

AVALIAÇÃO IN VITRO DE CHAPAS DE TITÂNIO
COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE
EM SOLUÇÃO SIMULADORA DE PLASMA HUMANO

Paulo Sérgio Vanzillotta

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Dra. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

Dr. Sérgio Álvaro Camargo Jr, D.Sc.

Dr. Ivan Napoleão Bastos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2003

VANZILLOTTA, PAULO SÉRGIO

Avaliação in vitro de chapas de titânio
com diferentes tratamentos de superfície
em solução simuladora de plasma humano.

[Rio de Janeiro] 2003

VII, 81 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc.,
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2003)

Tese - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Titânio
2. Tratamento de superfície
3. Bioatividade

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*Aos meus pais,
Elza e Salvatore,
pelo amor e apoio.
Aos meus filhos,
Guilherme e Victoria,
pela alegria de ser pai.*

AGRADECIMENTOS

À professora Gloria de Almeida Soares pela sábia orientação desta tese. Sempre presente e paciente, agradeço por ter me aceitado no programa, ter acreditado em mim, e me iniciado na Ciência dos Materiais e na pesquisa de biomateriais.

Às colegas Márcia Sader e Lídia Ágata Senna pela amizade e ajuda inestimável durante a tese.

Ao pesquisador Ivan Napoleão Bastos pela pronta colaboração na análise de rugosidade e pelos conhecimentos transmitidos.

Às alunas Renata e Michelle pela ajuda na fase experimental da tese.

A todos os professores do PEMM que me transmitiram preciosos conhecimentos durante o mestrado.

Aos técnicos e funcionários do PEMM que estavam sempre disponíveis para me ajudar.

Ao Instituto Politécnico de Nova Friburgo (UERJ) pela análise de rugosidade.

À Sra Kátia Gamboa (NUCAT / PEQ / COPPE) pela análise de XPS.

Ao Instituto de Química (UFRJ) pela análise química de absorção atômica.

Aos meus filhos, Guilherme e Victoria, pela paciência e compreensão, por terem sido privados, em muitos momentos, de minha convivência .

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

AVALIAÇÃO IN VITRO DE CHAPAS DE TITÂNIO
COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE
EM SOLUÇÃO SIMULADORA DE PLASMA HUMANO

Paulo Sérgio Vanzillotta

Março/2003

Orientadora: Glória de Almeida Soares

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Alguns dos fatores de grande influência nos índices de sucesso clínico dos implantes osseointegrados são a qualidade e quantidade de adesão do tecido ósseo à sua superfície, definindo assim o conceito de osseointegração. O fenômeno da osseointegração depende primordialmente das reações que ocorrem na superfície dos implantes. As pesquisas no campo de engenharia de superfícies visam modificar as propriedades de superfície tanto nos aspectos químico e biológico, quanto morfológicos e topográficos. Este trabalho teve como objetivo verificar a relação entre alguns tipos de tratamentos de superfície com a resposta *in vitro* de chapas de titânio comercialmente puro submetidas à exposição de soluções simuladoras de plasma humano. Estes tratamentos de superfícies visaram obter uma superfície rugosa e/ou bioativa. As chapas foram caracterizadas em MEV, XPS e perfilometria de contato. Os resultados mostraram diferenças significativas entre as chapas tratadas e não tratadas, evidenciando que os tratamentos realizados favoreceram a interação osso-implante.

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

IN VITRO EVALUATION OF TITANIUM SHEETS
WITH DIFFERENT SURFACE TREATMENTS
IN SIMULATED HUMAN BLOOD PLASMA SOLUTION

Paulo Sérgio Vanzillotta

March/2003

Advisor: Glória de Almeida Soares

Department: Metallurgy and Materials Engineering

Some of the major influent factors on osseointegrated implants clinical success rate are both quality and quantity of bone tissue bonded to its surface, defining thereby the osseointegration concept. The osseointegration phenomenon depends primarily of the reactions that take place on implants surface. Research in the surface engineering field looks for to modify the surface properties in the chemical and biological aspects, as in the morphological and topographic ones. This work had the purpose to verify the relationship between some sorts of surface treatment and the *in-vitro* response of commercially pure titanium sheets submitted to human plasma simulated solutions. These surface treatments seek for a rough and/or bioactive surface. The plates were characterized by SEM, XPS and contact profilometry. The results show significant differences between treated and non treated sheets, revealing that the first ones seems to be more advantageous for bone-implant interaction.

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|----|
| I. | INTRODUÇÃO | 1 |
| II. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| II.1 | Tratamentos de superfícies | 9 |
| II.1.1 | Jateamento | 9 |
| II.1.2 | Aspersão térmica | 10 |
| II.1.3 | - Tratamento químico com ácido | 11 |
| II.2 | Técnicas de caracterização de superfícies | 15 |
| II.2.1 | Caracterização metalúrgica | 15 |
| II.2.1.1 | Ângulo de contato | 15 |
| II.2.1.2 | Perfilometria | 16 |
| II.2.1.3 | MEV | 19 |
| II.2.1.4 | XPS | 20 |
| II.2.1.5 | Outras técnicas | 21 |
| II.2.2 | Caracterização biológica | 21 |
| II.2.2.1 | Cultura de células | 22 |
| II.2.2.2 | Testes <i>in vitro</i> com fluidos simulados | 25 |
| III. | MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| III.1 | Materiais | 27 |
| III.2 | Metodologia | 30 |
| III.2.1 | MEV | 30 |
| III.2.2 | Perfilometria | 30 |
| III.2.3 | Teste de bioatividade | 32 |
| III.2.4 | XPS | 34 |
| IV. | RESULTADOS | 35 |
| V. | DISCUSSÃO | 61 |
| VI. | CONCLUSÕES | 71 |
| VII. | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 72 |
| VIII. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |

I. INTRODUÇÃO

A perda de elementos dentários decorrente de doença periodontal, cárie ou trauma levou os profissionais de Odontologia a desenvolverem diversas modalidades de tratamento protético para a substituição destes dentes perdidos. O número e distribuição dos elementos remanescentes e a qualidade do rebordo alveolar residual são fatores que influenciam diretamente na seleção e desempenho da prótese dentária, bem como no prognóstico do tratamento.

O emprego de implantes osseointegrados consolidou-se como uma alternativa viável para solucionar limitações anatômicas, funcionais e estéticas advindas do tratamento convencional. A demanda crescente na utilização de implantes dentários é resultado de diversos fatores, tais como: aumento na expectativa de vida da população, perda dentária associada à idade, seqüelas do edentulismo, desempenho insatisfatório das próteses removíveis, e bons resultados obtidos em estudos longitudinais com prótese implanto-suportadas.

Existe um grande número de marcas comerciais de implantes a disposição dos profissionais no mercado mundial. Estes implantes são comercializados com diferentes desenhos, materiais e tratamentos superficiais, como forma de melhorar seus desempenhos clínicos. Eles apresentam diferentes índices de sucesso clínico, comprovados por estudos longitudinais. Alguns sistemas apresentam altos índices de sucesso, embora ainda não possuam estudos que possam comprovar sua eficácia ao longo dos anos. Um dos fatores de maior influência nos índices de sucesso clínico dos implantes osseointegrados é a qualidade e quantidade de adesão do tecido ósseo à sua superfície, definindo assim o conceito de osseointegração.

O fenômeno da osseointegração depende primordialmente das reações que ocorrem na superfície dos implantes. ALBREKTSSON et al. (1981) propuseram seis fatores que são aceitos como fundamentais no sucesso dos implantes endósseos: material e projeto do implante, qualidade óssea, técnicas cirúrgicas e qualidade da superfície. Com relação à superfície, quatro parâmetros devem ser considerados: composição, rugosidade, topografia e energia de superfície, sendo que a alteração de

um deles afeta os demais. Os sistemas de implantes comerciais buscam desenvolver superfícies que otimizem as reações implante-tecido, buscando reduzir o tempo de osseointegração e/ou favorecê-la em locais de comprovada baixa taxa de sucesso, como em osso do tipo IV.

As pesquisas no campo de engenharia de superfícies visam modificar as propriedades de superfície tanto nos aspectos químico e biológico, quanto morfológicos e topográficos, e numa escala que abrange do centímetro ao nanômetro. A forma do implante (cônico ou cilíndrico; rosqueado ou liso; com ou sem fendas) determina condições adequadas para sua retenção mecânica no sítio ósseo e o relacionamento com os componentes protéticos, sendo este projetado com precisão de milímetros. Outra forma de promover o aumento da área efetiva de contato do tecido com o implante se dá através de tratamentos de superfície que alterem a topografia em escala micrométrica como, por exemplo, os recobrimentos com hidroxiapatita e os ataques ácidos, que também aumentam a retenção mecânica. Por último, a presença de íons fosfato (nos recobrimentos com hidroxiapatita) ou as espessas camadas de óxido decorrentes dos tratamentos de anodização podem induzir a adesão de determinadas proteínas, que desencadearão o processo de formação óssea, embora não se tenha claro como essas alterações – em escala nanométrica - afetam a osseointegração.

Este trabalho tem como finalidade verificar a correlação entre diferentes tratamentos de superfície e a bioatividade de chapas de titânio comercialmente puro submetidas à uma solução simuladora de plasma humano por até sete dias.

II . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sucesso dos implantes dentários está relacionado com a capacidade de se integrarem ao tecido ósseo circunvizinho (ALBREKTSSON et al, 1981). O termo “osseointegração”, originalmente proposto por BRÅNEMARK et al (1969) sugere um contato direto entre o tecido ósseo e o implante, quando observado em microscopia óptica, e é considerado como uma medida de sucesso da longevidade da prótese. Essa osseointegração permite uma transferência eficiente de tensões, geradas durante função, do implante para o osso. Os requisitos básicos exigidos para a ocorrência da osseointegração, segundo SCHENK & BUSER (2000) são: adaptação precisa, estabilidade primária e carga adequada durante o período de regeneração. Além disso, a osseointegração requer um material bioinerte ou bioativo e configurações de superfície (osteofílicas) que sejam atrativas para a deposição óssea.

Os materiais bioinertes não liberam nenhuma substância tóxica e, desta forma, não causam nenhuma reação tecidual adversa. O titânio, comercialmente puro ou em certas ligas, é um bom exemplo de material bioinerte. Um material bioativo é aquele que causa uma reação tecidual favorável, seja estabelecendo ligações químicas com componentes teciduais ou promovendo atividades celulares envolvidas na formação da matriz óssea. A bioatividade é atualmente restrita a compostos de baixas propriedades mecânicas como a hidroxiapatita e fatores de crescimento, e podem ser apenas utilizados como finas camadas de recobrimento ou incorporados ao filme óxido (ANSELME et al, 2000b).

O titânio é o biomaterial mais empregado na fabricação dos implantes dentários. LEVENTHAL, em 1951, já destacava as propriedades deste metal em contato com tecido ósseo. O titânio é um metal altamente reativo, formando espontaneamente, em contato com o ar e eletrólitos aquosos, um filme fino e denso de óxido passivante em sua superfície. Esta reação produz então uma barreira para a dissolução do material. Embora importante, esta estabilidade química não é suficiente para determinar compatibilidade tecidual ao material. Entretanto, devem ser considerados os efeitos da corrosão destes produtos nas células. MAURER (1997) investigou os aspectos químicos e bioquímicos da adesão e proliferação celular na presença de diversos metais e os resultados demonstraram que a inibição do

crescimento de osteoblastos somente não ocorreu nos meios de cultura onde havia concentrações de titânio, nióbio, zircônio e tântalo, tendo o primeiro apresentado os melhores resultados.

Os eventos que levam a osseointegração de um implante no osso ocorrem principalmente na sua interface. O desenvolvimento desta interface é complexo e envolve diversos fatores. Estes incluem não somente fatores relacionados ao implante, como o material, forma, topografia, e química de superfície, mas também carga mecânica, técnica cirúrgica, e variáveis do paciente, como qualidade e quantidade de osso, e saúde geral (WENNERBERG, 1996; MISCH, 2000; SCHENK & BUSER, 2000). Uma das metas da pesquisa atual em implantodontia é o desenvolvimento de implantes que induzam uma regeneração controlada, guiada e rápida do tecido ósseo. HOWLETT et al (1994) e COOPER (2000) ressaltam que, mais especificamente, além de acelerar o fenômeno da cicatrização tecidual normal, os implantes devem apresentar uma matriz interfacial com uma composição e estrutura característica de osso, e esta matriz deve apresentar propriedades mecânicas adequadas. Estes resultados permitirão não somente uma rápida recuperação do paciente, mas também uma fixação primária estável entre o osso e implante que favoreceria um carregamento precoce ou imediato do implante. A direção destes estudos concentra-se no aproveitamento das propriedades biológicas de alguns materiais cerâmicos no recobrimento de implantes de titânio (WONG et al, 1995; SILVA, 1999), e em tratamentos físico-químicos que visam modificar a superfície para o favorecimento da osseointegração (KIM et al, 1997; BUSER et al, 1998; SHIRKHZANZADEH, 1998; BUSER et al, 1999).

A afinidade por células é uma importante propriedade dos biomateriais. As aplicações destes biomateriais exigem contato íntimo com os tecidos circunvizinhos e dependem desta união para poderem funcionar corretamente (GLANTZ et al, 1999). Outros biomateriais, como os de aplicação cardiovascular, necessitam apresentar total falta de afinidade celular para não causar efeitos colaterais indesejados, como atividade trombogênica. Desta forma, a compreensão do fenômeno da adesão celular torna-se fundamental para o desenvolvimento de biomateriais. ALBREKTSSON et al (1989) e ESPÓSITO et al (1999) ressaltam que os biomateriais empregados nos

implantes dentários devem apresentar alta afinidade celular para que a osseointegração ocorra de forma adequada e permita ao implante suportar as tensões geradas durante as funções do sistema estomatognático.

A adesão celular está envolvida em vários fenômenos como na embriogênese, na manutenção da estrutura tecidual, na cicatrização de feridas, na resposta imune, em metástases e na integração tecidual aos biomateriais (EDELMAN, 1983; RATNER et al, 1996; ANSELME, 2000). A biocompatibilidade dos biomateriais está estreitamente relacionada com o comportamento celular durante a adesão a sua superfície. O termo “adesão”, no âmbito dos biomateriais, abrange fenômenos distintos, tais como: a fase de fixação que ocorre rapidamente e envolve eventos curtos como ligações físico-químicas entre células e materiais por meio de forças iônicas e de van der Waals, e a fase de adesão, cuja cinética é mais lenta, envolvendo várias moléculas biológicas como proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e proteínas citoesqueléticas.

Quando um material é implantado em um organismo vivo, ele é exposto a células e a uma gama de moléculas e íons que determinarão o curso dos eventos interfaciais. Um dos primeiros eventos a ocorrer é a adsorção de proteínas sobre o substrato que acontece de 10 a 60 segundos após o contato, muito antes que quaisquer células tenham acesso a sua superfície (BAGAMBISA et al, 1994). Isto significa que qualquer célula que interaja com o substrato, o fará de forma indireta, através de uma camada protéica adsorvida (fig. I.1). Esta camada será formada por grupos diferentes de moléculas protéicas, de acordo com o tipo de material implantado. O contingente de proteínas adsorvidas depende das propriedades físicas e eletroquímicas da superfície, e determinará que tipos de células irão interagir com o substrato. Um grupo de moléculas que será fundamental nos eventos pós-implantação é composto pelas proteínas de adesão. Em nível molecular, as proteínas de adesão são responsáveis pela ancoragem, fixação, espalhamento, adesão e migração celulares. O contato da célula com o substrato é mantido pela formação de sítios de adesão subcelulares, espacial e morfológicamente definidos, denominados de adesões focais. Estes sítios estão de 15 a 30 nm distantes do substrato e apresentam um comprimento de 2 a 20 μm e uma largura de 250 a 500nm (EDELMAN, 1983).

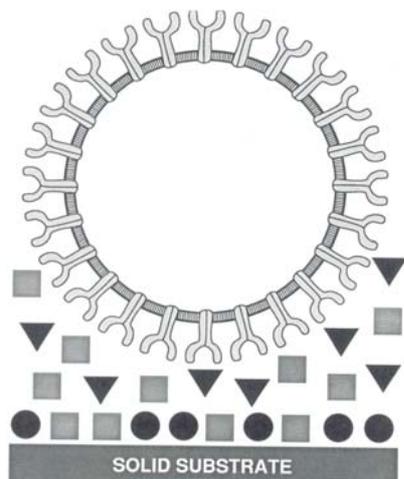


Figura I.1 – Interação da célula com um substrato sólido através de uma camada de proteínas adsorvidas. O diagrama mostra as proteínas extracelulares como triângulos e quadrados se relacionando com os receptores (círculos) da membrana celular (RATNER et al, 1996).

Entre os fatores reconhecidamente importantes para o estabelecimento da osseointegração (material empregado, desenho do implante, qualidade de superfície, condições ósseas, técnica cirúrgica e condições de carga do implante), a qualidade de superfície, atualmente, é a área responsável pela maior quantidade de produção científica em Implantodontia Oral. Este direcionamento das linhas de pesquisa justifica-se por reconhecer o importante papel que as propriedades superficiais desempenham no sucesso da osseointegração (WENNERBERG, 1996; LAMPIN et al, 1997). A hipótese de se comercializar um sistema de implantes liso e polido, cilíndrico justaposto ou rosqueado, sem qualquer tipo especial de tratamento superficial, está totalmente descartada. Diversos trabalhos publicados demonstraram que a qualidade e a quantidade de osseointegração, assim como sua manutenção ao longo dos anos, é superior nos implantes que receberam algum tipo de tratamento superficial (ANSELME et al, 2000a; BAIER et al, 1984; BOWERS et al, 1992; BUSER et al, 1998; HANSON & NORTON, 1999; HURÉ et al, 1996; WENNERBERG, 1996).

Figura I.2 – Exemplos de implantes com diferentes desenhos de roscas. Da esquerda para direita: AstraTech (Mölnadal, Suécia), ITI Bonelit (Institut Straumann, Waldenburg, Suíça) e Brånemark (Nobel Biocare, Gotemburgo, Suécia).

A forma cilíndrica, com ou sem roscas, consagrou-se como o desenho de escolha na fabricação dos implantes dentários. Os sistemas livres de roscas fundamentam sua fixação cirúrgica primária na justaposição friccional do implante na loja óssea preparada. Os sistemas com roscas são fixados pelo rosqueamento do implante e possuem diferentes formatos e tamanhos de roscas (fig. I.2). BAIER et al (1984), SYKARAS et al (2000) e ELLINGSEN (2000) destacam que a seleção do desenho das roscas reflete a necessidade de oferecer ao implante uma distribuição mais controlada das tensões aplicadas e favorece uma estabilização cirúrgica primária. Entretanto, ressaltam que estas características macroscópicas não atuam de forma direta no fenômeno de adesão celular. Os tratamentos superficiais empregados proporcionam uma alteração microscópica capaz de favorecer e otimizar esta adesão. O que se espera com estes tratamentos é criar uma microrrugosidade superficial ideal que promova um aumento da retenção mecânica e que otimize a resposta tecidual (JONES, 2001). De um modo geral os diversos tipos de superfícies encontrados nos biomateriais de uso clínico são categorizados como lisos e rugosos. Entretanto, esta classificação dicotômica, segundo WENNERBERG & ALBREKTSSON (2000), esbarra em duas considerações importantes: as superfícies usinadas (ou maquinadas)

não são lisas ou polidas e as superfícies rugosas podem variar muito, tanto em tipo quanto em quantidade de rugosidade.

