, mesmo após 300 dias de imersão em SBF (ISHIZAWA & OGINO, 1995). Após irradiação com luz UV (ultravioleta) pequenas quantidades de hidroxiapatita podem ser vistas sobre as superfícies dos recobrimentos anodizados. A espectroscopia por dispersão de energia (EDS) foi utilizada para detectar Ca e P. Picos discretos foram observados nas amostras anodizadas com eletrólito de baixa concentração, porém estes picos eram muito mais acentuados nas amostras anodizadas com eletrólito de alta concentração. Estes dados levam a supor que a irradiação UV favorece a precipitação de hidroxiapatita no anatásio devido às suas propriedades fotocatalíticas. Cultura de células Saos-2 foi utilizada para investigar a função dos osteoblastos sobre as superfícies anodizadas após 19h de cultura. Osteoblastos cresceram sobre todas as superfícies. A integração celular nos recobrimentos porosos foi considerada muito boa (ABDULLAH, 2010).

Uma característica de grande importância quanto às propriedades mecânicas do recobrimento de óxidos é que durante o momento de sua inserção no osso, estes são submetidos a forças de compressão e torção. Desta forma é crucial que o recobrimento se mantenha íntegro na superfície, sem ocorrência de danos ou destacamentos. Para isto, ensaio de riscamento e ensaio de torque são importantes ferramentas empregadas na avaliação da resistência à aderência desses recobrimentos. Huang e cols. avaliaram a formação óssea local (BIC - *bone-implant contact*) e osseointegração em implantes com superfícies de óxido de titânio (TiUnite<sup>®</sup>) em macacos na região posterior da maxila com qualidade óssea tipo IV durante os períodos de 2, 3, 4 e 16 semanas. Observou-se a formação de uma fina camada de osso recobrindo a maioria das roscas dos implantes. A média da BIC para todo o grupo do estudo foi de  $74,1 \pm 4,8\%$ , o que é considerado um alto nível de contato implante-osso, podendo ter significado clínico de sucesso e taxa de sobrevida satisfatória quando utilizado este tipo de superfície (óxido de titânio) em áreas com pobre qualidade óssea. Concluiu-se que a superfície de óxido de titânio em questão

tem um considerável potencial osteocondutor promovendo alto nível de osseointegração em osso tipo IV (HUANG *et al.*, 2004).

Knobloch e cols. em um estudo em cães Beagle adultos com o objetivo de comparar a estabilidade e sobrevida após sua inserção em implantes usinados (controle) e implantes com superfícies de óxido de titânio nos períodos de 2, 4 e 6 semanas. Foi observado que após quatro semanas, a sobrevida dos implantes aumentou significativamente para ambos os grupos quando comparada com o período de duas semanas (KNOBLOCH *et al.*, 2004).

Além da modificação da superfície do implante, alguns estudos avaliam a influência da macrogeometria dos implantes (COELHO *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2011). Ensaio de torque de remoção foi empregado no estudo sobre da influência da macrogeometria de implantes dentários e a fixação óssea inicial nos períodos de 14 e 40 dias *in vivo*. Os resultados mostraram que o torque de remoção foi significativamente maior no intervalo de 40 dias *in vivo* ( $59,9 \pm 9,2$  Ncm) quando comparado com o tempo *in vivo* de 14 dias ( $28,4 \pm 9,2$  Ncm). Concluiu-se em 14 dias aconteceu a formação óssea, porém apenas no período de 40 dias que houve a remodelação óssea e a conversão do osso imaturo em osso lamelar (tecido ósseo) (COELHO *et al.*, 2011).

Marin e cols. avaliaram biomecânica e histologicamente diferentes macrogeometrias (cilíndrico com roscas triangulares-grupo controle e cônico com roscas trapezoidais – grupo experimental) de implantes no período inicial da osseointegração na porção proximal da tíbia de cães da raça Beagle. Histologicamente, ambos os grupos apresentaram adequada biocompatibilidade e osteocondução com neoformação óssea nas regiões cortical e medular da tíbia. Baseado nos resultados obtidos, a macrogeometria do grupo experimental melhorou o desempenho para o torque de remoção comparado ao grupo controle. Os resultados apontam que em relação aos implantes cilíndricos (grupo controle), o grupo experimental apresentou estabilidade aumentada em tempo de reparo reduzido. Estas características convergem para as tendências atuais dos implantes osseointegrados (MARIN *et al.*, 2011).

Embora o titânio seja o biomaterial de escolha para utilização em implantes odontológicos, o mesmo não tem propriedades para prevenir a colonização bacteriana. O acúmulo de placa bacteriana em volta do pescoço do implante após sua implantação pode levar a peri-implantite e subsequente perda de osseointegração (SATO *et al.*, 2007, MOMBELLI & SAMARANAYAKE, 2004). Estudos recentes apontam que superfícies de titânio dopadas com íons zinco apresentam propriedades antibacterianas elevadas. Xu

e cols. avaliaram e quantificaram a adesão de *S. mutans* (*Streptococcus mutans*) nas superfícies dopadas com íons zinco (teste) e superfícies de titânio puro (controle). Como resultado foi observado que houve elevada redução na adesão de *S. mutans* na superfície teste quando comparada com a quantidade de *S. mutans* aderida à superfície controle. Inclusive foi constatado que a propriedade antibacteriana é diretamente proporcional à concentração de zinco (XU *et al.*, 2010).

Hu e cols. avaliaram a atividade antibacteriana de recobrimentos de TiO<sub>2</sub> contendo íons Zn incorporados produzidos por oxidação anódica a microarco. Os resultados mostram que tais superfícies podem inibir fortemente a colonização de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A atividade antibacteriana está diretamente relacionada à presença do composto ZnO (óxido de zinco) no recobrimento que leva à geração de ROS (*Reactive Oxygen Species*) que são espécies reativas de oxigênio, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ZnO, OH<sup>-</sup>. Elas atuam inibindo o crescimento de bactérias e reduzindo a adesão bacteriana. Além disso, a superfície desenvolvida apresentou elevada adesão, proliferação e diferenciação de células da medula óssea de ratos (bMSC) gerando alto nível de atividade de fosfatase alcalina quando comparada com a superfície controle. Sugere-se que a atividade antibacteriana, a citocompatibilidade e a capacidade de promover diferenciação osteogênica podem ser atribuídas ao fato de haver a liberação lenta e constante de íons Zn a partir da superfície do recobrimento (HU *et al.*, 2011).

Zhang e cols. avaliaram *in vitro* a adesão celular de osteoblastos MC3T3-E1 em superfícies de Ti puro, TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> dopados com zinco e concluíram a adesão de osteoblastos MC3T3-E1 foi significativamente favorecida na superfície de TiO<sub>2</sub> enriquecida com zinco quando comparado com as outras superfícies do estudo, além de não alterar a topografia da superfície nem composição de fases. Desta forma, segundo os autores, acredita-se que superfícies de TiO<sub>2</sub> dopadas com zinco são candidatas promissoras para aplicações em implantes ortopédicos (ZHANG *et al.*, 2011).

Diante do exposto concernente à literatura, superfícies de TiO<sub>2</sub> produzidas por oxidação anódica a microarco com incorporação de íons são fortes candidatas a oferecer mudanças favoráveis na resposta dos tecidos ao implante. Por este motivo superfícies de TiO<sub>2</sub> com íons incorporados (grupo com adição de cálcio e fósforo; grupo com adição de fósforo; e grupo com adição de fósforo e zinco) foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas *in vitro* nesta tese. Um grupo foi selecionado para avaliação *in vivo* e, desta forma, avaliar a osseointegração de implantes biomédicos em função da modificação superficial do titânio puro com recobrimento de óxido de titânio com íons incorporados.

## CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1– Preparação da superfície do titânio

Na etapa de desenvolvimento dos recobrimentos anodizados foram utilizados discos de titânio comercialmente puro (ASTM F-67 grau 2), com dimensões de 12,0 mm x 1,0 mm. Para eliminar a rugosidade remanescente do processo de fabricação foi realizada limpeza superficial dos discos de titânio. Foram utilizadas lixas de SiC (carbeto de silício) com granulometrias 220, 400, 600 e 1200 em polítriz com fluxo de água. Para cada lixa, as amostras ficaram aproximadamente 03 minutos em posição perpendicular ao sentido de rotação da polítriz com fluxo de água. Para minimizar a presença da camada natural de óxidos que cresce sobre o titânio quando em contato com o oxigênio a lixa 1200 só foi utilizada no dia em que as amostras foram anodizadas. Na avaliação *in vivo*, foram utilizados implantes cilíndricos com sextavado externo de titânio puro, usinados, sem qualquer tratamento superficial, com 8,0 mm de comprimento e 3,5 mm de diâmetro.

A limpeza da superfície, inclusive do implante, foi realizada conforme procedimento recomendado por Takeuchi e cols. As amostras foram imersas em solução de HCl (ácido clorídrico) 10N em ultrassom por 30 minutos e lavadas abundantemente com água destilada. Posteriormente, foram imersas em acetona P.A. em ultrassom por mais 30 minutos e lavadas abundantemente em água destilada (TAKEUCHI *et al.*, 2003).

### 4.2– Sistema para produção dos recobrimentos

Para a realização do processo de oxidação anódica a microarco foi utilizada uma fonte de tensão DC (Agilent HP 6035A) (figura 4.1 a). Com o objetivo de aumentar a escala de produção, o sistema de produção dos recobrimentos foi aperfeiçoado conforme apresentado na figura 4.1 b. Foram distribuídas quatro saídas de tensão de forma a produzir quatro superfícies anodizadas simultaneamente, com arranjo em paralelo. O contra-eletrodo de platina utilizado tem forma cilíndrica com paredes em tela (figura 4.1 c). Além disso, foram projetadas tampas de teflon (figura 4.1 c, d) para acoplamento dos béqueres encamisados, que proporciona melhor fixação das hastes no

eletrólito. A tampa de teflon foi constituída de dois orifícios: onde em um deles foi posicionada a amostra, que foi previamente fixada em uma haste de titânio (por solda-ponto no caso dos discos e rosqueada no caso dos implantes); no outro orifício foi fixado o contra-eletrodo de platina. Uma pequena garra metálica foi utilizada para fazer contato elétrico entre os eletrodos e a fonte. Com este aparato, toda superfície de titânio ficou exposta à solução eletroquímica, possibilitando o crescimento homogêneo do óxido. A distância entre o contra-eletrodo de platina e a amostra de titânio foi de aproximadamente 2 cm. Utilizou-se um béquer encamisado com capacidade para 500 ml (figura 4.1 d), e a circulação de água na temperatura ambiente teve como finalidade manter a temperatura da solução estável durante o processo, evitando seu aquecimento. Finalizada a anodização, as amostras foram devidamente lavadas com água destilada e secas com um jato de ar quente.

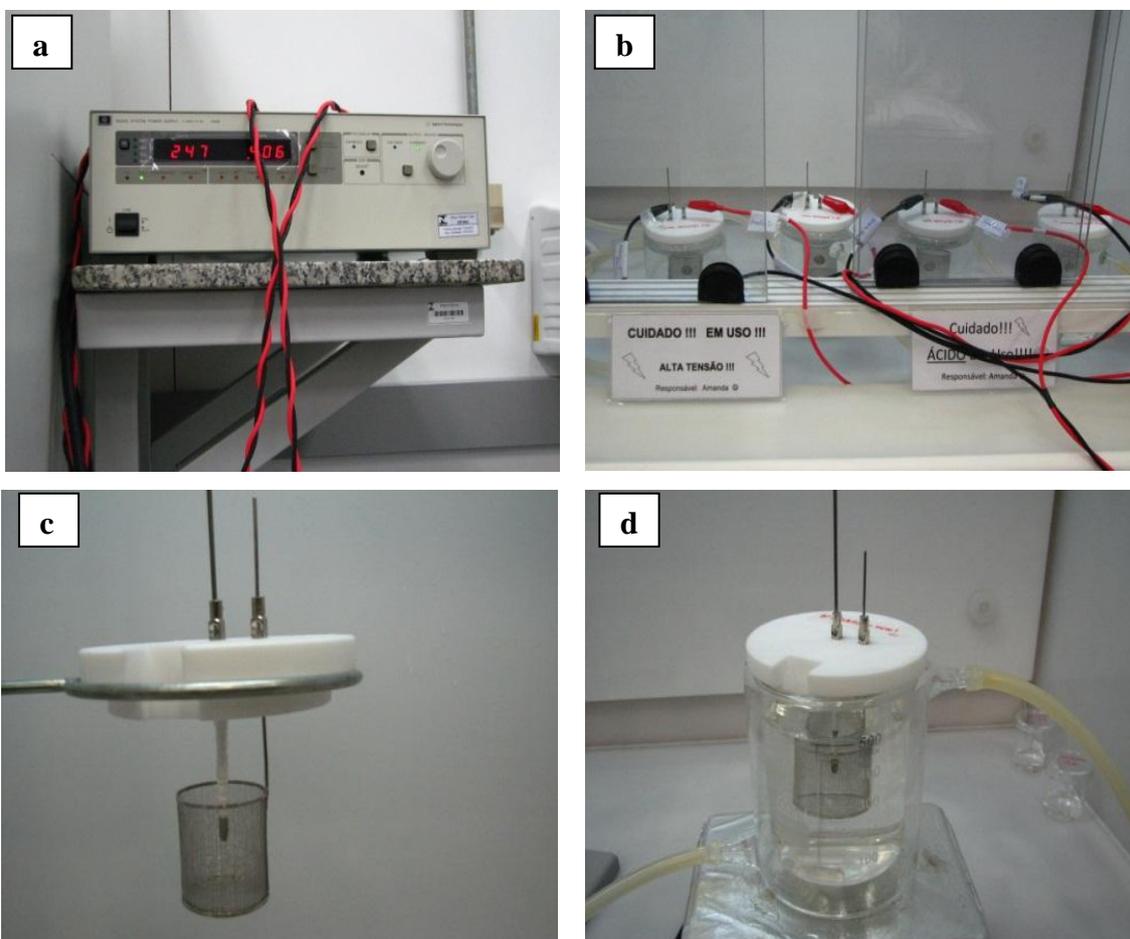


Figura 4.1- Sistema de deposição utilizado para anodização: (a) fonte de tensão DC; (b) circuito em série para anodização de 04 superfícies ao mesmo tempo; (c) eletrodo de platina personalizado e tampa de teflon; (d) béquer encamisado com circulação de água.

### 4.3– Produção dos recobrimentos

Três grupos de recobrimentos foram desenvolvidos neste trabalho. É conhecido que a composição do eletrólito tem influência na morfologia e composição do recobrimento produzido (SANTOS *et al.*, 2009; SIMKA *et al.*, 2009; KIM & RAMASWAMY, 2009; SONODA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2007; OH *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005; SUL *et al.*, 2002).

Na tabela 4.1 são apresentadas as especificações das soluções e os parâmetros de anodização utilizados. Para facilitar a identificação ao longo do texto, as seguintes denominações foram empregadas: grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf; grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos; e o grupo TiO<sub>2</sub> Zinco que subdivide-se em: TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco, dependendo da concentração de nitrato de zinco empregada.

O primeiro grupo consistiu na produção de recobrimentos de óxido de titânio com incorporação de cálcio e fósforo (grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf); o segundo grupo consistiu na produção de recobrimentos de óxido de titânio com incorporação de fósforo (grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos); e o terceiro grupo consistiu na produção de recobrimentos de óxido de titânio com incorporação de fósforo e zinco (grupo TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco). Variações nas condições de anodização foram necessárias com objetivo de produzir filmes homogêneos e sem trincas. No grupo contendo zinco, a voltagem foi diminuída e a corrente levemente aumentada, uma vez que a qualidade dos recobrimentos foi adicionalmente monitorada em função da resistência mecânica da interface avaliada pelo ensaio de riscamento.

Tabela 4.1- Parâmetros utilizados na produção dos recobrimentos de TiO<sub>2</sub>.

TiO <sub>2</sub>	Eletrólito	Voltagem (V)	Tempo (min)	Frequência (Hz)	Corrente (A)
TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf	Acetato de cálcio 0,5M + Betaglicerofosfato de sódio 0,02M	150	0,33	60	2
TiO <sub>2</sub> Ácidos	Ácido sulfúrico 0,25M + Ácido fosfórico 0,25M	280	60	60	0,100
TiO <sub>2</sub> 0,04M Zinco	Ácido sulfúrico 0,25M + Ácido fosfórico 0,25M + Nitrato de zinco 0,04M	250	60	60	0,105
TiO <sub>2</sub> 0,1M Zinco	Ácido sulfúrico 0,25M + Ácido fosfórico 0,25M + Nitrato de zinco 0,1M	250	60	60	0,105

#### 4.4– Caracterização dos recobrimentos

Para avaliação morfológica e composicional dos recobrimentos foram realizadas as caracterizações descritas a seguir: a microscopia eletrônica de varredura (MEV; FEI Quanta 200) com espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS; EDAX) empregada para determinação da morfologia e composição elementar dos recobrimentos. Cada acabamento superficial foi produzido em triplicada e analisadas quatro regiões da superfície para cada amostra, utilizando uma voltagem de aceleração de 15 kV. O microscópio eletrônico de varredura com feixe duplo de íons (FIB / MEV; FEI Nova Nanolab), com sistema de injeção de gás Pt e micromanipulador de amostras (Omniprobe), foi usado para produzir o corte transversal (análise da interface óxido-substrato) e determinação da espessura dos recobrimento.

A caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET) teve como objetivo combinar a geração de imagem microestrutural, composição elementar e distribuição espacial das fases amorfa e cristalina. A análise por MET foi realizada utilizando microscópio Titan (FEI) a 300 kV, equipado com corretor de aberração esférica Cs. Duas técnicas de aquisição de imagem foram utilizadas: a microscopia eletrônica transmissão no modo varredura (STEM- *Scanning Transmission Electron Microscopy*) utilizando a difração de elétrons de área selecionada (SAED) e o detetor de campo escuro anular (HAADF - *High-Angle Dark Field*), para identificação e microanálise das fases presentes; e no modo STEM utilizando EDS para investigar e mapear a composição elementar das regiões amorfas e cristalinas presentes no recobrimento (WILLIAMS & CARTER, 2009).

As composições química e de fases das amostras foram também avaliadas por espectroscopia de fotoeletrons excitados por raios X (XPS; Omicron Nanotechnology) e difração de raios X (DRX; Bruker AXS). As análises de XPS foram realizadas em ultra alto vácuo com uma fonte de raios X monocromática de Al K $\alpha$  ( $h\nu= 1486,7$  eV), potência de emissão de 16 mA e tensão de 12,5 kV. Para os elementos Ca e Ti, os espectros de alta resolução foram obtidos com uma energia de passagem do analisador de 40 eV. Um fluxo de íons de argônio foi utilizado para fazer o bombardeamento da superfície nas medições de perfil de profundidade, com uma energia de 3 keV, emissão de 17 mA e ângulo de incidência de 45° durante 40 min. As energias de ligação tiveram como referência o nível 1s de carbono, cuja energia de ligação é de 284,6 eV. A análise

quantitativa foi realizada utilizando o *software* Casa XPS para calcular a área dos picos e ponderação da mesma pelo fator de sensibilidade de cada átomo.

A caracterização cristalográfica das fases presentes foi realizada pela análise dos padrões de difração de raios X adquiridos no Difratorômetro de Raios X (Bruker; D8 Discover) na configuração simétrica (Bragg-Brentano) com radiação Cu Ka (Ni-filtro), ângulo de incidência de raios X rasante ( $0,50^\circ$ ), passo de aquisição de  $0,02^\circ$  em  $2\theta$  e tempo de aquisição de 80 s/passos. A análise de fases do recobrimento foi realizada pelo método Rietveld utilizando o programa Topas-Academic.

A determinação do perfil de rugosidade da camada de óxidos foi realizada por meio de um perfilômetro (DEKTAK 6M), que tem o seguinte princípio de funcionamento: a mesa posicionadora move horizontalmente a amostra situada abaixo da ponta (apalpador) de diamante. Parâmetros da varredura (*scan*) como comprimento, velocidade e força foram programados (tabela 4.2). Conforme a amostra move-se horizontalmente, a ponta de diamante desliza por sobre sua superfície. Um sinal proporcional à altura de sua superfície é gerado e o perfil da superfície da amostra (rugosidade) é registrado por um computador para visualização, manipulação e impressão (KOWALSKI, 2002). Foram realizadas 10 medidas para cada amostra, sendo analisadas três amostras de cada grupo desenvolvido: 03 amostras do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf; 03 amostras do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos; 03 amostras do grupo TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e 03 amostras do grupo TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco. O parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a rugosidade superficial é a rugosidade média (Ra) que é definido como o valor médio aritmético de todos os desvios do perfil de rugosidade (picos e vales) da linha média dentro do comprimento de medição. Ra indica a média da variação dos picos e vales em relação à linha média imaginária do perfil da superfície.

Tabela 4.2- Parâmetros utilizados para a realização das medidas de rugosidade das amostras.

Ponta:	diamante_0,7 $\mu$ m
Extensão:	2 mm
Tempo:	30 s
Força:	30 mg
Tipo de análise:	<i>Hills &amp; valleys</i>

Muitos são os fatores que influenciam a biocompatibilidade dos materiais, dentre os quais se destacam as propriedades composicionais, mecânicas e a física de superfície. Os mecanismos que ocorrem durante o fenômeno da osseointegração são dependentes da interação das células com a superfície do biomaterial. Desta maneira, é de fundamental importância realizar a análise da molhabilidade da superfície do biomaterial.

A molhabilidade da superfície é dependente da energia de superfície do biomaterial e pode ser quantificada pela medida do ângulo de contato de um líquido com o substrato, que neste caso é a superfície do biomaterial. Quanto maior a molhabilidade (menor ângulo de contato, logo, maior energia de superfície), maior é a interação da superfície do biomaterial com o ambiente biológico. Segundo Bandão e cols., “uma alta energia de superfície proporciona melhor molhabilidade e consequentemente melhor adsorção e aposição de moléculas inorgânicas como íons Ca e fosfatos, e moléculas orgânicas como proteínas, lipoproteínas e peptídeos sobre a superfície de TiO<sub>2</sub>, potencializando a osseointegração” (BRANDÃO *et al.*, 2010). Materiais que apresentam baixa afinidade pela água são chamados hidrofóbicos. Em geral, a adesão celular se torna mais efetiva com o aumento da hidrofiliabilidade da superfície.

A molhabilidade é quantificada pelo ângulo de contato formado entre as interfaces líquido/superfície e líquido/vapor. O equilíbrio do ângulo de contato é determinado pela Equação de Young que descreve o equilíbrio termodinâmico entre o líquido (L), sólido (S) e gás/vapor (V) (CHOW, 1998):

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta$$

Onde,

$\gamma_{SV}$  é a energia da interface sólido-vapor,

$\gamma_{SL}$  é a energia da interface sólido-líquido e

$\gamma_{LV}$  é a energia da interface líquido-vapor (tensão superficial).

As propriedades de molhabilidade referenciam que uma superfície é molhável pela água (hidrofílica) quando apresenta ângulo de contato menor que  $90^\circ$ , as superfícies de molhabilidade neutra possuem ângulo de contato igual a  $90^\circ$  e as superfícies hidrofóbicas com ângulo de contato maior do que  $90^\circ$ . A redução do ângulo de contato indica que a superfície é mais hidrofílica. A figura 4.2 apresenta uma ilustração esquemática das diferenças entre superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.

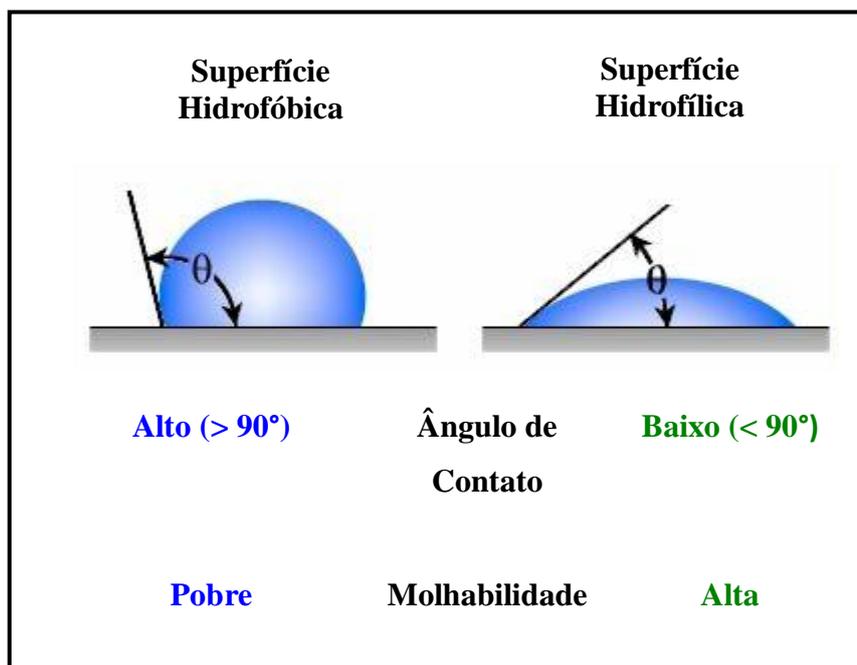


Figura 4.2 - Ilustração dos fenômenos hidrofobicidade x hidrofiliicidade.

A molhabilidade dos recobrimentos foi determinada através da medição do ângulo de contato formado entre a gota ( $1 \mu\text{L}$ ) e a superfície da amostra, utilizando um goniômetro (Ramé-Hart, NRL A-100). Três diferentes tipos de líquidos foram utilizados nos testes: água destilada, diiodometano e etileno glicol. Foram realizadas três medidas para cada líquido, utilizando-se amostras em triplicata, com o intervalo de tempo de 5 segundos entre as medições.

#### 4.5 – Avaliação do desempenho mecânico

A avaliação do comportamento tribomecânico dos recobrimentos foi realizada pelo *ensaio de riscamento* e pelo *ensaio de torque de remoção*. Embora estes dois

ensaios forneçam informações sobre a resistência ao destacamento do recobrimento ao substrato, o ensaio de torque de remoção reproduz a condição mais próxima da realidade clínica.

**4.5.1- Ensaio de riscamento:** O ensaio de riscamento foi realizado para avaliação tribomecânica dos recobrimentos utilizando um tribômetro multi-amostras com módulo para ensaio de riscamento (CETR; UMNT-1). Nos ensaios de riscamento o principal parâmetro para avaliação da resistência ao destacamento dos recobrimentos é realizado em termos da análise da carga crítica  $Lc1$  que é o primeiro ponto de destacamento do recobrimento observado na trilha. Nas amostras desta tese este ponto foi identificado através da análise por MEV onde houve a evidência de um ponto brilhante referente à exposição do substrato, ou seja, evidenciação do destacamento do recobrimento. Durante o ensaio, foram registrados os valores da carga aplicada durante o riscamento e a força lateral produzida em decorrência do riscamento. Foi utilizada uma ponta cônica de diamante com raio de  $12,5 \mu\text{m}$ , com velocidade da ponta de  $40 \mu\text{m/s}$ , num percurso de  $2,8 \text{ mm}$  em cada risco. Para cada amostra foram realizados 10 riscos, utilizando-se amostras em triplicata. Durante o ensaio, a carga foi variada de  $50 \text{ mN}$  até  $400 \text{ mN}$ , com uma taxa de carregamento linear de  $5 \text{ mN/s}$ . A morfologia do recobrimento, o mecanismo de falha do recobrimento relativo à  $Lc1$  e a interface entre recobrimento e substrato foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV; FEI Quanta 200).

**4.5.2- Ensaio de torque de remoção:** Este ensaio é realizado após implantação *in vivo* e eutanásia, e está diretamente relacionado à avaliação mecânica do implante em contato com o osso. O ensaio de torque de remoção mede a quantidade de força necessária para remover o implante do osso ou para que se produza uma falha na interface osso-implante (GRANATO *et al.*, 2008).

A fim de aproveitar as amostras para posterior realização da análise histomorfométrica, optou-se por não remover completamente o implante e proceder a verificação da força máxima necessária ao rompimento da interface osso-implante, que foi medida por meio de um torquímetro digital de acordo com os parâmetros apresentados no capítulo 4 Materiais e Métodos. Em seguida, um estudo detalhado da morfologia da interface foi realizado pela análise histomorfométrica, que permite estimar a taxa de contato osso/implante.

O ensaio de torque de remoção foi realizado na Faculdade de Odontologia da Unigranrio, situada em Duque de Caxias, com as orientações dos professores Dr. Estevam A. Bonfante e Dr. Charles Marin. Os blocos ósseos com os implantes obtidos no dia da eutanásia (06 blocos controle e 06 blocos teste) foram adaptados a uma morsa na bancada (figura 4.3) e através de um torquímetro digital (Cedar\_DID-4) com célula de carga de torque de 500 Ncm foi realizado o ensaio (figura 4.4 a). Um adaptador foi exclusivamente confeccionado para adaptação do torquímetro aos implantes para a execução do ensaio (figura 4.4 b). O torquímetro foi cuidadosamente posicionado ao implante para minimizar angulações e evitar desalinhamentos durante a realização do ensaio (figura 4.5). Os implantes receberam torque em sentido anti-horário até que houvesse falha de interface de acordo com a indicação do sinal sonoro do torquímetro, então os valores de torque de remoção das amostras foram registrados. Após a etapa do ensaio de torque de remoção, as mesmas amostras foram preparadas para análise histomorfométrica, onde a metodologia é apresentada na sessão 4.8.