O fator desencadeante das pesquisas que buscavam desenvolver superfícies texturizadas decorreu dos diversos relatos científicos que acusavam altos índices de fracassos associados aos tratamentos com implantes de superfície lisa. Com frequência, estes trabalhos associavam estes altos índices de fracasso com regiões dos maxilares que apresentavam densidade óssea desfavorável (osso tipo IV).

JAFIN & BERMAN (1991) observou em estudo retrospectivo que ao instalar implantes de superfície lisa em maxilares com osso tipo I, II e III, obteve sucesso em 97% dos casos. Por outro lado, os resultados obtidos em regiões de rebordo alveolar com cortical delgada e densidade baixa (tipo IV), foram significativamente desfavoráveis, em torno de 65%. Outros autores, como QUIRYNEN et al (1992) apresentaram resultados similares em estudos semelhantes.

BRUNETTE (1988) realizou um trabalho de revisão sobre os efeitos da topografia da superfície de diferentes biomateriais no comportamento celular *in vitro* e observou a ocorrência de aposição celular, de forma indistinta, nos diferentes materiais com superfícies lisas ou rugosas. Entretanto, concluiu que apesar da texturização da superfície não influenciar no fenômeno da aposição óssea, esta desempenha papel importante no percentual de tecido ósseo que interage com o biomaterial.

WILKE et al (1990) em estudo *in vivo* observou resultados favoráveis em ensaio de remoção por desrosqueamento de implantes submetidos a diferentes tratamentos de superfície colocados em tíbias de carneiro. Após o período de osseointegração, as forças de torque necessárias para a remoção foram analisadas e pôde-se concluir que os implantes tratados com jateamento de pequenas partículas de óxido de alumínio e posterior ataque ácido (SLA) demonstravam valores 5 a 7 vezes maiores que os demais. Os autores ressaltam que tanto o jateamento quanto o ataque ácido influenciaram nos resultados.

Em estudo similar, BUSER et al (1991) relatam que implantes com superfícies rugosas apresentam maiores taxas de contato osso-implante e que o tratamento químico determinava influência importante em relação a este aspecto.

A forma geométrica de qualquer superfície normalmente é referida como sua textura superficial. Esta textura é composta de características definidas como rugosidade, ondulação e forma. De uma forma geral, somente a característica de rugosidade é quantitativamente analisada em uma superfície, sendo aplicado um filtro com frequência de corte espacial (“cut-off”) para remover mecânica, elétrica ou digitalmente suas ondulações ou formas.

A diferença básica entre rugosidade e ondulação consiste no comprimento de onda espacial ou distância entre os picos, definida pela norma ISO 11562. Segundo STOUT & BLUNT (1995), uma grande dificuldade encontrada nesta definição é que o limite de separação destes dois parâmetros é arbitrada de acordo com situações específicas.

II.1 - Tratamentos de Superfícies

II.1.1 - Jateamento

Tornar uma superfície de um implante rugosa objetiva aumentar a aposição mecânica do tecido ósseo. Um dos métodos normalmente utilizados é o jateamento da superfície com partículas duras de determinados óxidos. Estes podem ser a base de Ti, Al ou Si (fig. II.3). Após o jateamento algumas partículas podem ficar aprisionadas nas rugosidades criadas. Recomenda-se então um tratamento químico com ácido para remover possíveis impurezas que venham posteriormente prejudicar o processo de osseointegração. Além disso, este tratamento químico promove uma uniformização das rugosidades criadas pelo jateamento, o que permite uma padronização experimental (DINIZ et al, 2001).



Figura II.3 – Superfície de implante AstraTech (Möln dal, Suécia) tratada por jateamento com dióxido de titânio.

II.1.2 - Aspersão térmica

Existem duas técnicas de aspersão térmica de um pó sobre um substrato metálico. Uma utiliza como fonte de calor uma tocha de oxigênio a alta velocidade para acelerar as partículas em direção ao substrato. A outra usa como fonte uma tocha de plasma (gás ionizado). A técnica de aspersão térmica a plasma é o processo mais empregado na indústria. Neste processo, o gás argônio é ionizado ao passar pela zona de descarga de alta temperatura, gerada por um arco de corrente formado entre um anodo de cobre e um catodo de tungstênio. Esta técnica está sujeita a algumas variáveis, tais como: mistura gasosa empregada, corrente, distância entre catodo e anodo, distância do substrato à tocha de plasma, e a posição em que as partículas entram no plasma. Apesar da alta temperatura gerada pelo processo, o substrato mantém-se a uma temperatura média de 300° C, o que não impõe nenhum tipo de alteração microestrutural e conseqüente alteração mecânica. Os pós utilizados para aspersão podem ser metálicos ou cerâmicos. A hidroxiapatita é o pó cerâmico mais utilizado e as partículas empregadas são da ordem de 20 a 40 μ m (SILVA, 1999).

II.1.3 - Tratamento químico com ácido

Esta técnica, além de proporcionar uma rugosidade e ativação da superfície, determina uma limpeza do substrato removendo impurezas inclusas deixadas por técnicas de jateamento e descontaminando a superfície. Os ácidos mais utilizados são o ácido fluorídrico e o nítrico. O ataque químico cria na superfície uma rugosidade controlada e uniforme, podendo regularizar rugosidades criadas por outras técnicas. Um exemplo disso é o emprego de uma solução de HF + H₂O₂ que controla a formação de uma camada estável de óxido, ativando sua superfície (KLOKKEVOLD et al, 1997).

Tabela II.1 – Relacionamento da textura do biomaterial com os diferentes tipos de tratamentos de superfície (adaptado de RATNER et al, 1996)

| TEXTURA | TRATAMENTO |
|---------------------------------------|---|
| Rugosa | <ul style="list-style-type: none"> • Jateamento com Al₂O₃ ou TiO₂ com diferentes granulometrias • Ataque iônico |
| Porosa | <ul style="list-style-type: none"> • Aspersão térmica de metal ou cerâmica. • <i>Sintering metal beads</i> • <i>Weaving textiles</i>. • Trocas químicas hidrotérmicas. • Bombardeio iônico |
| Fibrosas | <ul style="list-style-type: none"> • Difusão de fios de Ti ou cerâmica na superfície sob alta pressão e temperatura. |
| Usinadas | <ul style="list-style-type: none"> • Roscas, degraus, reentrâncias. |
| Microusinadas ou microatacadas | <ul style="list-style-type: none"> • Usinagem mecânica e/ou condicionamento com ácido |

O recobrimento de implantes osseointegrados metálicos com materiais bioativos visa favorecer o contato osso-implante, pelas ligações físico-químicas. Um dos mais materiais bioativos de recobrimento mais empregados pela indústria é a hidroxiapatita. Embora muitos bons resultados clínicos tenham sido relatados, há uma série de intercorrências associadas a este material. FUJIBAYASHI et al (2001) relataram problemas advindos da porosidade, baixa resistência à fadiga, degradação, e destacamento da camada de hidroxiapatita, aplicada por plasma-spray, a longo prazo e sua baixa aderência ao substrato metálico durante a implantação. BLOEBAUM et al (1994) relataram que partículas de HA se destacaram do substrato (implante de quadril) durante a cirurgia e moveram-se para o interior da articulação, tendo provocado seu desgaste.

Outras formas de se proporcionar bioatividade à superfície têm sido relatadas na literatura. Uma das mais desenvolvidas é pela formação de uma camada de óxido de titânio, que apresenta comportamento similar ao da hidroxiapatita (KIM et al, 1996). Pela perspectiva da engenharia de materiais, o titânio apresenta-se como um excelente material para este propósito, pois se pode variar sistematicamente suas propriedades de superfície. O titânio forma naturalmente uma fina camada de óxido em contato com o ar, mas sua espessura, morfologia, topografia, e composição química podem variar em larga escala.

A composição química dos óxidos de titânio é, na maioria dos casos, principalmente TiO_2 . Óxidos preparados eletroquimicamente podem conter impurezas devido à contaminação dos eletrólitos usados. A espessura da camada de óxidos em implantes de titânio, produzidos por usinagem, é da ordem de 2 a 6 nm, dependendo do seu método de esterilização (LARSSON, 2000). Camadas mais espessas podem ser obtidas por tratamento térmicos ou eletroquímicos (LARSSON et al, 1994).

A morfologia e microestrutura da camada de óxido dependem muito da microestrutura do metal sobre o qual ele se forma. As superfícies usinadas e polidas apresentam uma camada amorfa, plasticamente deformada que se estende alguns micrômetros para o interior do material. O eletropolimento ou outro tratamento ácido remove esta camada amorfa, resultando em superfície com terminações policristalinas

em que a estrutura de grãos do material pode ser claramente observada. Os filmes óxidos mais finos apresentam uma morfologia homogênea e regular. Óxidos térmicos e anódicos mais espessos, por outro lado, são mais heterogêneos e consistem de áreas distintas com diferentes porosidades (LAUSMAA et al, 1986).

O tamanho e a distribuição das diferentes áreas dos óxidos se relacionam com a morfologia dos grãos do substrato, o que provavelmente reflete que grãos com diferentes planos cristalinos promovem a formação de diferentes morfologias de óxidos. Os óxidos térmicos (<20nm) e anódicos (40nm) finos são essencialmente não-cristalinos. Os implantes usinados também apresentam uma camada de óxido não-cristalino e homogêneo. No entanto, à medida em que a camada de óxido se espessa, ela se torna mais cristalina (ELLINGSEN, 1998)

O controle na preparação das superfícies e a manutenção da sua qualidade determinam uma demanda crescente na excelência dos métodos de caracterização (ELLINGSEN, 2000). Diversos métodos têm sido usados para este propósito. A tabela II.2 mostra os principais métodos utilizados para caracterização de superfícies, relacionando suas profundidades de análise e suas resoluções espaciais.

Tabela II.2 – Métodos de caracterização da superfície de biomateriais
(VON RECUM, 1999).

| MÉTODO | PROFUNDIDADE | RESOLUÇÃO | SENSIBILIDADE | CUSTO ⁷ |
|-----------------------|--------------|-------------|--|--------------------|
| Ângulo de contato | 3 – 20 Å | 1 mm | Muito ou pouco dependente da química de superfície | \$ |
| ESCA ¹ | 10 – 250 Å | 10 – 150 µm | 0.1 Atom % | \$\$\$ |
| AES ² | 50 – 100 Å | 100 Å | 0.1 Atom % | \$\$\$ |
| SIMS ³ | 10 Å - 1µm | 100 Å | Muito alta | \$\$\$ |
| FTIR-ATR ⁴ | 1 – 5 µm | 10 µm | 1 Mol % | \$\$ |
| STM ⁵ | 5 Å | 1 Å | Átomo isolado | \$\$ |
| SEM ⁶ | 5 Å | 40 Å | Alta, mas não quantitativa | \$\$ |

1 - Espectroscopia de elétrons para análise química

2 - Espectroscopia de elétrons Auger

3 - Espectroscopia de massa iônica secundária

4 - Espectroscopia por raios infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) – Reflectância total atenuada (ATR)

5 - Microscopia de varredura por tunelamento

6 - Microscopia eletrônica de varredura

7 - \$, acima de US\$ 5000; \$\$, US\$ 5000-100,000; \$\$\$, > US\$ 100,000

Os métodos de caracterização de superfície englobam as técnicas metalúrgicas e biológicas. A primeira inclui técnicas de análise topográfica, microanálise e química analítica. A segunda inclui as técnicas de cultura de células e de líquido corporal simulado.

II.2 – Técnicas de caracterização de superfícies

II.2.1 - Caracterização metalúrgica

II.2.1.1 - Ângulo de contato

A superfície de qualquer material é especialmente mais reativa que seu interior devido ao fato que os átomos externos não apresentam suas valências totalmente preenchidas, gerando assim a chamada energia livre de superfície. Como a estrutura e composição da superfície são diferentes de seu interior, os métodos de análise do corpo de um material não se adequam para caracterizar sua superfície. Outra particularidade da superfície é a certeza de contaminação imediata sob condições atmosféricas normais, o que pode resultar em uma situação favorável ou não. Finalmente, a estrutura superficial de um material é freqüentemente “móvel”. O movimento de átomos e moléculas perto da superfície em resposta ao ambiente externo é sempre significativo. Em resposta a um ambiente hidrofóbico, mais componentes hidrofóbicos podem migrar para a superfície do material. Por outro lado, em resposta a um ambiente aquoso, a superfície pode reverter sua estrutura e grupos polares exteriorizam-se para interagir com as moléculas polares de água (VON RECUM, 1999).

O método de ângulo de contato (θ) é usado para medir a energia de superfície de um corpo sólido em contato com um líquido em uma dada atmosfera. A energia de superfície é um importante parâmetro na interação biológica dos biomateriais e está diretamente relacionada com sua capacidade de molhamento. Este método é de baixo custo e de fácil operação após algum treinamento. Ele oferece uma caracterização inicial da hidroflicidade ou hidrofobicidade da superfície e possibilita uma visão de como o material analisado irá interagir com o meio.

Neste método, gotas de líquidos com diferentes tensões superficiais são colocadas sobre um sólido e seus ângulos medidos. Uma correlação linear entre as

tensões superficiais dos líquidos (γ_{lv}) x ângulos de contatos medidos, permite a obtenção do valor da tensão crítica superficial (γ_C) na qual o ângulo de contato é zero.

Experimentalmente, existe uma série de maneiras de se medir o ângulo de contato entre um líquido e a superfície de um material sólido. O método da gota líquida sobre a superfície e o uso de um equipamento chamado goniômetro, o método de captação e aprisionamento da bolha de ar, o método da capilaridade, são exemplos pelos quais pode-se medir θ .

O ângulo de contato pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta ,$$

onde, γ_{sv} é a energia de superfície, γ_{sl} é a tensão interfacial entre o sólido e o líquido, e γ_{lv} é a tensão entre o líquido e o vapor (ar).

II.2.1.2 – Perfilometria

Os métodos de perfilometria ou rugosimetria baseiam-se na varredura de uma superfície por uma sonda que quantifica sua rugosidade através da medição da altura dos picos em relevo. As sondas podem utilizar-se de pontas de diamante (agulhas) que contactam a superfície ou de sensores ópticos (microscopia de varredura confocal a laser – CLSM) que além de apresentarem uma maior sensibilidade, possibilitam uma análise tridimensional (WENNERBERG et al, 1996), desde que se disponha de softwares específicos e material para calibração. Uma superfície é caracterizada em termos de rugosidade aritmética média (R_a), rugosidade média quadrática (RMQ ou R_q), e altura máxima pico/vale (R_t ou PV). Os instrumentos de contato não podem ser usados em implantes com roscas, já que sua superfície irregular impede o percurso normal da ponta.

Os principais perfilômetros 3D podem ser classificados em termos do mecanismo de medida em “por contato” e “sem contato”:

A - Por contato

Um sensor com ponta de diamante da ordem de 2-10 μ m varre uma área sob o efeito de uma pequena força (usualmente da ordem de 0,5 mN). O sensor percorre com elevada precisão o plano XY da amostra e avalia a altura da superfície. No estudo de implantes esta técnica está restrita a implantes não-rosqueados. UNGERSBÖCK & RAHN (1994) sugerem que a combinação de MEV com perfilometria mecânica por contato é a melhor escolha. A varredura vertical se situa em 2mm e a resolução vertical é na ordem de nanômetros.

B - Sem contato

Os principais tipos são detecção de foco, laser confocal e interferometria de luz branca.

Detecção de Foco

Um feixe de luz de aproximadamente 1 μ m de diâmetro varre a superfície. O foco é determinado pela intensidade da luz refletida. Apresenta boa excursão vertical (~500 μ m) o que é uma vantagem para superfícies recobertas por plasma spray. Entretanto, pode apresentar pequenas reflexões que geram uma super estimativa da rugosidade em alta frequência espacial. A resolução vertical é da ordem de 5 nm.

Laser Confocal

Um laser foca ponto a ponto o reflexo do laser sobre a superfície. Possui pequena extensão lateral (2 x 2 mm) o que o torna adequado para análise de implantes rosqueados. A resolução vertical é ordem de 6 nm.

Interferometria com Luz Branca

Um feixe de luz é dividido em dois através de espelhos e lentes. Um deles reflete sobre uma superfície de referência e o outro incide sobre a amostra. As irregularidades da amostra causam o aniquilamento de algumas ondas de luz e o reforço da intensidade de outras, causando o aparecimento de franjas. A altura da superfície é proporcional à intensidade destas franjas. Permite medir áreas próximas a 200 x 200 μ m com alturas de até 2 mm. A resolução vertical atinge valores tão baixos quanto 0,1 nm. Porém uma inclinação da área sob estudo de apenas três graus

dificulta a medida de superfícies pouco reflexivas. Ainda assim, os flancos de implantes orais podem ser avaliados por esta técnica.

Os parâmetros mais relevantes em 3D foram compilados por STOUT & BLUNT (1995) e WENNERBERG *et al.* (2000) e a formulação matemática pode ser obtida em WENNERBERG (1996) e DAGNALL (1986). Uma breve descrição dos parâmetros mais fundamentais na análise 3D será feita a seguir:

- Parâmetros de amplitude (dependem apenas das alturas no eixo vertical):

Sa – média aritmética do módulo das alturas, tem dimensão linear de μm . Equivale a Ra em 2D, entretanto não consta da lista mínima sugerida por STOUT & BLUNT (1995).

Sq – raiz quadrada dos desvios médios, tem dimensão linear de μm . Representa o desvio padrão das alturas de picos e vales de toda a área analisada. Apresenta grande significado teórico, influenciando diretamente no cálculo dos outros parâmetros, tais como assimetria (Ssk), curtose (Sku) e medida da isotropia da superfície. Possui maior sensibilidade que Sa em relação aos valores extremos de picos e vales, sendo normal apresentar para uma mesma medida, correspondente à mesma área, valores superiores que Sa, em geral superior em 10%.

Sz – valor médio dos dez pontos extremos, tem dimensões lineares de μm . Calculado a partir dos cinco picos mais elevados e pelos cinco vales mais baixos da amostra, constituindo ao todo de dez pontos. Este valor se reduz quando a superfície se desgasta em serviço, pois os picos mais elevados são os primeiros a se desgastarem.

Ssk – assimetria da superfície, adimensional. Indica a média da distribuição em relação ao plano médio. Um valor nulo revela igual contribuição de picos e vales na construção da superfície. Valores positivos estão relacionados à existência de mais e maiores picos que vales e vice-versa para valores negativos. Fenômenos que dependem de ancoragem nos vales podem estar diretamente relacionados com esta propriedade.

Sku – curtose, adimensional. Representa a distribuição da acuidade do relevo. O valor de referência numérica três representa uma distribuição semelhante à de

Gauss, ou seja, normal. Valores superiores a três são típicos de superfícies com muitos picos e vales.

- Parâmetros espaciais (dependem apenas da posição dos picos e vales no plano X e Y):

Sds – densidade dos picos sobre a superfície, picos/mm². Considera para este cálculo picos que sejam os mais elevados dentre os oito picos vizinhos.

Str – índice de textura, revela o quanto a superfície é isotrópica em relação às direções X e Y. Varia de 0 a 1, sendo 1 uma superfície totalmente isotrópica e 0 uma completamente anisotrópica (propriedades variam com a direção considerada).

Std – direção da textura principal, medida em graus. Este parâmetro indica a direção preferencial da anisotropia no plano XY, determinando, por exemplo, a direção em que sulcos ocorrem na superfície.

- Parâmetros híbridos (dependem de valores no eixo Z e da posição no plano XY):

SDq – raiz quadrada da média das inclinações, medida em graus. Traduz a inclinação efetiva da superfície.

Ssc – curvatura ou forma média do relevo.

Sdr – razão de área. É obtida dividindo-se a área retificada da amostra pela área do plano XY. É sempre igual ou maior que um.

Sal – comprimento de autocorrelação, indica a importância dos comprimentos das oscilações da superfície. Quanto maior significa que as oscilações de maior comprimento são mais relevantes na formação da topografia.

II.2.1.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV consiste de um feixe de elétrons que é acelerado em direção a uma superfície e os elétrons refletidos pela superfície são coletados por um detector para avaliação. Substratos com superfícies não-condutoras necessitam ser recobertos com uma fina camada de ouro, o que caracteriza o método como destrutivo para a amostra. O nível de detecção lateral é cerca de 5 Å e é dependente do diâmetro do feixe de

elétrons e da corrente do feixe. A MEV é freqüentemente empregado em pesquisas na área de Implantodontia para analisar morfológicamente a superfície dos implantes, dada a sua excelente profundidade de foco.

As interações do feixe de elétrons com a amostra geram fótons, elétrons Auger, elétrons retroespalhados e secundários, e ainda emitem raios-X característicos. Quando se acopla um detector de Raios-X ao MEV é possível fazer uma análise quanto a sua energia (EDS) ou comprimento de onda (WDS), sendo a primeira, a espectroscopia por energia dispersiva (EDS), a mais utilizada. Os elementos constituintes da amostra são identificados através de uma comparação com padrões pré-estabelecidos, fornecendo assim, uma análise química qualitativa e semi-quantitativa dos elementos presentes numa dada região da amostra (STEINEMANN, 1998; SILVA, 1999).

II.2.1.4 – Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios-X (XPS) ou Espectroscopia de Elétrons para Análise Química (ESCA)

Espectroscopia e espectrometria são terminologias empregadas nas técnicas que envolvem a utilização de luz como meio de análise. O instrumento utilizado para este fim é denominado espectrômetro. Quando se utiliza de um fotomultiplicador para detecção é chamado de espectrofotômetro e a técnica de espectrofotometria.

Esta técnica consiste em bombardear a amostra com um feixe de raios-X que fará com que os elétrons da camada de valência sejam ejetados. A análise se dá pela medição da energia despreendida pela transição dos elétrons das camadas mais internas que ocuparão os lugares vagos. Como apresenta uma pequena profundidade de análise, se restringe a fornecer informações das interações da amostra com o meio ou identificar finas camadas de óxidos presentes. O emprego desta técnica é fundamental para o estudo do comportamento do filme de óxido do titânio e sua interação com a camada protéica (SILVA, 1999).

II.2.1.5 – Outras técnicas

Diversas outras técnicas têm sido empregadas na caracterização de superfícies de implantes, dentre as quais pode-se citar a microscopia eletrônica de tunelamento (MVT) e a microscopia de força atômica (AFM).

Microscopia Eletrônica de Varredura por Tunelamento (MET)

É aplicada uma diferença de potencial a uma ponta fina de tungstênio ou platina que é mantida a uma distância constante de poucos espaços atômicos sobre a superfície. Uma pequena corrente de tunelamento de elétrons flui entre a ponta e a amostra. A corrente diminui se a distância entre a ponta e a superfície aumenta. Esta técnica caracteriza-se por evidenciar detalhes a nível atômico e processos de adsorção e por permitir uma observação mais localizada. A utilização desta técnica na análise de biomateriais oferece como vantagens a possibilidade de trabalhar em meios líquidos e de operar à pressão atmosférica ambiente. Como desvantagem, as superfícies devem ser as mais planas possíveis (KELLER et al, 1994).

II.2.2 – Caracterização biológica

Os testes disponíveis para avaliar a biocompatibilidade de materiais de uso biomédico envolvem ensaios *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, por questões práticas e éticas, os biomateriais devem seguir um protocolo de testes que os obrigam a serem avaliados primeiramente *in vitro*. As avaliações sob condições *in vitro* oferecem informações rápidas, e de baixo custo, sobre as interações biológicas entre fluidos simulados ou células e o substrato.

II.2.2.1 – Cultura de células

As técnicas de cultura de células têm sido intensamente usadas na área de pesquisa e desenvolvimento de biomateriais nas últimas décadas. A questão sempre levantada é se os ensaios *in vitro* são a real representação do que ocorre *in vivo*, que é um ambiente de maior complexidade. Embora os resultados positivos verificados em testes *in vitro* necessitem quase sempre de confirmação *in vivo*, resultados negativos freqüentemente descartam a sua experimentação em animais. Desta forma, a utilização racional dos ensaios *in vitro* minimiza a utilização de animais em pesquisas, o que é um objetivo sempre desejado. Mesmo os ensaios em animais não oferecem resultados totalmente confiáveis quanto a sua utilização em seres humanos, mas proporcionam uma margem de segurança bastante aceitável (VON RECUM, 1999). A utilização de animais requer uma infraestrutura física e de pessoal complexa como biotério para manutenção dos animais, ambiente cirúrgico, médico veterinário, etc, gerando um custo elevado. Além disso, o processo de instalação cirúrgica dos implantes determina um período de espera necessário para a ocorrência da osseointegração, para então submetê-los ao ensaio mecânico.

As vantagens experimentais óbvias com os estudos do comportamento de osteoblastos *in vitro* incluem o isolamento e a natureza homogênea do sistema osteoblástico, um curso de eventos cronológicos definido, custos relativamente limitados, o crescimento reprodutível de múltiplas culturas, e uma morbidade e mortalidade animal reduzidas, especialmente quando linhagens de células clonadas são utilizadas. As variáveis experimentais podem ser mais facilmente controladas e as culturas de células proporcionam análises bioquímicas e moleculares mais práticas. Outras vantagens podem ser relacionadas, tais como a utilização de grandes superfícies para análise e o emprego de diversos métodos de caracterização da camada celular e de sua interface (ESPÓSITO et al, 1999; LAMPIN et al, 1997).

As limitações do emprego das culturas de células osteoblásticas advêm da própria impossibilidade de se modelar a osseointegração *in vitro*. A reprodução do ambiente *in vivo*, com a interferência dos fenômenos fisiológicos associados (inflamação, neovascularização, contato com outros tipos de células, etc) é inviável.

A tabela 3 relaciona as principais vantagens e limitações do emprego de cultura de células para caracterização biológica de biomateriais.

Tabela II.3 – Principais vantagens e limitações observadas na utilização de culturas de células na caracterização biológica de biomateriais (RATNER, 1996).

| VANTAGENS | DESVANTAGENS |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Reprodutibilidade do ensaio com uma seqüência de eventos estabelecida. • Possibilidade de emprego dos diferentes métodos de avaliação. • Possibilidade de isolamento de variáveis. • Possibilidade de produção de extensa área de cultura celular, proporcionando bastante material para análise. | <ul style="list-style-type: none"> • Limitações quanto à análise de materiais opacos. • As células não estão sujeitas às forças biomecânicas que ocorrem <i>in vivo</i>. • A necessidade de suplementos pode alterar o comportamento das células, interferindo nos resultados. • Ausência de fenômenos fisiológicos interagindo com a amostra. |

Os principais teste *in vitro* são os testes em líquido corporal simulado (SBF) e os testes de cultura de células. Neste último, pode-se avaliar todos os fenômenos que ocorrem ao se relacionar células com um determinado substrato (AHMAD et al, 1999; ANSELME et al, 2000a; COOPER et al, 1999). Diversas metodologias podem ser empregadas para analisar a citotoxicidade, a adesão celular, a proliferação celular e síntese protéica, e a mineralização da matriz óssea e a formação da interface em culturas de células osteoblásticas (RATNER, 1996). Um teste qualitativo que avalia a adesão celular à um substrato utiliza o MEV para observação da morfologia dos processos celulares ancorados às superfícies (ANSELME, 2000).

Um dos índices quantitativos empregados para avaliar a qualidade da adesão célula-biomaterial é sua resistência mecânica (HANSSON & NORTON, 1999; REZANIA et al, 1997; TRUSKEY & PIRONE, 1990; WONG et al, 1995). Como a força que atua na interface implante dentário/osso é predominantemente de cisalhamento, a célula é induzida ao desprendimento durante o funcionamento do

implante. Desta forma, os métodos para avaliação da adesão celular devem considerar a resistência ao cisalhamento das células. Alguns métodos foram desenvolvidos para avaliar quantitativamente a adesão celular, *in vitro*, do tipo célula/célula ou célula/substrato sob condições de um fluxo (tabela II.4). Outros métodos utilizam dispositivos mecânicos como micropipetas e microcantileveres para esta avaliação (ANSELME, 2000; ATHANASIOU et al, 1999). Os ensaios *in vivo* utilizam dispositivos que removem implantes inseridos em cobaias e avaliam a força necessária para romper sua fixação ao osso. Nos casos de implantes cilíndricos, a força aplicada apresenta um sentido paralelo ao longo eixo do implante (“pull-off test”) (BERZINS et al, 1997). O implante rosqueado, devido a sua forma, requer um ensaio do tipo desrosqueamento, verificando o torque necessário para mover o implante (“release torque test”) (BUSER et al, 1998).

Tabela II.4 – Ensaio de adesão célula-célula e célula-substrato (MORGAN & YARMUSH, 1999).

| Método | Princípio |
|-------------------------------------|---|
| Stampler-Woodruff | Suspensão de leucócitos repousando sobre espécime de tecido rotatório (não-estático) |
| Ensaio de placas de união | Suspensão de leucócitos |
| Ensaio de centrifugação | Células em placas ELISA seladas são centrifugadas a velocidades variadas |
| Visosímetro de cone e placa | Suspensão de células expostas a cisalhamento uniforme |
| Viscosímetro Couette | Suspensão de células expostas a cisalhamento uniforme |
| Tubo capilar | Suspensão de células expostas a variáveis forças de cisalhamento; exposição de células fixadas a uma força de cisalhamento definida; alguns equipamentos utilizam um circuito recirculante. |
| Câmara de fluxo radial | Células fixadas em substrato adesivo experimentam uma tensão de cisalhamento fluida baseada na posição do centro do disco |
| Câmara de fluxo de placas paralelas | Células fixadas em substrato adesivo experimentam uma tensão de cisalhamento definida |

II.2.2.1 – Testes *in vitro* com fluidos simulados

Os materiais bioativos são assim denominados por apresentarem a propriedade de formar espontaneamente uma camada de apatita biologicamente ativa (“bonelike apatite”) na sua superfície quando em contato com fluidos corpóreos, e unir-se ao tecido ósseo através dessa camada. Acredita-se então, que o princípio essencial para que um biomaterial se una ao tecido ósseo é a formação desta camada de apatita biológica em sua superfície (KOKUBO et al, 2000; SENA et al, 2003).

A formação desta camada de apatita biológica *in vivo* pode ser estimada por meio de testes *in vitro* com o emprego de soluções simuladoras de plasma humano. Estas soluções são acelulares e visam reproduzir a mesma concentração iônica do plasma sanguíneo. Há diversas soluções empregadas com este propósito, cada uma utilizando reagentes químicos distintos. Como exemplos, podemos citar as soluções simuladora de fluido corpóreo (SBF), de Ringer, de Hanks, de Kokubo e outras. Para o controle do pH, é comumente empregado um agente tampão a base de tris-hidroximetilaminimetano (TRIS).

A solução SBF, empregada em vários trabalhos (KOKUBO et al, 1989 e 1990) apresenta alta concentração de íons Cl^- e baixa concentração de íons HCO_3^- em relação à composição do plasma humano. A apatita formada nesta solução é ligeiramente diferente em composição e estrutura da apatita biológica, tendo sido recentemente demonstrado por KIM et al (1999) que é rica em íons Cl^- e pobre em íons carbonato em relação à apatita óssea. Pra superar esta deficiência, KIM et al (2001) propuseram uma nova formulação (Kokubo revisada, R-SBF) de reagentes que igualasse a concentração iônica do plasma sanguíneo humano. Para isto, os autores substituíram o agente tampão TRIS por HEPES (2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etano ácido sulfônico), e o reagente 1M-HCl por 1M-NaOH. Além disso, foi introduzido o reagente Na_2CO_3 e as quantidades de NaCl e NaHCO_3 foram alteradas (tabela II.5).

Tabela IV.5 – Reagentes, com respectivas massas, presentes na formulação original da solução SBF e na solução R-SBF, proposta por KIM et al (2001).

| SBF | massa (g) | R-SBF | massa (g) |
|--|------------------|--|------------------|
| NaCl | 1,6074 | NaCl | 1,0807 |
| NaHCO ₃ | 0,0703 | NaHCO ₃ | 0,1473 |
| Na ₂ SO ₄ | 0,0146 | Na ₂ CO ₃ | 0,4073 |
| MgCl ₂ .H ₂ O | 0,1114 | Na ₂ SO ₄ | 0,0143 |
| KCl | 0,0454 | MgCl ₂ .H ₂ O | 0,1119 |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0,0622 | KCl | 0,0453 |
| CaCl ₂ | 0,0584 | K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0,0479 |
| TRIS | 1,2238 | CaCl ₂ | 0,0588 |
| HCl 1M | 4 ml | HEPES | 2,3857 |
| | | NaOH 1M | 0,3 ml |

As vantagens deste método de avaliação da bioatividade de materiais em comparação com os testes que empregam cultura de células e *in vivo*, são o baixo custo operacional, tempo dispensado para o ensaio e facilidade técnica. A cultura de células oferece dificuldades técnicas que exigem apurado domínio sobre o ensaio, enquanto que os testes *in vivo* necessitam da participação de profissionais de outras áreas para as intervenções cirúrgicas e tratamento dos animais. Entretanto os testes de imersão em solução SBF apresentam como limitante o fato do ensaio não ser normatizado. Assim o que se pode extrair do mesmo é apenas um indicativo da bioatividade de materiais a serem utilizados no corpo humano, esperando-se que haja uma correlação (sugerida na literatura, mas ainda não comprovada) entre esses resultados e a formação óssea *in vivo*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - Materiais

Foram obtidas 72 amostras medindo $10 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ e 6 amostras medindo $20 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$ a partir de uma chapa de titânio cp ASTM B265 grau 2. Para o recorte das chapas utilizou-se uma guilhotina mecânica (Newton, TP 1, Brasil). As amostras foram numeradas nas faces que não seriam tratadas e analisadas, com instrumento rotatório, para facilitar sua posterior identificação.

Todos as amostras sofreram dupla limpeza em acetona em um aparelho de ultra-som por 10 minutos, sendo lavadas abundantemente com água destilada após cada etapa e secadas, ao final, com ar quente por 30 segundos.

As amostras foram então divididas em 6 grupos relativos aos tipos de tratamentos que iriam receber. Um grupo não recebeu nenhum tipo de tratamento, permanecendo com sua superfície original, apenas com a usinagem realizada em sua fabricação, sendo nomeada CONDIÇÃO Ø. Cada um dos outros cinco grupos recebeu um tipo de tratamento diferente, sendo nomeados CONDIÇÕES 1 a 5.

A CONDIÇÃO 1 consistiu em submeter as chapas de titânio a um ataque químico, por imersão, com ácido fluorídrico (HF) a 4% por 60 segundos. As chapas foram então lavadas abundantemente com água destilada e em seguida atacadas com uma solução de ácido fluorídrico (HF) a 4% e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 8% por 15 segundos. Ao final, foram novamente lavadas com água destilada e secadas com ar quente por 30 segundos.

A CONDIÇÃO 2 consistiu em submeter as chapas de titânio a um ataque químico, por imersão, com uma solução aquecida a 55°C de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 48% e ácido clorídrico (HCl) a 18% por 60 segundos, sendo então lavadas abundantemente com água destilada e secadas com ar quente por 30 segundos. A solução foi colocada em um becher de vidro e este posicionado sobre uma placa de

aquecimento (Corning, Brasil) e mantida a uma temperatura de 55° C, sob verificação constante com auxílio de um termômetro.

A CONDIÇÃO 3 consistiu em submeter as chapas de titânio ao mesmo tratamento da CONDIÇÃO 2 e, em seguida, submetê-las à uma oxidação anódica com H₃PO₄ 8% em solução de 100ml de etanol por 10 min a 20V, em uma fonte de corrente contínua (Tecmol, Brasil), sendo então lavadas abundantemente com água destilada e secadas com ar quente por 30 segundos.

A CONDIÇÃO 4 consistiu em submeter as chapas de titânio ao mesmo tratamento da CONDIÇÃO 2 e, em seguida, submetê-las a um tratamento térmico, em forno elétrico (Quimis, Brasil), por 60 minutos a 450° C. A escolha da temperatura se baseou em testes preliminares onde se buscou atingir a formação de uma camada de óxido de espessura controlada da ordem de 80 nm. De acordo com os resultados obtidos por SUL et al (2002), há uma correlação direta entre a coloração do óxido de titânio e sua espessura. A cor violeta expressa uma espessura de 60 nm, enquanto a azul de 80 nm, a azul clara de 90 nm, a amarela azulada de 110 nm, a amarela de 120 nm, a laranja clara de 150 nm, a vermelha de 175 nm e finalmente a verde de 240 nm. Os testes preliminares mostraram, para o tempo fixo de 60 minutos, que a temperatura de 450°C foi a que resultou na camada desejada.

A CONDIÇÃO 5 consistiu em submeter as chapas de titânio ao mesmo tratamento da CONDIÇÃO 4 e, em seguida colocá-las em imersão em uma solução de fluoreto de sódio (NaF) a 40% durante 40 minutos, sendo então lavadas abundantemente com água destilada e secadas com ar quente por 30 segundos. O objetivo deste tratamento adicional foi avaliar o efeito do flúor na osseointegração. Segundo ELLINGSEN (1995), os íons fluoreto possuem a capacidade de interagir com os cristais de hidroxiapatita e formar hidroxiapatita fluoretada (Ca₁₀(PO₄)₆FOH) ou fluorapatita (Ca₁₀(PO₄)₆F₂), que apresentam maior cristalinidade e maior resistência à dissolução que a hidroxiapatita.

Os tempos de ataque com a solução ácida empregada nas condições 2 a 5 foram escolhidos após uma verificação prévia de perda de peso e espessura em 3

chapas de teste. Estas foram pesadas em uma balança analítica e suas espessuras medidas com um micrômetro digital antes e após o tratamento. Isto porque na eventual aplicação industrial destes tratamentos em superfícies de implantes seria importante manter a integridade das roscas ou suas corretas dimensões. Os testes preliminares mostraram que o tempo selecionado (60 segundos), ocasionou uma perda desprezível de apenas 0,25% em peso e desprezível em espessura. A tabela III.1 resume os tratamentos de superfície empregados.