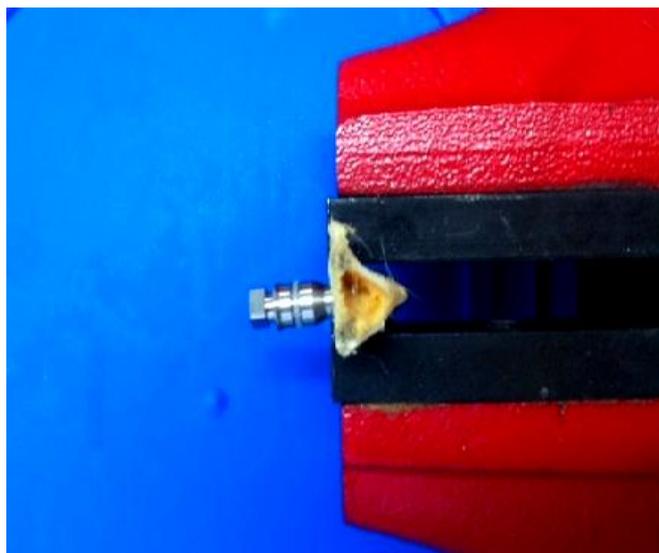


Figura 4.3- Adaptação do bloco ósseo com o implante na morsa sobre a bancada.

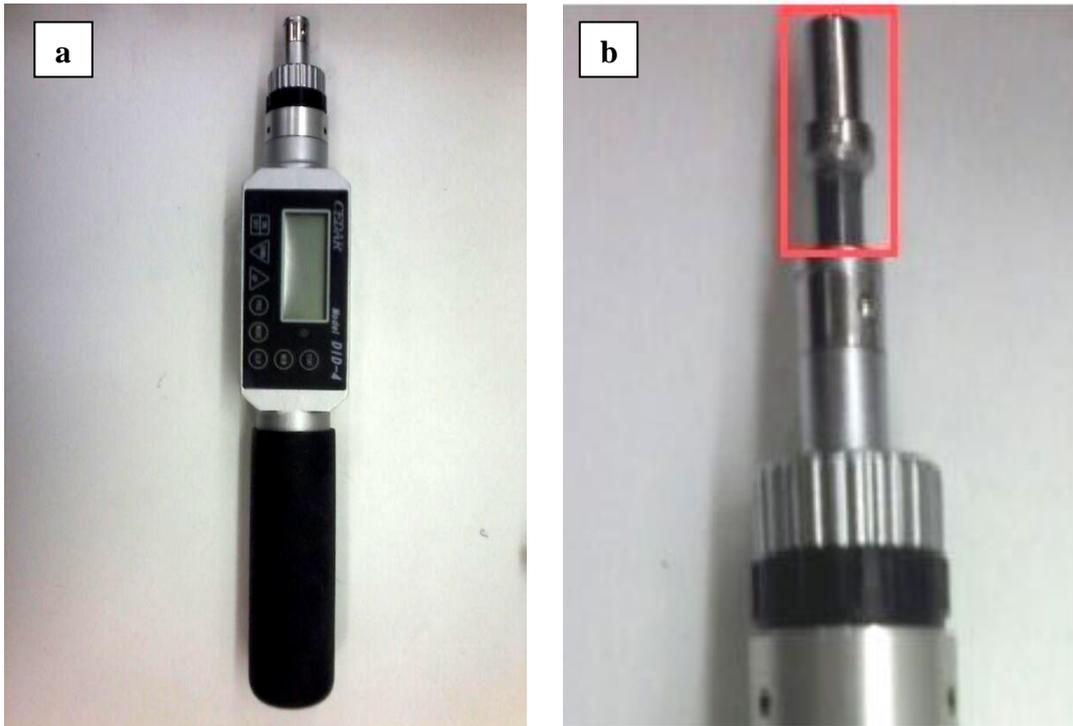


Figura 4.4- (a) Torquímetro digital; (b) No retângulo vermelho, adaptador confeccionado para adaptação do torquímetro ao implante.



Figura 4.5- Posicionamento do torquímetro ao implante

#### 4.6– Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da biocompatibilidade *in vitro* foi realizada pelo ensaio de citotoxicidade, de acordo com a norma ISO 10993-5 (2009), com a avaliação da viabilidade celular de Fibroblastos L929 (anexo A). As células foram expostas por 24 horas aos extratos obtidos dos recobrimentos produzidos. A viabilidade celular foi avaliada através de dois métodos: XTT (ensaio colorimétrico que quantifica o metabolismo mitocondrial e a atividade de cadeia respiratória de células em resposta a

diferentes compostos) e NRU - vermelho neutro (*Neutral Red Uptake* – ensaio colorimétrico que quantifica a permeabilidade da membrana e a atividade lisossomal). Materiais que diminuem a viabilidade em mais de 30% são considerados citotóxicos.

#### 4.7– Avaliação *In vivo*

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme Anexo B. Diversos modelos animais e protocolos cirúrgicos têm sido utilizados para avaliar a resposta do tecido ósseo aos implantes dentários (BUTZ *et al.*, 2006; ALBREKTSSON & WENNERBERG, 2004a; BUSER *et al.*, 2004; BERGLUNDH *et al.*, 2003; COELHO, 2002; VERCAIGNE *et al.*, 2000a; VERCAIGNE *et al.*, 2000b; GARETTO *et al.*, 1995). Nesta pesquisa foram utilizados seis coelhos Nova Zelândia Brancos (*Oryctolagus cuniculus*), sem distinção de gêneros, entre 5 e 6 meses de idade e peso entre 3000 e 3500 gramas, com o período experimental de 4 semanas após o procedimento cirúrgico. Todos os animais foram mantidos em gaiolas no Laboratório de Produção de Coelhos (LPC) da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) situado na cidade de Cachoeiras de Macacu de acordo com as determinações da norma ISO 10993-2 (2006) que tem como objetivo manter um padrão desejável e ético tanto para manuseio, manutenção, assim como para eutanásia dos animais.

O grupo selecionado para a realização da avaliação *in vivo* foi o grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos uma vez que este grupo obteve melhor resistência à aderência no ensaio de riscamento, além de apresentar resultados satisfatórios nas demais caracterizações. Como controle, foram utilizados implantes de titânio usinados, sem qualquer tratamento. A análise das superfícies após o ensaio *in vivo* foi conduzida pelo ensaio de torque de remoção e pela análise histomorfométrica, realizados posteriormente à eutanásia, após 30 dias de implantação.

4.7.1- **Preparo dos animais:** Os animais foram mantidos em condição laboratorial padronizado, com livre acesso a água potável e suporte nutricional adequado. As cirurgias foram realizadas pelo turno da manhã no Laboratório de Pesquisa Animal da Universidade Federal Fluminense em Cachoeira de Macacu de acordo com as orientações da norma ISO 10993-6 (2007). Recomendações como necessidade da cirurgia ocorrer em condições assépticas e minimização do trauma na

região operada foram atendidas. No dia da cirurgia, os animais foram pesados em uma balança eletrônica (Lucastec®) para determinação das doses dos fármacos utilizadas. Todas as anestésias foram realizadas pela mesma equipe de anestesistas, os médicos veterinários Douglas Castro e Alice Gress.

4.7.2- **Material:** Foram utilizados 06 implantes com superfície de óxido de titânio produzidos por oxidação anódica a microarco do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste) e 06 implantes de Ti comercialmente puro usinados (controle). A esterilização dos materiais foi realizada com raios gama conforme orientações da norma ABNT NBR 15729:2009. Conforme determinado na norma ISO 10993-6 (2007), os implantes foram manuseados de forma asséptica e cuidadosamente para não contaminá-los antes ou durante a sua implantação.

4.7.3- **Procedimentos de anestesia:** Os animais foram operados sob anestesia geral e receberam como medicação pré-anestésica 20mg/kg<sup>-1</sup> de Quetamina (Francotar®– Virbac) e 1 mg/kg<sup>-1</sup> de Xilazina (Sedazine®– FortDodge), por via intramuscular para diminuição do tônus vagal. Após 10 minutos os animais estavam visivelmente sedados e com ausência de reflexos à dor. Cada animal foi posicionado na mesa cirúrgica onde foi feita antisepsia da orelha para posterior punção da veia auricular e administração da solução ringer lactato IV. Em seguida cada coelho foi conectado ao circuito anestésico T de Ayres por meio de máscara facial para o início da administração de anestésico geral inalatório (Isoflurano 1%, Isoflurane®- Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda).

A concentração do isoflurano foi controlada de acordo com a resposta de diferentes parâmetros monitorados no paciente (dose-resposta). Após a realização da tricotomia os animais foram instalados na mesa operatória na posição decúbito dorsal, com rotação lateral cervical para manter livre as vias aéreas superiores.

Antes do início de cada cirurgia foi realizada a administração de pentabiótico veterinário IM (Pentabiótico® - Eurofarma) na dose adequada a cada animal. Essa medicação reúne em sua composição cinco antibióticos com ação predominantemente bactericida. Este fato confere um sinergismo de ação na combinação destes antibióticos.

Todos os animais foram monitorados com cardioscópio na derivação II, oxímetro de pulso, termômetro digital, capnógrafo e analisador de gases anestésicos. Para a manutenção da temperatura corpórea do animal foi utilizado um colchão térmico.

**4.7.4- Procedimentos cirúrgicos:** Em condições assépticas e para prevenir variações na técnica, a mesma cirurgiã, Prof<sup>a</sup>. Mônica Diuana Calasans Maia executou todas as cirurgias seguindo o mesmo protocolo. Antissepsia local da pele com escova contendo sabão a base de clorexidina a 2% (RiohexScrub® –Rioquímica) foi realizada na região das tíbias, aposição de campos estéreis permitindo exposição apenas da área a ser operada, infiltração na região da linha média com lidocaína a 2% com epinefrina a 1:100.000 (Alphacaine® - DFL) para reduzir estímulos durante a cirurgia e gerar vasoconstricção.

Uma incisão de aproximadamente 10 cm de comprimento foi realizada sobre cada tíbia para exposição do plano esquelético e perfuração com uma broca cirúrgica com 8 mm de profundidade e de 3 mm de diâmetro, em rotação baixa (1200 rpm) e intermitente, com irrigação profusa de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a implantação do parafuso (figura 4.6 a, b), o plano muscular e a tela subcutânea foram suturados em plano único com pontos simples, separados, com fio Mononylon 5-0 (Ethicon) (figura 4.6 c) e a pele com pontos simples e separados com o mesmo fio (figura 4.6 d). Todos os animais receberam antibioticoterapia antes do início da cirurgia e antiinflamatório por meio de uma injeção intramuscular de 1 ml/Kg de Meloxicam (Ouro Fino) ao final da cirurgia.

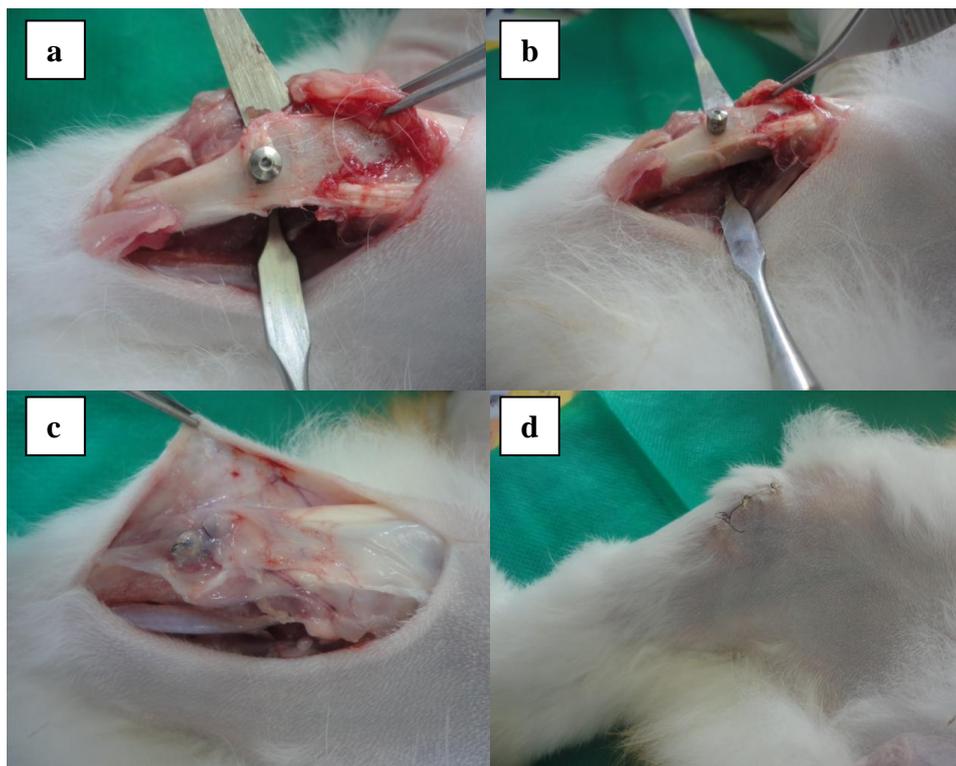


Figura 4.6- Fotos dos implantes inseridos na tíbia do animal (a, b) e suturas (c, d).

**4.7.5- Obtenção das amostras:** Após o período de 04 semanas, os seis animais receberam dose letal de anestésico geral e em seguida foram coletados os blocos ósseos contendo os implantes para realização do ensaio de torque de remoção e análise histomorfométrica.

**4.7.6- Processamento das amostras:** As amostras obtidas das duas tíbias de cada animal foram fixadas em álcool 70% e processadas para inclusão em resina poliéster cristal -MC 2120<sup>®</sup> (Epoxyfiber, Rio de Janeiro), conforme procedimento a seguir:

1. Secagem dos corpos de prova (figura 4.7 a);
2. Seleção e vedação (evitar extravasamento da resina) das fôrmas em placa de vidro para inclusão dos corpos de prova (figura 4.7 b);
3. Acomodação dos blocos ósseos (corpos de prova) às fôrmas com suas devidas identificações (figura 4.7 c);
4. Preparo da resina poliéster cristal (para cada 100 ml de resina poliéster cristal utiliza-se 18 gotas do catalisador);
5. Inclusão da resina poliéster cristal às fôrmas com os blocos ósseos (figura 4.7 d);
6. Mínimo de 24 horas para completa polimerização e manipulação dos blocos embutidos.

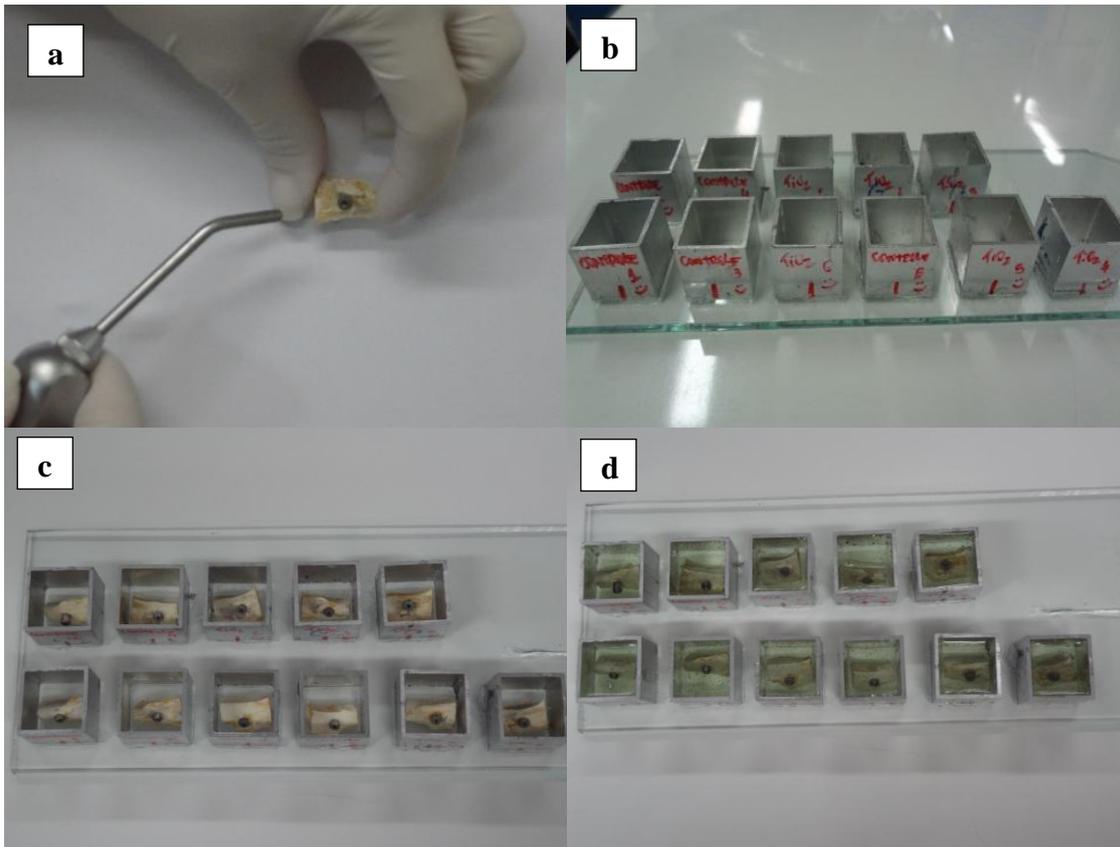


Figura 4.7- (a) Secagem dos corpos de prova; (b) fôrmas selecionadas e vedadas em placa de vidro; (c) acomodação dos copos de prova nas formas selecionadas; (d) corpos de prova incluídos em resina poliéster cristal.

- **Corte dos corpos de prova:** Cada bloco inicialmente foi cortado longitudinalmente ao meio com o equipamento Labcut 1010<sup>®</sup> (Extex Corp.-USA) com disco de diamante 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm, com rotação de aproximadamente 250 rpm (figura 4.8 a, b).

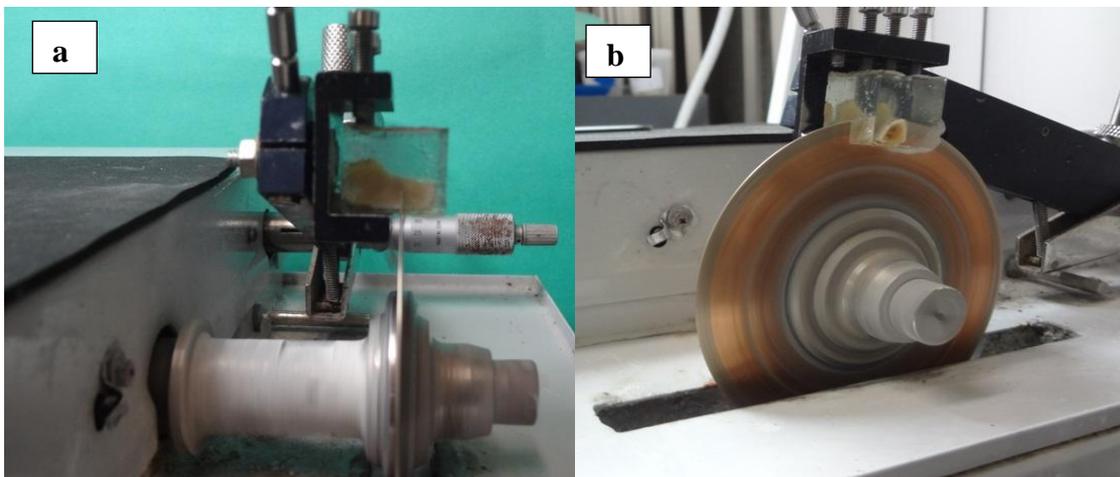


Figura 4.8- (a) Corte longitudinal inicial do corpo de prova visto de frente; (b) Corte longitudinal inicial do corpo de prova visto lateralmente.

Após o corte inicial, uma das metades cortadas de cada bloco foi selecionada e em seguida novo corte produzido (figura 4.9 a), resultando numa lâmina de aproximadamente 0,3 mm de espessura (figura 4.9 a, b). A partir desta lâmina foi realizado lixamento com lixa d'água com granulometrias de nº 1000, nº 1500 e nº 2000 em politriz com fluxo de água até chegar a uma espessura de aproximadamente 0,05 mm. As finas lâminas foram fixadas sobre uma placa de vidro (figura 4.10) por meio de adesivo à base de cianoacrilato (Tekbond®). Imagens das lâminas foram capturadas através de câmera digital de alta resolução acoplada ao microscópio de luz de campo claro (Zeiss Axioplan), no Laboratório de Biomineralização do ICB daUFRJ. A análise histomorfométrica foi realizada a partir das imagens capturadas.

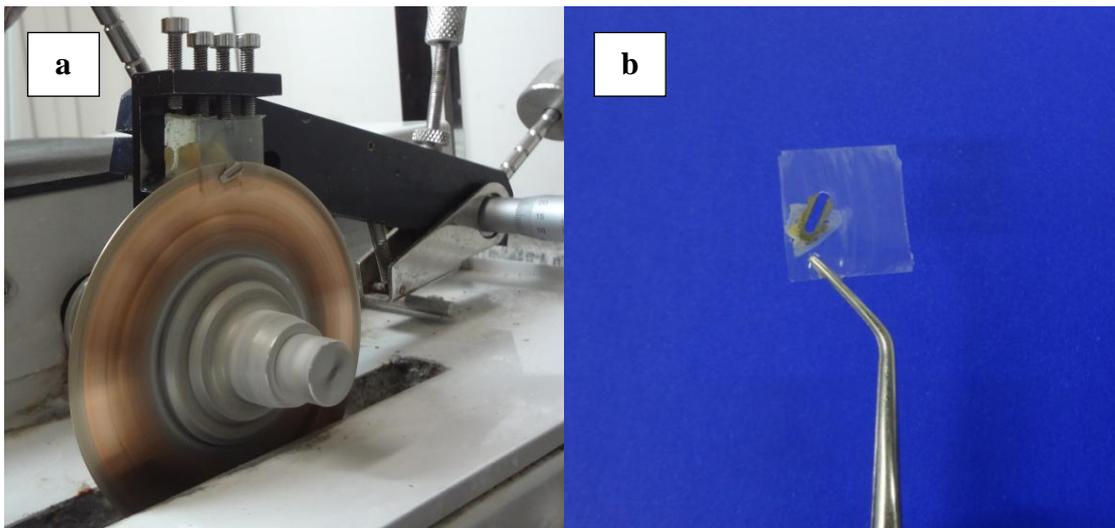


Figura 4.9- (a) Corte da lâmina com espessura de aproximadamente 0,3mm; (b) Lâmina após corte com aproximadamente 0,3mm de espessura.



Figura 4.10- Amostra lixada e fixada em placa de vidro, pronta para análise histomorfométrica.

#### 4.8 – Análise histomorfométrica

As doze lâminas (seis do grupo controle e seis do grupo teste) foram observadas em um microscópio de luz de campo claro (Nikon Eclipse E400, Tóquio, Japão), onde utilizou-se também um filtro polarizador. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital de alta resolução (Evolution® MP color; 5.0 mega pixels; Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) acoplada ao microscópio (Zeiss, Axioplan®), utilizando uma lente objetiva acroplan de 10x. A análise descritiva da resposta tecidual aos implantes foi avaliada em função da presença de tecido conjuntivo e de neoformação óssea. Padronizou-se de dois a três filetes de rosca de cada implante abrangendo região medular e cortical, uma vez que houve dificuldade em padronizar apenas a região medular para verificar o crescimento de tecido ósseo advindo da região endosteal. Foi realizada segmentação da imagem através do programa Image-Pro Plus® v.4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), onde segmentou-se o implante, tecido conjuntivo e osso neoformado. Após a segmentação, as áreas evidenciadas foram contadas e transportadas para o software Excel 2007 (Microsoft Office®), onde foi obtido um percentual de cada área/imagem.

##### - Análise Estatística:

A área de tecido conjuntivo e de tecido ósseo, percentual, foi determinada para seis lâminas dos implantes controle (Ti puro/usinado) e seis lâminas dos implantes teste (tratado por anodização para produção de superfície modificada). As médias obtidas para cada amostra foram utilizadas para cálculo das médias, desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança, considerando  $\alpha = 0,05$ . O teste de Grubbs ( $\alpha = 0,2$ ) foi utilizado para remover um *outlier* de cada grupo experimental. Os valores amostrais foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste t ( $\alpha = 0,05$ ).

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados acompanha a seguinte ordem: caracterização dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos; caracterização dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos com zinco incorporados; avaliação *in vitro* e avaliação *in vivo*.

### 5.1 – Caracterizações morfológica, estrutural e composicional dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos

*Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Corte transversal (FIB):*

Os recobrimentos resultantes da oxidação anódica a microarco são caracterizados por diversos microporos de diferentes tamanhos e formas que são fortemente dependentes da natureza da descarga envolvida no mecanismo de oxidação e são norteados pelos parâmetros do processo, tais como voltagem, corrente, tempo, composição do eletrólito e frequência (WANG *et al.*, 2006, OH *et al.*, 2005).

Na figura 5.1 são apresentadas micrografias das topografias dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos. A camada de óxido do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf, figuras 5.1 (a) e (b), é constituída por poros interconectados, de forma arredondada e tamanho de poros (a partir da parede interna) de  $2,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ , homoganeamente distribuídos por toda a superfície, visivelmente sem presença de trincas. Nas figuras 5.1 (c) e (d), as micrografias do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos apresentam topografia com inúmeros poros irregulares com tamanho de poros (a partir da parede interna) de  $3,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$ , homoganeamente distribuídos, sem a evidência de trincas. As paredes dos poros mostram-se visivelmente preservadas por toda a superfície do recobrimento.

Resultados semelhantes foram produzidos por Park e cols. em condições de tensão mais elevada. Um aumento significativo no tamanho de poros foi observado quando a voltagem passou de 220 V para 320 V. Ao contrário do presente estudo, que utilizou tensão de 150 V para produção dos recobrimentos, somente com 320 V as paredes tornaram-se nitidamente visíveis, chegando a  $3,0 \mu\text{m}$  de diâmetro a partir da parede interna do poro (PARK *et al.*, 2005). O uso de tensão menor permite minimizar a

chance de formação de trincas, que podem vir a comprometer estabilidade mecânica do recobrimento.

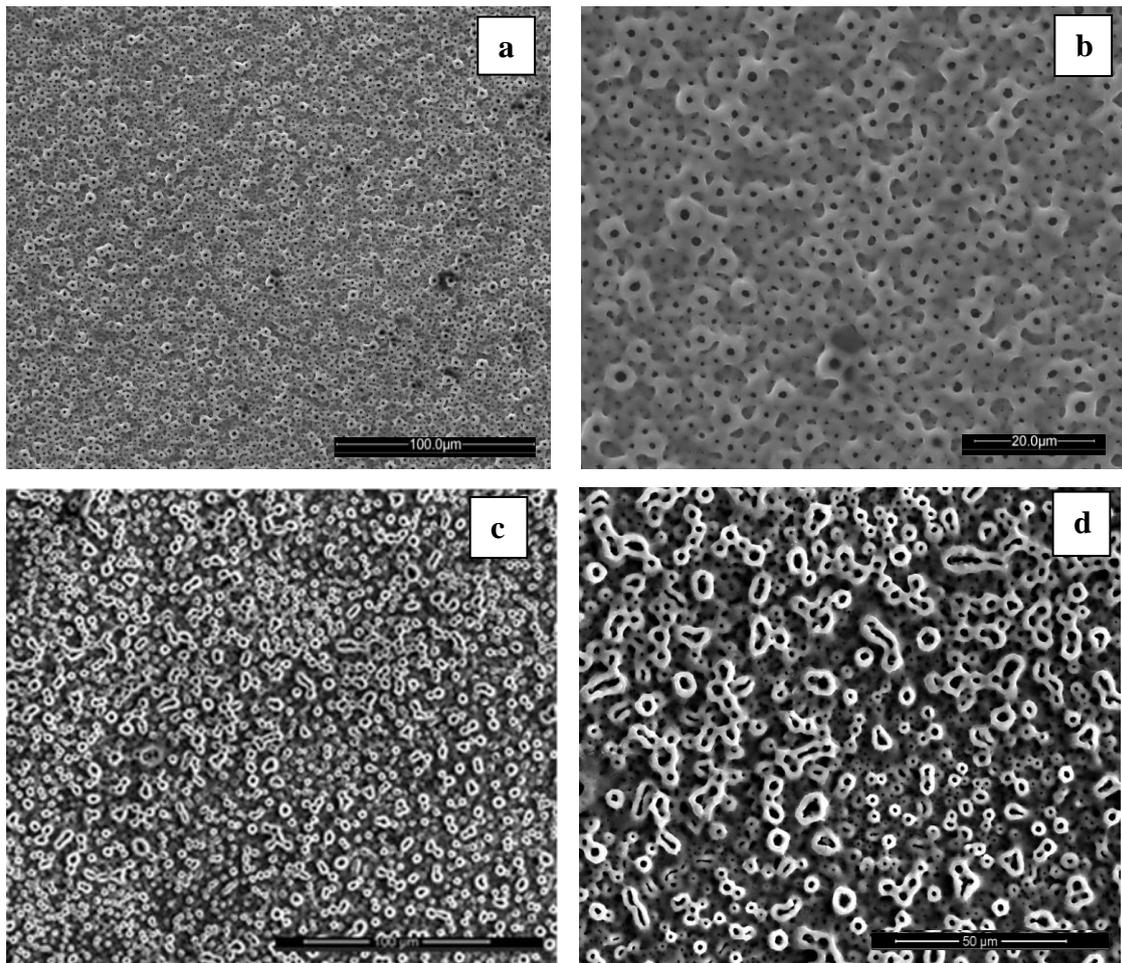


Figura 5.1- Micrografias da topografia dos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf (a, b) e do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (c, d) com aumentos de 1000x (a, c) e 3000x (b, d).