Tabela III.1 – Resumo dos tratamentos realizados nas chapas de titânio

| CONDIÇÃO | TRATAMENTO |
|-----------------|---|
| Ø | Como recebida |
| 1 | Ataque 1: HF 4% (60 s) + (HF 4% + H ₂ O ₂ 8% (15 s)) |
| 2 | Ataque 2: HCl 18% + H ₂ SO ₄ 48% (55° C – 60 s) |
| 3 | Ataque 2 + oxid. anódica com H ₃ PO ₄ 8% em solução de etanol (20V/ 10 min) |
| 4 | Ataque 2 + tratamento térmico a 450 ⁰ C por 60 min |
| 5 | Ataque 2 + tratamento térmico a 450 ⁰ C por 60 min + NaF (40%/40 min) |

Das condições tratadas, a 1 e 2 visaram a criação de uma textura nas amostras, enquanto que as de 3 a 5 associaram a texturização com a formação de uma camada mais espessa de óxido.

III.2 - Metodologia

III.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As condições produzidas foram fixadas em uma base metálica para análise no MEV (Zeiss, DSM 940A, Alemanha). Foram obtidas imagens digitais das amostras analisadas com as seguintes magnitudes: 50x, 200x, 1000x, 3000x e 5000x.

Procedeu-se uma análise de espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS) em algumas amostras, para caracterização dos elementos presentes nas regiões analisadas.

III.2.2. Perfilometria

A análise de rugosidade foi realizada com um perfilômetro de contato (TaylorHobson, Inglaterra) com uma ponta de diamante de 2 μm . Para esta análise foi necessário usar chapas de titânio com dimensões de 20 x 10 x 1 mm^3 para viabilizar seu posicionamento no equipamento.

Uma área foi selecionada no centro da chapa para a realização da leitura pela ponta de diamante. Para a delimitação da área de leitura, confeccionou-se uma marcação prévia com o auxílio de um aparelho de teste de dureza Rockwell (WPM, Alemanha). A partir desta marcação, traçou-se uma área de 5 x 5 mm^2 na superfície da chapa.

A ponta de diamante executou 500 linhas de leitura com espaçamentos uniformes de 10 μm a uma velocidade de 750 $\mu\text{m/s}$. A resolução vertical de leitura depende de ajuste individual para cada amostra e teve os seguintes valores médios:

- CONDIÇÃO Ø: 1,470 nm
- CONDIÇÃO 1: 1,450 nm.

- CONDIÇÃO 2: 0,748 nm.
- CONDIÇÃO 3: 0,974 nm
- CONDIÇÃO 4: 0,507 nm
- CONDIÇÃO 5: 1,420 nm

Uma chapa de cada condição de tratamento foi submetida ao ensaio e empregaram-se os seguintes parâmetros de análise, levando-se em consideração um filtro gaussiano (*cut-off*) de 0,8mm, segundo a norma ISO 11562:

Parâmetros de amplitude:

- Sa – média aritmética do módulo das alturas de picos e vales
- Sq – raiz quadrada dos desvios médios das alturas de picos e vales
- Sz – valor médio dos dez pontos extremos
- Ssk – assimetria da superfície
- Sku – curtose

Parâmetros espaciais:

- Sds – densidade dos picos sobre a superfície
- Str – índice de textura
- Std – direção da textura principal

Parâmetros híbridos:

- SDq – raiz quadrada da média das inclinações
- Ssc – curvatura do relevo
- Sdr – razão da área retificada da amostra pelo plano XY
- Sal – comprimento de autocorrelação

III.2.3. Teste de bioatividade

Após a realização dos tratamentos de superfície, seguiu-se o teste de bioatividade visando verificar o efeito na superfície na incorporação de fosfato de cálcio precipitado a partir da solução simuladora de plasma.

Para o ensaio, utilizou-se a solução simuladora de plasma desenvolvida por KOKUBO (KIM et al 1996) que foi preparada com os reagentes mostrados na tabela III.2, segundo a formulação de ANDRADE (1999), sem o emprego de solução tampão para o controle do pH. As chapas de titânio foram colocadas em tubos de 50 ml, com fundo cônico, para assegurar que a superfície tratada mantivesse exposição direta com a solução, evitando assim, que aderisse às paredes internas.

Tabela III.2 – Composição do plasma humano e reagentes utilizados no preparo da solução simuladora de plasma humano (ANDRADE, 1999).

| PLASMA HUMANO | | SOLUÇÃO SIMULADORA | | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|---|----------|
| Ion | Concentração (mM) | Concentração (mM) | Reagentes Empregados | Peso (g) |
| Na ⁺ | 142,0 | 142,0 | NaCl | 7,9147 |
| Mg ²⁺ | 1,5 | 1,5 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,3061 |
| K ⁺ | 5,0 | 5,0 | KCl | 0,3730 |
| Ca ²⁺ | 2,5 | 2,5 | Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O | 0,2455 |
| Cl ⁻ | 103,0 | 148,0 | CaSO ₄ .2H ₂ O | 0,0861 |
| HCOO ₃ ⁻ | 27,0 | 4,2 | NaHCO ₃ | 0,3545 |
| HPO ₄ ²⁻ | 1,0 | 1,0 | CaCl ₂ | 0,2008 |
| SO ₄ ²⁻ | 0,5 | 0,5 | H ₂ O destilada | 1000 ml |

Cada tubo recebeu 30 ml de solução e uma chapa de teste de 10 x 10 mm². Para cada condição de tratamento foram empregados 3 tempos de submersão na solução – 1 (t1), 2 (t2) e 7 (t7) dias - para o teste de bioatividade. Um grupo controle (tØ) não foi submetido ao ensaio. Para t1 e t2 foram utilizadas três chapas cada e para t7 foram utilizadas cinco chapas, totalizando 66 amostras de teste.

Para o ensaio de bioatividade, os recipientes foram colocados em um banho termostático, mantendo-se a temperatura constante em 37° C. Após os tempos determinados (1, 2 e 7 dias), as chapas de teste foram retiradas e armazenadas. As soluções de cada tubo foram diluídas para possibilitar a análise química por absorção atômica do teor de cálcio na solução. Foram retirados 5 ml da solução e acrescentados 5 ml de ácido clorídrico (HCl) a 37 %, 5 ml de cloreto de potássio (KCl), e água destilada q.s.p. 50 ml.

As chapas de teste foram então submetidas à análise por MEV e XPS, à exceção da condição Ø que, por problemas com o equipamento, não pode ser examinada no XPS, conforme mostrado na tabela III.3.

Tabela III.3 – Métodos de caracterização das amostras para os diferentes tempos de exposição à solução simuladora de plasma (SBF).

| | tØ 2 amostras | t2 - 1 dia 3 amostras | t3 - 2 dias 3 amostras | t5 - 7 dias 5 amostras |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Condição Ø | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV % Ca |
| Condição 1 | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV XPS, % Ca |
| Condição 2 | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV XPS, % Ca |
| Condição 3 | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV XPS, % Ca |
| Condição 4 | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV XPS, % Ca |
| Condição 5 | MEV perfilometria | MEV % Ca | MEV % Ca | MEV XPS, % Ca |

III.2.4. Espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X

As amostras expostas à solução simuladora de plasma por 7 dias foram analisadas por XPS, à exceção da condição Ø.

A espectroscopia de fotoelétrons por raios-X foi utilizada para identificar e caracterizar a presença de fosfato de cálcio após a imersão em SBF por 7 dias. A análise foi realizada em um espectrômetro de fotoelétrons por raios-X 1257 PHI, operando a 12,0 kV, em um ângulo de 54° e com a energia Al-K α (1.486,60 eV). Em cada espectro, as energias de ligações (BE) foram correlacionadas as órbitas dos elementos usando, como referência, a energia de ligação (BE) do pico C 1s (BE = 284,6 eV) da contaminação superficial por hidrocarbonetos. Cada um dos espectros foi decomposto de forma a se identificar os diferentes estados de oxidação, usando-se o programa Microcal Origin. A quantificação foi feita calculando-se a área sob a curva de cada espectro e levando-se em conta o fator de sensibilidade para cada elemento. Dessa forma temos que:

$$C_x = (\text{Área}_x / \text{FS}_x) / \sum (\text{Área}_i / \text{FS}_i), \text{ onde}$$

C_x = % atômica do elemento x

Área x = área sob a curva calculada pelo programa XPS.exe

FS = fator de sensibilidade (constante para cada elemento)

Isso significa que a concentração do elemento x (em % atômica) é calculada dividindo-se a área sob a curva pelo fator de sensibilidade (tabelado) dividido pelo somatório de todas as áreas divididas cada uma por seu FS. O erro associado à quantificação de XPS é estimado em 10%.

IV. RESULTADOS

A análise por MEV possibilitou a caracterização morfológica da superfície das chapas empregadas. As figuras IV.1 a IV.3 apresentam as micrografias de MEV das chapas de titânio após os tratamentos de superfície (Tabela III.1), e antes de serem submetidas ao teste de bioatividade.

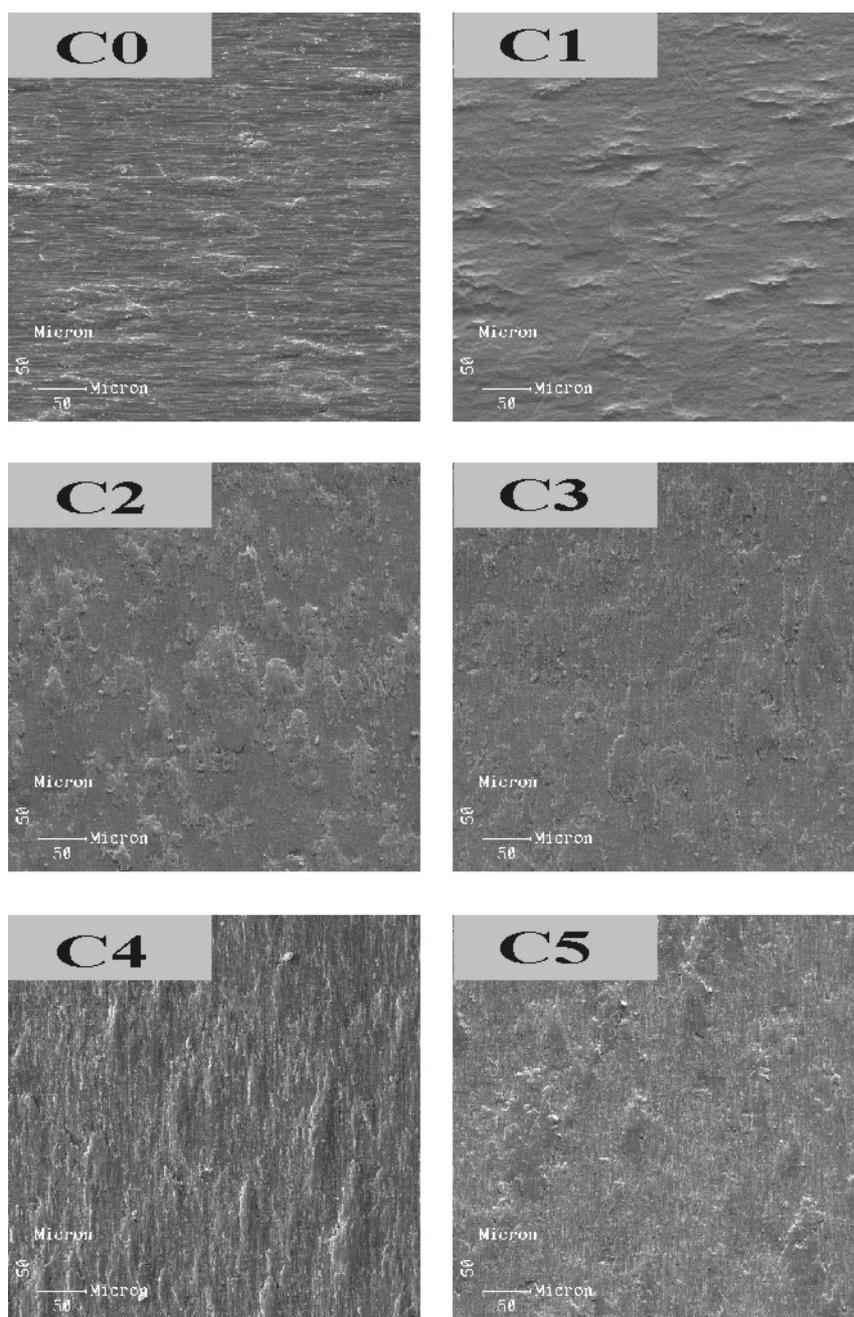


Figura IV.1 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície (t \emptyset). Magnitude original de 200x.

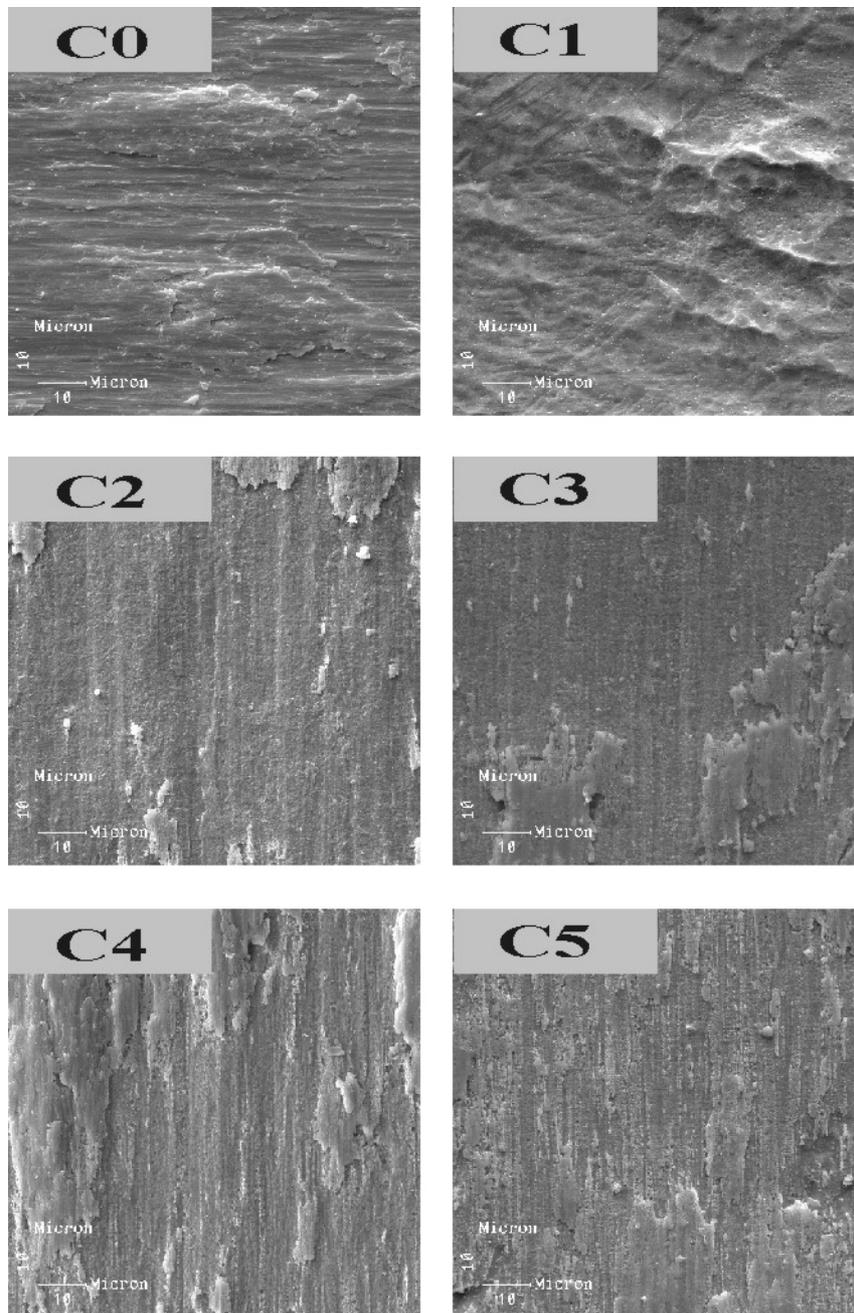


Figura IV.2 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície ($t\emptyset$). Magnitude original de 1000x.