Topografias homogeneamente porosas são desejadas para finalidades de superfícies de implantes odontológicos e ortopédicos uma vez que favorecem o processo de osseointegração. Porosidade é considerada uma característica importante no que diz respeito ao ancoramento ósseo e embricamento mecânico do implante (LI *et al.*, 2004; CORTEZ, 2002).

A figura 5.2 apresenta as micrografias dos corte transversais dos recobrimentos preparados por FIB (feixe de íons focalizado, do termo em inglês *Focused Ion Beam*). Na figura 5.2 (a) observa-se que o recobrimento é homogêneo ao longo de toda a interface. Entretanto, a presença de cavidades próximas à interface óxido-substrato pode levar à falha na aderência do recobrimento ao substrato, além de agir como

concentrador de tensões. A propagação de trincas pode gerar delaminação e destacamento do recobrimento durante a inserção *in vivo* e aumenta o risco de reação adversa exacerbada e consequente perda do implante (SANTOS, 2008). Resultados similares de cortes transversais em recobrimentos de TiO<sub>2</sub> produzidos com solução de acetato de cálcio com betaglicerofosfato de sódio em diferentes concentrações foram obtidos por Abdullah. Foram evidenciadas diversas cavidades nas regiões próximas à interface óxido-substrato, porém não foi realizado ensaio mecânico para avaliação da resistência mecânica dos recobrimentos (ABDULLAH, 2010).

Na figura 5.2 (b) apresenta a micrografia do corte transversal do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos onde observa-se a interface substrato-recobrimento relativamente íntegra, com a presença de poucos e diminutos poros no recobrimento, que pode conferir-lhe maior aderência ao substrato e, conseqüentemente, maior resistência mecânica.

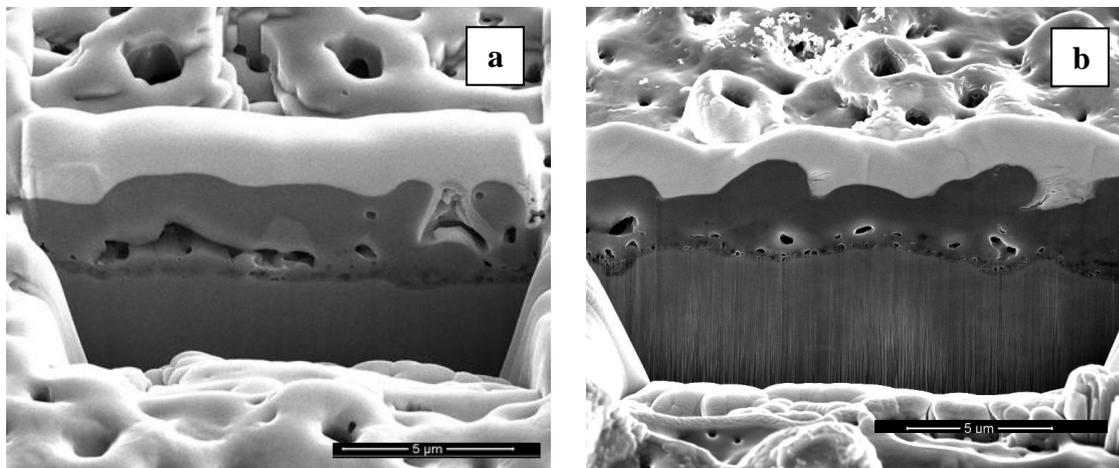


Figura 5.2- Corte transversal dos recobrimentos: (a) grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf; e (b) grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos produzidos por FIB.

#### *Rugosidade e Espessura:*

A rugosidade da superfície do biomaterial desempenha papel importante nos processos biológicos, como adesão de proteínas, adesão celular e formação de tecido ósseo circundante ao implante. Comparadas com superfícies lisas, as superfícies rugosas apresentam maior área de superfície, podendo proporcionar maior integração com o osso por embricamento mecânico. Estudos confirmam que a rugosidade da superfície dos implantes afeta diretamente a osseointegração e a estabilidade mecânica dos

implantes dentários (WERNER *et al.*, 2009). Superfícies rugosas promovem melhor fixação e espalhamento celular que superfícies lisas (ZHU *et al.*, 2004; COCHRAN *et al.*, 1994). Nishimoto e cols. mostraram em seu estudo que proteínas do soro ligam-se preferencialmente a superfícies rugosas em vez de superfícies lisas (NISHIMOTO *et al.*, 2008). A possibilidade de implantes rugosos, conseqüentemente com maior área de superfície, alcançarem melhor contato implante-osso, favorecendo desta forma a osseointegração, é um dos principais objetivos que motivam os estudos atuais em superfícies de implantes (ALLA *et al.*, 2011).

A tabela 5.1 apresenta a média dos resultados obtidos de rugosidade e espessura para os recobrimentos grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos. A rugosidade média (Ra) encontrada para o recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf foi 0,48 ± 0,04 µm. Resultados semelhantes foram encontrados por Elias & Coutinho (2009) em superfícies anodizadas de TiO<sub>2</sub> contendo Ca e P (Ra 0,55 ± 0,06 µm).

Estes resultados são comparáveis com os encontrados para as superfícies estudadas por Lincks e cols. que avaliaram o efeito da rugosidade do substrato de titânio na resposta celular de dois tipos acabamentos superficiais: usinado (Ra ~ 0,42 µm) e o polido (Ra ~ 0,02 µm). Foi verificado que a superfície usinada apresentou resultados mais satisfatórios para a resposta celular, principalmente com relação ao aumento no crescimento e diferenciação celulares (LINCKS *et al.*, 1998).

Tabela 5.1- Rugosidade média (Ra) e espessura média dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos

Eletrólito	Rugosidade (µm)		Espessura (µm)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
TiO <sub>2</sub> Acetato + Bgf	0,48	0,04	4,4	0,8
TiO <sub>2</sub> Ácidos	0,9	0,1	3,8	0,9

A média dos resultados obtidos de rugosidade para os recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos foi Ra 0,9 ± 0,1 µm, o dobro do valor encontrado para o grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf. Este resultado é compatível com os obtidos por Park e cols., que utilizaram eletrólito semelhante e produziram recobrimento com tempo de oxidação de 60 min e voltagem 320 V. A rugosidade média (Ra) do recobrimento produzido foi de

0,73  $\mu\text{m}$  (PARK *et al.*, 2005). Ha e cols. mostraram que a tensão empregada influenciou diretamente na rugosidade final. Recobrimentos produzidos a 220 V e 330 V apresentaram rugosidade média de  $3,29 \pm 0,37 \mu\text{m}$  e  $1,14 \pm 0,14 \mu\text{m}$ , respectivamente. Foi observado que, de acordo com os parâmetros de anodização utilizados, como por exemplo, aumento da voltagem, proporcionou recobrimentos com menor rugosidade (HA *et al.*, 2006).

Ainda não existe um consenso sobre qual seria a rugosidade ideal para superfícies de implantes, embora se reconheça sua importância no processo de osseointegração. Alguns estudos defendem que superfícies com padrão de rugosidade Ra entre 0,5 e 2,0  $\mu\text{m}$  alteram positivamente a resposta tecidual ao implante (BUTZ *et al.*, 2006; BUSER *et al.*, 2004; ABRAHAMSSON *et al.*, 2004; ALBREKTSSON *et al.*, 2004 a; ALBREKTSSON *et al.*, 2004 b). Entretanto, Butz e cols. demonstraram que superfícies com rugosidades Ra superiores a 2,0  $\mu\text{m}$  podem aumentar as chances de contaminação bacteriana. Nestes casos, o tratamento de possíveis peri-implantites torna-se um desafio, podendo levar à perda completa da osseointegração e do implante (BUTZ *et al.*, 2006).

A adesão celular é geralmente aumentada em superfícies com rugosidade média (Ra) em torno de 1  $\mu\text{m}$ , geralmente obtidos com tratamentos de modificação superficial, como por exemplo anodização (BIGERELLE *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002). A rugosidade variando entre 0,8  $\mu\text{m}$  e 1,9  $\mu\text{m}$  otimizaria respostas celulares intermediárias e finais, mas não afetaria respostas iniciais, e superfícies lisas não favoreceriam esta resposta (ROSA & BELOTI, 2003). De acordo com estes dados, pode-se concluir que a rugosidade superficial do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (~ 0,9  $\mu\text{m}$ ) favoreceria a adesão celular e otimizaria as respostas celulares intermediárias e finais, sendo um fator que beneficiaria a biocompatibilidade da superfície do implante.

As medidas de espessura foram realizadas no momento da análise da interface substrato-recobrimento através de microscópio de varredura de alta resolução com feixe focalizado de íons – FIB. Conforme observado na tabela 5.1 não houve diferença significativa entre as espessuras dos recobrimentos. A espessura média dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos foi de  $4,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$  e  $3,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ , respectivamente. Estes resultados são compatíveis com dados disponíveis na literatura por procedimento semelhante (ABDULLAH, 2010; KERN & ZINGER, 2006). A espessura é um parâmetro importante para o desempenho mecânico

já que recobrimentos muito espessos, ainda mais porosos como os obtidos por anodização a microarco, são propensos a falhar na inserção.

#### *Difração de Raios X (DRX):*

Na figura 5.3 o padrão de difração de raios X do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf (linha preta) mostra a presença das formas alotrópicas do TiO<sub>2</sub> anatásio (linha azul) e rutilo (linha verde). Picos adicionais também foram observados (identificados com “ \* ” na figura 5.3), que podem ser atribuídos a fases em menor quantidade e intensidade eventualmente formadas durante a síntese do recobrimento. Baixa intensidade e a sobreposição das fases anatásio e rutilo não permitiu a identificação de tais fases pelas indexações já existentes. Além de utilizar geometria Bragg-Brentano, foi utilizado o modo de incidência rasante para diminuir a contribuição dos picos de Ti (substrato). Ainda assim, não foi possível identificar tais fases. Desconsiderando esta fase minoritária, o refinamento pelo método de Rietveld indicou que o recobrimento é composto por 74 (2) % de anatásio e 23 (2) % de rutilo.

Além disso, a presença de um abaulamento na linha de base dos difratogramas adquiridos no modo de incidência rasante sugere a presença de fase amorfa. A presença de componente amorfo nos recobrimentos de TiO<sub>2</sub> também é reportado por Li e cols., cujos difratogramas obtidos apresentam região difusa entre 20° e 30° (LI *et al.*, 2004). Segundo os autores, a utilização de eletrólitos à base de cálcio e fósforo propiciam a formação de compostos amorfos. Outros autores que descrevem que recobrimentos de TiO<sub>2</sub> produzidos por oxidação anódica a microarco geram recobrimentos com misturas de fases cristalina e amorfa são YU *et al.* (2007) e LIU *et al.* (2005).

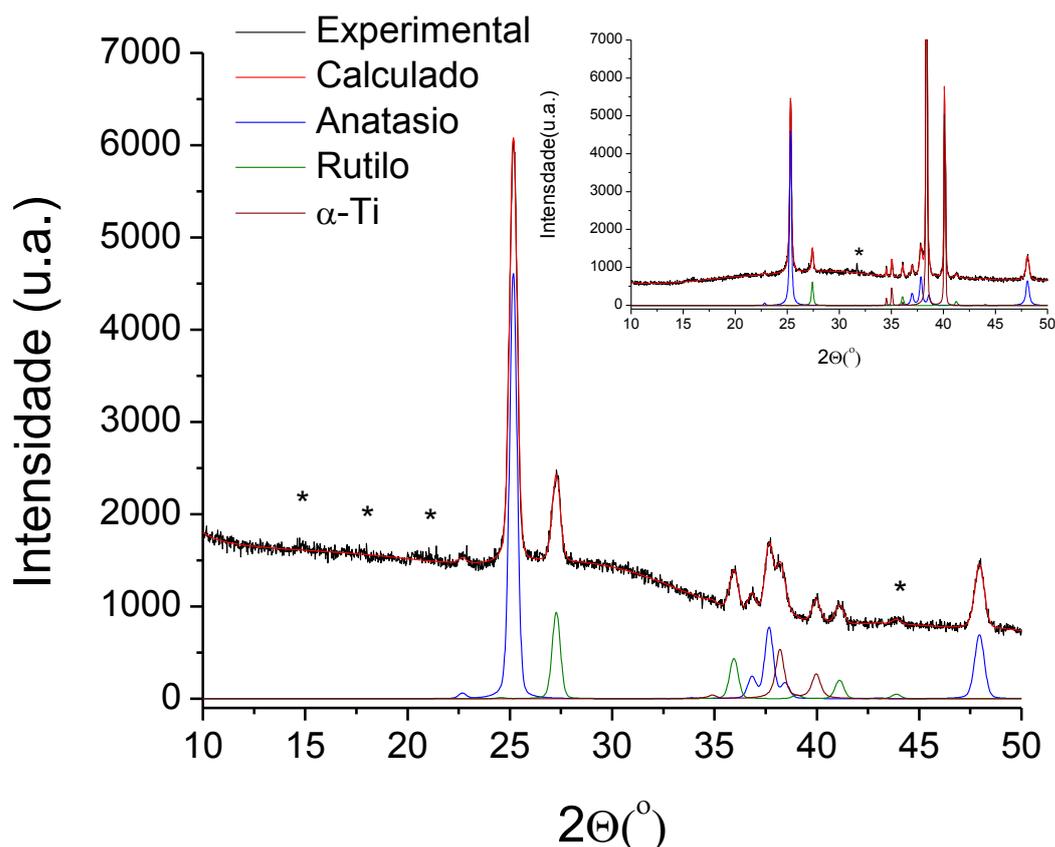


Figura 5.3- Difratoograma do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf obtido em incidência rasante (linha preta); Padrões de raios X do anatásio (linha azul), do rutilo (linha verde), do titânio (linha marrom) e perfil calculado no método de Rietveld (vermelho). Detalhe: Difratoogramas na geometria Bragg-Brentano (indicação de cores similar). Os “\*” indicam picos adicionais observados, que podem ser atribuídos a fases em menor quantidade e intensidade eventualmente formadas durante a síntese do recobrimento.

A figura 5.4 apresenta o padrão de difração de raios X do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. Apresentando picos bem definidos, identificado na figura pela cor azul, o perfil é característico da forma alotrópica do  $\text{TiO}_2$  chamada anatásio. Nesta condição não foi verificada a presença da forma alotrópica rutilo. Os picos do titânio (substrato) estão representados na figura 5.3 com a cor marrom. Devido à intensidade do ruído na linha de base do difratograma, o método de Rietveld (vermelho) não foi capaz de detectar a presença de outras fases cristalinas, com exceção do substrato de titânio.

A presença de anatásio como fase majoritária no recobrimento de  $\text{TiO}_2$  pode ser benéfica. De acordo com Kokubo, o anatásio é a fase mais reativa de  $\text{TiO}_2$  e a mais efetiva na formação de apatita quando em SBF (*Simulated Body Fluid*) (KOKUBO *et al.*, 2003). Abdullah afirma que o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico) potencializa a formação de

anatásio e quando o mesmo é misturado ao  $H_3PO_4$  (ácido fosfórico) aumenta a possibilidade da presença da fase anatásio (ABDULLAH, 2010). Apenas a fase anatásio foi identificada nos recobrimentos produzidos com solução de ácido sulfúrico 3% e ácido fosfórico 3% aplicando-se voltagens entre 110 e 220 V por 20 minutos (SONODA *et al.*, 2007). Kern & Zinger, com uma solução de 0,1M ácido sulfúrico e 0,5M ácido fosfórico, produziram recobrimentos aplicando-se uma voltagem de 185 V e observaram a formação de  $TiO_2$  na forma de anatásio, sem a presença de rutilo no recobrimento (KERN & ZINGER, 2006).

Os resultados de Park e cols. contradizem os anteriores, onde foi observada a presença das fases anatásio e rutilo em recobrimentos produzidos com eletrólito de ácido sulfúrico 0,25M e ácido fosfórico 0,25M aplicando voltagem de 320 V, densidade de corrente  $380 A/m^2$ , durante 60 minutos de anodização. Levando em consideração que os parâmetros de anodização utilizados são similares ao desta tese, pode-se chegar à conclusão que a densidade de corrente pode ter um efeito importante na formação do rutilo, uma vez que a densidade de corrente deste estudo foi de  $\sim 18 A/m^2$  e não houve a formação de rutilo. Abdullah em seu aprofundado estudo sobre a formação de  $TiO_2$  afirma que a formação do rutilo a partir de eletrólitos a base de ácido sulfúrico e ácido fosfórico é dependente da densidade de corrente (ABDULLAH, 2010; PARK *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* comprovam a efetividade das fases anatásio e/ou rutilo na formação de apatita. Segundo os autores e seus respectivos colaboradores KAWASHITA, XIONG e YANG, superfícies com pouca ou nenhuma presença de anatásio e/ou rutilo apresentam uma menor formação de apatita, apontando baixa bioatividade (KAWASHITA *et al.*, 2004; XIONG *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004).

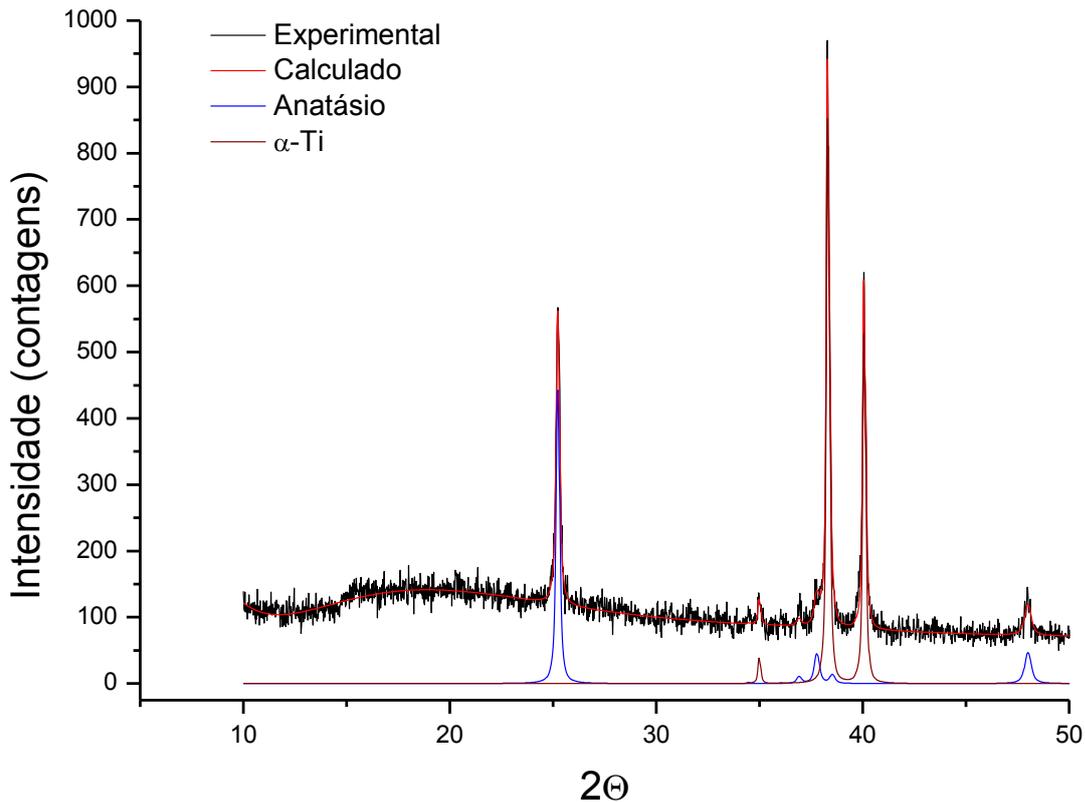


Figura 5.4- Difratoograma do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (preto) obtido em incidência rasante, padrão anatásio (azul), padrão de titânio (marrom) e perfil calculado no método de Rietveld (vermelho).

#### *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):*

A micrografia de MET no modo STEM, na figura 5.5 (a), evidencia que a microestrutura do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf é composta por fase cristalina (cruz laranja) e fase amorfa (cruz azul). A figura 5.5 (b) mostra os espectros de EDS obtidos nas regiões cristalina e amorfa indicadas pelas cruzes na figura 5.5 (a). A razão Ca/Ti é maior na fase amorfa ( $\sim 0,26$ ) que na fase cristalina ( $\sim 0,03$ ) indicando que o cálcio tende a se concentrar predominantemente na fase amorfa que na fase cristalina. Já no caso do fósforo, não é possível estabelecer uma preferência na fase amorfa ou cristalina, pois a razão P/Ti é muito baixa ( $\sim 0,07$  e  $\sim 0,03$  respectivamente). Isso pode ser devido à baixa concentração de íons P no eletrólito (0,02M de  $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P}$ ). Na figura 5.5 (c), a indexação dos padrões de difração de elétrons na área selecionada (SAED) apontam a presença de planos característicos das fases

anatásio (vermelho) e rutilo (amarelo), corroborando com os resultados de difração de raios X (figura 5.3). Os anéis ou halos concêntricos indicam a presença de uma fase amorfa.

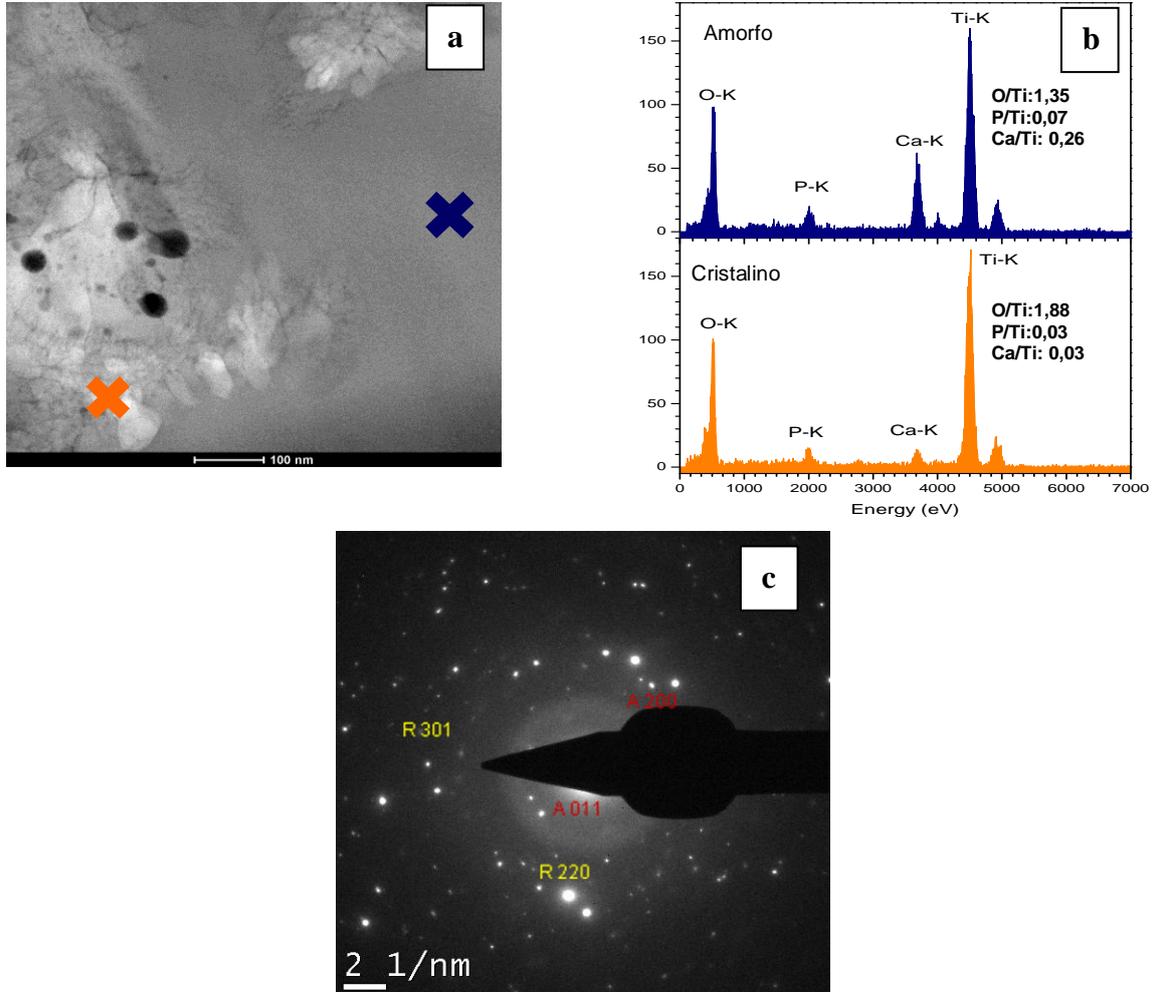


Figura 5.5- Micrografia de MET do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf: (a) A cruz laranja identifica fase cristalina e a cruz azul identifica fase amorfa; (b) Espectros de EDS das fases amorfa e cristalina; e (c) padrão de difração de elétrons (SAED).

Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) foi usada para identificar e fornecer informações da distribuição elementar na área analisada. A figura 5.6 apresenta os mapas elementares do (b) oxigênio, (c) cálcio, (d) fósforo e (e) titânio no recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf. Comparando-se a imagem obtida no modo STEM e os mapas elementares da mesma região é possível correlacionar a localização dos elementos com as fases. Pode-se observar que o oxigênio (figura 5.6 b) está distribuído uniformemente por toda a superfície. Já o cálcio apresenta-se prioritariamente na região amorfa, confirmando o resultado de EDS da figura 5.5 (b).

Este resultado contradiz com dados da literatura, onde o aumento da concentração de cálcio é correlacionado com o aumento na cristalinidade dos recobrimentos (KIM & RAMASWAMY, 2009; ZHU *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2001). Entretanto, este pode ser um ponto positivo uma vez que estruturas amorfas são mais solúveis e, por isso, disponibilizam o cálcio mais rapidamente para o meio corpóreo e acelerando o processo de osseointegração. O fósforo (figura 5.6 d), apesar estar presente numa concentração relativamente baixa no eletrólito (0,02M de Betaglicerofosfato de sódio à solução), encontra-se distribuído por toda a superfície. Em contrapartida, o titânio apresenta-se visivelmente distribuído na região cristalina.

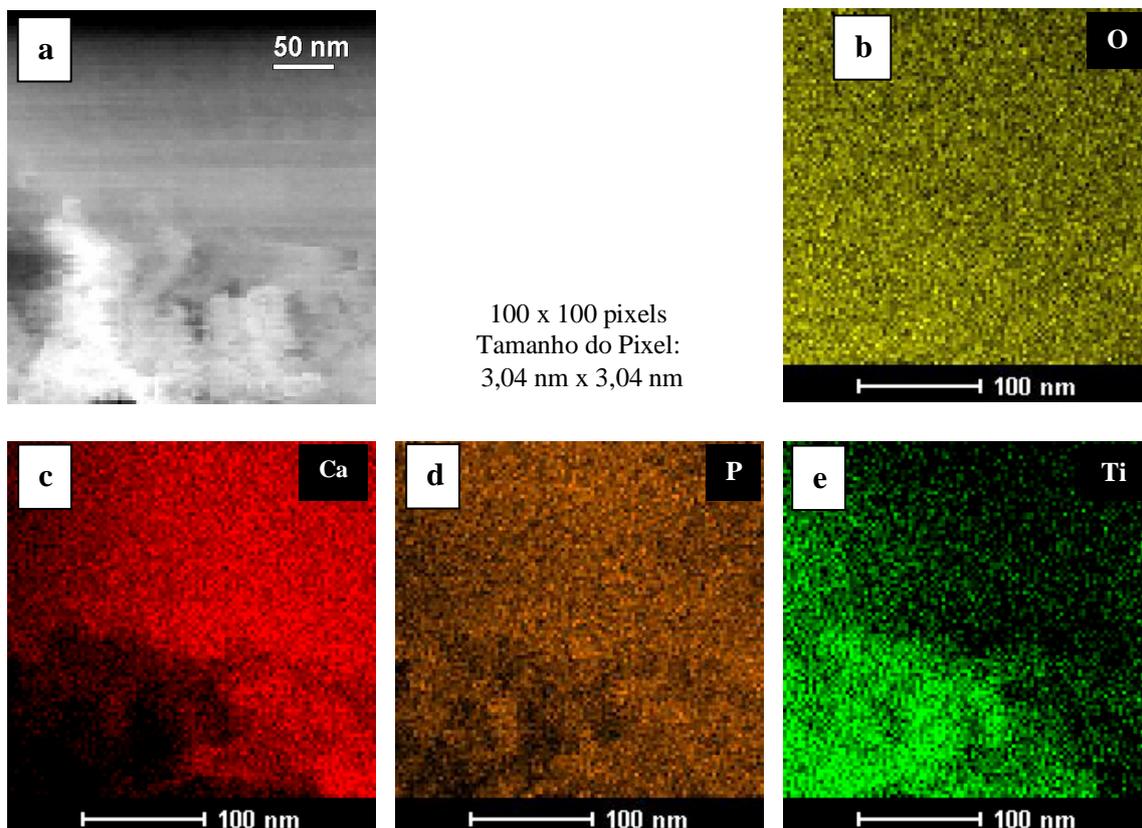


Figura 5.6- (a) Micrografia de MET (HAADF) do corte transversal do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Cálcio; (d) Fósforo e (e) Titânio.

A figura 5.7 apresenta a imagem HAADF/STEM (a) e os mapas elementares obtidos por EDS/STEM do (b) oxigênio, (c) fósforo e (d) titânio no recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. Observa-se que o oxigênio (b) concentra-se basicamente nas

mesmas regiões em que o titânio (d). Em contrapartida, o fósforo concentra-se na região amorfa. Este resultado é confirmado pelo EDS da figura 5.9.

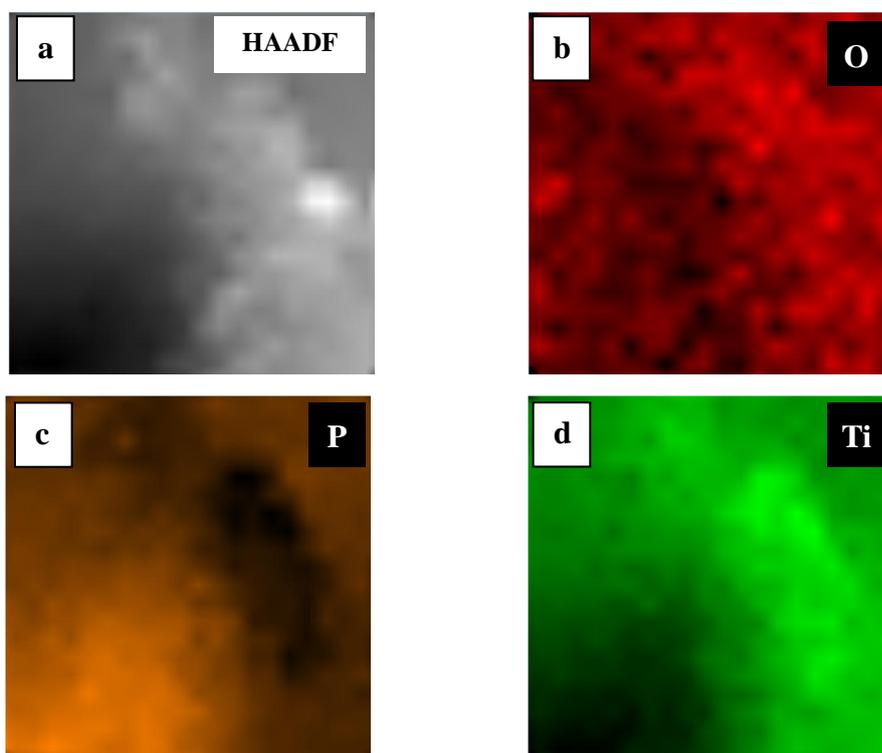


Figura 5.7- (a) Micrografia de HAADF/STEM do corte transversal do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Fósforo e (d) Titânio. (Imagens: 20 X 20 pixels Tamanho:  $(9,21 \times 9,21) \text{ nm}^2$ )

Na figura 5.8 (a), a micrografia por STEM/MET evidencia microestrutura do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos composta por fase cristalina (região clara) e fase amorfa (região escura). A figura 5.8 (b) apresenta o espectro de EDS obtido das regiões cristalina (cruz verde) e amorfa (cruz amarela) indicadas na figura 5.8 (a). A razão P/Ti é maior na fase amorfa ( $\sim 0,94$ ) que na fase cristalina ( $\sim 0,12$ ) confirmando a predominância do fósforo na fase amorfa.

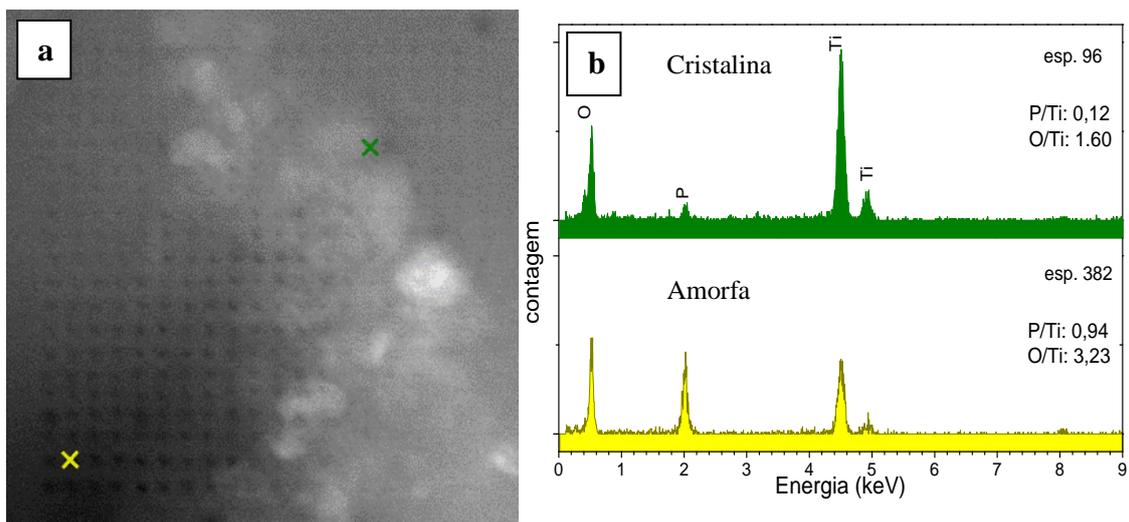


Figura 5.8 - (a) Micrografia de STEM/MET do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos; (b) Espectro de EDS na região cristalina (cruz verde) e na região amorfa (cruz amarela).

As figuras 5.9 (a) e (b) mostram, à esquerda, imagem de MET de alta resolução das regiões cristalinas e amorfas do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. À direita, são mostrados os respectivos padrões de difração de elétrons das áreas selecionadas (SAED). Estes resultados ratificam as análises de DRX que identificou a presença de fases cristalinas e amorfas na superfície do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos.

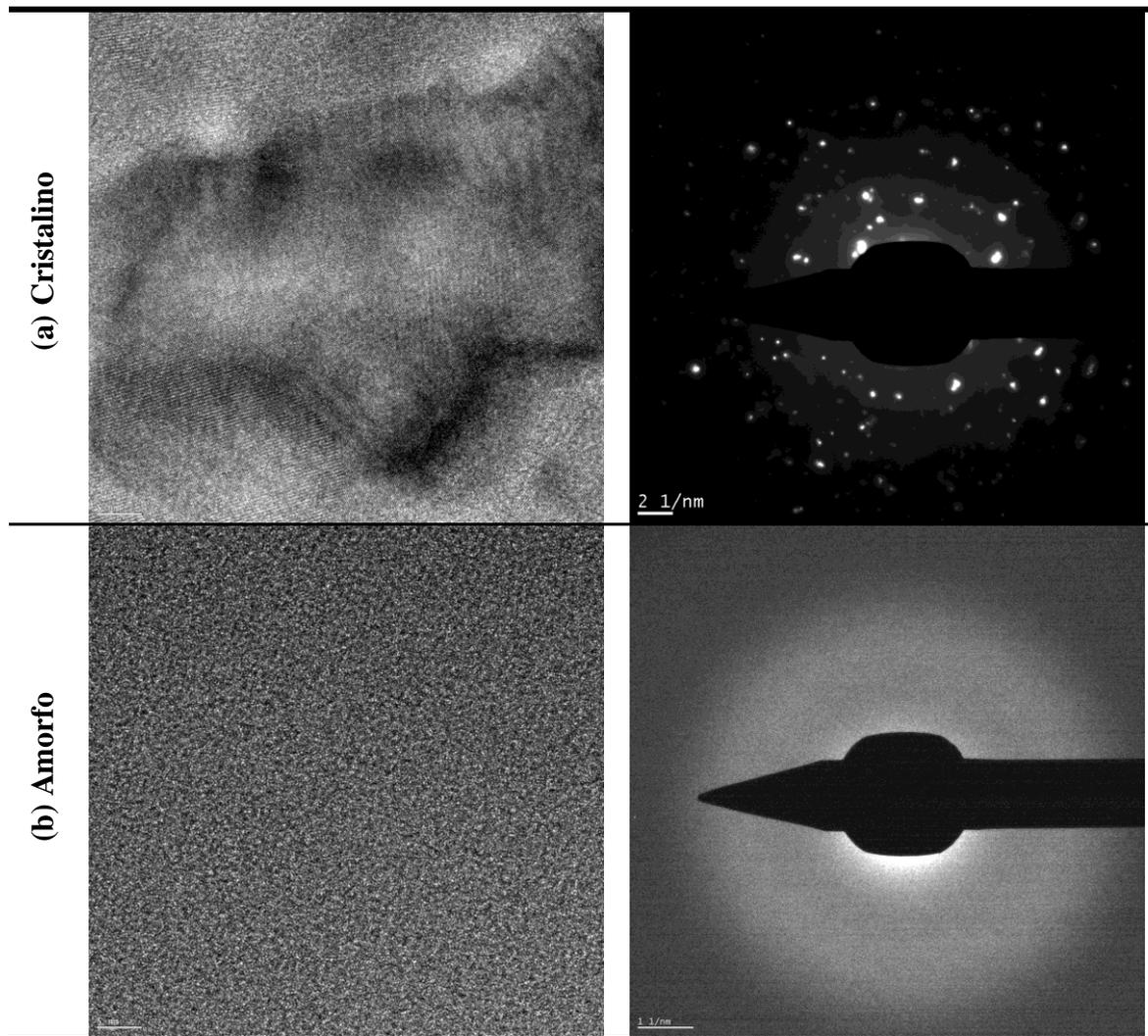


Figura 5.9- Micrografias de MET de alta resolução e padrão de difração de elétrons (SAED) do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos: (a) região cristalina e (b) região amorfa.

#### *Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS):*

A distribuição das concentrações atômicas (at%) dos elementos que compõem o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf é apresentada na figura 5.10. A análise química elemental por XPS foi realizada antes e após bombardeamento com  $\text{Ar}^+$  por: 20, 40, 60, 80 e 100 minutos. Uma forte variação de concentração dos elementos no recobrimento foi observada nos primeiros 40 minutos de bombardeamento, a partir de então as concentrações atingem o equilíbrio mantendo-se estáveis até 100 minutos. A maior alteração na concentração *versus* tempo de bombardeamento é observada para o

carbono (de ~ 76 at% para 4 at%), o que pode ser atribuído a uma forte desorção deste elemento pelos poros adjacentes à superfície do recobrimento de TiO<sub>2</sub>.

A remoção dos átomos de carbono da superfície pelo bombardeamento com Ar<sup>+</sup> resulta num aumento do conteúdo relativo de todos os outros elementos nas camadas mais profundas do recobrimento. O percentual atômico de oxigênio estabilizou-se em ~ 64 at% a partir de 40 minutos de bombardeamento, enquanto o percentual atômico do titânio chegou a ~ 20 at%. A proporção entre os elementos titânio e oxigênio manteve-se constante para os tempos posteriores de bombardeamento (maior profundidade).

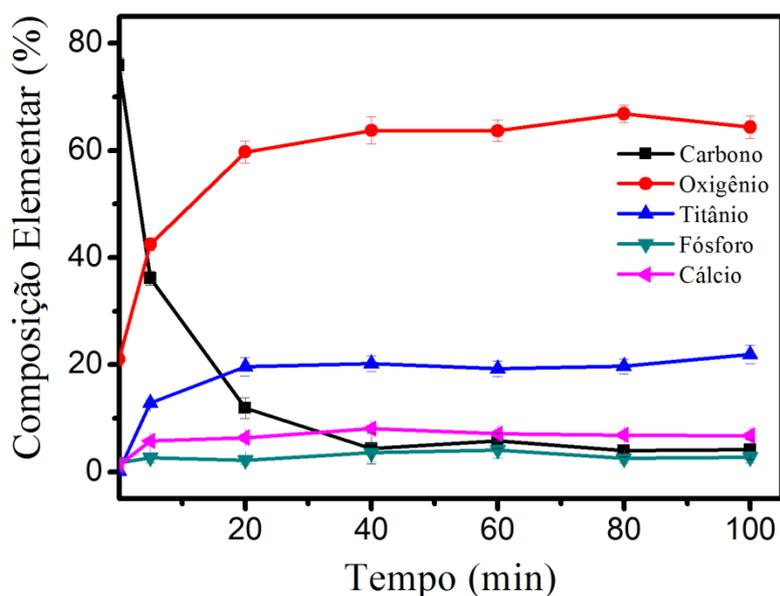


Figura 5.10- Concentração atômica dos elementos (at%) no recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf em função do tempo de bombardeamento.

Com o objetivo de entender o estado químico dos elementos no recobrimento, espectros de alta resolução de XPS do titânio, oxigênio, cálcio e fósforo foram adquiridos. A figura 5.11 ilustra o espectro típico de XPS que mostra a presença dos principais elementos do recobrimento. O percentual atômico (at%) de cada elemento na composição da superfície foi calculado.

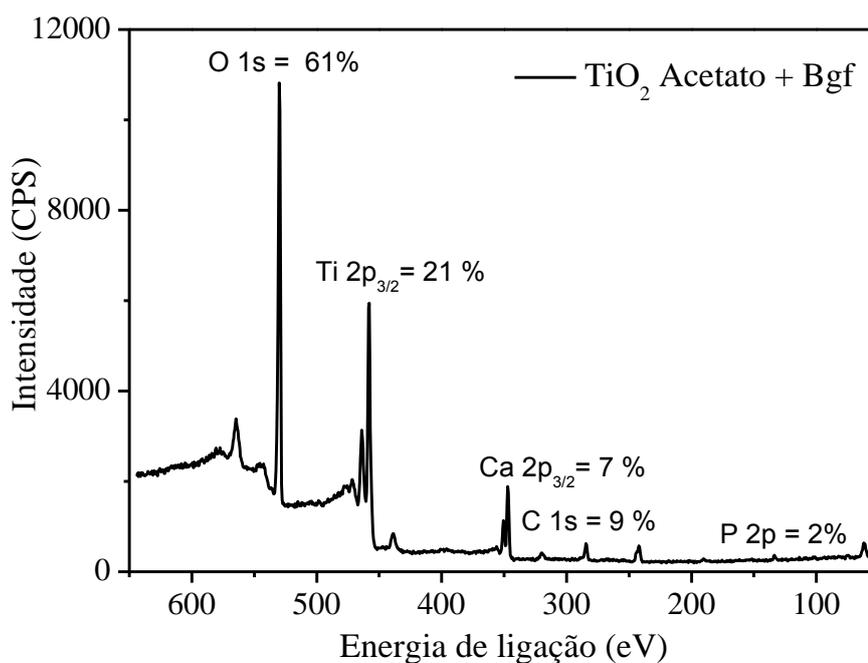


Figura 5.11 - Espectro *survey* de XPS do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e percentual atômico (at.%) para cada elemento.

A tabela 5.2 apresenta os picos medidos, seus respectivos valores de energias de ligação (eV), percentuais atômicos, FWHM (largura a meia altura) e possíveis grupos químicos encontrados no recobrimento.

Tabela 5.2- Percentual atômico (at%) para cada pico dos elementos do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub>Acetato + Bgf.

Pico	Energia de ligação (eV)	Conteúdo (At %)	FWHM	Grupo químico
Ca 2p <sub>3/2</sub> (1)	346,7	21,7	1,2	CaCO <sub>3</sub>
Ca 2p <sub>3/2</sub> (2)	347,2	78,3	1,5	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , CaHPO <sub>4</sub>
Ti 2p <sub>3/2</sub> (1)	455,1	4,1	2,4	TiO, TiOH
Ti 2p <sub>3/2</sub> (2)	456,3	22,2	1,7	Ti <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Ti 2p <sub>3/2</sub> (3)	457,9	73,7	1,4	TiO <sub>2</sub>
O 1s (1)	529,9	74,7	1,6	TiO <sub>2</sub>
O 1s (2)	531,1	25,3	2,0	Ti-OH, (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> , CaO
P 2p	133,2	100	2,2	(PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> , (HPO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>

Os átomos do titânio com energias de ligação no pico  $2p_{(3/2)}$  representam um total de 20,8% da composição da superfície. Baseado na forma do pico  $2p_{(3/2)}$  medido, o mesmo pode ser deconvoluído em 4 outros picos, conforme ilustrado na figura 5.12. Os perfis obtidos correspondem aos compostos  $TiO$ ,  $TiOH$ ,  $Ti_2O_3$  e  $TiO_2$ , que são análogos aos encontrados por Marino e cols. (MARINO *et al.*, 2004). O pico correspondente ao  $Ti_2O_3$  está localizado na energia de ligação de 456,3 eV e representa 22,2% dos átomos do Ti. O pico  $TiO_2$  exibe uma energia de ligação em 457,9 eV e corresponde a 73,7% dos átomos do Ti, correspondendo a maior contribuição para o pico Ti 2p neste recobrimento. O pico localizado a 455,1 eV é consistente com  $TiO$  (óxido de titânio) e/ou  $TiOH$  (hidróxido de titânio) e pode ser interpretado por um ou ambos os compostos com o pequeno conteúdo de 4,1%.

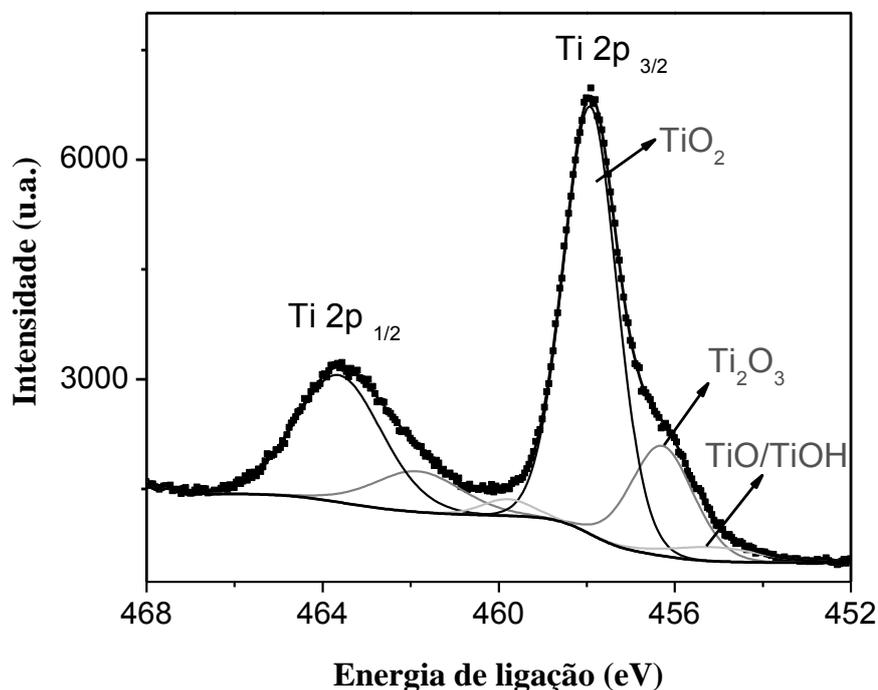


Figura 5.12- Picos de energias de ligação de XPS do Titânio (Ti 2p) no recobrimento do grupo  $TiO_2$  Acetato + Bgf.

O dubleto na figura 5.13, separado por 3,5 eV, é consistente com os dados de XPS relativos ao cálcio. Cada pico para este dubleto tem largura a meia altura de aproximadamente 1,5 eV e resulta num conteúdo atômico de 7% dos átomos de cálcio presentes na superfície. O pico a 346,7 eV é atribuído aos íons de cálcio do  $CaCO_3$  (carbonato de cálcio) e representa um total de 21,7% do átomos de cálcio da superfície.

O principal pico a 347,2 eV corresponde ao cálcio no  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{CaHPO}_4$  (ambos fosfatos de cálcio) e geram a maior contribuição (78,3%) para todo o pico  $\text{Ca } 2p_{3/2}$  (OHTSU *et al.*, 2013; NIST,2012; IDE-EKTESSABI *et al.*, 2005). Dados da literatura correlacionam a presença de cálcio e fósforo nos recobrimentos com o aumento da biocompatibilidade do implante, favorecendo a osseointegração (SOUZA *et al.*, 2011). A incorporação de Ca e P nos recobrimentos produzidos por oxidação anódica oferecem base composicional para a formação de fosfatos de cálcio. O fosfato de cálcio compreende a uma das fases inorgânicas dos tecidos duros (osso) com propriedades osteoindutoras nos fluídos fisiológicos desempenhando importante papel na osseointegração (ZHU *et al.*, 2001).

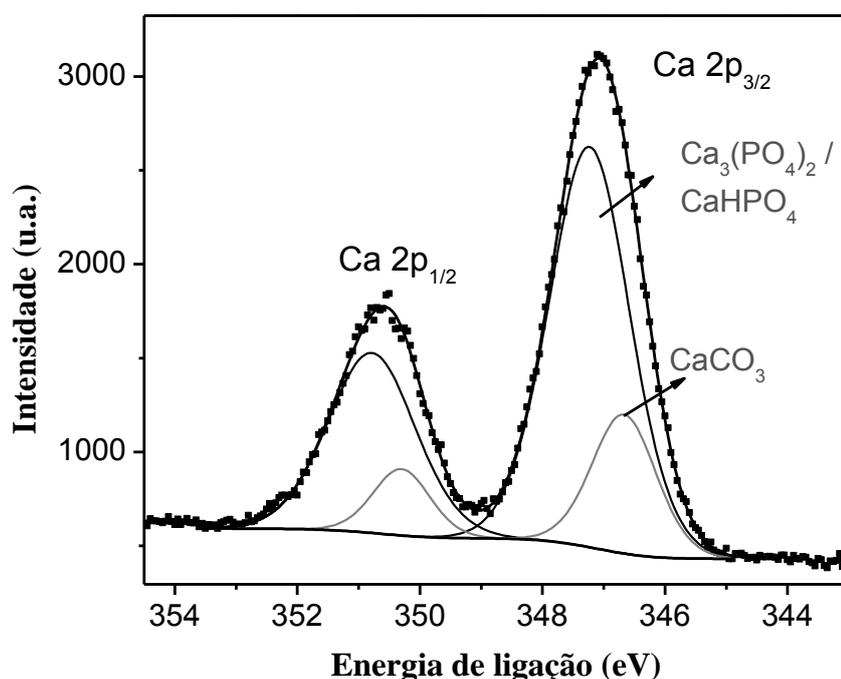


Figura 5.13- Picos de energias de ligação de XPS do Cálcio ( $\text{Ca}2p$ ) no recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf.

O pico do oxigênio  $\text{O}1s$  da figura 5.14 pode ser deconvoluído por dois picos largos representando os átomos de oxigênio associados ao titânio no  $\text{TiO}_2$ , com energia de ligação de 529,9 eV, e a fração relativa de 74,7% dos átomos de oxigênio do volume da superfície. Este percentual é similar ao obtido para o elemento titânio (73,7%), associado ao composto  $\text{TiO}_2$ . O segundo pico de  $\text{O}1s$  pode ser atribuído ao OH e outras espécies que contenham oxigênio. Por exemplo, a energia de ligação de 531,1 eV (e

fração relativa de 25,3%) se encaixa bem ao ânion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), ou às espécies Ti-OH e CaO. O alto valor de FWHM dos respectivos picos indica que é possível a existência de outras espécies contendo oxigênio, conforme discutido na literatura, pois de acordo com as observações dos autores, o processo de oxidação anódica pode causar a fixação de radicais de oxigênio na superfície durante a formação do plasma (ABBASI *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2010).

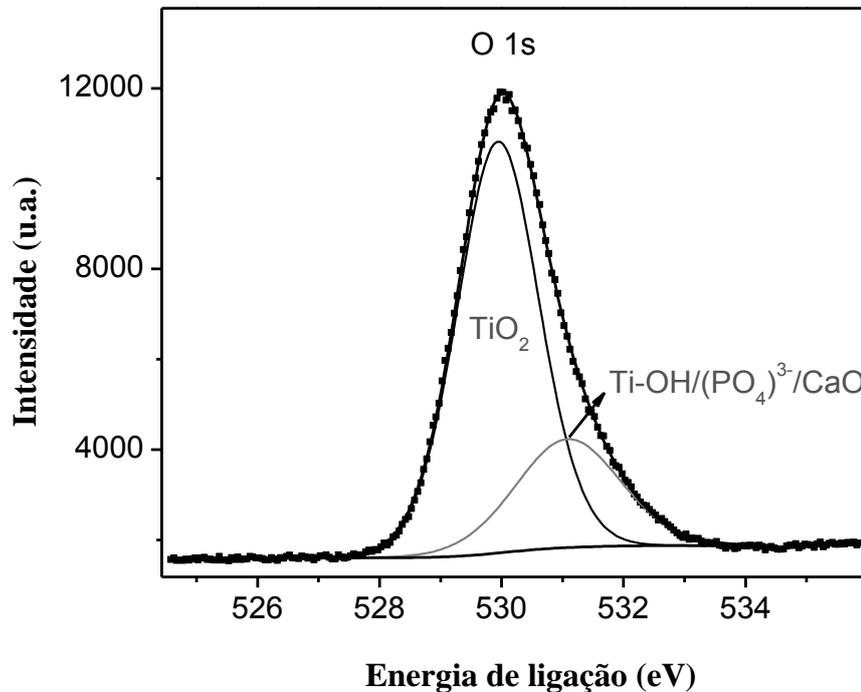


Figura 5.14- Picos de energias de ligação de XPS do Oxigênio (O1s) no recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf.

O pico medido para o fósforo P 2p, apresentado na figura 5.15, é centrado a 133,2 eV e corresponde a um conteúdo atômico de 2,0%. Este valor de energia de ligação indica que os átomos de fósforo formam íons fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (TSUTSUMI *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2004). A largura do pico P 2p, com FWHM de 2,2 eV, é similar ao resultado obtido por Screckenbach e cols. e por Horowitz & Parr. Tais autores sugerem que as altas temperaturas do processo de oxidação anódica a microarco podem induzir o aumento na condensação de fosfatos levando à formação de grupos fosfatos e pirofosfatos (SCHRECKENBACH *et al.*, 1999; HOROWITZ & PARR, 1994). De acordo com Marino e cols., o dubleto P 2p muda após o

bombardamento com íons argônio, além disso, os átomos de fósforo começam a contribuir em energias de ligação inferiores ( $\sim 128,5$  eV) devido à formação de fosfitos (ROGUSKA *et al.*, 2011; MARINO *et al.*, 2004). Porém, nenhum pico correspondente a energia de ligação do fósforo nos complexos fosfitos foi observado no presente estudo.

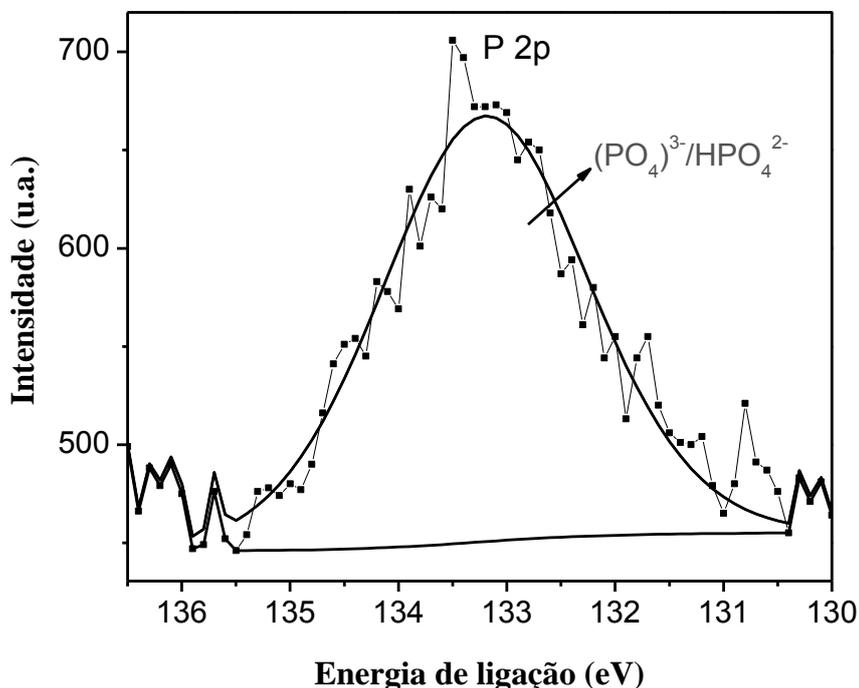


Figura 5.15- Picos de energias de ligação de XPS do Fósforo (P2p) no recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf.