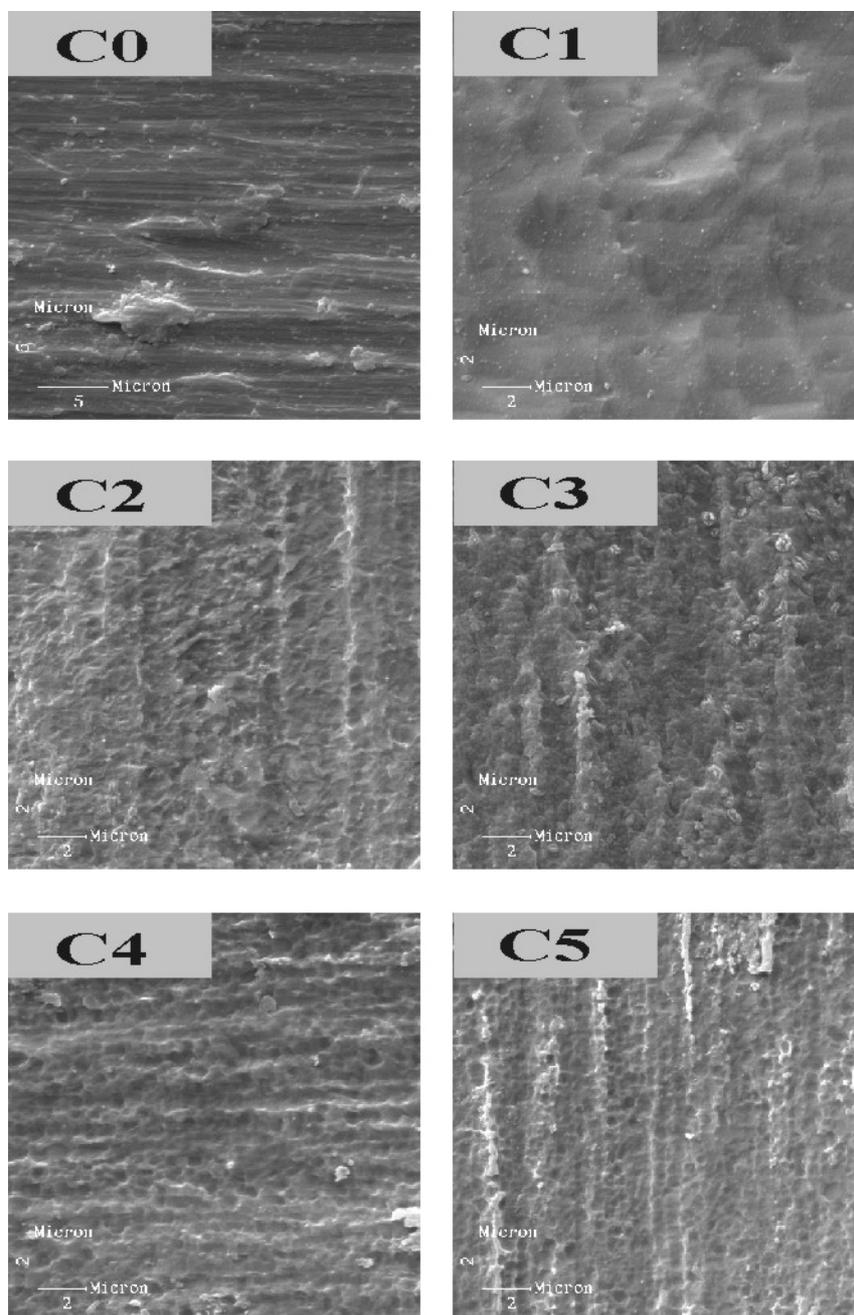


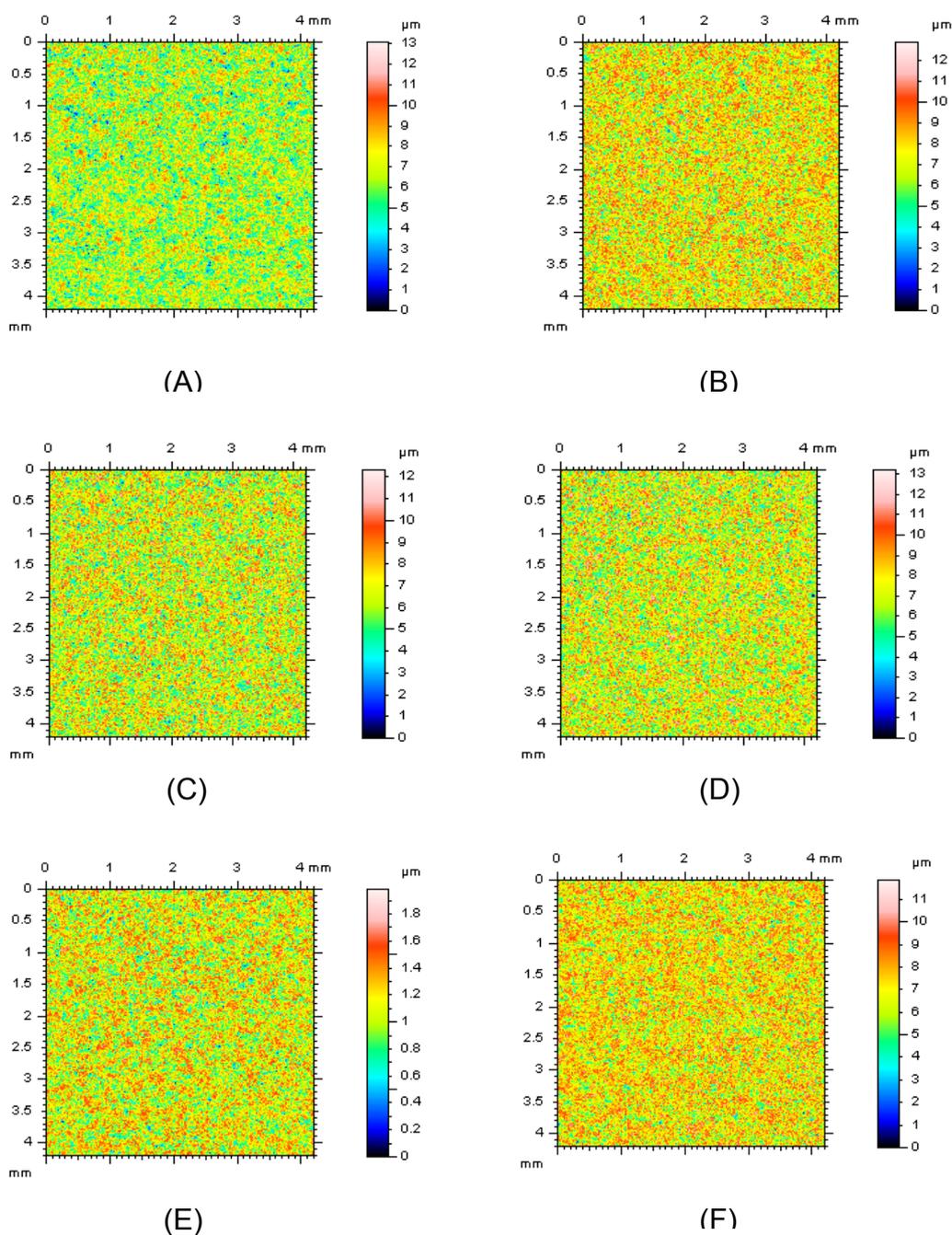
Figura IV.3 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície (t \emptyset). Magnitude original de 3000x.

As amostras submetidas à análise de perfilometria forneceram diversos resultados referentes aos parâmetros previamente selecionados. A tabela IV. 1 mostra os valores obtidos para cada uma das condições de tratamento.

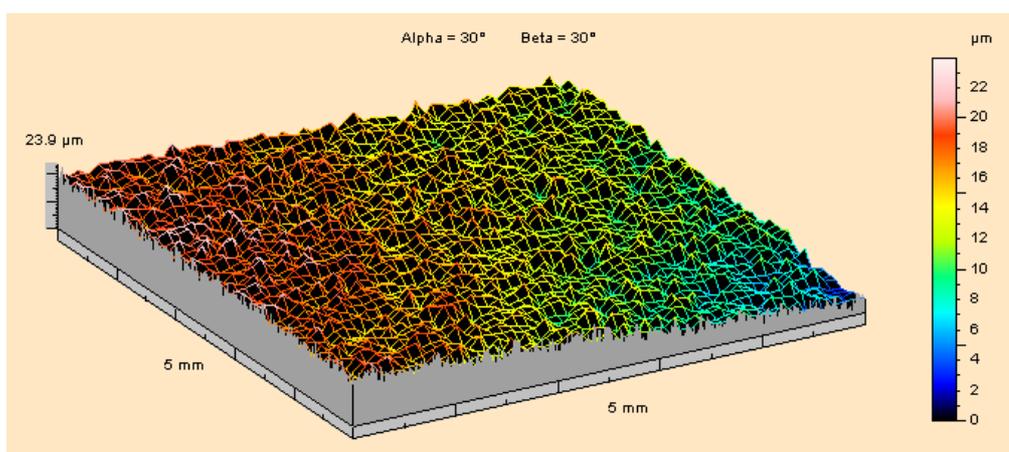
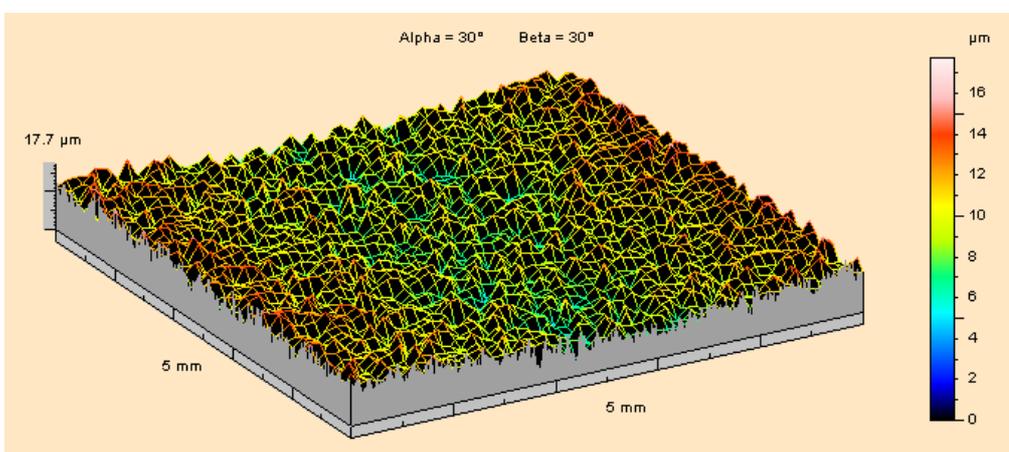
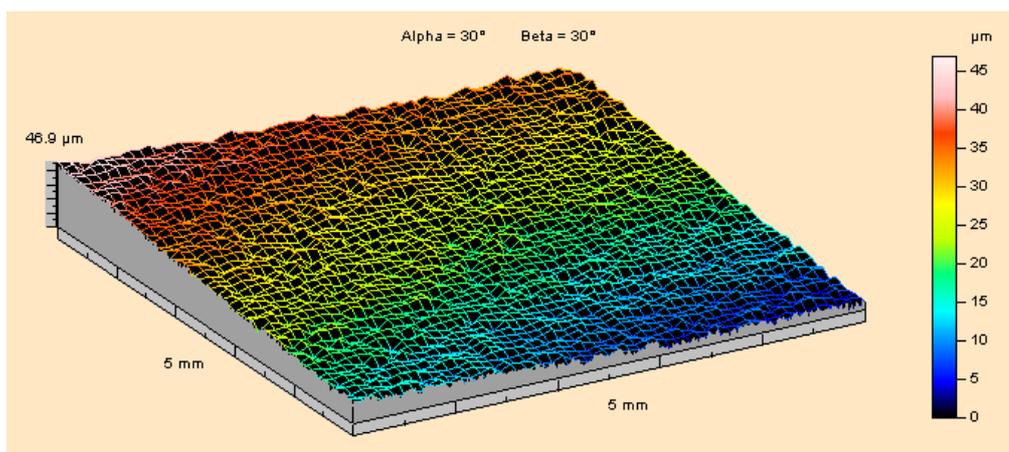
Tabela IV.1 – Valores obtidos para os parâmetros de análise de rugosidade nos diferentes tipos de tratamentos, realizados em uma amostra de cada grupo.

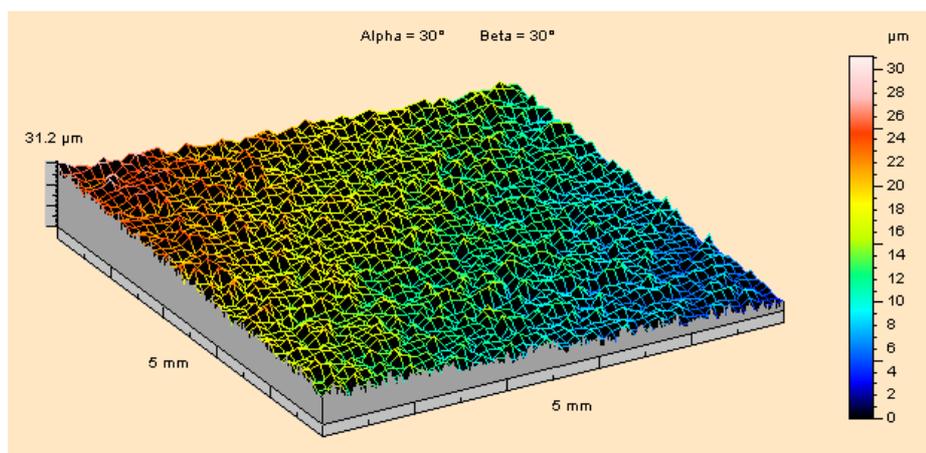
| | COND Ø | COND 1 | COND 2 | COND 3 | COND 4 | COND 5 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Sa (µm) | 1,28 | 1,33 | 1,36 | 1,44 | 0,21 | 1,17 |
| Sq (µm) | 1,56 | 1,65 | 1,69 | 1,8 | 0,26 | 1,45 |
| Sz (µm) | 12,1 | 12 | 11,6 | 12 | 1,8 | 10,6 |
| Ssk | -0,222 | 0,017 | 0,109 | 0,25 | -0,162 | -0,064 |
| Sku | 2,63 | 2,71 | 2,71 | 2,82 | 2,61 | 2,75 |
| Sds (pc/mm ²) | 644 | 695 | 730 | 657 | 667 | 680 |
| Str | 0,632 | 0,784 | 0,620 | 0,707 | 0,707 | 0,686 |
| Std (graus) | 2 | 0,5 | 0,5 | 89 | 1,5 | 0,5 |
| SDq (mm/mm) | 0,182 | 0,212 | 0,227 | 0,221 | 0,030 | 0,181 |
| Ssc | 0,0237 | 0,0309 | 0,0333 | 0,0326 | 0,0041 | 0,0248 |
| Sdr (%) | 1,65 | 2,23 | 2,54 | 2,42 | 4,00 | 1,63 |
| Sal (µm) | 26,0 | 23,2 | 18,4 | 23,2 | 26,0 | 23,2 |
| Ra (µm) | - | 1,22 | 1,24 | 1,38 | 0,16 | 1,02 |
| Rq (µm) | - | 1,51 | 1,57 | 1,71 | 0,20 | 1,24 |
| Rsk | - | -0,124 | 0,278 | 0,141 | 0,055 | -0,483 |
| Rku | - | 2,57 | 2,86 | 2,84 | 2,48 | 2,70 |
| RSm (mm) | - | 0,0771 | 0,0639 | 0,0840 | 0,0679 | 0,0675 |
| RDq | - | 7,48° | 8,64° | 7,94° | 1,04° | 6,37° |

As figuras IV.4 e IV.5 mostram as imagens 2D e 3D criadas a partir do mapeamento realizado pela ponta de leitura sobre a área da chapa analisada, após a aplicação do filtro gaussiano de 0,8mm. As cores escuras representam os vales e as cores claras os picos. Já a figura IV.6 mostra os perfis em 2D das superfícies.

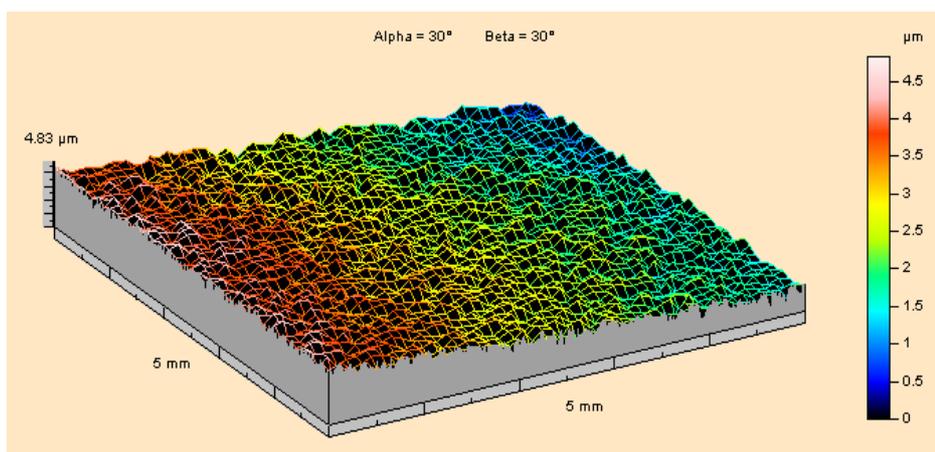


Figuras IV.4: Imagens 2D das chapas de teste das condições \emptyset (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).

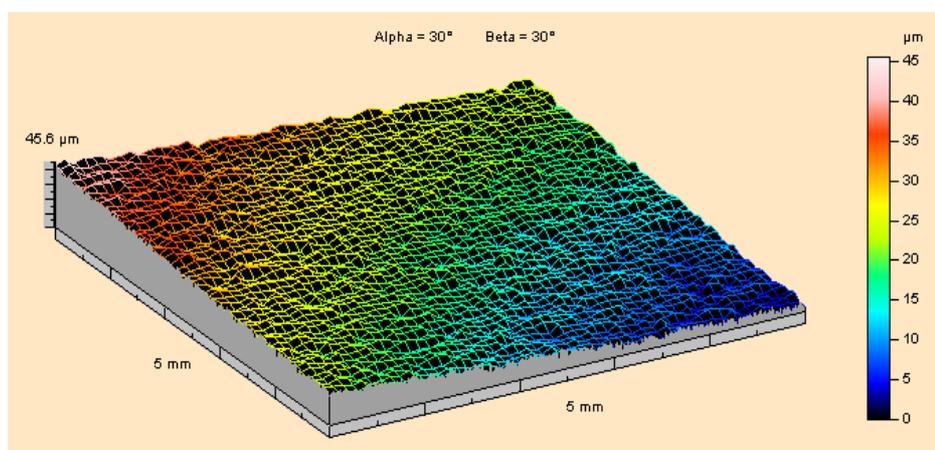




(D)



(E)



(F)

Figura IV.5: Imagens 3D das chapas de teste das condições \emptyset (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) e 5 (F).

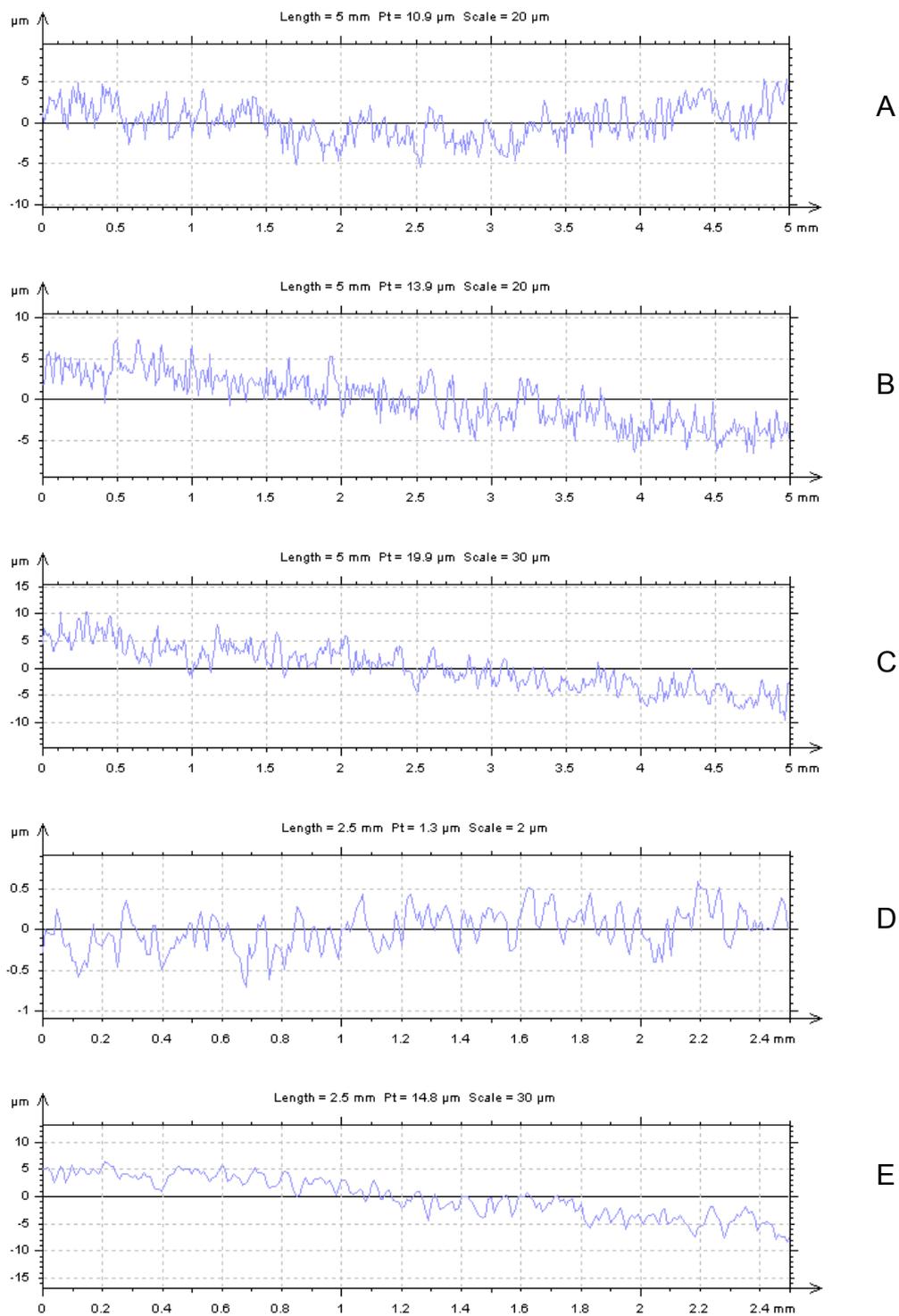


Figura IV.6 - Perfil em 2D das superfícies das chapas de titânio, nas condições 1 a 5 (A a E, respectivamente) numa posição média da área analisada.

As figuras de IV.7 a IV.13 mostram a morfologia das superfícies das chapas de titânio após exposição em solução simuladora de plasma durante 1, 2 e 7 dias.

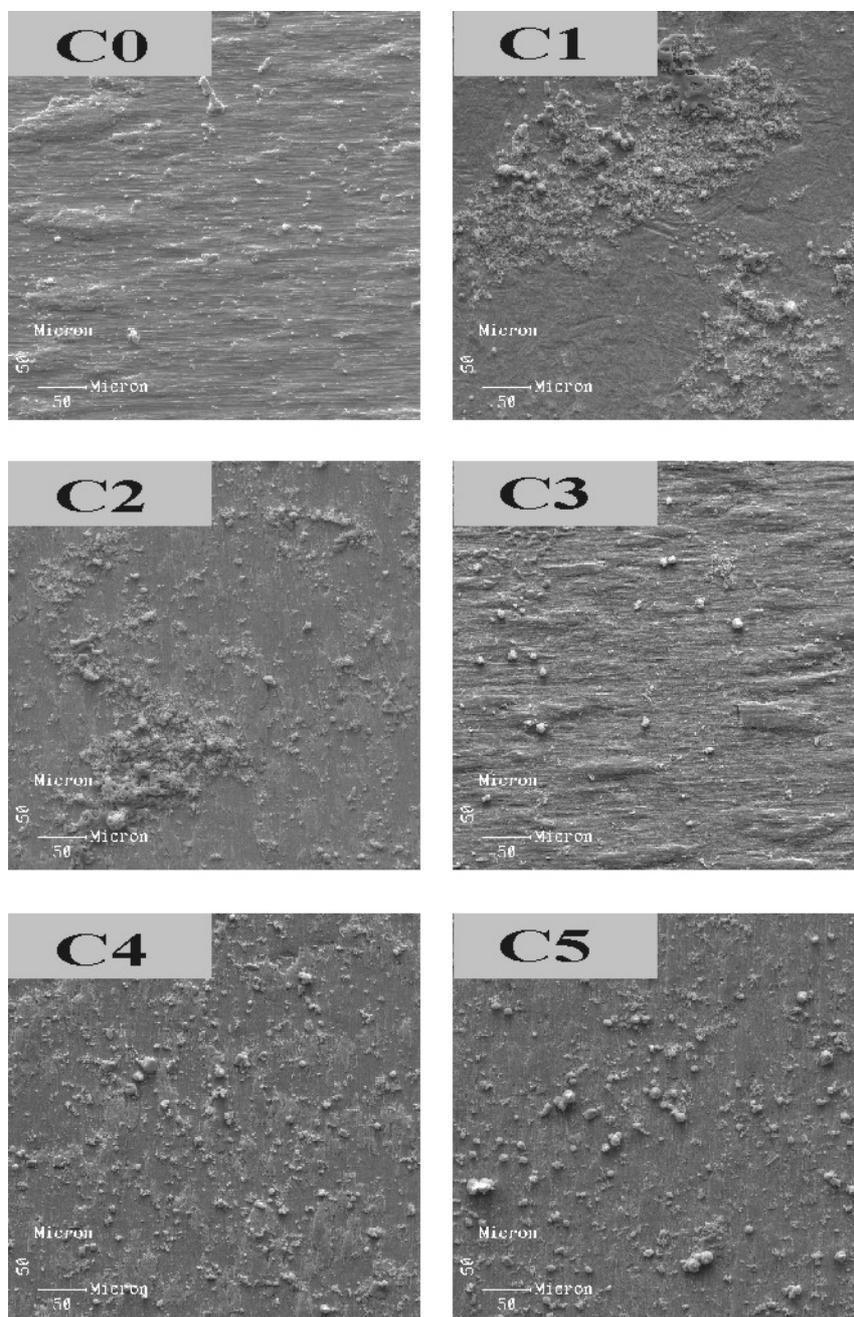


Figura IV.7 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 1 dia (t1). Magnitude original de 200x.

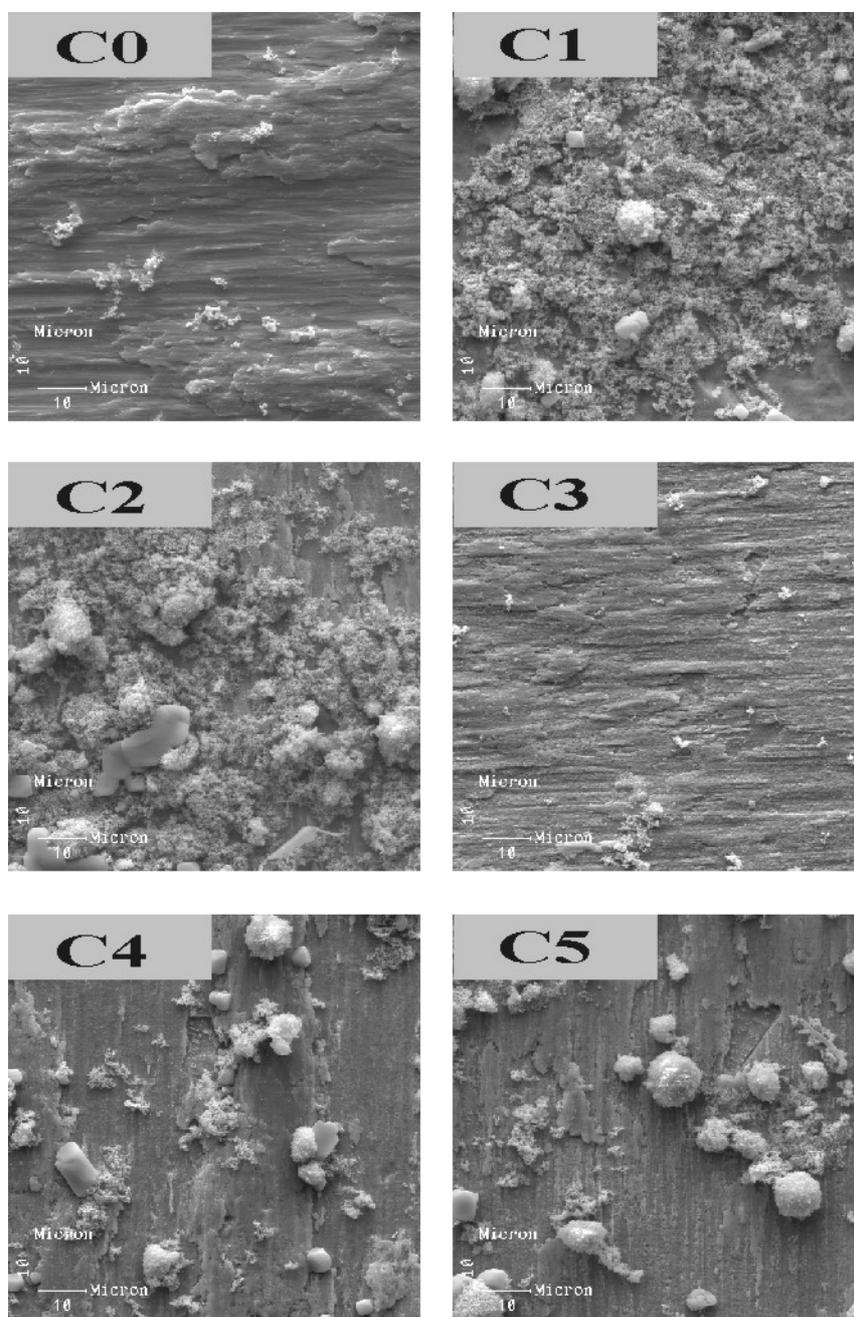


Figura IV.8 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 1 dia (t1). Magnitude original de 1000x.

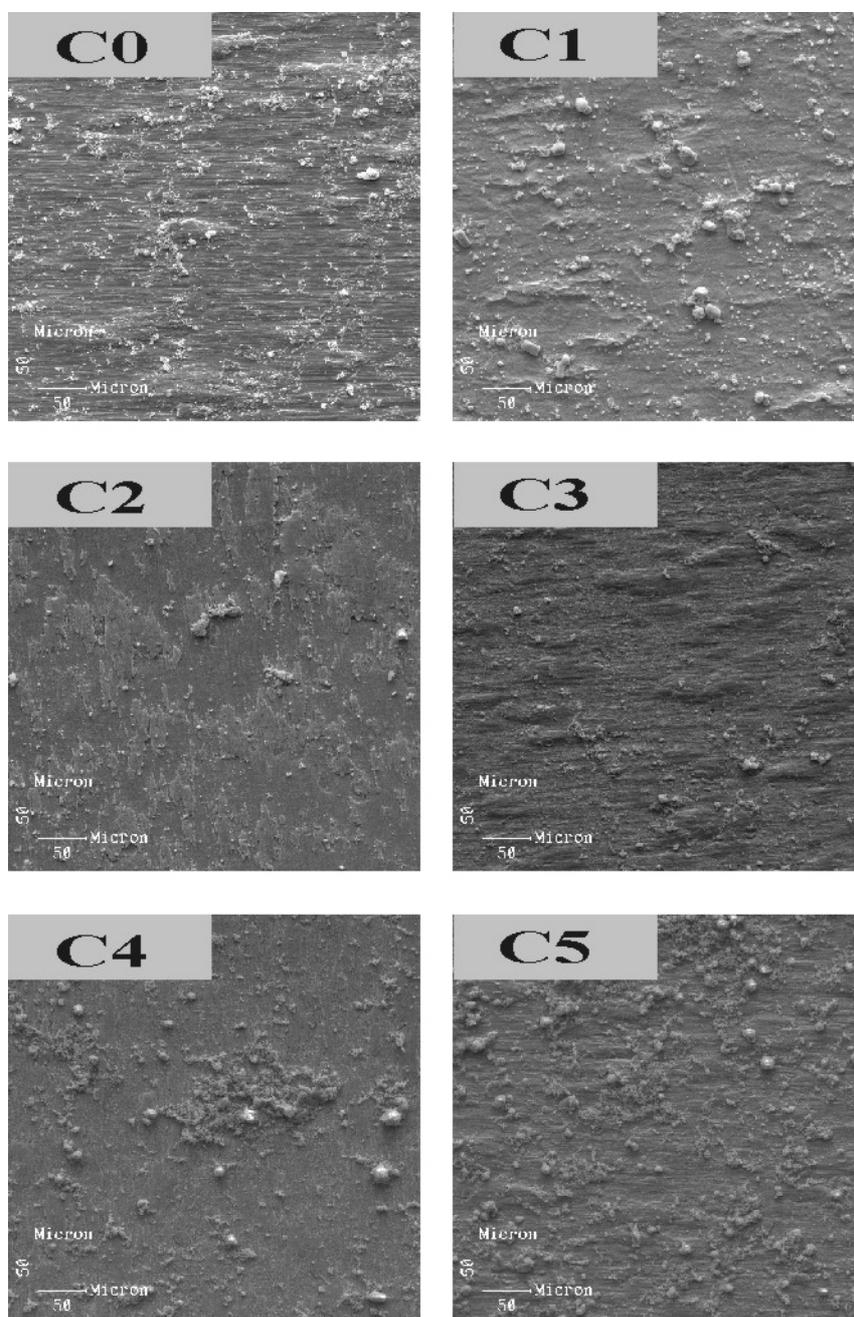


Figura IV.9 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 2 dias (t₂). Magnitude original de 200x.

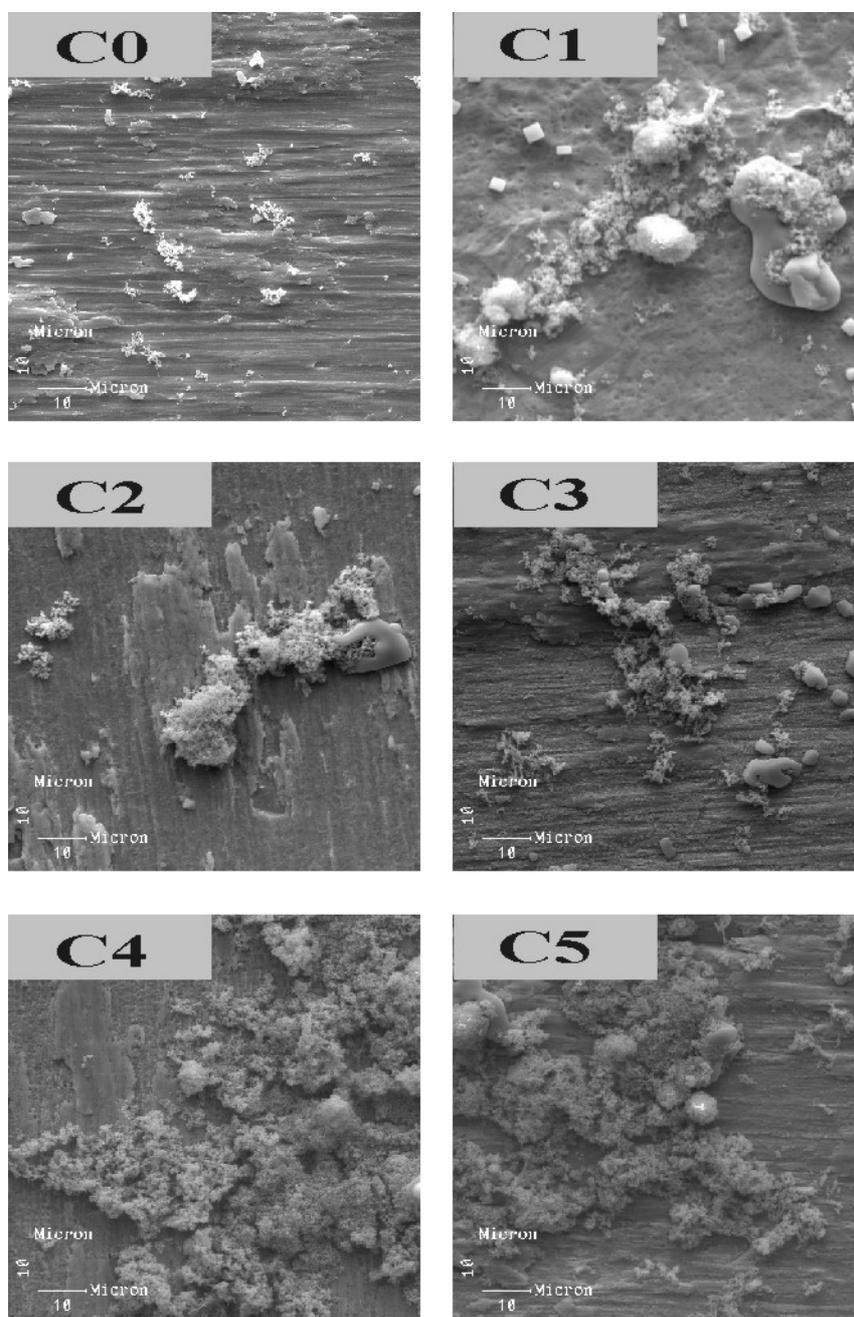


Figura IV.10 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 2 dias (t₂). Magnitude original de 1000x.

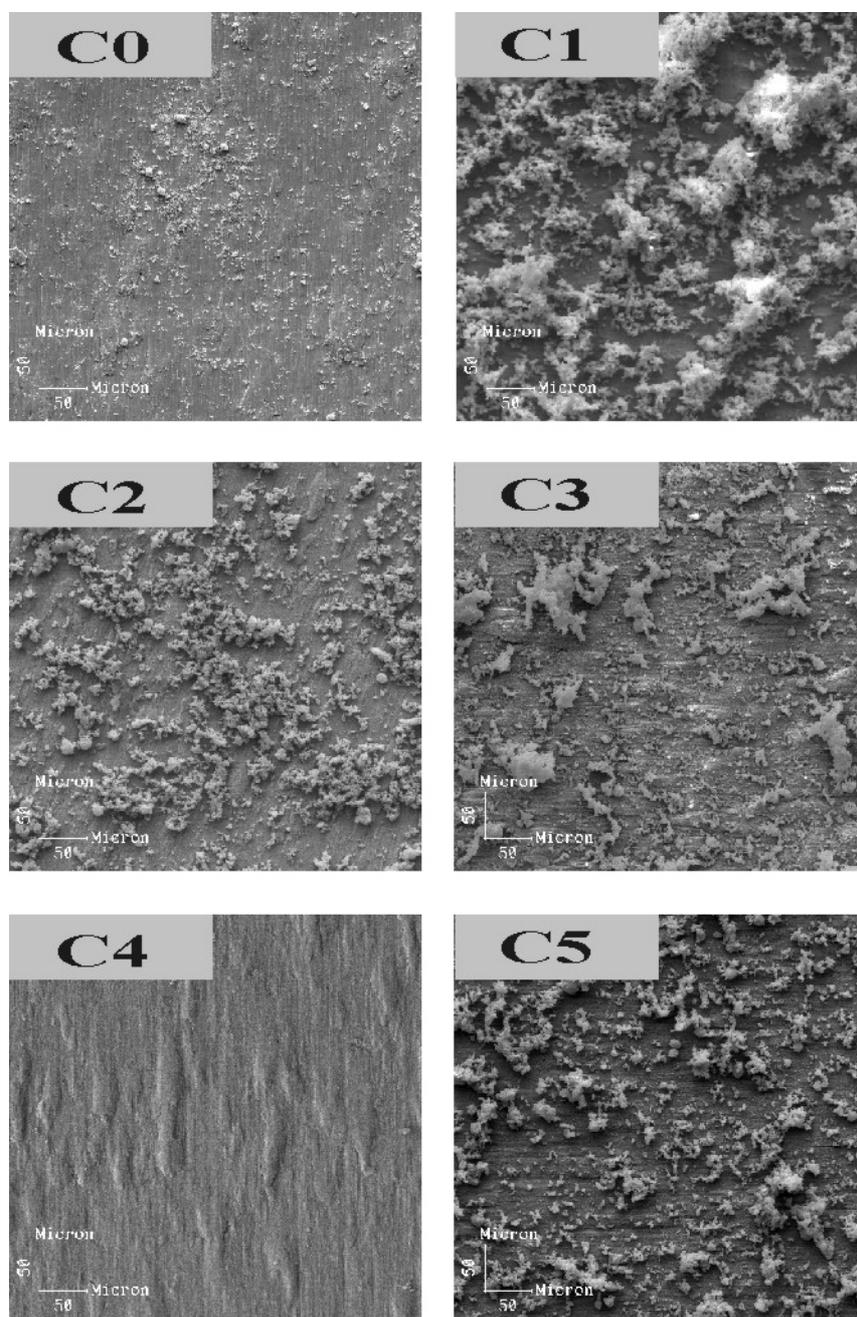


Figura IV.11 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 7 dias (t7). Magnitude original de 200x.