A presença de Ca e P tem sido reportada como vantajosa para o crescimento celular (MAXIAN *et al.*, 1994). Os dados de XPS inequivocamente mostram a formação de fosfato de cálcio no recobrimento produzido. Infelizmente a baixa quantidade e o estado não cristalino do fosfato de cálcio não permitiu sua identificação pela técnica de DRX, estando fora do limite de detecção da técnica. Entretanto, o mapa elementar de MET forneceu evidência para esta conclusão (figura 5.6). As regiões amorfas do recobrimento, confirmadas por difração de elétrons, são ricas em átomos de cálcio (razão Ca/Ti por EDS = 0,26 %), enquanto quase não há presença de cálcio nas regiões cristalinas do recobrimento (razão Ca/Ti por EDS = 0,03 %), conforme apresentado na figura 5.5 (b).

A distribuição das concentrações atômicas (at%) dos elementos que compõem o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos é apresentada na figura 5.16. A análise química elementar por XPS foi realizada antes e após 5, 20 e 40 minutos de bombardeamento.

Observa-se uma grande variação na concentração dos elementos nos primeiros 20 minutos de desbaste e, a partir de então, a concentração manteve-se relativamente estável até 40 minutos de bombardeamento. A maior alteração na concentração em função do tempo de bombardeamento foi observada para o carbono (de ~ 49 at% para 1 at%), o que pode ser atribuído a uma forte dessorção deste elemento pelos poros adjacentes à superfície do recobrimento de TiO<sub>2</sub>.

A remoção dos átomos de carbono da superfície pelo bombardeamento com Ar<sup>+</sup> resulta num aumento do conteúdo relativo de todos os outros elementos nas camadas mais profundas do recobrimento. O percentual atômico de oxigênio estabilizou-se em ~ 67 at% após 40 minutos de bombardeamento, enquanto a porcentagem global do titânio chegou a ~ 26 at%. Para o elemento fósforo, a porcentagem atômica estabilizou-se em 5 at%. A proporção da composição elementar mantém-se constante para os próximos tempos de bombardeamento (profundidades).

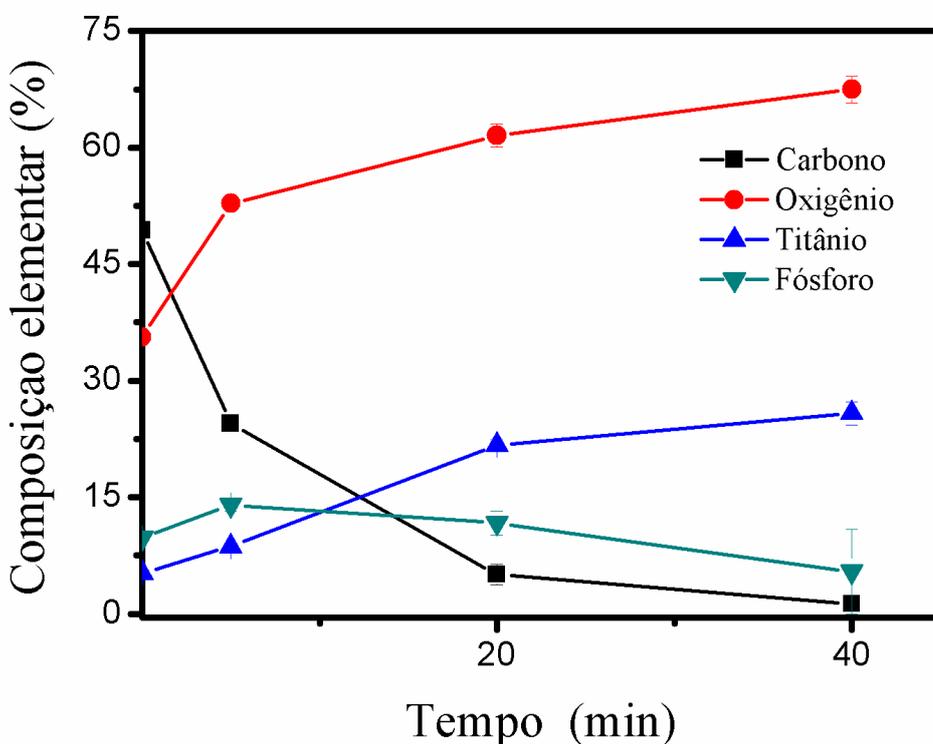


Figura 5.16- Concentração atômica dos elementos (at%) em função do tempo de bombardeamento com íons Ar<sup>+</sup> para o recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos.

O pico observado no espectro de XPS em alta resolução, figura 5.17 (a), com energia de ligação em 458,6 eV corresponde ao elemento titânio (Ti 2p<sub>3/2</sub>), e está relacionada ao composto TiO<sub>2</sub>. Da mesma forma, o pico do oxigênio O 1s com energia

de ligação 530,1 eV, figura 5.17 (b), também é associado ao titânio no composto  $\text{TiO}_2$ . O pico em alta resolução do fósforo (P 2p), figura 5.17 (c), apresenta energia de ligação em 133,4 eV, compatível com o componente fosfato:  $\text{PO}_4^{3-}$  (133,4 eV).

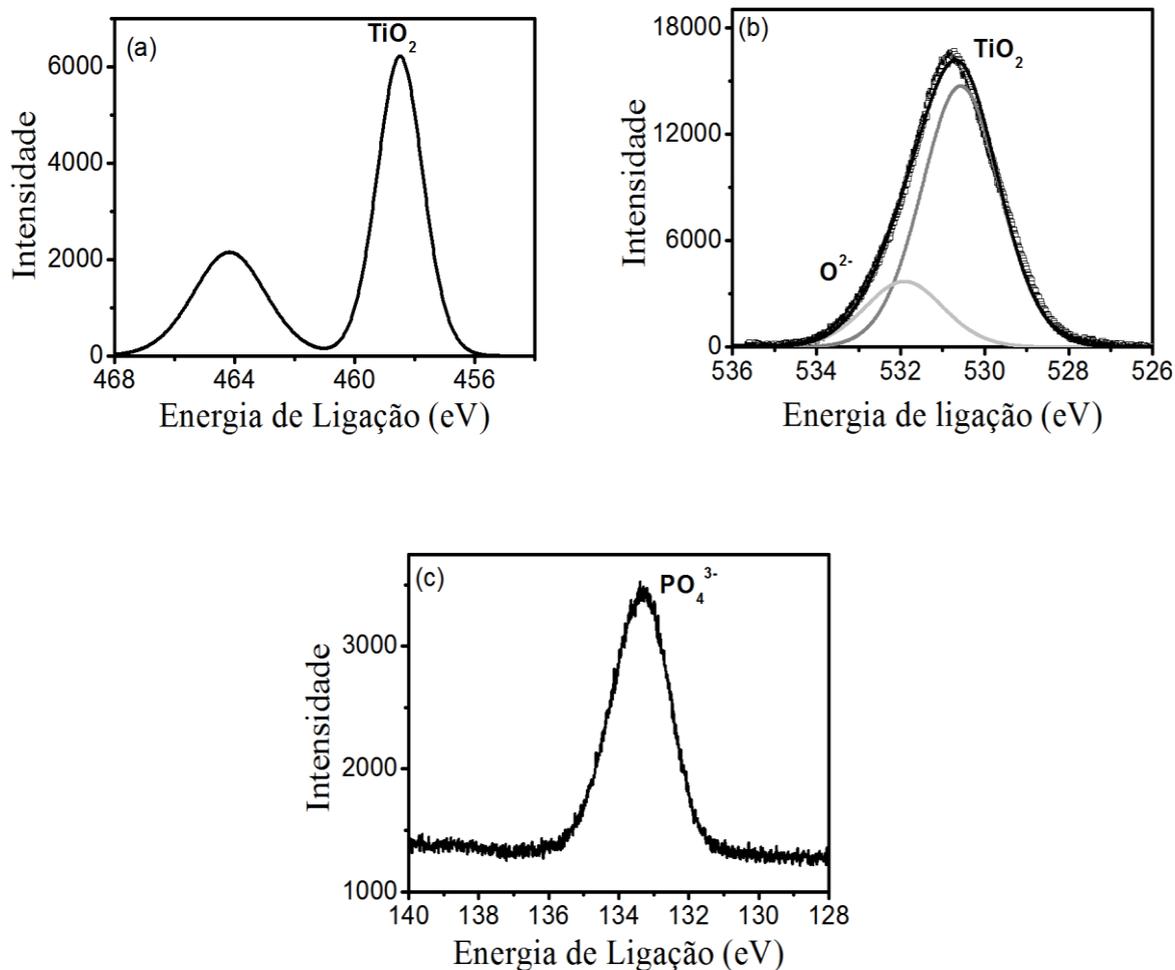


Figura 5.17- Espectros de XPS em alta resolução do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos: (a) titânio (Ti 2p), (b) oxigênio (O 1s) e (c) fósforo (P 2p).

#### *Molhabilidade:*

As medidas de ângulo de contato da água destilada, diiodometano e etilenoglicol com a superfície de Ti puro resultaram nas médias  $(56,6 \pm 1,4)^\circ$ ;  $(55,7 \pm 0,6)^\circ$  e  $(48,6 \pm 1,5)^\circ$ , respectivamente, conforme ilustrado no gráfico da figura 5.18. A superfície do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf resultaram nas médias  $(71,7 \pm 6,7)^\circ$ ,  $(61,9 \pm 5,9)^\circ$  e  $(57,0 \pm 8,7)^\circ$ . A superfície do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos apresentou,

para os mesmos solventes, as médias  $(83,9 \pm 7)^\circ$ ,  $(63,8 \pm 7,1)^\circ$  e  $(68,3 \pm 5,3)^\circ$ , respectivamente. Uma vez que em todos os líquidos avaliados produziram valores de ângulo de contato abaixo de  $90^\circ$ , pode-se concluir que tanto a superfície de Ti puro quanto as dos recobrimentos produzidos são hidrofílicas (FÖRCH & SCHÖNHERR, 2009).

Ao compararmos as medidas de ângulo de contato das superfícies dos recobrimentos com a superfície de Ti puro, ou seja, lixadas e polidas com SiC em granulometrias de 180, 400, 600 e 1200 respectivamente, percebemos que as medidas de ângulo de contato para o Ti puro são menores que para a superfície tratada (figura 5.18). Uma das teorias que explicam o comportamento dos líquidos no Ti puro é o fato de que na superfície polida o líquido se espalha com mais facilidade, ao passo que na superfície tratada o molhamento demora mais para acontecer, sendo diretamente dependente do tempo de análise da gota. Em outras palavras, na superfície Ti puro o molhamento ocorre mais rápido, sendo que para o mesmo tempo de análise, o molhamento ocorre mais lentamente para a superfície anodizada, levando a um ângulo de contato, que o tempo estipulado foi de 150s. Este fato pode ser ilustrado observando a figura 5.19, onde na superfície anodizada utilizando água destilada, após 900s, a superfície apresenta-se completamente molhada e a gota cessou. Na verdade, não ocorre espalhamento da gota na superfície anodizada, mas sim absorção da gota (líquido) pelos poros da superfície, ocorrendo de forma mais lenta do que o espalhamento da gota na superfície não anodizada.

A molhabilidade da superfície do biomaterial é mencionada como um dos principais fatores relacionados ao sucesso da osseointegração. O comportamento celular frente à superfície do biomaterial depende das interações célula-implante, que estão diretamente correlacionadas com as propriedades da superfície. A hidrofiliabilidade da superfície, rugosidade, composição química e morfologia afetam fortemente a resposta celular quando em contato com o biomaterial do implante. Além disso, a rugosidade pode favorecer o espalhamento de proteínas e a adesão celular na superfície do biomaterial (ZHU *et al.*, 2004).

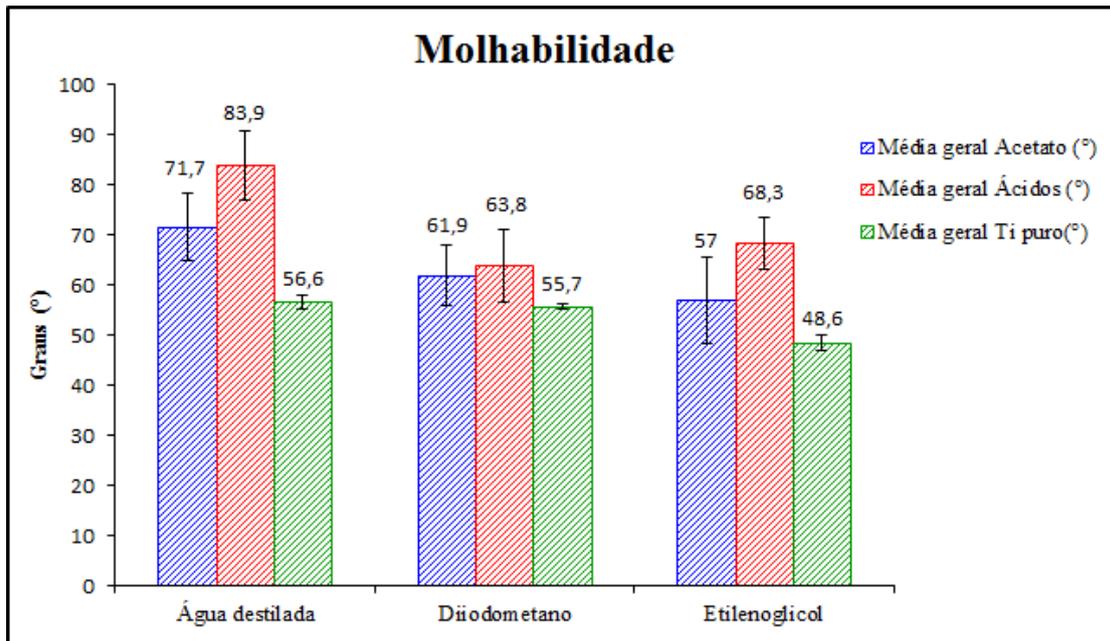


Figura 5.18- Comparação da molhabilidade das superfícies de Ti puro polido e os recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos.



Figura 5.19- Evolução do molhamento na superfície anodizada com gota de água destilada (900s).

#### *Ensaio de Riscamento ou “Scratch test”:*

A caracterização da aderência do recobrimento é importante para avaliar falhas como: delaminação, deformações plásticas e presença de fissuras no recobrimento ou no substrato. Este é um parâmetro importante visto que durante sua instalação, na clínica, o implante é submetido a mecanismos de desgaste por forças de cisalhamento. Não obstante, o destacamento do recobrimento com a geração de resíduos são altamente indesejáveis pois os fragmentos podem causar reações adversas levando à necessidade de substituição do implante (KORKUSUZ, 2004).

Na figura 5.20 são apresentados os locais onde foi realizado o ensaio de riscamento nos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf e do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. As setas indicam os locais onde foi observado o primeiro destacamento em cada trilha e o retângulo preto na parte superior de cada figura representa o percurso da trilha. Pode-se observar que a partir de uma determinada carga crítica ( $Lc1$ ) o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf apresentou descontinuidade no destacamento até o final do percurso da trilha em todas as repetições. Neste recobrimento, os valores médios das posições onde ocorreu o primeiro destacamento ( $Lc1$ ) nas trilhas foi de  $429,4 \pm 157,7$   $\mu\text{m}$  e das forças necessárias para ocorrer o destacamento foi de  $104,6 \pm 19,9$  mN.

No caso do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos os valores médios das posições onde ocorreu o primeiro destacamento ( $Lc1$ ) nas trilhas foi de  $1807,5 \pm 361,2$   $\mu\text{m}$  e das forças necessárias para ocorrer este destacamento foi de  $278,6 \pm 45,6$  mN. Uma vez que não tenham sido observadas diferenças significativas entre os valores de rugosidade e espessura dos recobrimentos produzidos (tabela 5.1), a grande diferença no desempenho mecânico pode estar relacionada à presença de vários vazios interconectados (figura 5.2), que podem fragilizar o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf. Além disso, a maior resistência do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos poderia ser explicada por sua nanoestrutura. Conforme apresentado por Gamboa & Pasquevich, a fase anatásio somente alcança estabilidade estrutural quando o tamanho das partículas se torna inferior a 14 nm (GAMBOA & PASQUEVICH, 2009).

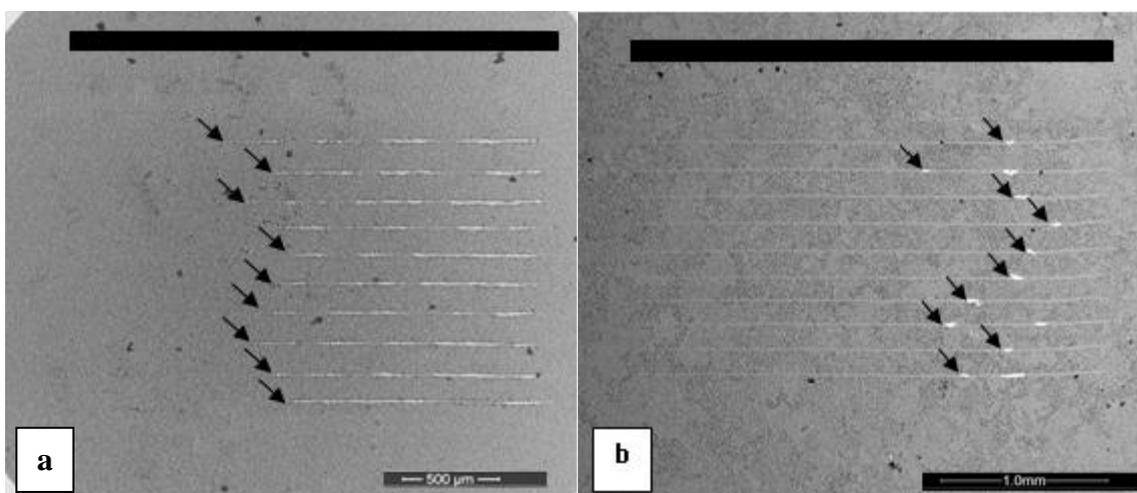


Figura 5.20- Micrografia por MEV das trilhas após ensaio de riscamento no recobrimento: (a) do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf e (b) do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. As setas indicam a posição onde o destacamento do recobrimento foi iniciado. Retângulo preto na parte superior da figura representa o percurso da trilha.

Na figura 5.21 são apresentadas micrografias com maior ampliação das regiões de destacamento dos recobrimentos. Nas figuras 4.21 (a) e (c) são identificados a trilha, o recobrimento de  $\text{TiO}_2$  e o substrato. Na figura 5.21 (b) e (d), são apresentadas uma porção das trilhas com aumento de 2500x.

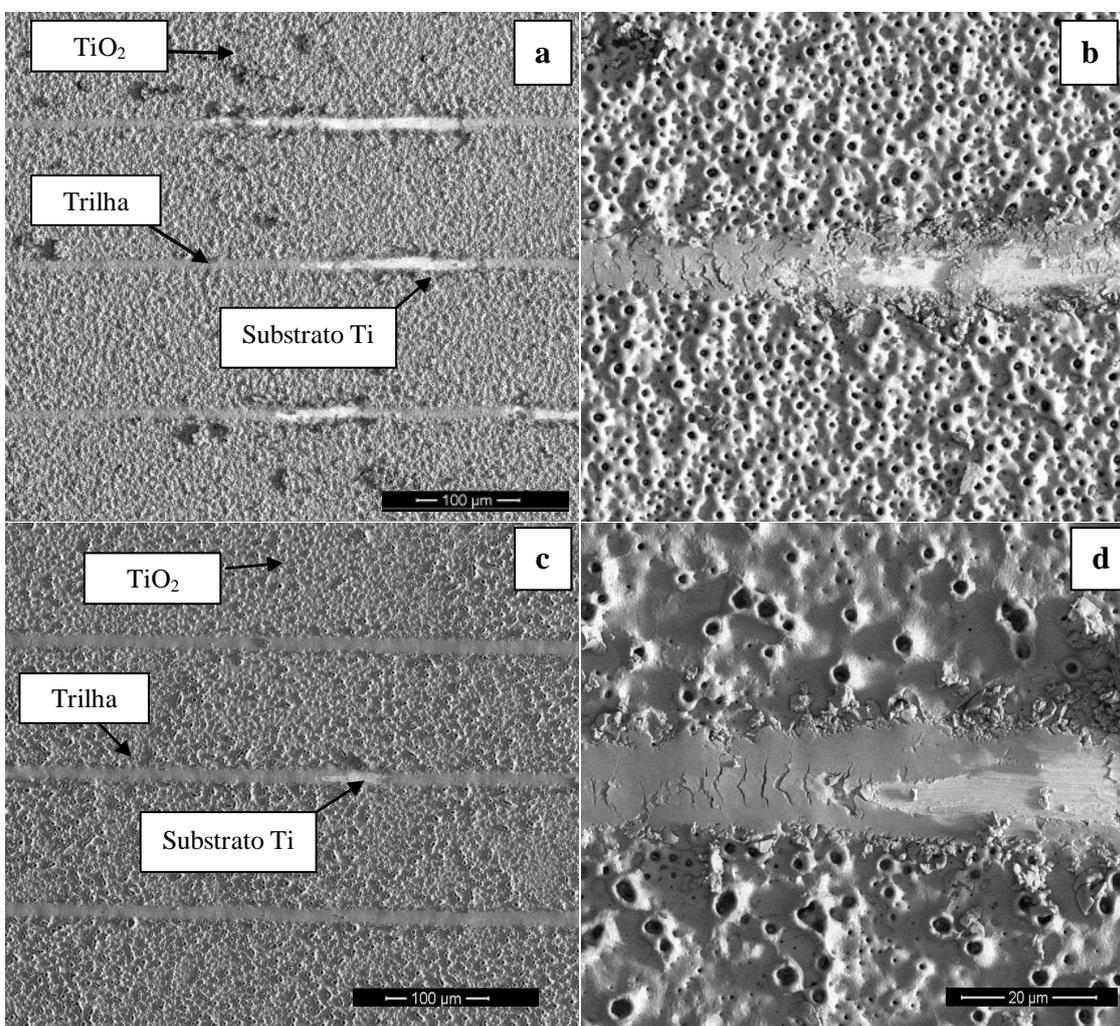


Figura 5.21- Micrografias por MEV por elétrons retroespalhados das trilhas após ensaio de riscamento nos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf (superior) e do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (inferior): (a, c) região de início de destacamento do recobrimento; (b, d) ampliação de 2500x.

A partir dos resultados apresentados, o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos foi selecionado para avaliação *in vivo*. A descrição dos resultados obtidos será feita na sessão 5.3. Antes disso, serão apresentados os resultados da caracterização dos recobrimentos com íons zinco incorporados.

### 5.1.1- Recobrimentos de TiO<sub>2</sub> Ácidos contendo zinco incorporado

É bem estabelecido, inclusive estudos *in vitro* comprovam que o zinco é um elemento essencial às funções biológicas e que tem como objetivo promover a adesão, proliferação e diferenciação de células osteobásticas, além de inibir atividade osteoclástica (HADLEY *et al.*, 2010). Além disso, o zinco possui diversas atividades e funções biológicas, como atuar na síntese de DNA, participar em atividades enzimáticas, participar no metabolismo de ácido nucleico, atuar na biomineralização, atuar como cofator da fosfatase alcalina (importante enzima na mineralização óssea), favorecer a densidade óssea, prevenir a perda óssea, auxiliar na atividade hormonal, além de possuir excelentes qualidades antibacterianas (HU *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2010; TANG, *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2009).

Nesta etapa foram utilizados os mesmos reagentes empregados na produção dos recobrimentos do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (tabela 4.1), porém com incorporação de nitrato de zinco em duas concentrações diferentes: 0,04M e 0,1M. Com a incorporação do sal de zinco ao eletrólito foi necessário proceder alguns ajustes nos parâmetros de deposição para obtenção de superfícies homogêneas. Para facilitar a identificação os recobrimentos foram denominados grupo TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e grupo TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco.

#### *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Corte transversal (FIB):*

A figura 5.22 mostra as micrografias por MEV dos recobrimentos dos grupos TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco (a) e TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco (b). Nos dois recobrimentos observa-se a presença de grande inúmeros poros arredondados e interconectados, com tamanhos de poros (a partir da parede interna) de  $2,0 \pm 0,7 \mu\text{m}$  para o grupo TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco, e de  $2,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$  para o grupo TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco. Ressalta-se, entretanto que a superfície não apresenta trincas aparentes. É possível constatar que a morfologia dos poros do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (figuras 5.1 c, d) modificou de forma significativa com a adição de zinco ao eletrólito.

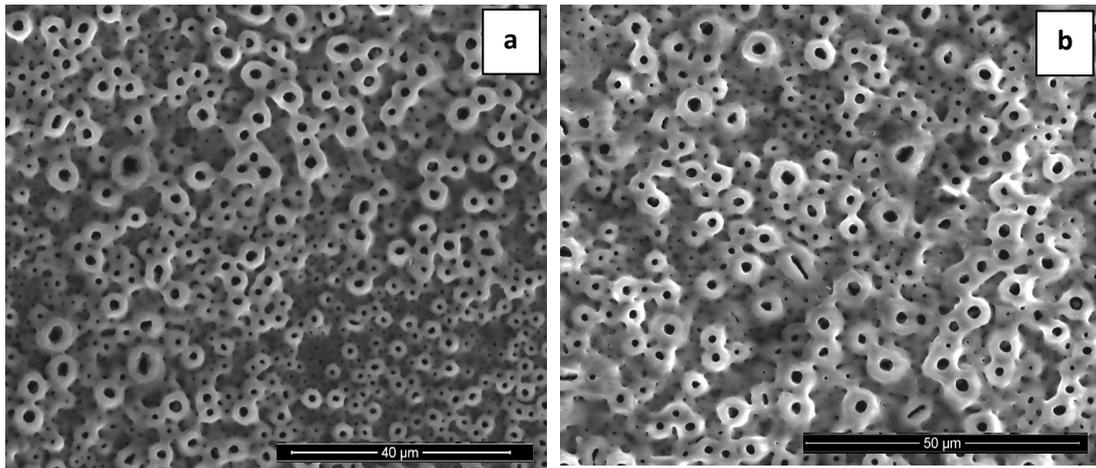


Figura 5.22- Micrografias por MEV da topografia dos recobrimentos (a)  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e (b)  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco com aumento de 3000x.

A figura 5.23 apresenta as micrografias dos cortes transversais dos recobrimentos preparados por FIB (*Focused Ion Beam*\_ feixe de íons focalizado). As superfícies dos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco (figura 5.23 a) e do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco (figura 5.23 b) revelam-se aparentemente densas, sem vazios próximos à interface substrato-recobrimento.

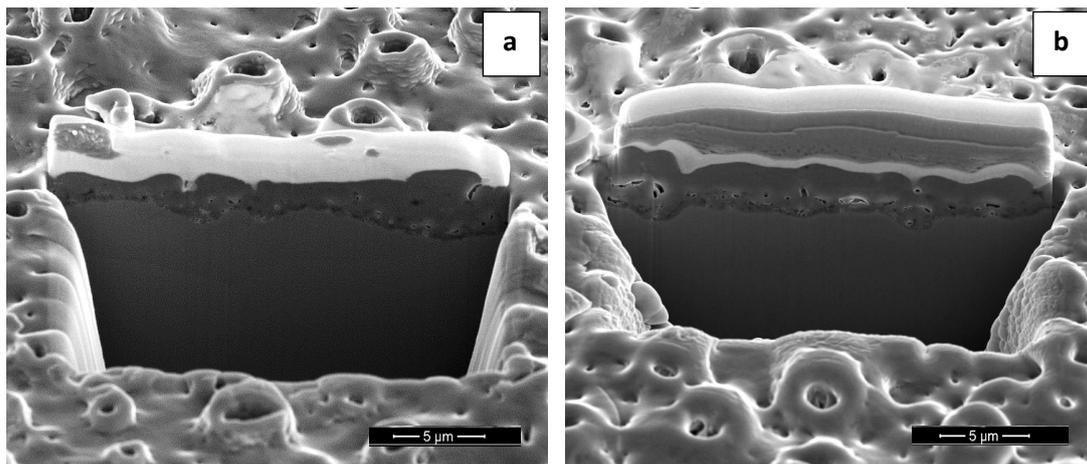


Figura 5.23- Micrografias por MEV do corte transversal dos recobrimentos preparados por FIB: (a) grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e (b) grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco.

#### *Rugosidade e Espessura:*

A tabela 5.3 apresenta as médias dos resultados obtidos de rugosidade e espessura para os recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco. O aumento na concentração de nitrato de zinco não gerou diferença significativa na rugosidade dos recobrimentos. Por outro lado, observa-se que o aumento na

concentração de zinco proporcionou um aumento de duas vezes a espessura do recobrimento. Conforme apresentado na tabela 5.1 os recobrimentos do grupo e  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco possuem espessura semelhante do recobrimento sem eletrólito.

Tabela 5.3- Média dos valores de rugosidade e espessura nos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco.

Eletrólito	Rugosidade ( $\mu\text{m}$ )		Espessura ( $\mu\text{m}$ )	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
$\text{TiO}_2$ 0,04M Zinco	0,60	0,07	1,8	0,3
$\text{TiO}_2$ 0,1M Zinco	0,63	0,09	3,9	0,8

#### *Difração de Raios X (DRX):*

A figura 5.24 apresenta os padrões de difração de raios X dos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco (vermelho), do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco (azul) e do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (preto). Além da fase cristalina anatásio, verifica-se a presença de fase amorfa nos recobrimentos. Não foi identificada nenhuma outra fase cristalina. Com o aumento da concentração de zinco, ocorre uma diminuição na intensidade dos picos do anatásio, quando comparado com o difratograma do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos.

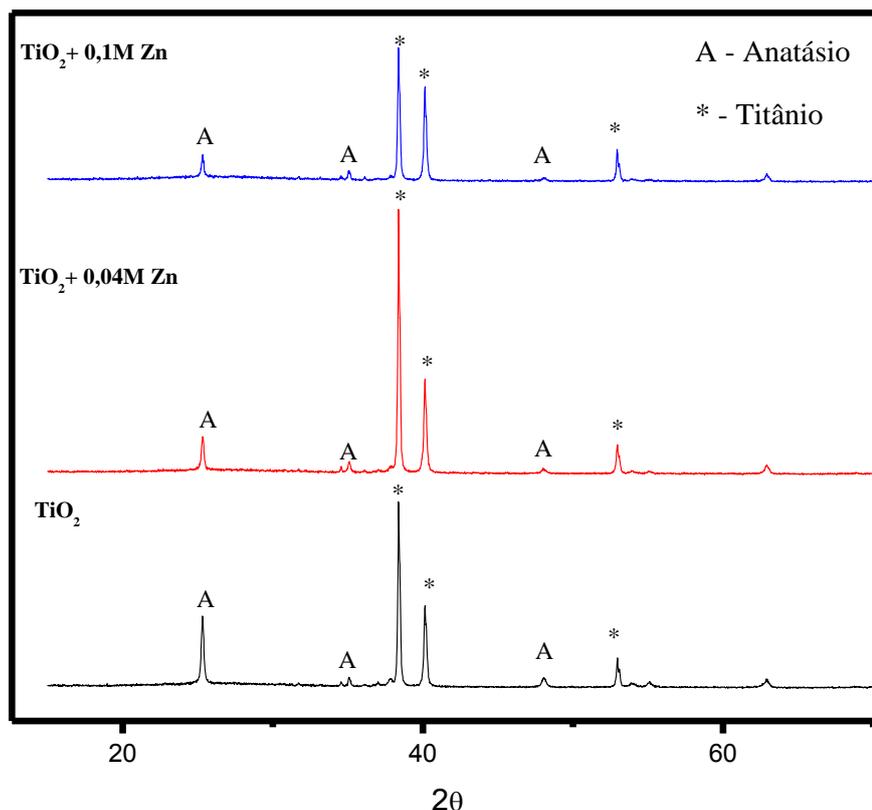


Figura 5.24- Padrões de difração de raios X dos recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco (vermelho), grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco (azul) e grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (preto).

#### *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):*

A baixa concentração de zinco nos recobrimentos produzidos no grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco impossibilitou sua detecção por EDS. Uma vez que a morfologia dos recobrimentos contendo diferentes concentrações de zinco foi muito similar, serão apresentados apenas os resultados de MET do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco.

A micrografia de MET no modo STEM na figura 5.25 evidencia microestrutura do recobrimento de  $\text{TiO}_2$  é composta por fase cristalina (2) e fase amorfa (1). A figura 5.26 mostra os espectros de EDS obtidos nas regiões cristalina e amorfa marcadas pelos quadrados vermelhos na figura 5.25. Observa-se que a razão P/Ti é maior na fase amorfa ( $\sim 0,26$ ) que na fase cristalina ( $\sim 0,12$ ) indicando que o fósforo tende a se concentrar mais predominantemente na fase amorfa que na fase cristalina, igualmente observado no grupo  $\text{TiO}_2$  Acetato + Bgf e no grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos. Não é possível estabelecer uma diferenciação de predominância do elemento zinco nas fases amorfa e cristalina, pois a razão Zn/Ti em ambas as fases é muito baixa ( $\sim 0,02$  e  $\sim 0,03$

respectivamente). Isto possivelmente é devido à baixa concentração de íons Zn no eletrólito.

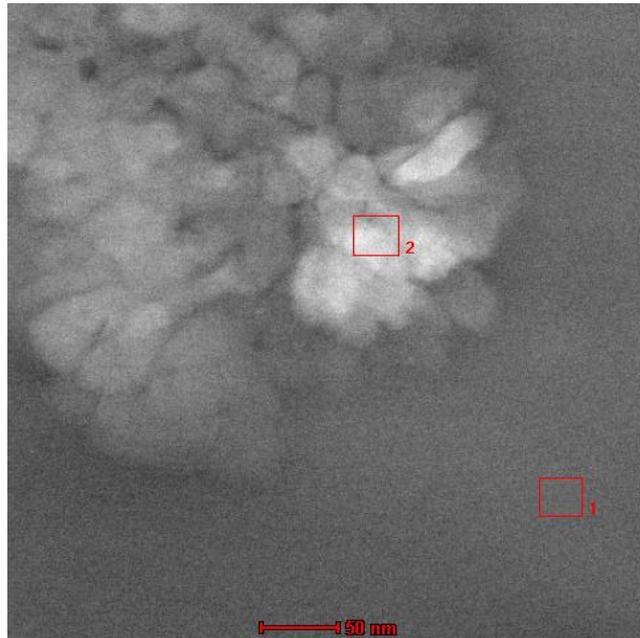


Figura 5.25- Micrografia de MET do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2,0,1\text{M}$  Zinco: (1) fase amorfa e (2) fase cristalina.

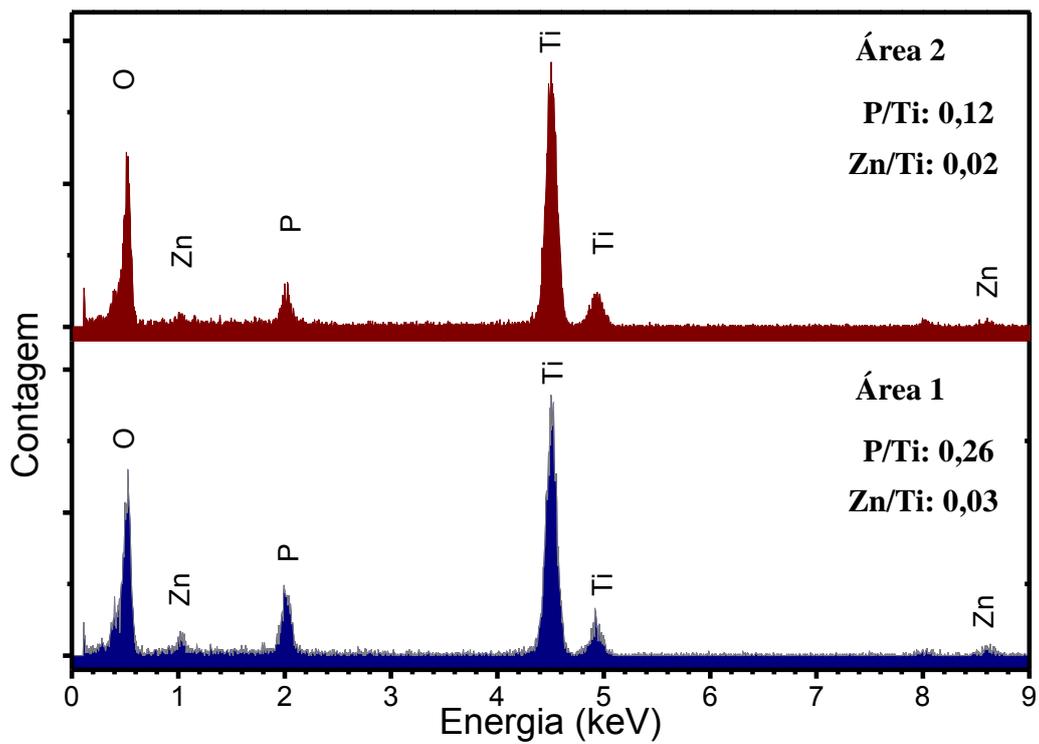


Figura 5.26- Espectros de EDS das fases amorfa e cristalina do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2,0,1\text{M}$  Zinco.

A figura 5.27 apresenta a micrografia (a) HAADF (MET) e os mapas elementares do (b) oxigênio, (c) fósforo, (d) titânio e (e) zinco no recobrimento de  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco. Observa-se que o oxigênio (b) concentra-se basicamente nas mesmas regiões em que o titânio (d). Já o fósforo (c) apresenta-se mais concentrado na região amorfa confirmando o resultado de EDS da figura 5.26. O titânio (d) apresenta-se distribuído por toda a superfície do recobrimento, porém com uma leve predominância pela região cristalina. É possível que o aumento de intensidade nesta região do recobrimento esteja relacionado com uma maior espessura do corte devido algum ajuste durante o preparo da amostra para a realização da análise por MET. O zinco (e) apresenta levemente predominância na região amorfa.

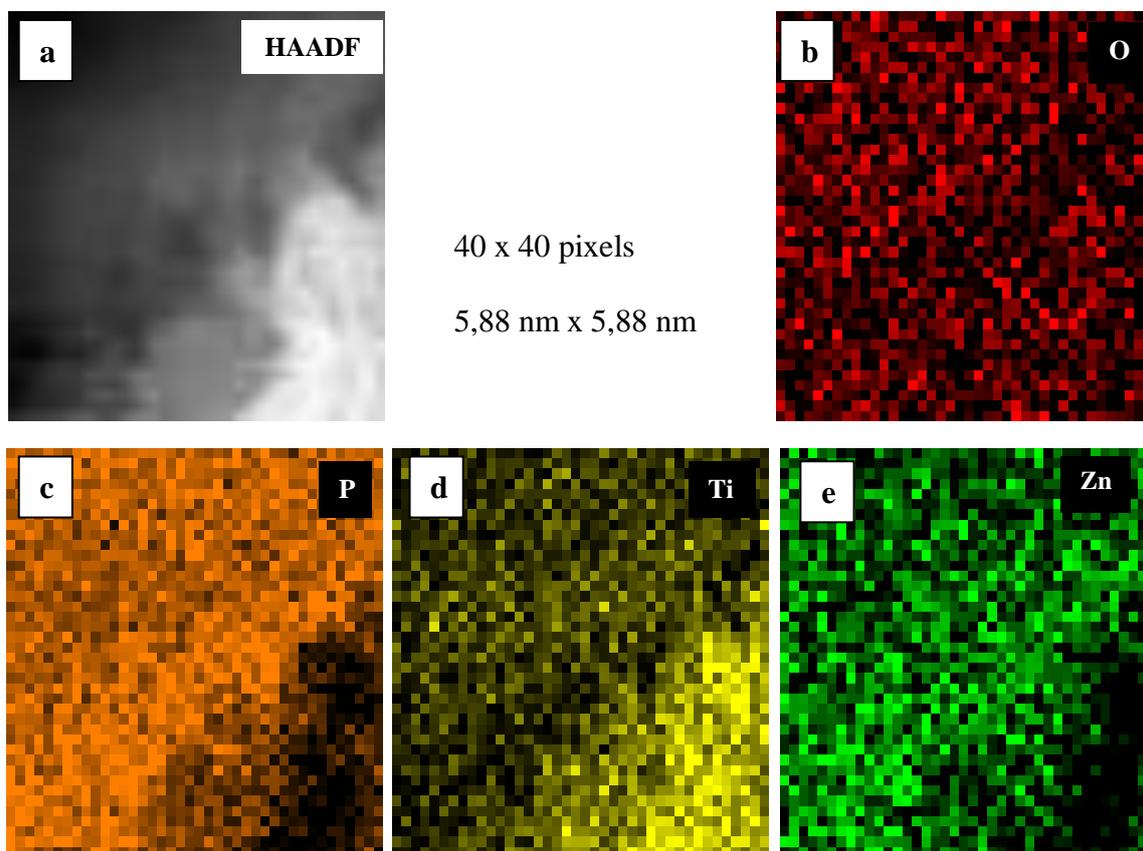


Figura 5.27- (a) Micrografia de MET (HAADF) do corte transversal do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco; Mapas elementares individuais: (b) Oxigênio; (c) Fósforo; (d) Titânio e (e) Zinco.

### *Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS):*

Os diagramas da distribuição dos principais elementos que compõem os recobrimentos, em termos das respectivas concentrações atômicas (at%), em função do tempo de bombardeamento com íons  $\text{Ar}^+$  (min) do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco é apresentada na figura 5.28. A análise química elementar por XPS foi realizada antes e após 0, 5, 20 e 40 minutos de bombardeamento. Para o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco, figura 5.28 (a), observa-se que ocorreu variação na concentração dos elementos no recobrimento nos primeiros 05 minutos de desbaste e, a partir de então, a concentração dos elementos manteve-se relativamente estável até 40 minutos de bombardeamento. Para o recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco, figura 5.28 (b), ocorreu variação na concentração dos elementos no recobrimento nos primeiros 05 minutos, igualmente à superfície do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco.

No recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco, para o elemento carbono houve uma alteração na concentração em função do tempo de bombardeamento (de ~ 32 at% para 19 at%), o que pode ser atribuído a uma forte dessorção deste elemento pelos poros adjacentes à superfície do recobrimento de  $\text{TiO}_2$ . O percentual atômico de oxigênio estabilizou-se em ~ 54 at% após 40 minutos de bombardeamento, enquanto a porcentagem global do titânio chegou a ~ 19 at%. Para o elemento fósforo, a porcentagem atômica estabilizou-se em ~ 7 at% e para o elemento zinco, a porcentagem atômica estabilizou-se em ~ 0,2 at%, por ser um elemento com baixa concentração no eletrólito (apenas 0,04M de nitrato de zinco).

Maiores alterações foram observadas na superfície do recobrimento do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco. A maior alteração na concentração em função do tempo de bombardeamento foi observada para o carbono (de ~ 54 at% para 3 at%), o que pode ser atribuído a uma forte dessorção deste elemento pelos poros adjacentes à superfície do recobrimento de  $\text{TiO}_2$ . A remoção dos átomos de carbono da superfície pelo bombardeamento com  $\text{Ar}^+$  resulta num aumento do conteúdo relativo de todos os outros elementos nas camadas mais profundas do recobrimento. O percentual atômico de oxigênio estabilizou-se em ~ 49 at% após 40 minutos de bombardeamento, enquanto a porcentagem global do titânio chegou a ~ 37 at%. Para o elemento fósforo, a porcentagem atômica estabilizou-se em ~ 9 at%. Para o elemento zinco, a porcentagem atômica estabilizou-se em ~ 1 at%.

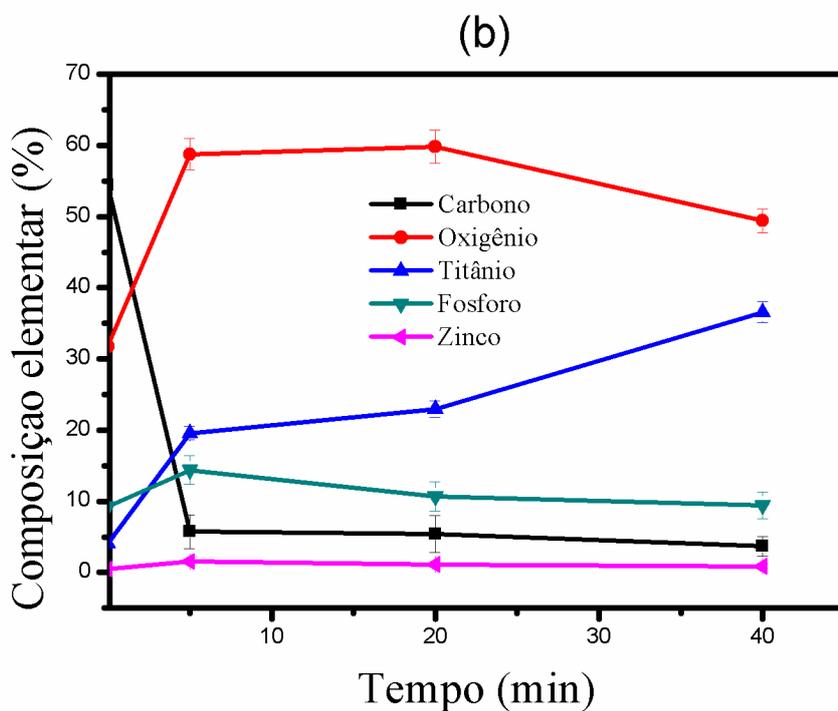
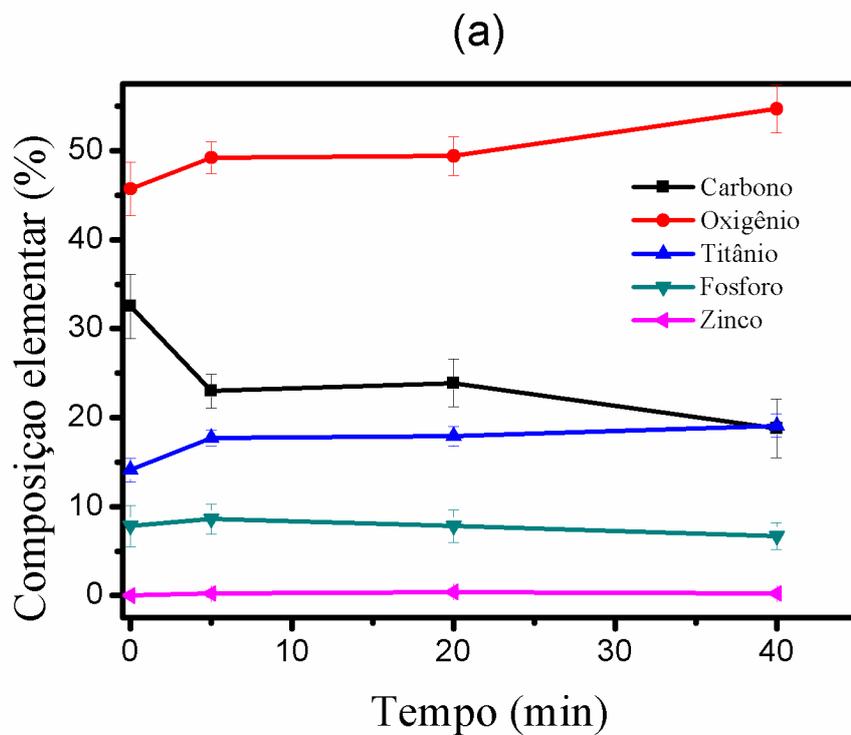


Figura 5.28- Concentração atômica dos elementos (at%) nos recobrimentos: (a) grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e (b) grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco em função do tempo de bombardeamento com íons  $\text{Ar}^+$ .

Uma vez que os perfis de alta resolução foram semelhantes para os recobrimentos dopados com zinco, exceto pela intensidade dos picos, aqui serão discorridos somente os resultados da superfície do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco. O pico no espectro de XPS em alta resolução em 458,5 eV, figura 5.29 (a), corresponde ao

elemento titânio (Ti 2p<sub>3/2</sub>) sendo que esta energia de ligação é referente ao composto TiO<sub>2</sub>. O pico do oxigênio O 1s, figura 5.29 (b), corresponde aos átomos de oxigênio associados ao titânio no composto TiO<sub>2</sub>. Pode-se atribuir este pico majoritariamente ao TiO<sub>2</sub> pela simetria e largura à meia altura (FWHM), tanto para o pico Ti 2p<sub>3/2</sub>, figura 5.29 (a), como para o pico O 1s em 530,1 eV, figura 5.29 (b). Porém o elemento oxigênio além da formação para a componente TiO<sub>2</sub>, também está ligado ao zinco formando o composto ZnO (óxido de zinco), com energia de ligação 530,9 eV e além disso colabora na formação do composto PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, com energia de ligação 531,1 eV. O pico em alta resolução do fósforo (P 2p), figura 5.29 (c), apresenta energia de ligação em 133,5 eV, compatível com o componente fosfato: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. O pico com energia de ligação em 1021,5 eV, figura 5.29 (d), corresponde ao elemento zinco (Zn 2p) e é característica do composto ZnO.

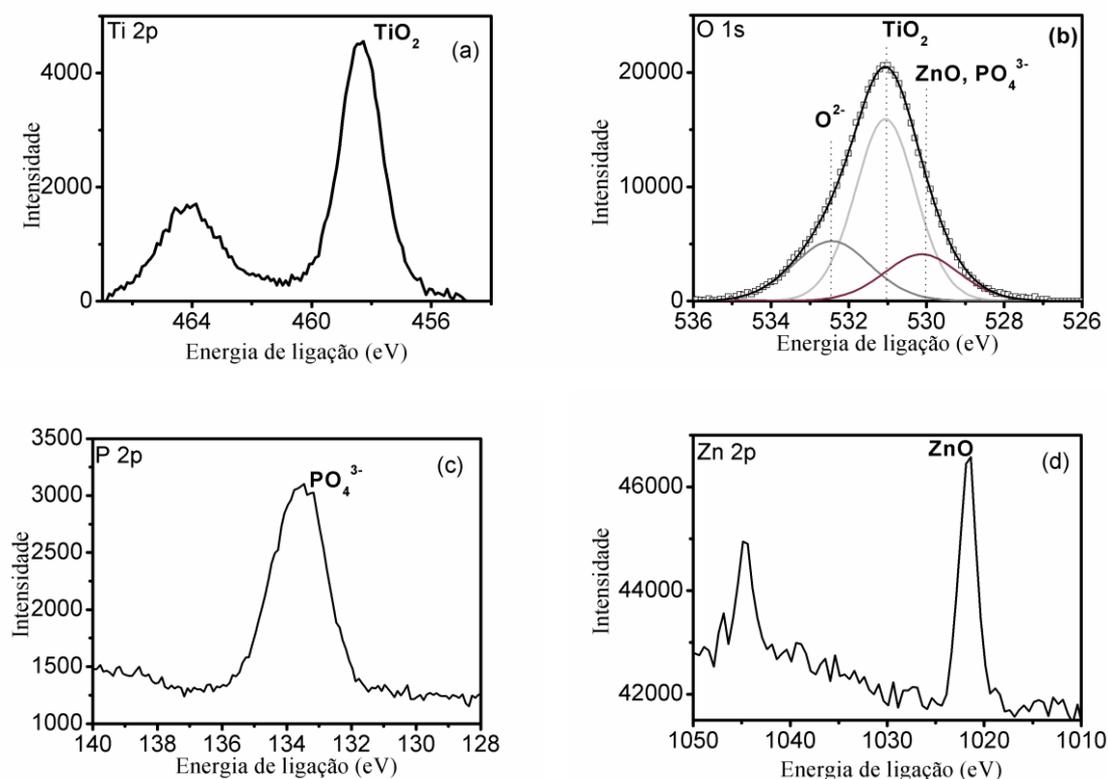


Figura 5.29- Picos de XPS em alta resolução para os elementos: (a) titânio (Ti 2p), (b) oxigênio (O 1s), (c) fósforo (P 2p) e (d) zinco (Zn 2p).

*Ensaio de Riscamento ou “Scratch test”:*

Na figura 5.30 são apresentadas as trilhas produzidas no ensaio de riscamento para os recobrimentos do grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco (a) e do grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco (b). As setas indicam os locais onde ocorreu o primeiro destacamento em cada trilha e o retângulo preto na parte superior de cada micrografia de MEV indica o percurso da trilha. Pode-se observar que a partir de uma determinada carga crítica ( $L_{c1}$ ) o recobrimento foi destacado, porém com carga crítica ( $L_{c1}$ ) maior, pois conforme há o deslocamento, a carga vai aumentando. Logo, conclui-se que tanto para (a) grupo  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco quanto para (b) grupo  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco houve uma resistência inicial ao destacamento, porém a partir de determinada  $L_{c1}$  o recobrimento começou a destacar, conforme os valores apresentados na tabela 5.4.

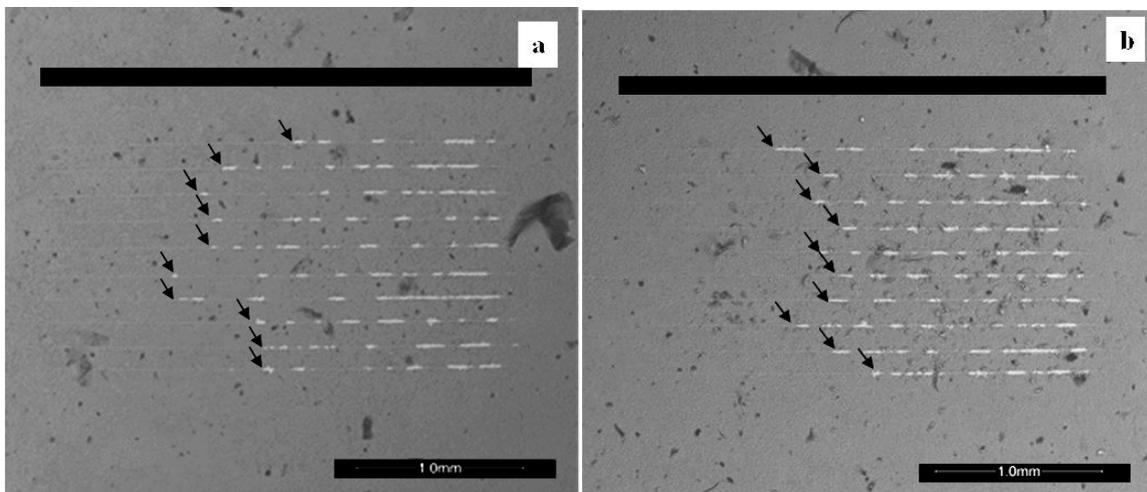


Figura 5.30- Ensaio de riscamento dos recobrimentos: (a)  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco e (b)  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco. As setas indicam o primeiro destacamento em cada trilha. Retângulo preto na parte superior da figura representa o percurso da trilha.

A tabela 5.4 apresenta os valores das médias das posições em que ocorreu o primeiro destacamento ( $L_{c1}$ ) nas trilhas e a média das forças necessárias para ocorrer este destacamento. A posição média da  $L_{c1}$  para o recobrimento  $\text{TiO}_2$  0,04M Zinco foi de  $1148,6 \pm 242,62 \mu\text{m}$  e a média de força necessária para que o primeiro destacamento ocorresse foi de  $190,0 \pm 44,2 \text{ mN}$ . Para o recobrimento  $\text{TiO}_2$  0,1M Zinco foi de  $1201,5 \pm 188,0 \mu\text{m}$  e a média de força necessária para que o primeiro destacamento ocorresse foi de  $201,4 \pm 23,8 \text{ mN}$ . Com esses resultados, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os recobrimentos dopados com zinco.

Tabela 5.4- Valores das médias e desvios padrões da posição e força do primeiro destacamento na trilha dos recobrimentos: (a) TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e (b) TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco.

Condições	Força (mN)	Posição (μm)
(a) 0,04 M	190,0 (± 44,2)	1148,6 (± 242,6)
(b) 0,1 M	201,4 (± 23,8)	1201,5 (± 188,0)

A figura 5.31 apresenta os gráficos com os valores de posição (1) e carga crítica Lc1 (2) para os grupos de recobrimentos desenvolvidos. Levando-se em consideração que os grupos TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco são alterações do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos, a adição do dopante zinco, não beneficiou mecanicamente o recobrimento. O eletrólito principal (grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos) obteve melhores resultados no ensaio de riscamento, podendo-se admitir que o componente zinco fragiliza o recobrimento de TiO<sub>2</sub>, pois seus resultados ficaram aquém dos resultados obtidos no recobrimento produzido com o eletrólito principal sem dopante.

Sugere-se com estes resultados que a possibilidade de destacamento do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos durante a inserção do implante ao osso no momento do torque de inserção torna-se menor quando comparada aos demais grupos. Por este motivo e pelos demais resultados que a superfície do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos foi a escolhida para a realização da avaliação *in vivo* em coelhos neste estudo.

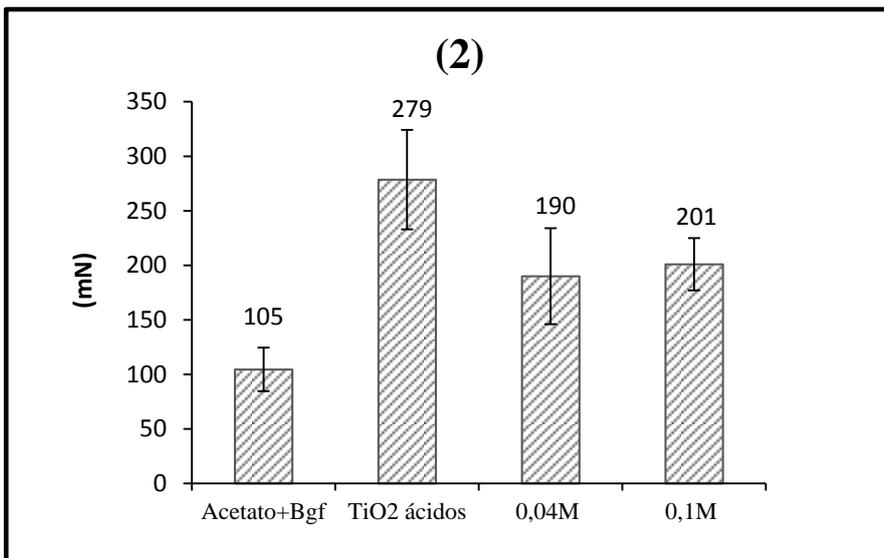
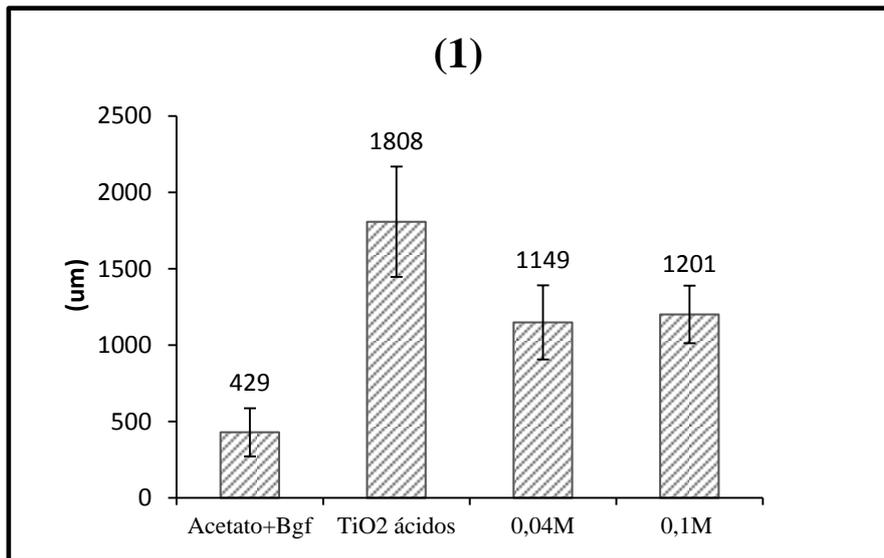


Figura 5.31 – Gráficos de (1) posição e (2) carga crítica dos conjuntos de amostras dos grupos: TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf; TiO<sub>2</sub> Ácidos; TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco e TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco.