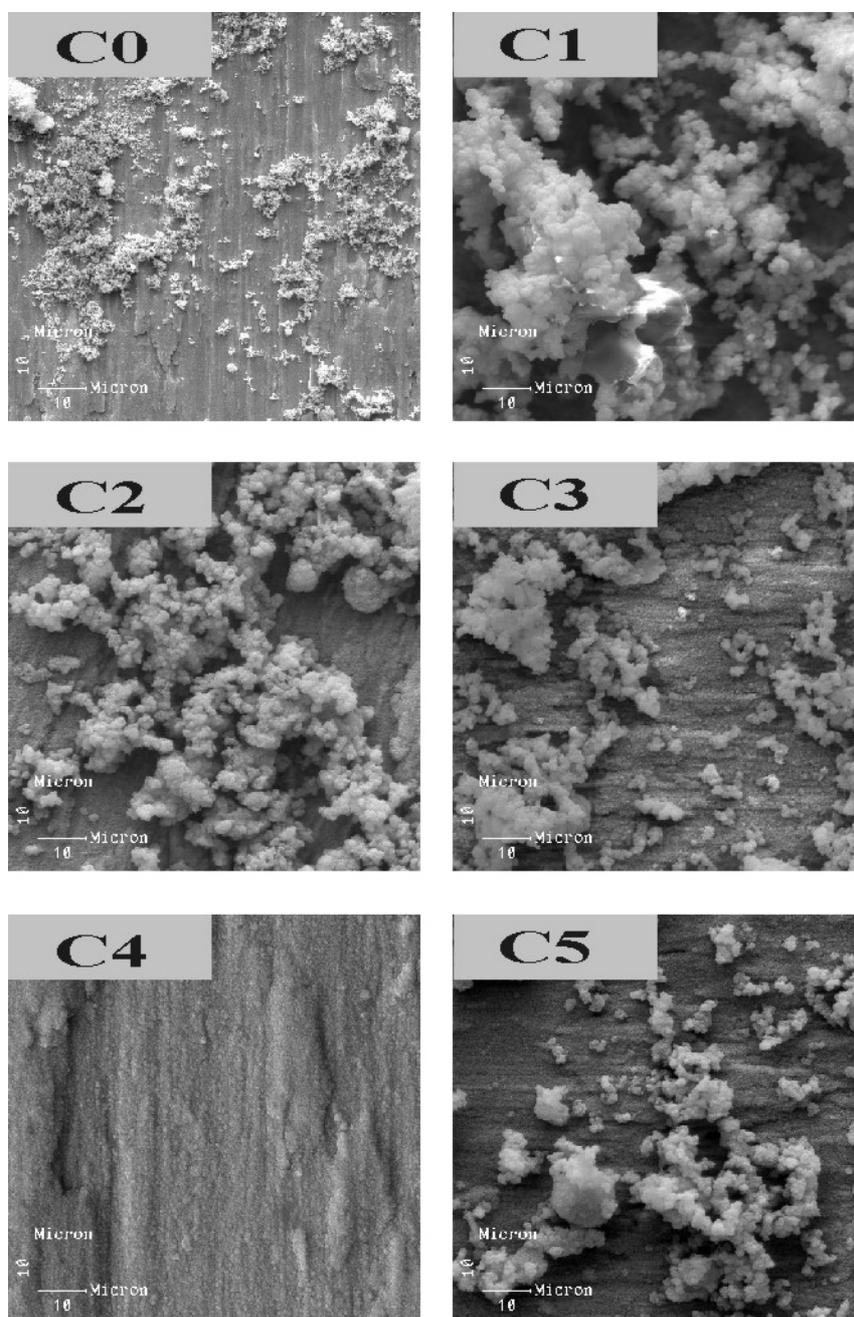


Figura IV.12 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 7 dias (t7). Magnitude original de 1000x.

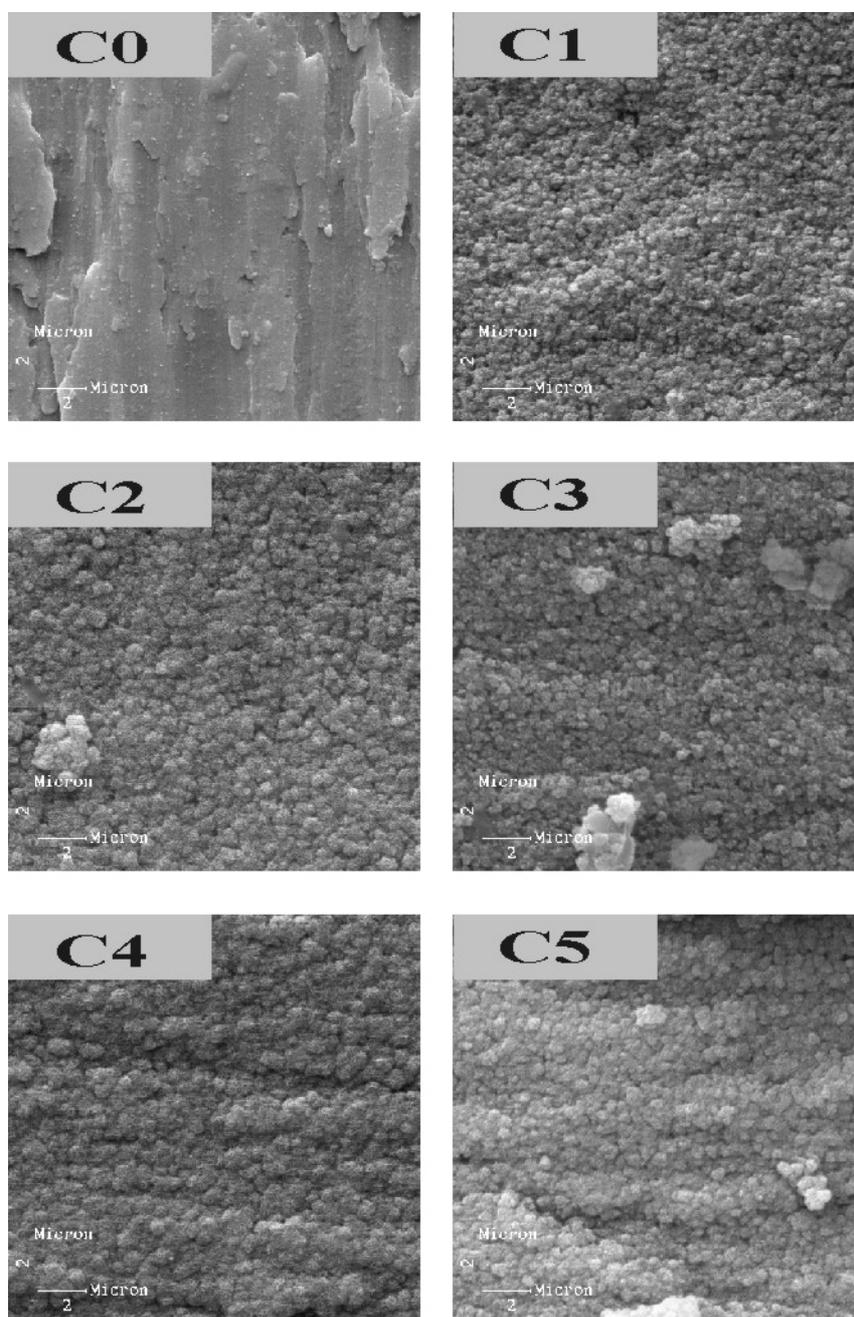
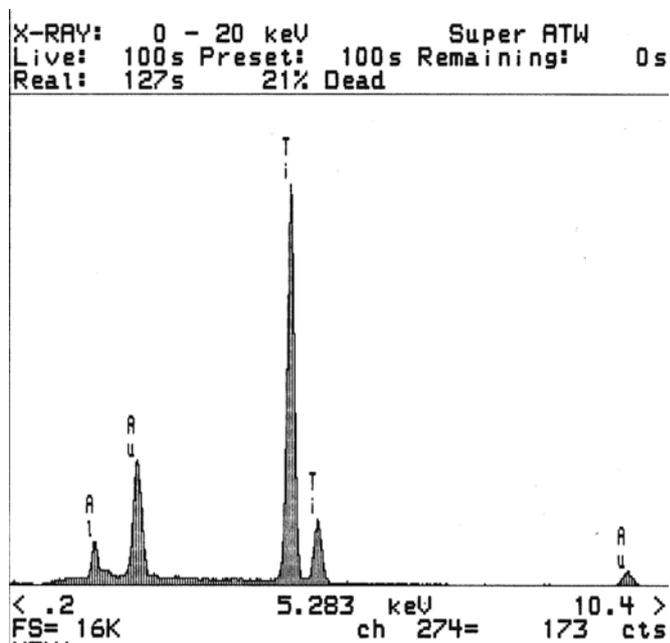
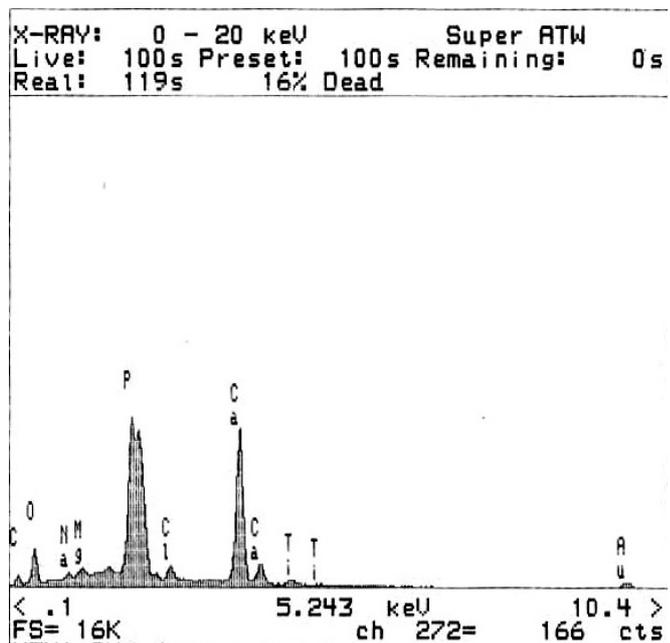


Figura IV.13 – Fotomicrografias das chapas de titânio após os tratamentos de superfície e exposição em SBF por 7 dias (t7). Magnitude original de 5000x.

A figura IV.14 apresenta os espectros de EDS típicos da chapa de titânio tratada antes e após a exposição à solução simuladora de plasma humano por 7 dias.



(A)



(B)

Figura IV.14 – Espectros de EDS típicos de chapa de titânio tratada, antes (A) e após (7 dias) (B) ser submetida à exposição de solução simuladora de plasma humano.

Após o teste de bioatividade por imersão em solução simuladora de plasma (solução de Kokubo) procedeu-se a uma análise química por absorção atômica do teor de cálcio na solução de cada frasco. A figura IV.15 mostra em gráfico os teores de cálcio (média e desvio padrão) nas soluções empregadas nos testes de bioatividade após os tempos estipulados.

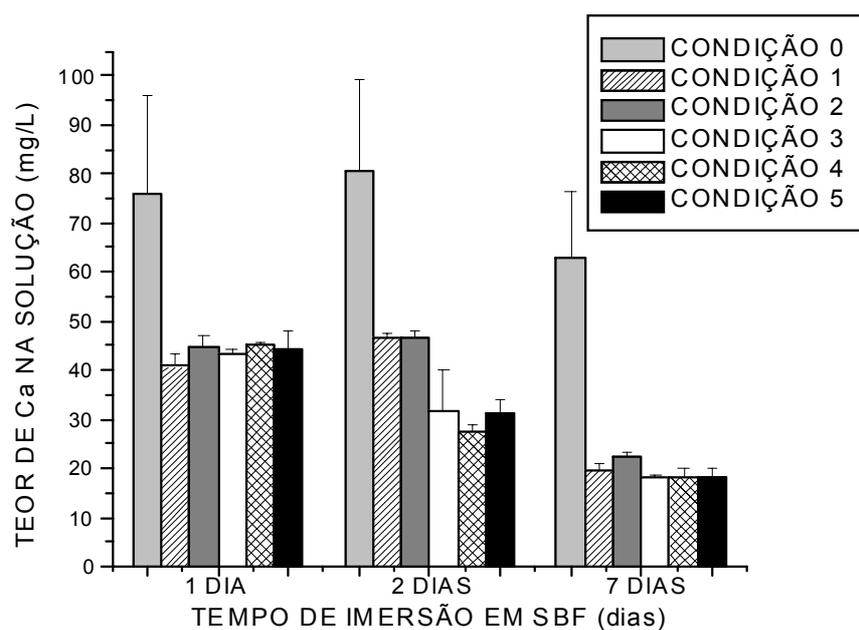


Figura IV.15 – Resultado da análise química realizada nas soluções empregadas no teste de bioatividade.

As figuras IV.16 a IV.20 apresentam os resultados da análise de XPS das condições 1 a 5 após a exposição por 7 dias na solução simuladora de plasma humano. Na figura IV.16 pode ser visto o aspecto geral do espectro enquanto que nas seguintes (IV.17 a IV.20) são apresentadas as ampliações em torno do pico referentes ao C 1s, O 1s, Ca 2p e P 2p, respectivamente. Cada uma das curvas referentes ao pico O 1s foi decomposta em 3 componentes com energia de ligação igual a 529.8, 531.6 e 533.0 eV, correspondendo às espécies óxido (O^{2-}), grupamentos hidroxila ou fosfato (OH^- ou PO_4^{3-}) e água adsorvida, respectivamente. A tabela IV.2 mostra o percentual atômico do oxigênio presente nos três componentes decompostos do espectro inicial. Nos espectros referentes aos elementos carbono (figura IV.17) e cálcio (IV.19) foram indicados somente os valores correspondentes aos picos presentes na região.

Tabela IV.2 – Percentual atômico do oxigênio presente de acordo com a energia de ligação analisada.

| | O 1s | | |
|-------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | 529.8 eV (O^{2-}) | 531.5 eV(OH^- ou PO_4^{3-}) | 532.5 eV (H_2O) |
| Condição 1 | 45,0 | 0,0 | 3,7 |
| Condição 2 | 24,0 | 13,0 | 12,5 |
| Condição 3 | 44,8 | 0,2 | 53,0 |
| Condição 4 | 39,5 | 9,1 | 3,6 |
| Condição 5 | 1,3 | 51,5 | 0,2 |

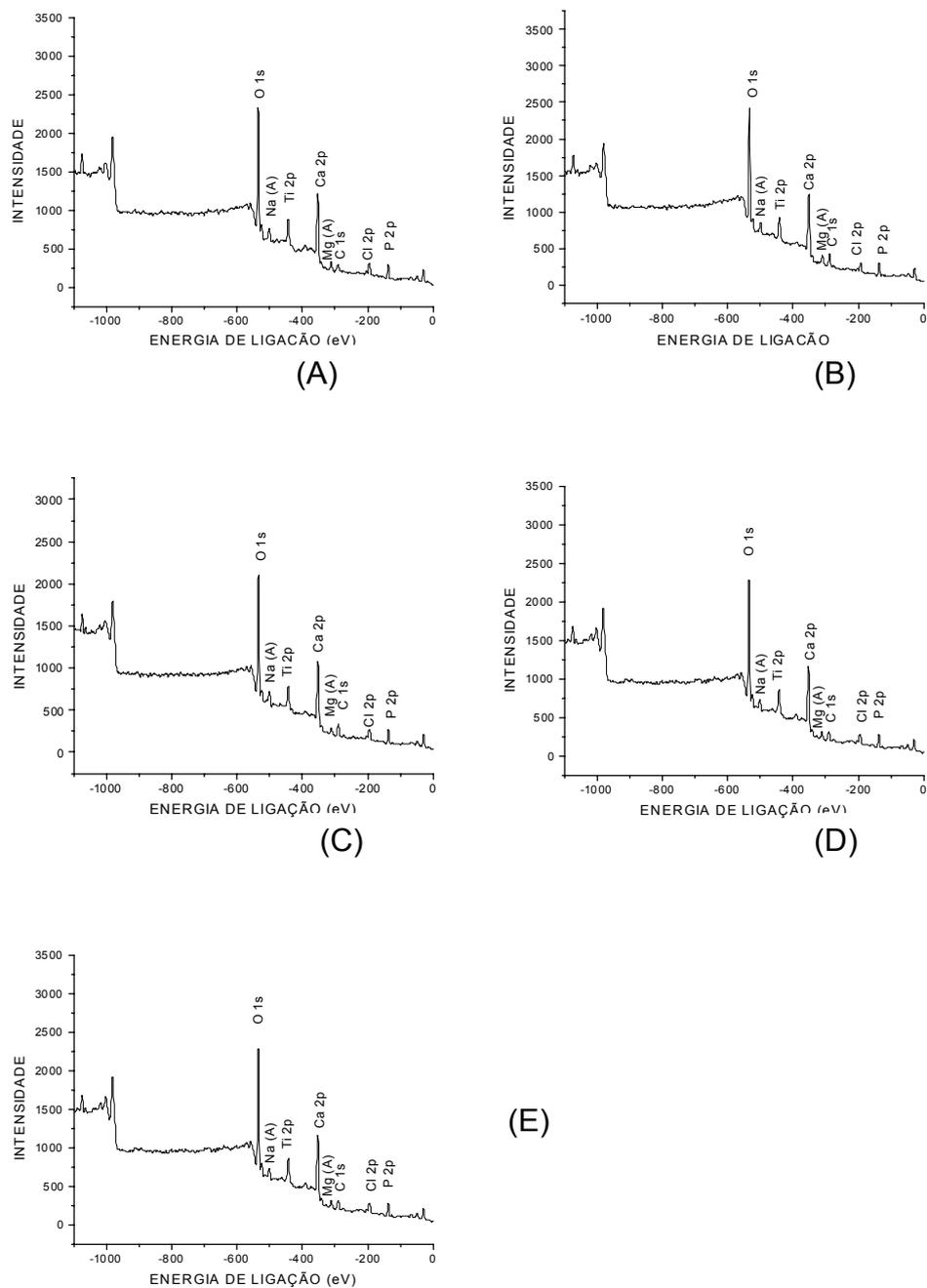


Figura IV.16 – Aspecto geral dos espectros obtidos na análise de XPS nas chapas de titânio das condições 1 a 5 (A a E respectivamente) após exposição à solução simuladora de plasma humano por 7 dias.