Importante ressaltar que a espessura dos recobrimentos não é um fator determinante na resistência à aderência desses recobrimentos ao substrato, uma vez que seus valores foram próximos e seus comportamentos frente ao ensaio de riscamento foram muito diferentes. Além disso, o grupo TiO<sub>2</sub> 0,04M Zinco apresentou espessura inferior às demais e nem por este motivo obteve desempenho de resistência mecânica inferior.

## 5.2– Ensaio *In vitro* – Avaliação da Citotoxicidade

A figura 5.32 mostra uma comparação da viabilidade de células L929 expostas a diferentes concentrações do extrato do recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf, sendo a viabilidade determinada pela redução do XTT a azul de formazan (XTT) e também por captação de vermelho neutro (NRU). Em ambos os métodos a viabilidade do metabolismo celular foi superior a 70%, confirmando a citocompatibilidade do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf.

Neste trabalho a reprodutibilidade foi melhor alcançada, em termos de percentual da viabilidade do metabolismo celular pelo método de Vermelho Neutro (NRU), conforme os valores são observados na figura 5.32. Por este motivo os resultados de NRU serão apresentados e discutidos.

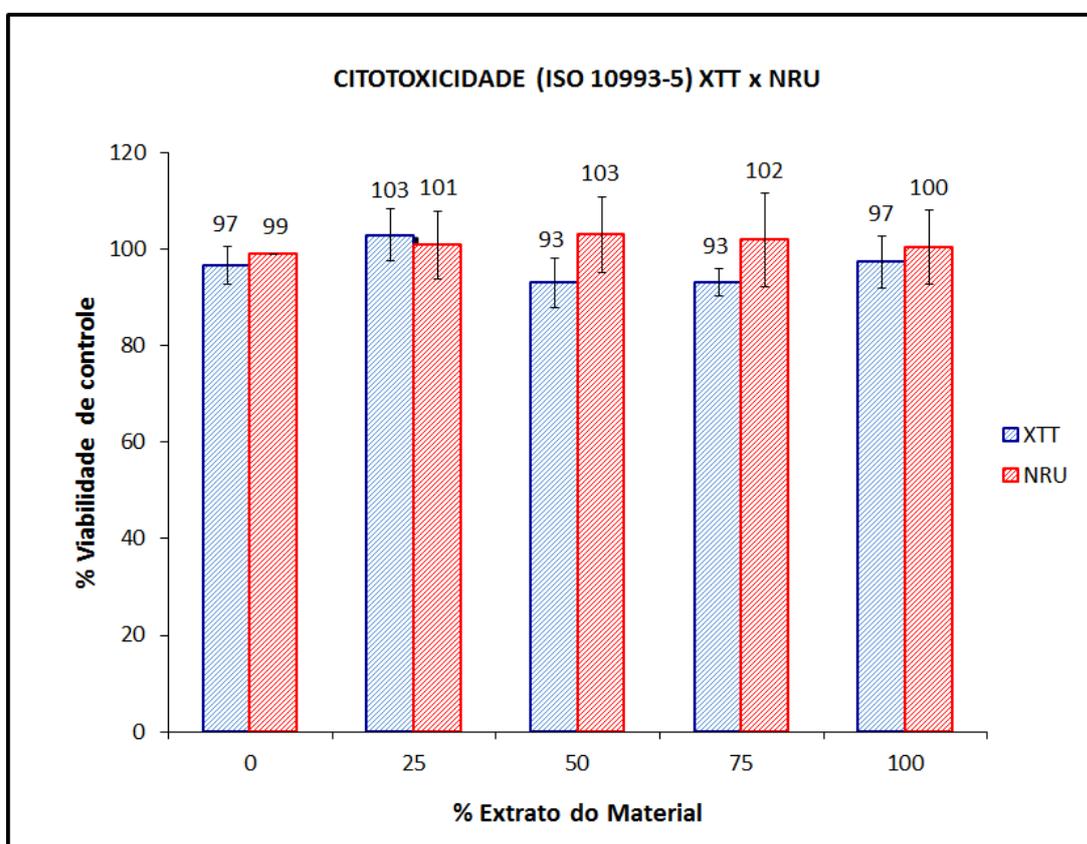


Figura 5.32- Comparação dos resultados dos métodos XTT e NRU para recobrimento do grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf.

A figura 5.33 apresenta o gráfico com os resultados de citotoxicidade pelo método NRU para todos os grupos desenvolvidos. O extrato puro dos materiais promoveu viabilidade celular ao redor de 100% similar ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). Através do método NRU foi obtida viabilidade celular superior a 70% para todos os grupos, inclusive o grupo Ti puro (controle), confirmando que as superfícies desenvolvidas são atóxicas.

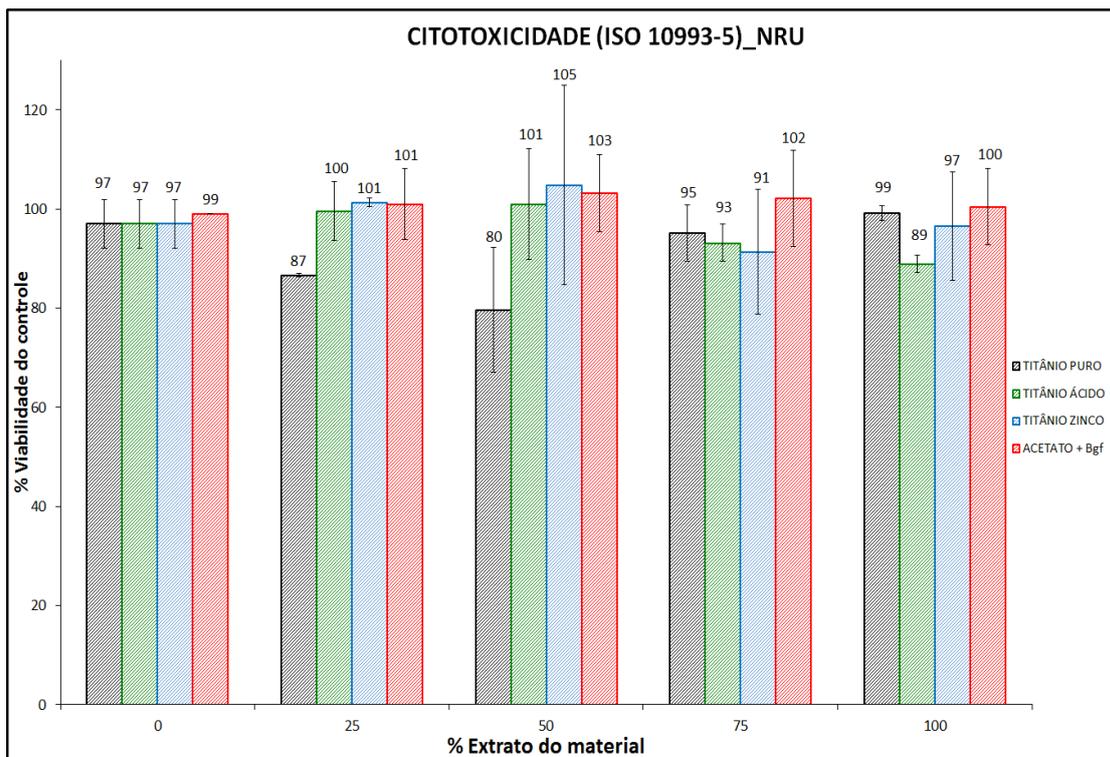


Figura 5.33- Comparação da citotoxicidade pelo método NRU para todos os grupos.

### 5.3– Avaliação *In vivo*

A figura 5.34 apresenta os blocos ósseos com os implantes inseridos (controle e teste). A partir do conjunto implante-osso são realizados os ensaios de torque de remoção e análise histomorfométrica.



Figura 5.34- Blocos ósseos.

#### - Ensaio de Torque de Remoção:

A figura 5.35 apresenta o gráfico com os valores médios de torque de remoção para o grupo controle  $10,5 (\pm 2,7)$  Ncm e para o grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos  $26,2 (\pm 5,1)$  Ncm. Observa-se que o grupo  $\text{TiO}_2$  Ácidos (teste/tratado) foi, em média, duas vezes e meia mais resistente à remoção que o grupo controle (usinado). Estes resultados sugerem que o tratamento superficial promoveu um maior embricamento mecânico entre o tecido ósseo e a superfície do implante podendo estar associado a uma melhor osseointegração. Resultados semelhantes foram obtidos por Carlsson e cols. que compararam a capacidade de resistência à remoção por dois tipos de superfícies de implantes: superfície lisa e superfície rugosa após 06 semanas de implantação em coelhos. Os implantes lisos alcançaram médias de torque de remoção da ordem de 17,2 Ncm, enquanto que os de superfície rugosa apresentaram médias de remoção de 26,4 Ncm (CARLSSON *et. al.*, 1988).

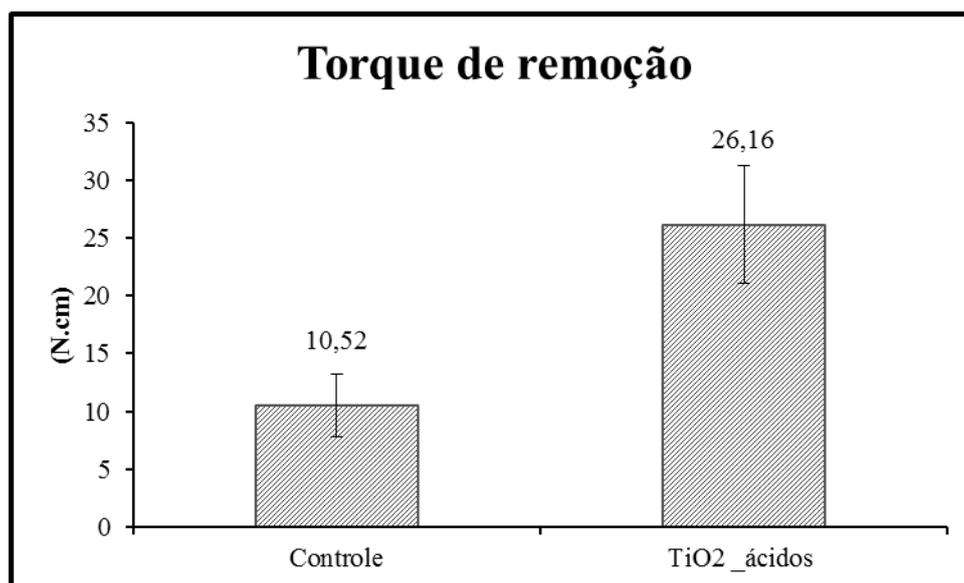


Figura 5.35- Torque de remoção (Ncm) para os grupos controle e teste (grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos).

Kang & Cho avaliaram o torque de remoção de implantes de titânio puro com tratamento a laser (teste) e implantes comerciais com superfície anodizada TiUnite<sup>®</sup> (controle), num período de implantação de 8 semanas. O resultado do torque de remoção para o grupo com tratamento a laser (teste) foi de  $48,59 \pm 8,07$  Ncm e para o grupo comercial TiUnite<sup>®</sup> (controle) foi de  $32,83 \pm 6,15$  Ncm . Considerando que as superfícies são parecidas com as produzidas nesta tese, os resultados não se apresentam discrepantes se levarmos em consideração seus desvios padrões e os diferentes tempos experimentais (KANG & CHO, 2011).

Nossos resultados foram compatíveis com os encontrados por Suzuki e cols., ao avaliar a biofixação de quatro tipos de superfícies de implantes ao tecido ósseo após 2 e 4 semanas de implantação. As superfícies analisadas foram: usinada; alumina/ataque ácido; alumina/ataque ácido com fosfato de cálcio; e spray de plasma de fosfato de cálcio. Os resultados de torque de remoção para 4 semanas foram: usinado  $17,44 (\pm 3,82)$  Ncm; alumina/ataque ácido  $23,09 (\pm 3,81)$  Ncm; alumina/ataque ácido com recobrimento cerâmico  $20,59 (\pm 3,81)$  Ncm e spray de plasma de fosfato de cálcio  $32,01 (\pm 4,22)$  Ncm (SUZUKI *et al.*, 2010).

**- Análise Histomorfométrica:**

Conforme apresentado na figura 5.36, a análise da área percentual de tecido ósseo (BIC) nos filetes de rosca dos implantes instalados na tíbia de coelhos demonstrou que o grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste/tratado) apresentou maior formação de novo osso ( $41,23 \pm 10,98 \%$ ) que o grupo controle (usinado) ( $29,05 \pm 9,86 \%$ ), utilizando teste t e  $p = 0,0148$ . Desta forma, assume-se que a taxa de osseointegração foi maior para o grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos.

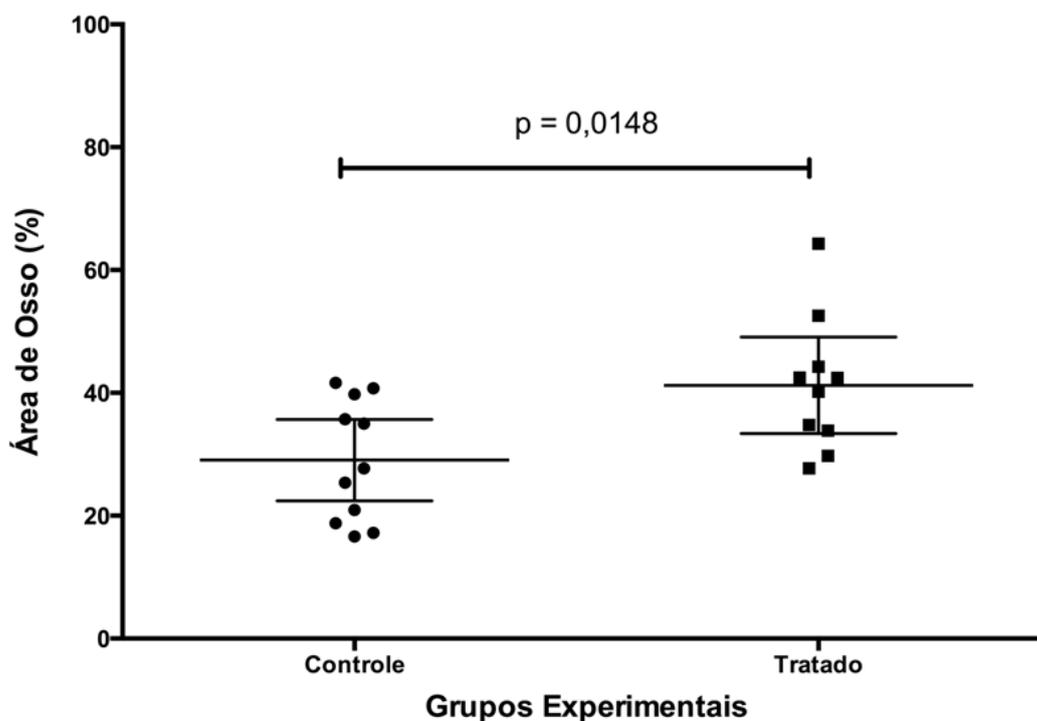


Figura 5.36- Análise histomorfométrica da área de tecido ósseo nos filetes de rosca dos implantes do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste/tratado) e grupo Controle. As barras representam o intervalo de confiança, considerando alfa = 0,05.

Em contrapartida, a análise da área percentual de tecido conjuntivo na área dos filetes de rosca dos implantes instalados na tíbia de coelhos demonstrou que não houve diferença entre os grupos estudados no que concerne a área de tecido conjuntivo e seus resultados foram de  $6,59 \pm 3,6 \%$  para o grupo controle e para o grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste/tratado) foi de  $6,59 \pm 3,4 \%$  ( $p > 0,05$ , figura 5.37).

A análise da área percentual de osso exibiu variâncias significativamente diferentes entre os grupos experimentais (teste F,  $p < 0,001$ ) enquanto que a análise da área percentual de tecido conjuntivo não apresentou variância significativamente

diferente (test F,  $p > 0,05$ ). A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste t (alfa = 0,05).

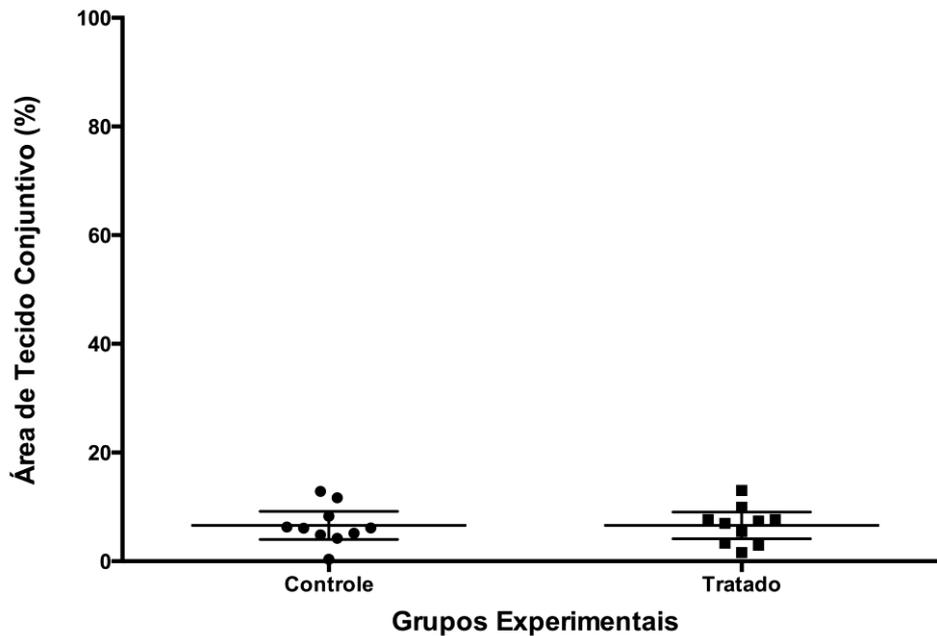


Figura 5.37- Análise histomorfométrica da área de tecido conjuntivo nos filetes de rosca dos implantes do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste/tratado) e grupo Controle. As barras representam o intervalo de confiança, considerando alfa = 0,05.

A figura 5.38 apresenta as fotomicrografias dos grupos Controle (usinado) e grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste/tratado), obtidas por microscópio de luz de campo claro com filtro polarizador e lente objetiva de 10x. As imagens (a) e (b) correspondem ao grupo Controle onde observa-se intensa neoformação de tecido ósseo entre os filetes de roscas do implante. Em (a), através da fotomicrografia de luz de campo claro, pode-se analisar a direção tomada pelas células ósseas, que preencheram a região do filete de rosca o qual estava vazio no momento da inserção do implante ao osso. Após quatro semanas, o filete foi preenchido por células ósseas. Na fotomicrografia (b) é apresentada a mesma região, porém utilizando o filtro polarizador.

As imagens (c) e (d) da figura 5.38 correspondem ao grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste) onde também observa-se intensa neoformação de tecido ósseo entre os filetes de roscas do implante. Semelhante ao grupo Controle, em (c), através da fotomicrografia de luz de campo claro do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos, analisa-se a direção tomada pelas células ósseas, que preencheram a região do filete de rosca o qual estava vazio no momento da inserção

do implante ao osso. Após quatro semanas, o filete foi preenchido por células ósseas. Na fotomicrografia (d) é apresentada a mesma região, porém utilizando o filtro polarizador.

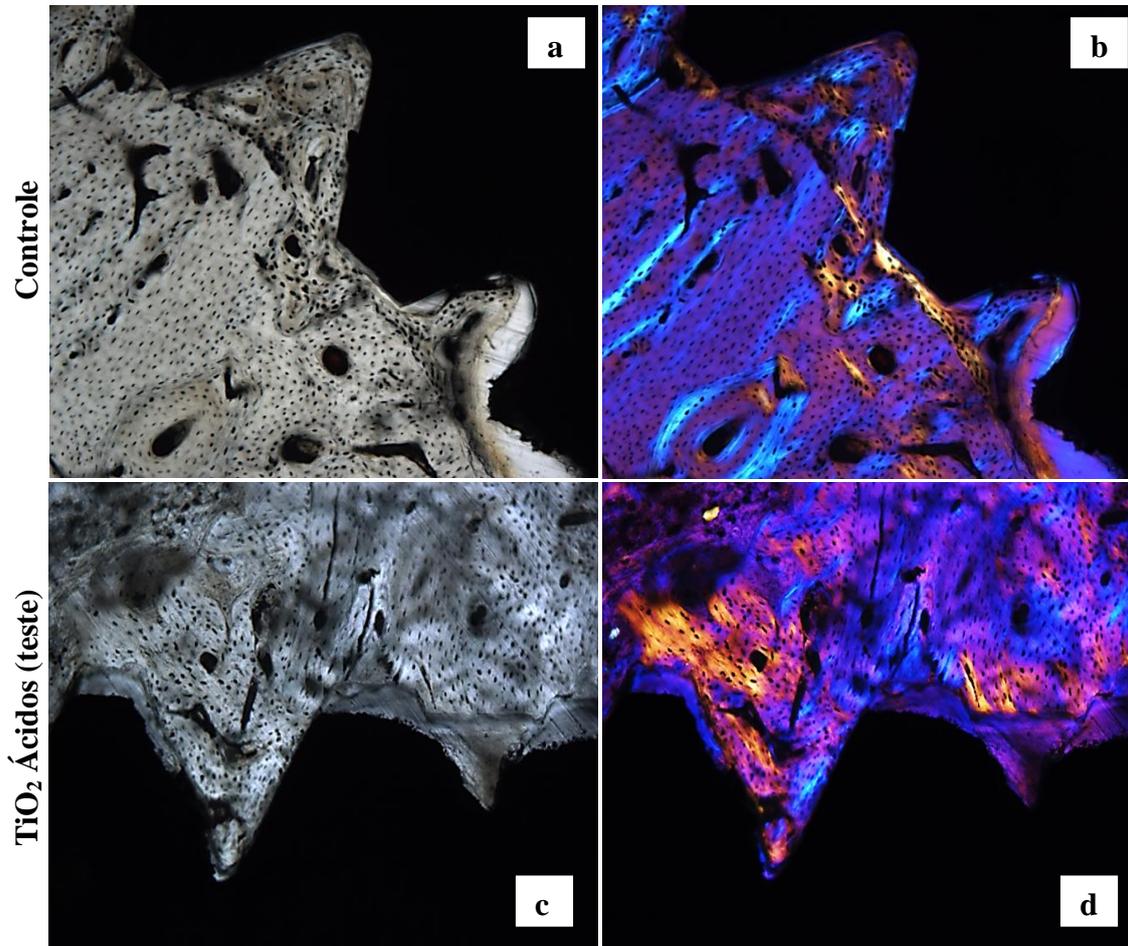


Figura 5.38- Fotomicrografias das lâminas dos grupos Controle (a, b) e TiO<sub>2</sub> Ácidos (c, d), obtidas por microscópio de luz de campo claro (a, c) com filtro polarizador (b, d), com aumento de 10x.

No estudo de Pak e cols. foi investigada a resposta óssea ao redor de implantes com diferentes tratamentos superficiais, onde o modelo de estudo foram tíbias de coelhos num período de cicatrização óssea de 3 e 6 semanas. Superfícies com recobrimento de tricálcio fosfato (TCP), superfícies anodizadas e superfícies usinadas (controle) foram comparadas. As superfícies anodizadas foram desenvolvidas em eletrólito de 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,25M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a 300 V por 22 minutos. Os resultados médios de BIC (contato osso-implante) no período de 3 semanas para a superfície TCP foi de 32,97 %; para a superfície anodizada foi de 32,54 % e para a superfície usinada

foi de 39,08 %. Para o período de 6 semanas o resultado para a superfície TCP foi de 44,92 %; para a superfície anodizada foi de 41,42 % e para a superfície usinada foi de 25,19 %. A avaliação histológica destas amostras mostrou que houve osseointegração em todos os 3 tipos de tratamento superficial estudados para ambos os tempos cirúrgicos de 3 e 6 semanas (PAK *et al.*, 2010). Os resultados do estudo de Pak e cols. corroboram com os resultados do grupo teste do presente estudo, onde o percentual de osso neoformado em contato com a superfície do implante foi de  $38,22 \pm 14,44\%$  (BIC).

Song e cols. realizaram um estudo com cães com objetivo de avaliar histomorfometricamente (através da análise do contato implante-osso\_BIC) a cicatrização de superfícies de implantes anodizadas (TiUnite<sup>®</sup>), superfícies com recobrimento de HA (Replace Select<sup>®</sup>) e superfícies com tratamento de jateamento reabsorvível (RBM\_*resorbable blast media*) (Kimplant<sup>®</sup>) no período de 2 semanas. Os resultados obtidos foram de  $71,9 \pm 9,6\%$  para o grupo TiUnite<sup>®</sup> (anodizado); e  $71,4 \pm 9,5\%$  para o grupo Replace Select<sup>®</sup> (recobrimento de HA); e  $71,9 \pm 10,2\%$  para o grupo Kimplant<sup>®</sup> (jateamento reabsorvível). Os autores concluíram que não houve diferença significativa nos resultados da avaliação do contato implante-osso entre os grupos avaliados (SONG *et al.*, 2004).

Burgos e cols. estudaram os eventos iniciais da osseointegração em implantes com superfícies anodizadas (teste\_TiUnite<sup>®</sup>) e implantes com superfícies usinadas (controle) em coelhos, nos períodos de 1, 2 e 4 semanas de osseointegração. Em todos os períodos de cicatrização óssea, a superfície que apresentou maior contato ósseo foi a da superfície anodizada, embora as diferenças tenham diminuído em relação aos períodos de 1 e 2 semanas. Eles puderam confirmar que as vias de osseointegração são diferentes para os implantes de superfície lisa (usinado) e implantes com topografia rugosa (anodizado), pois a formação óssea ocorreu diretamente nos implantes anodizados, enquanto que nos implantes usinados a formação óssea ocorreu a partir dos tecidos adjacentes, portanto é provável que diferenças topográficas desempenhem um papel importante na resposta óssea (BURGOS *et al.*, 2008).

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

Os resultados concernentes ao desenvolvimento, caracterização, avaliação biológica *in vitro* das superfícies de superfícies de óxido de titânio produzidos por oxidação anódica a microarco com incorporação de íons e a avaliação da osseointegração do grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Os recobrimentos produzidos nas quatro condições de anodização apresentaram superfícies homogeneamente porosas, com poros interconectados, homogeneamente distribuídos por toda superfície e sem presença de trincas aparentemente visíveis.
- No grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf foi identificada a presença das fases cristalinas do TiO<sub>2</sub> anatásio e rutilo e fase amorfa, enquanto nos demais grupos, apenas a fase cristalina anatásio foi identificada e fase amorfa.
- Na avaliação da resistência mecânica (ensaio de riscamento) o recobrimento produzido com eletrólito à base de ácido sulfúrico + ácido fosfórico (grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos) foi o que apresentou melhor aderência ao substrato.
- No ensaio de citotoxicidade a viabilidade celular foi avaliada pelo método Vermelho Neutro (NRU), onde foi confirmada que todas as superfícies desenvolvidas neste trabalho são atóxicas.
- De acordo com os resultados da análise histomorfométrica, a área percentual de osso (BIC) na área dos filetes de roscas dos implantes instalados na tíbia de coelhos demonstrou que o grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos (teste) apresentou maior formação de novo osso que o grupo controle (usinado), assumindo que a taxa de osseointegração foi maior neste grupo.

- Os resultados da avaliação *in vivo* permitiram observar que a superfície teste (grupo TiO<sub>2</sub> Ácidos) apresentou maior área de neoformação óssea, comprovando que a modificação superficial do titânio pela técnica de oxidação anódica a microarco favorece a osseointegração de implantes biomédicos.

## CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaios *in vivo* com período mais curto de avaliação (por exemplo 2 semanas) para analisar os estágios iniciais da osseointegração frente às superfícies modificadas.
- Desenvolver uma superfície que tenha a capacidade de acelerar o processo de osseointegração, sem perder as características morfológicas, composicionais e mecânicas desejáveis a uma superfície com finalidades biomédicas;
- Realizar avaliação *in vivo* das demais superfícies desenvolvidas nesta tese: grupo TiO<sub>2</sub> Acetato + Bgf e grupo TiO<sub>2</sub> 0,1M Zinco;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, S., BAYATI, M. R., GOLESTANI-FARD, F., *et al.*, 2011, “Micro arc oxidized Hap-TiO<sub>2</sub> nanostructured hybrid layers-part I: Effect of voltage and growth time”, *Applied Surface Sciences*; v. 257, pp. 5944-5949.

ABDULLAH, H. Z., 2010, *Titanium surface modification by oxidation for biomedical application*. D.Sc. Thesis, The University of the New South Wales, Sidney, Australia.

ABNT NBR 15729:2009, “Esterilização para implantes odontológicos – Radiação – validação e controle de rotina”.

ALBREKTSSON, T., WENNERBERG, A., 2004a, “Oral implant surfaces. Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them”, *Int J Prosthodont.*, v. 5, n. 17, pp. 536-543.

ALBREKTSSON, T., WENNERBERG, A., 2004b, “Oral implant surfaces. Part 2- review focusing on clinical knowledge of different surfaces”, *Int J Prosthodont.*, v.5, n. 17, pp. 544-564.

ALBREKTSSON, T., WENNERBERG, A., 2005, “The impact of oral implants - past and future”, *J Can Dent Assoc*, v. 71, n. 5, pp. 1966-2042.

ALLA, K. R., GINJUPALLI, K., UPADHYA, N., *et al.*, 2011, “Surface roughness of implants: A review”, *Trends Biomater. Artif. Organs*, v. 25, n. 3, pp. 112-118.

ALMEIDA, L. H., 2008, *Efeito de elementos intersticiais nas propriedades melásticas da liga Ti -35 Nb - 7 Zr - 5 Ta para aplicações biomédicas*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, Brasil.

ASTM F67, “Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications”.

BERGLUNDH, T., ABRAHAMSSON, I., LANG, N. P., *et al.*, 2003, “De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants”, *Clin Oral Implants Res.*, v. 14, n. 3, pp. 251-262.

BIGERELLE, M., ANSELME, K., NOEL, B., *et al.*, 2002, “Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response”, *Biomaterials*, v. 23, pp. 1563-1577.

BRANDÃO, M. L., ESPOSTI, T. B. D., BISOGNIN, E. D., *et al.*, 2010, “Superfície dos implantes osseointegrados x resposta biológica”, *Revista Implant News*, v. 7, n. 1, pp. 95-101.

BRÅNEMARK, P. I., ADELL, R., BREINE U., *et al.*, 1969, “Intra-osseous anchorage of dental prosthesis I. Experimental studies”, *Scand J Plast Reconstr Surg*, v.3, pp. 81-100.

BRÅNEMARK, P.I., HANSON, B. O., ADELL, R., *et al.*, 1977, “Osseo-integrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period” *Scand J Plast Reconstr Surg*, v. 16-20, p. 122-132.

BURGOS, P. M., RASMUSSEN, L., MEIRELLES, L., *et al.*, 2008, “Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia”, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v.10, n. 3, pp.181-190.

BUSER, D., BROGGINI, N., WIELAND, M., *et al.*, 2004, “Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface”, *Journal of Dental Research*, v.83, n.7, pp. 529-533.

BUSER, D., SCHENK, R., STEINEMANN, S., *et al.*, 1991, “Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs”, *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 25, pp. 889-902.

BUTZ, F., AITA, H., WANG, C. J., *et al.*, 2006, “Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium”, *Journal of Dental Research*, v.85, n. 6, pp. 560-565.

CARLSSON, L., ROSTLUND, T., ALBREKTSSON, B., *et al.*, 1988, “Removal torques for polished and rough titanium implants”, *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v. 3, pp.21-24.

CHOW, T. S., 1998, "Wetting of rough surfaces", *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 10, n. 27, L445, doi:10.1088/0953-8984/10/27/001.

COCHRAN, D. L., SIMPSON, J., WEBER, H., *et al.*, 1994, “Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium”, *International Oral Maxillofacial Implants*, v. 9, pp. 289-297.

COELHO, P. G., 2002, *Histomorphometric and biomechanical studies of a surface modified Ti-6Al-4V Implant*. D.Sc. Thesis, University of Alabama, USA.

COELHO, P. G., GRANATO, R., MARIN, C., *et al.*, 2011, “The effect of different implant macrogeometries and surface treatment in early biomechanical fixation: An experimental study in dogs”, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 4, pp. 1974-1981.

CORTEZ, A. L. V., 2002, *Influência de diferentes superfícies de implantes endósseos de titânio sobre o processo de osseointegração. Análises histológica e histométrica em tibia de coelhos*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

COSTA, A. C. F. M., LIMA, M. G., LIMA, L. H. M. A., *et al.*, 2009, “Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações”, *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4.3, pp. 29-38.

DONLEY, T. G., GILLETTE, W. B., 1991, “Titanium endosseous implant – soft tissue interface; a literature review”, *J. Periodontal*, v. 62, n. 2, pp. 153-160.

ELIAS, C. N, COUTINHO, M. P., 2009, “Rugosidade e molhabilidade do titânio usado em implantes dentários com superfícies tratadas”, *Rev. Bras.Odontol.*, v. 66, n. 2, pp. 234-238.

FÖRCH, R., SCHÖNHERR, H., JENKINS, A. T. A., *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology*. 1st. ed. Berlin, Wiley-VCH, 2009.

GAMBOA, J. A., PASQUEVICH, D. M., 2009, “Effect of Chlorine Atmosphere on the Anatase Rutile Transformation” *Journal of the American Ceramic Society*, v.75, n.1, pp. 2934-2938.

GARETTO, L. P., CHEN, J., PARR, J. A., *et al.*, 1995, “Remodeling dynamics of bone supporting rigidly fixed titanium implants: a histomorphometric comparison in four species including humans”, *Implant Dent.*, v. 4, n. 4, pp. 235-243.

GEBRAN, M. P., WASSAL, T., 2007. “Avaliação in-vitro da adesão de osteoblasto sobre implantes osseointegráveis com superfície tratada (Titamax II<sup>®</sup>)”. *Implants News*, v. 4, n.1.

GRANATO, R., MARIN, C., COELHO, P., *et al.*, 2008, “Tendências atuais para aprimorar o processo de osseointegração”, *Innovations Implant Journal – Biomaterials and Esthetics*, v.3, n.5, pp. 20-26.

HA, H-S., KIM, C-W., LIM, Y-J., *et al.*, 2006, “Surface characteristics of anodic oxidized titanium according to the pore size”, *J. Korean Acad Prosthodont.*, v. 44, n. 3, pp. 243-355.

HADLEY, K. B., NEWMAN, S. M., HUNT, J. R., 2010, “Dietary zinc reduces osteoclastic resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21, n. 4, pp. 297-303.

HANAWA, T. M., 2010, “Biofunctionalization of titanium for dental implant”, *Japanese Dental Science Review*, v. 46, pp. 93-101.

HERRMANN, J. M., TAHIRI, H., GUILLARD, C., 1999, “Photocatalytic Degradation of Aqueous Hydroxy-Butandioic Acid (Malic Acid) in Contact with Powdered and Supported Titania in Water”, *Catalysis Today*, v. 54, pp. 131-141.

HOROWITZ, E. & PARR, J. E., 1994, “Characterization and performance of calcium phosphate coatings for implants (ASTM STP 1196)”, *Journal of Applied Biomaterials*, v. 6, pp. 301.

HU, H., ZHANG, W., QIAO, Y., *et al.*, 2011, “Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings on titanium”, *Acta Biomaterialia*, doi:101016/j.actbio.2011.09.031.

HUANG, Y-H., *et al.*, 2004, “Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone”, *Clin. Oral Implant Res.*, v. 16, pp. 105-111.

ICCVAM, Validation Study of *In Vitro* Cytotoxicity Test Methods, 2006, “ The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing”, Research triangle park: National toxicology Program, NIH Publication n. 07- 4519.

IDE-EKTESSABI, A., YAMAGUCHI, T., TANAKA, Y., 2005, “RBS and XPS analyses of the composite calcium phosphate coatings for biomedical applications”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 241, I.1–4, pp. 685-688.

ISHIZAWA, H., OGINO, M., 1995, “Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, pp 65-72.

ISO 10993-2 (2006) - Biological evaluation of medical devices. “Part 2: Animal welfare requirements”, International Organization for Standardization, Genebra, Suíça.

ISO 10993-5 (2009) - Biological evaluation of medical devices. “Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”, International Organization for Standardization, Genebra, Suíça.

ISO 10993-6 (2007) - Biological evaluation of medical devices. "Part 6: Tests for local effects after implantation", International Organization for Standardization, Geneva, Suíça.

JOHANSSON, C., LAUSMAA, J., ASK, M., *et al.*, 1989, "Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti6Al14V or commercially pure titanium" *Journal of Biomedical Engineering*, v. 11, pp. 03-08.

KANG, S. H., CHO, S. A., 2011, "Comparison of removal torques for laser-treated titanium implants with anodized implants", *J Craniofac Surg.*, v. 22, n. 4, pp. 1491-1495. doi: 10.1097/SCS.0b013e31821d4d98.

KAWASHITA, M., KAMITAKAHARA, M., KOKUBO, T., 2004, " Bioactive inorganic-organic hybrids with deformability". In: *Annales de chimie-science des materiaux*, pp. 7-16 Jan.

KERN, P., ZINGER, O., 2007 "Purified titanium oxide with novel morphologies upon spark anodization of Ti alloys in mixed H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> electrolytes", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 80, pp. 283-296.

KIM, K. H., RAMASWAMY, N., 2009. "Electrochemical surface modification of titanium in dentistry". *Dental materials journal*, v. 28, n. 1, pp. 20-36.

KOKUBO, T., KIM, H. M., KAWASHITA, M., 2003, "Novel Bioactive materials with Different Mechanical Properties", *Biomaterials*, v. 24, pp. 2161-2175.

KONOBLOCH, L., LARSEN, P. A., RASHID, B., *et al.*, 2004, "Six-month performance of implants with oxidized and machined surfaces restored at 2, 4, and 6 weeks post implantation in adult beagle dogs", *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v. 19, pp. 350-356.

KORKUSUZ, P., KORKUSUZ, F., 2004, "Hard tissue-biomaterial interactions", In: *Yaszemski, M.J., et al. (Eds.), Biomaterials in Orthopedics*. Marcel Dekker, New York, 1-40.

KOWALSKI, C., *Dektak 6M Manual*. Digital Instruments Veeco Metrology Group. 2002.

LAUTENSCHLAGER, E. P., MONAGHAN, P., 1993. "Titanium and titanium alloys as dental materials". *Int. Dent.*, v. 43, n. 3, pp. 245 – 253.

LEE, T. M., TSAI, R. S., CHANG, E., *et al.*, 2002, "The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma-sprayed HA coating: Effect of surface roughness and serum contents", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, n. 4, pp. 341-350.

LI, L-H., KONG, Y-M., KIM, H-W., *et al.*, 2004, "Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation", *Biomaterials*, v. 25 , pp. 2867-2875.

LIMA, I. R., ALVES, G. G., FERNANDES, G. V. O., *et al.*, 2010, "Evaluation of the in vivo biocompatibility of hydroxyapatite granules incorporated with zinc ions", *Materials Research*, v. 13, n. 4, pp. 563-568.

LINCKS, J., BOYAN, B. D., BLANCHARD, C. R., *et al.*, 1998, "Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition", *Biomaterials*, v. 19, pp. 2219-2232.

LINSEBIGLER, A. L., LU, G., L., YATES, J. T. Jr., 1995, "Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> surfaces: principles, mechanisms, and selected results", *Chem. Rev.*, v. 95, pp. 735-758.

LIU, X., CHU, P. K., DING, C., 2004, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications", *Materials Science and Engineering*, v. 47, pp. 49-121.

LIU, X., WANG, F., SHIMIZU, T., *et al.*, 2005, "Formation of hydroxyapatite on Ti-6Al-4V alloy by microarc oxidation and hydrothermal treatment", *Surface & Coatings Technology*, v. 199, pp 220-224.

LÓPEZ, J. C. R. R., 2007, *Avaliação histomorfométrica do percentual de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

MARIN, C., GRANATO, R., BONFANTE, E. A., *et al.*, 2011, “Avaliação biomecânica e histológica de implantes com diferentes macrogeometrias no período inicial de osseointegração. Estudo experimental em cães”, *Revista. Implante News*, v. 8, n. 2, pp. 247-251.

MARINO, C. E. B., NASCENTE, P. A. P., BIAGGIO, S. R., *et al.*, 2004, “XPS characterization of anodic titanium oxide films grown in phosphate buffer solutions”, *Thin Solid Films*, v. 468, pp. 109-112.

MAXIAN, S. H., ZAWADSKY, J. P., DUNN, M. G., 1994, “Effect of Ca/P coating resorption and surgical fit on the bone /implant interface”, *Journal of Biomedical Materials*, v.28, pp. 1311-1319.

MISCH, C. E., 2000, *Implantes dentários contemporâneos*, 2ed. São Paulo, Editora: Santos.

MOMBELLI, A., SAMARANAYAKE, L. P., 2004. “Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases”, *Int. Dent.Journal*, v. 54, pp. 3-14.

MONTENEGRO, I. N. S., 2007. *Estudo das ligas de titânio-zircão resultantes do processo de fundição plasma-skull para aplicações como biomateriais*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

NIH PUBLICATION – NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity, n. 01-4500, pp. 01-102 ago. 2001.

NISHIMOTO, S. K., NISHIMOTO, M., PARK, S. W., *et al.*, 2008, “The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading”, *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v. 23, pp. 675-680.

NIST, 2012. “X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Database, Version 3.5”. Disponível em: [http://srdata.nist.gov/xps/main\\_search\\_menu.aspx](http://srdata.nist.gov/xps/main_search_menu.aspx).

OH, H-J., LEE, J-H., KIM, Y-J., *et al.*, 2008, “Surface characteristics of porous anodic TiO<sub>2</sub> layer for biomedical applications”, *Materials Science and Physics*, v. 109, pp. 10-14.

OH, H-J., LEE, J-H., JEONG, Y., *et al.*, 2005, “Microstructural characterization of biomedical titanium oxide film fabricated by electrochemical method”, *Surface & Coatings Technology*, v. 198, pp. 247-252.

OH, T., YOON, J., WANG, H., 2003, “Management of the implant periapical lesion: A case report”, *Implant Dent.*, v. 12, n.1, pp. 360-366.

OHTSU, N., HIROMOTO, S., YAMANE, M., *et al.*, 2013, “Chemical and crystallographic characterizations of hydroxyapatite- and octacalcium phosphate-coatings on magnesium synthesized by chemical solution deposition using XPS and XRD”, *Surface and Coatings Technology*, v. 218, pp. 114-118.

OLIVEIRA, P. T., NANCI, A., 2004, “Nanotexturing of titanium based surfaces up regulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells”, *Biomaterials*, v. 25, n. 3, pp. 403-413.

OMIDVAR, H., GOODARZI, S., SEIF, A., *et al.*, 2011, “Influence of anodization parameters on the morphology of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays”, *Superlattices and Microstructures*, v. 50, pp. 26-39.

PAK, H-S., YEO, I-S., YANG, J-H., 2010, “A histomorphometric study of dental implants with different surface characteristics”, *J. Adv. Prosthodont.*, v. 2, pp. 142-147.

PARK, I. S., LEE, M. H., BAE, T. S., *et al.*, 2007, “Effects of anodic oxidation parameters on a modified titanium surface”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Part B, pp. 422-429.

PARK, T-Y., EOM, S-H., KIM, S-H., *et al.*, 2005, “Effects of surface morphology of titanium anodic-oxidized with sulphuric acid and phosphoric acid on osteogenesis”, *OSSTEM implant system*, pp. 506-517.

RAVAGLIOLI, A., KRAJEWSKI, A., 1992. “Bioceramics materials properties applications”. *Chapman and Hall*, New York, USA.

REN, F., XIN, R., GE, X., *et al.*, 2009, “ Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites”, *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 3141-3149.

ROGUSKA, A., PISAREK, M., ANDRZEJCZUK, M., *et al.*, 2011, “Characterization of a calcium phosphate-TiO<sub>2</sub> nanotube composite layer for biomedical applications”, *Materials Science and Engineering*, v. C31, pp. 906-914.

ROHANIZADEH, R., AL-SADEQ, M., LeGEROS, R.G., 2004, “Preparation of different forms of titanium oxide on the titanium surfaces”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 71A, pp. 213-220.

ROSA, A. L., BELOTI, M. M., 2003, “Effect of cp Ti surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation”. *Braz dent J*, v.14, pp. 16-21.

SAMMONS, R. L., LUMBIKANONDA, N., GROSS, M. *et al.*, 2005, “Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning electron microscopic study”, *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, pp. 657-666.

SANTOS, A., LIDÍZIO, L. R., CRUZ, T. S., *et al.*, 2009, “Influence of electrolyte composition and time deposition on TiO<sub>2</sub> films produced by micro-arc oxidation”, *Key Engineering Materials*, v. 396-398, pp. 349-352.

SANTOS, A., 2008, *Produção de filmes de óxido de titânio por oxidação anódica a microarco*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SATO, R., SATO T., TAKAHASHI I., *et al.*, 2007, “Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates”, *Clin. Oral Implants Res.*, v.18, pp. 21-26.

SHIBUYA, Y., KOBAYASHI, M., TAKEUCHI, J., *et al.*, 2009, “Analysis of 472 Brånemark System TiUnite Implants: A retrospective study”, *Kobe J. Med. Sci.*, v.55, n.3, pp. 73-81.

SILVA, M. A. M., MARTINELLI, A. M., ALVES JUNIOR, C., *et al.*, 2005, “Surface modification of implants by plasma oxidation in hollow cathode discharge”, *Surface and coatings technology*, v. 20, pp. 612-620.

SIMKA, W., IWANIAK, A., NAWRAT, G., *et al.*, 2009, “Modification of titanium oxide layer by calcium and phosphorus”, *Electrochimica Acta*, v. 54, pp. 6983- 6988.

SONG, W-S., KIM Y-S., KIM C-W., *et al.*, 2004, “Bone response of three different surface implants : histomorphometric and resonance frequency analysis in dogs”, *J. Korean Acad. Prosthodont.*, v. 42, n. 6, pp. 671-678.

SONODA, T., KATO, M., ASASHINA, T., 2007, “Surface structure of Ti-O films formed on pure titanium by anodic oxidation”, *Journal of Physics: Conference Series*, v. 61, pp. 1091-1096.

SOUZA, G. B., LIMA, G. G., KUROMOTO, N. K., *et al.*, 2011, “Tribo-mechanical characterization of rough, porous and bioactive Ti anodic layers” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 4, pp. 796-806.

SCHRECKENBACH, J. P., MARX, G., SCHLOTTIG, F., *et al.*, 1999, “Characterization of anodic spark-converted titanium surfaces for biomedical applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, pp. 453-457.

SUL, Y. T., ALBREKSSON, T., JOHANSSON, C. B., *et al.*, 2002, “Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition”, *Biomaterials*, v. 23, pp. 491-501.

SUZUKI, M., MAIA, M. D. C., MARIN, C., *et al.*, 2010, “Effect of Surface Modifications on Early Bone Healing Around Plateau Root Form implants: An Experimental Study in Rabbits”, *J Oral Maxillofac Surg*, v. 68, pp. 1631-1638.

SYKARAS, N., IACOPINO, A. M., MARKER, V. A., *et al.*, 2000, “Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review”, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 15, pp. 675-690.

TAKEUCHI, M., ABE, Y., YOSHIDA, Y., *et al.*, 2003, “Acid pretreatment of titanium implants”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 1821-1827.

TANG, A., CHAPPEL, H. F., DOVE, M. T., *et al.*, 2009, “Zinc incorporation into hydroxyapatite”, *Biomaterials*, v. 30, pp. 2864-2872.

TSUTSUMI, Y., NISHIMURA, D., DOI, H., *et al.*, 2009, “Difference in surface reactions between titanium and zirconium in Hank’s solution to elucidate mechanism of calcium phosphate formation on titanium using XPS and cathodic polarization”, *Materials Science and Engineering*, v. C29, pp. 1702-1708.

VERCAIGNE, S., WOLKE, J. G., NAERT, I., *et al.*, 2000a, “A histological evaluation of TiO<sub>2</sub>-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the trabecular bone of the goat: Part 2”, *Clinical Oral Implants Research*, v. 11, pp. 314-324.

VERCAIGNE, S., WOLKE, J. G., NAERT, I., *et al.*, 2000b, “A mechanical evaluation of TiO<sub>2</sub>-gritblasted and Ca-P magnetron sputter coated implants placed into the trabecular bone of the goat: Part 1”, *Clin Oral Implants Res.*, v.11, n.4, pp.305-313.

WANG, Y. M., JIANG, B. L., GUO, L. X., *et al.*, 2006, “Tribological behavior of microarc oxidation coatings formed on titanium alloys against steel in dry and solid lubrication sliding”, *Applied Surface Science*, v. 252, pp. 2989-2998.

WEI, D., ZHOU, Y., JIA, D., *et al.*, 2007. “Effect of heat treatment on the structure and in vitro bioactivity of microarc-oxidized (MAO) titania coatings containing Ca and P ions”, *Surface & Coatings Technology*, v. 201, pp. 8723-8729.

WERNER, S., HUCK, O., FRISCH, B., *et al.*, 2009, “The effect of microstructured surfaces and laminin-derived peptide coatings on soft tissue interactions with titanium dental implants”, *Biomaterials*, v. 30, pp. 2291-2301.

WILLIAMS, D., 2003, “Revisiting the definition of biocompatibility”. *Med Device Technol.*, v. 14, n. 8, pp.10-13.

WILLIAMS, D. B., CARTER, C.B., 2009. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, Springer, New York, NY, USA.

XIONG, T-Y., CUI, C-Y., KIM, H. M., *et al.*, 2004, “Effect of surface morphology and crystal structure on bioactivity of titania films formed on titanium metal via anodic oxidation in sulfuric acid solution”. *Key Engineering Materials*, v. 254-256, pp. 375-378.

XU, J., DING, G., LI, J., *et al.*, 2010, “Zinc-ion implanted and deposited titanium surfaces reduce adhesion of *Streptococcus mutans*”, *Applied Surface Science*, v. 256, pp. 7540-7544.

XUANYONG, L., PAUL, K. C., CHUANXIAN, D., 2004, “Surface modification of titanium, titanium alloys and created materials for biomedical applications”, *Materials Science and Engineering*, v. 47, pp. 49-121.

YAN, Y., SUN, J., HAN, Y., *et al.*, 2010, “Microstructure and bioactivity of Ca, P and Sr doped TiO<sub>2</sub> coating formed on porous titanium by micro-arc oxidation”, *Surface & Coatings Technology*, v. 205, pp. 1702-1713.

YANG, B., UCHIDA, M., KIM, H. M., *et al.*, 2004, "Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment", *Biomaterials*, 17, pp. 1003-1010.

YU, S., YANG, X., YANG, L., *et al.*, 2007, "Novel technique for preparing Ca- and P-containing ceramic coating on Ti-6Al-4V by Micro-Arc Oxidation", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, DOI 10.1002/jbmb, pp. 623-627.

ZHANG, Z., GU, B., ZHANG, W., *et al.*, 2012, "The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to porous Zinc-TiO<sub>2</sub> coating prepared by plasma electrolytic oxidation", *Applied Surface Science*, v. 258, pp. 6504-6511.

ZHU, X., CHEN, J., SCHEIDELER, L., *et al.*, 2004, "Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses", *Biomaterials*, v. 25, pp. 4087-4103.

ZHU, X., ONG, J. L., KIM, S., *et al.*, 2002, "Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 60, n. 2, pp. 333-338.

ZHU, X., KIM, K. H., JEONG, Y., 2001, "Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial", *Biomaterials*, v. 22, pp. 2199-2206.

## ANEXO A

### Ensaio de citotoxicidade de acordo com a norma ISO 10993-5 (2009):

- Células: Fibroblastos L929, obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM- Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Sigma-Aldrich Co, St Louis, MI) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco BRL, Rockville, MD) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois ou três dias, ou quando a monocamada atingia a confluência de 80%, as células foram retiradas enzimaticamente, pela utilização de Tripsina 0,125% (Amresco LLC, Solon, OH) e 0,78mM de EDTA (Fmaia Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP) e posteriormente redistribuídas em novas garrafas de cultura (TPP AG, Trasadingen, CH) para expansão na densidade de 5x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>.

Antes da realização dos ensaios as células foram atestadas quanto a ausência de micoplasma, pelo método de bioluminescência (MycoAlert™ Mycoplasma Detection kit; Lonza Group Ltda, São Paulo, SP) e de bactérias e fungos pelos métodos de cultivo em Tioglicolato (Difco Laboratories, Detroit, MI) e cultivo em Caldo de Caseína de Soja (Difco Lab.), respectivamente.

- Extrato: O extrato dos biomateriais testados seguiu as diretrizes da ISO 10993-12. Uma vez que a espessura dos discos testados era da ordem de 1mm, a taxa de extração foi determinada em função a área de superfície considerando-se 3cm<sup>2</sup>/ml de DMEM com 5% de SFB (soro fetal bovino) durante 24h em em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

- Ensaio de citotoxicidade: Células L929 (10.000) foram plaqueadas em placas com 96 poços na densidade de 3,2x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e mantidas em DMEM e 10% de SFB em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h o meio foi substituído pelo extrato (como o SFB foi adicionado na hora de obtenção do extrato, este passo foi suprimido) e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após mais 24h o meio foi removido, as células gentilmente lavadas com PBS para a realização do ensaio de viabilidade celular.

- Redução do XTT a um sal azul de formazana: A atividade mitocondrial é mensurável a partir da redução do XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) a um sal azul de formazan na mitocôndria das células, organela responsável pela respiração celular, e somente ativo em células viáveis (Kit Cytotox XTT, Graulab, São Paulo). Resumidamente, as células foram lavadas com PBS seguido da adição de 200 µL / poço de meio de cultura fresco, a fim de evitar qualquer interação do composto de ensaio com o corante. Imediatamente antes do uso, misturou-se as soluções XTT I XTT II na proporção 1: 100 , sendo 50 µL desta mistura adicionada a todos os poços e incubando-se a placa durante 2-3 horas a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>, (a incubação foi feita de maneira estática. A agitação para aumento da dispersão do formazan foi realizada no agitador orbital após a incubação). Ao final a densidade óptica a 480 nm foi realizada, tendo-se a referência em 690 nm. Após subtração da DO do branco (todos os reagentes em poço sem células, o valor da absorbância final foi determinada, considerando-se 100% a absorbância do controle negativo de toxicidade (células não tratadas com extrato). O experimento foi realizado 3 vezes independentes em sextuplicatas.

- Incorporação de vermelho neutro (NRU): Visando determinar a viabilidade celular por meio da integridade da membrana celular, as células foram expostas ao vermelho neutro (Kit Cytotox NR, Graulab, Sao Paulo), mantendo-se coradas as células viáveis. Após a remoção por aspiração do meio de cultura, as células aderidas foram lavadas com 300 µL da solução NRI. Seguiu-se a adição de 200 µL da solução NRII diluída em DMEM com 5% SFB na proporção de 1:100, incubando-se por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após descartar a solução NRII, adicionou-se 200 µL da solução NRIII a cada poço e descartando-a após 1min. Em seguida, 200 µL da solução de solubilização NRIV foi adicionada em cada poço. Após 15 minutos de incubação e agitação delicada da placa, a densidade optica (DO) de cada poço foi lida em 540nm, sendo a referência lida em 690nm. Após subtração da DO do branco (todos os reagentes em poço sem células, o valor da absorbância final foi determinada, considerando-se 100% a absorbância do controle negativo de toxicidade (células não tratadas com extrato). O experimento foi realizado 3 vezes independentes em sextuplicatas.

- Controle negativo de toxicidade: Em cada experimento, duas colunas em sextuplicata contendo células, meio de cultura e 5% SFB foram plaqueadas de modo a determinar a

viabilidade celular na ausência de extrato. Ainda, estas colunas permitiram avaliar a eficiência da pipetagem considerando-se: a) média dos controles (CV, n=12, ambas as colunas), considerada 100%; b) CV1 média da coluna controle 1; e c) CV2 média da coluna controle 2. O experimento é aceito apenas se CV-CV1 e CV-CV2 seja inferior a 20% de CV.

- Controle positivo de toxicidade: As células foram tratadas com diferentes concentrações de SDS (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MI) – 30, 40, 50 e 60 µg/ml observando-se todas as condições descritas para a exposição das células ao biomaterial.

- Análise estatística: Os resultados foram expressos na forma de médias e intervalo de confiança 95%, os quais foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e o de comparações múltiplas de Dunn, se  $p < 0,05$ .

## ANEXO B



Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comitê de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº188, intitulado “OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE ÓXIDO DE TITÂNIO PRODUZIDOS POR OXIDAÇÃO ANÓDICA A MICROARCO” sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto Achete e sob orientação nos procedimentos cirúrgicos da Profª Dra. Mônica Divana Calasans Maia, da Faculdade de Odontologia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em 12 de abril de 2012.

Niterói, 12 de abril de 2012.

Presidente da C.E.U.A.