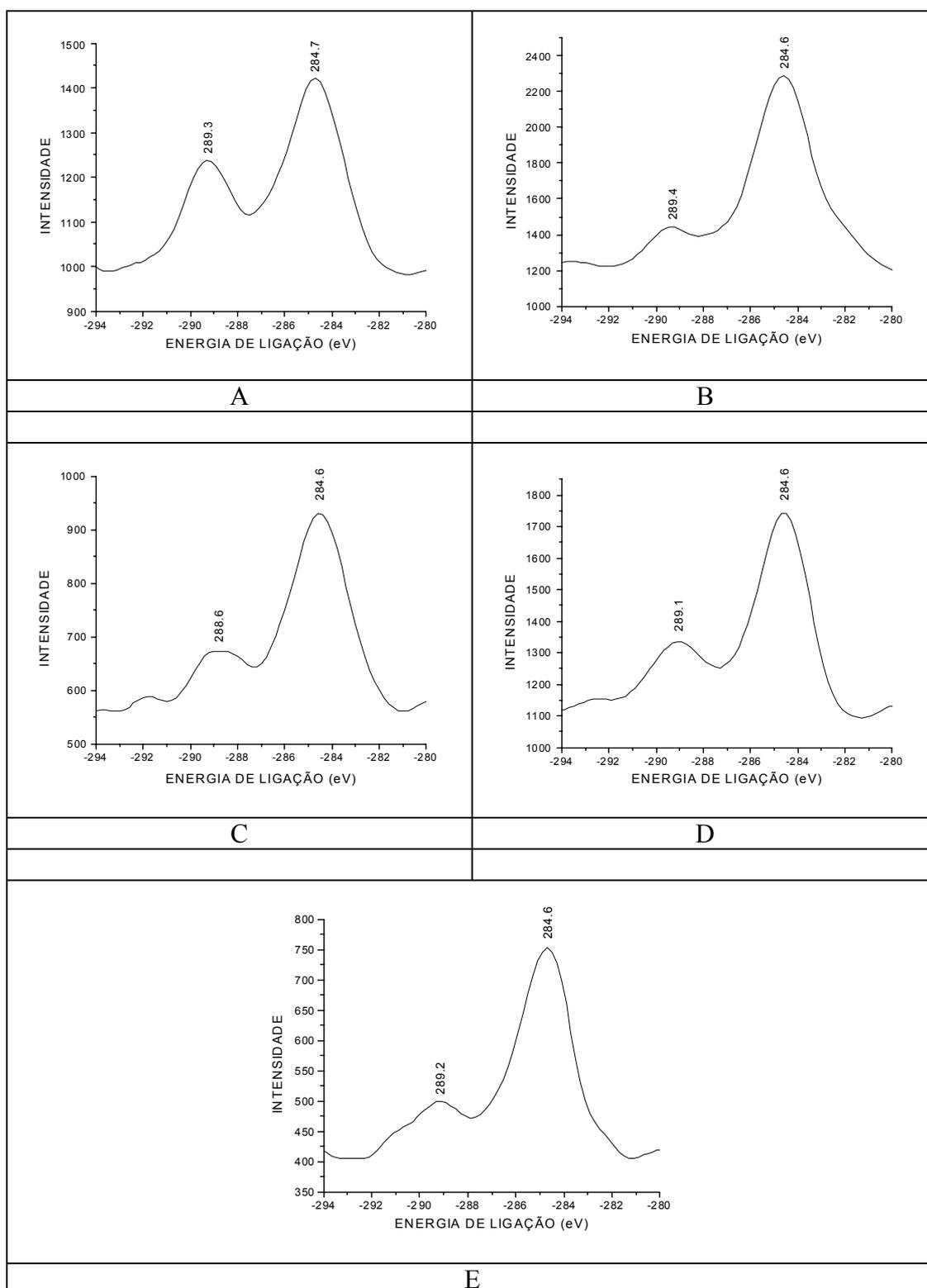


Figura IV.17 – Espectros de XPS na região do orbital C 1s
A) condição 1; B) condição 2; C) condição 3; D) condição 4; E) condição 5.

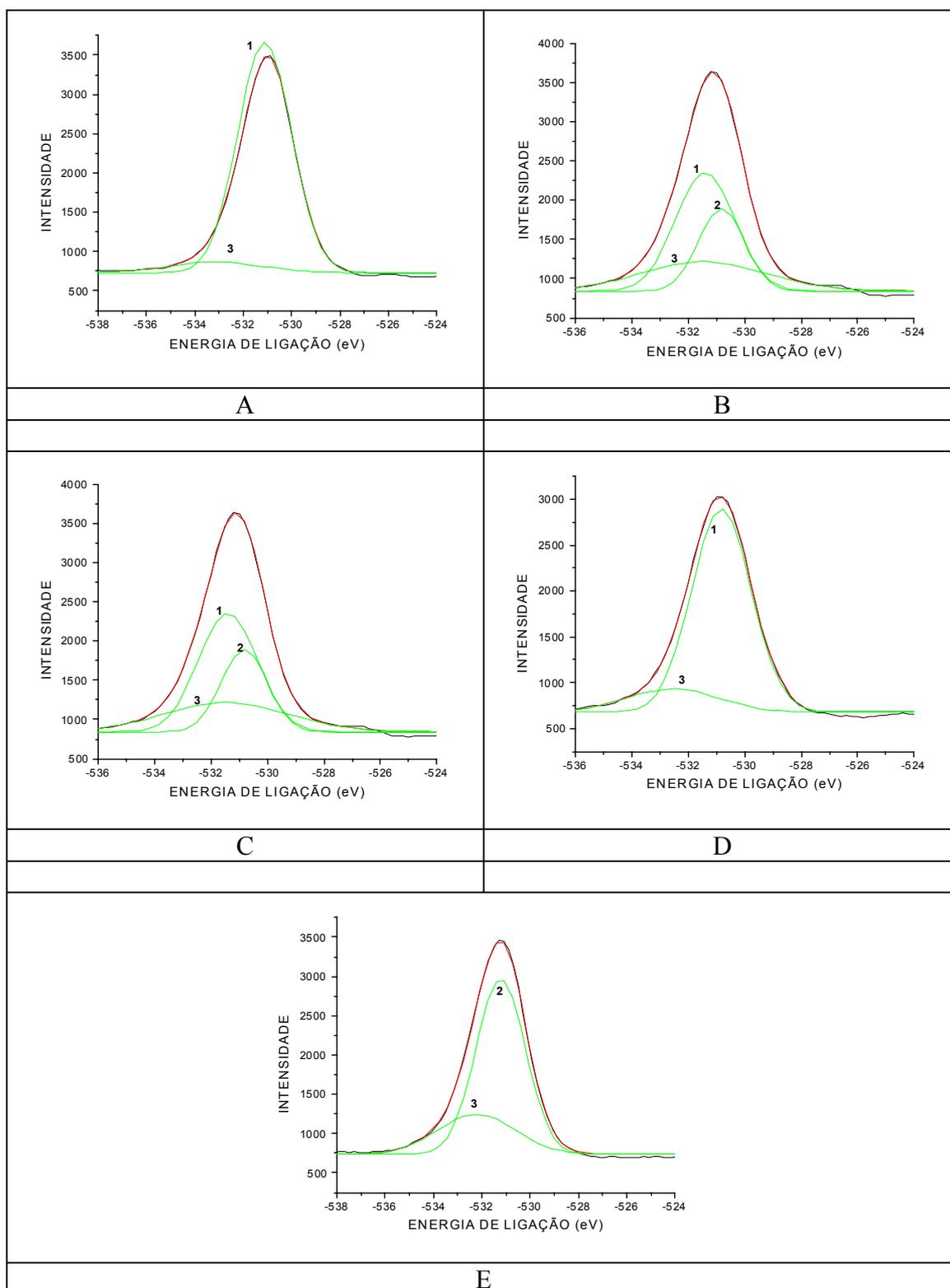


Figura IV.18 – Espectros de XPS na região do orbital O 1s
A) condição 1; B) condição 2; C) condição 3; D) condição 4; E) condição 5.

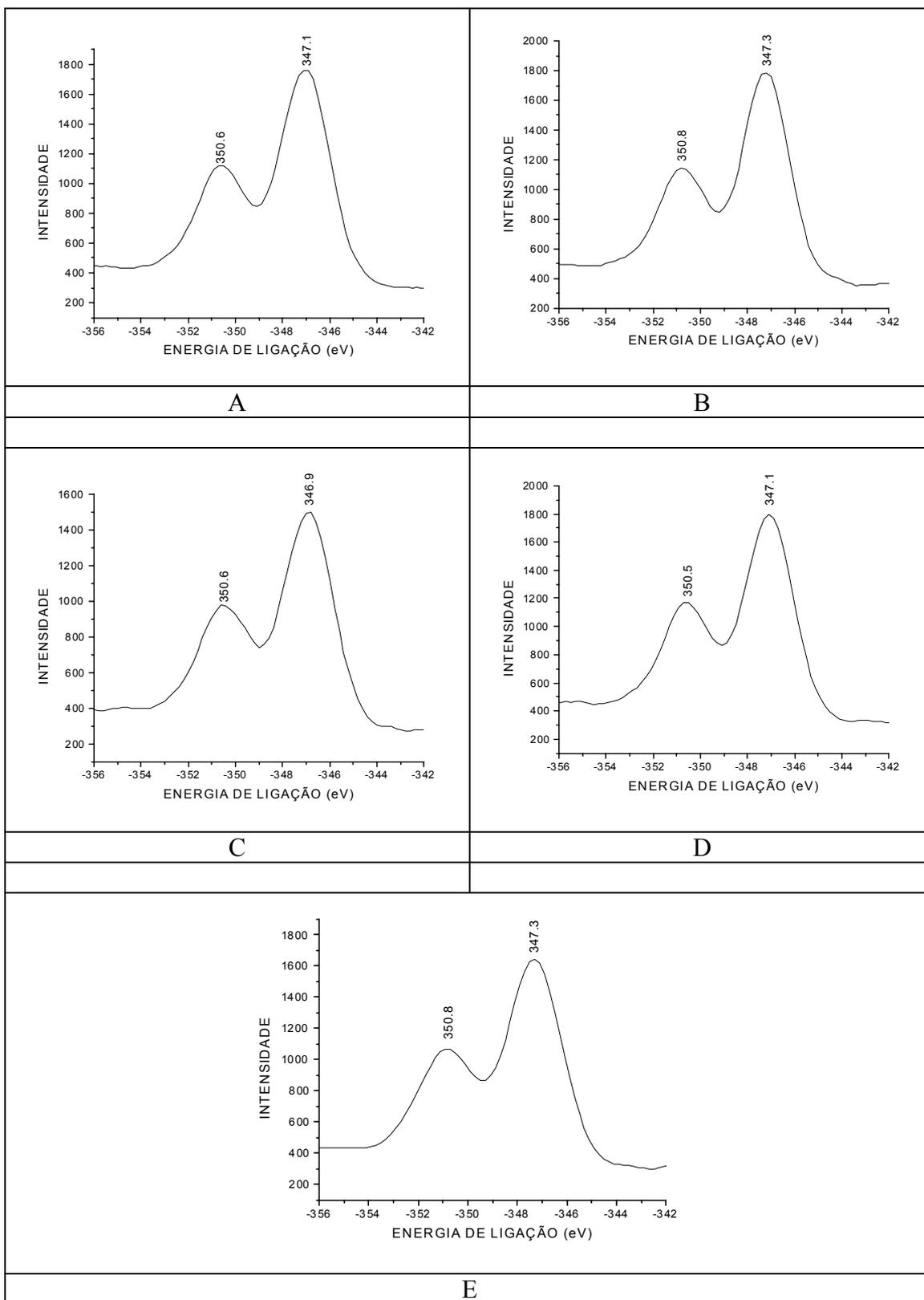


Figura IV.19 – Espectros de XPS na região do orbital Ca 2p
A) condição 1; B) condição 2; C) condição 3; D) condição 4; E) condição 5.

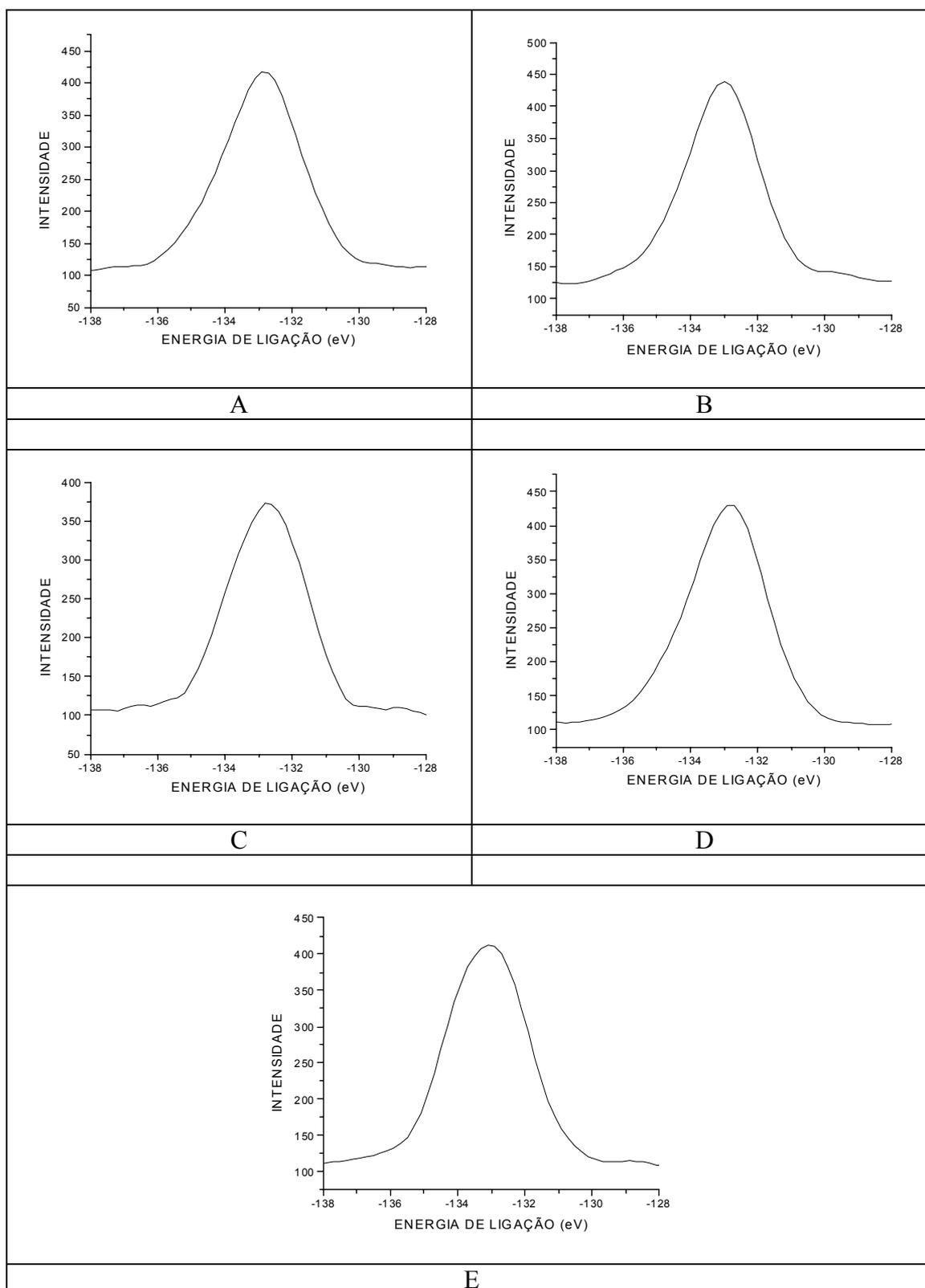


Figura IV.20 – Espectros de XPS na região do orbital P 2p
A) condição 1; B) condição 2; C) condição 3; D) condição 4; E) condição 5.

As tabelas IV.3 a IV.7 mostram a determinação do percentual atômico dos elementos identificados no espectro de XPS de cada uma das condições tratadas.

Tabela IV.3 - Percentual atômico dos elementos identificados por XPS na condição 1.

| Elementos | Fator de sensibilidade | Área | Percentual atômico |
|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Ti | 2,001 | 132,11 | 0,3% |
| P | 0,486 | 835,53 | 8,9% |
| N | 0,477 | - | 0,0% |
| Ca | 1,833 | 5502,27 | 15,5% |
| Na | 1,685 | 1592,45 | 4,9% |
| Si | 0,339 | - | 0,0% |
| Mg | 0,153 | 428,28 | 14,4% |
| F | 1,000 | 92,26 | 0,5% |
| C | 0,296 | 392,04 | 6,8% |
| O | 0,711 | 6703,43 | 48,7% |
| | | | 100,0% |

Tabela IV.4 - Percentual atômico dos elementos identificados por XPS na condição 2.

| Elementos | Fator de sensibilidade | Área | Percentual atômico |
|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Ti | 2,001 | 370,46 | 1,0% |
| P | 0,486 | 633,27 | 6,9% |
| N | 0,477 | - | 0,0% |
| Ca | 1,833 | 4382,99 | 12,6% |
| Na | 1,685 | 1069,65 | 3,3% |
| Si | 0,339 | - | 0,0% |
| Mg | 0,153 | 398,39 | 13,7% |
| F | 1,000 | - | 0,0% |
| C | 0,296 | 706,06 | 12,6% |
| O | 0,711 | 6675,37 | 49,5% |
| S | 0,666 | 42,17 | 0,3% |
| | | | 100,0% |

| Elementos | Fator de sensibilidade | Área | Percentual atômica |
|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Ti | 2,001 | 32,31 | 0,1% |
| P | 0,486 | 680,75 | 8,2% |
| N | 0,477 | - | 0,0% |
| Ca | 1,833 | 4492,78 | 14,3% |
| Na | 1,685 | 1224,67 | 4,2% |
| Si | 0,339 | - | 0,0% |
| Mg | 0,153 | 307,07 | 11,7% |
| F | 1,000 | | 0,0% |
| C | 0,296 | 435,20 | 8,6% |
| O | 0,711 | 6474,17 | 53,0% |
| S | 0,666 | - | 0,0% |
| | | | 100,0% |

Tabela IV.4 - Percentual atômico dos elementos identificados por XPS na condição 3.

Tabela IV.5 - Percentual atômico dos elementos identificados por XPS na condição 4.

| Elementos | Fator de sensibilidade | Área | Percentual atômico |
|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Ti | 2,001 | 126,64 | 0,3% |
| P | 0,486 | 844,85 | 8,7% |
| N | 0,477 | - | 0,0% |
| Ca | 1,833 | 5498,15 | 15,0% |
| Na | 1,685 | 1634,94 | 4,9% |
| Si | 0,339 | - | 0,0% |
| Mg | 0,153 | 387,43 | 12,7% |
| F | 1,000 | - | 0,0% |
| C | 0,296 | 358,21 | 6,1% |
| O | 0,711 | 7416,62 | 52,2% |
| S | 0,666 | 31,52 | 0,2% |
| | | | 100,0% |

Tabela IV.6 - Percentual atômico dos elementos identificados por XPS na condição 5.

| Elementos | Fator de sensibilidade | Área | Percentual atômico |
|------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------|
| Ti | 2,001 | 144,54 | 0,4% |
| P | 0,486 | 890,34 | 9,2% |
| N | 0,477 | - | 0,0% |
| Ca | 1,833 | 5141,56 | 14,1% |
| Na | 1,685 | 1195,63 | 3,6% |
| Si | 0,339 | - | 0,0% |
| Mg | 0,153 | 379,01 | 12,5% |
| F | 1,000 | - | 0,0% |
| C | 0,296 | 426,44 | 7,2% |
| O | 0,711 | 7494,58 | 53,0% |
| S | 0,666 | - | 0,0% |
| | | | 100,0% |

A tabela IV.7 mostra a razão Ca/P feita a partir dos valores de percentual atômico dos elementos cálcio e fósforo obtidos na análise de XPS.

Tabela IV.7 – Razão Ca/P das condições tratadas, quantificada nos espectros de XPS.

| | % Ca | % P | Ca/P |
|-------------------|-------------|------------|-------------|
| Condição 1 | 15,5 | 8,9 | 1,74 |
| Condição 2 | 12,6 | 6,9 | 1,82 |
| Condição 3 | 14,3 | 8,2 | 1,74 |
| Condição 4 | 15,0 | 8,7 | 1,72 |
| Condição 5 | 14,1 | 9,2 | 1,53 |

V. DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos os resultados dos tratamentos de superfície realizados nas chapas de titânio, comparando-os com os da chapa não tratada.

As imagens de MEV da superfície da CONDIÇÃO Ø (figs. IV.1 e IV.2) mostraram as ranhuras e imperfeições típicas do processo de usinagem da chapa. Com aumentos de até 1000x, não é evidente o efeito dos tratamentos de superfície, à exceção da CONDIÇÃO 1, que se mostra mais texturizada. Esta condição foi utilizada por Diniz (2001) com boa resposta celular (osteoblastos) e aqui empregada como parâmetro de comparação com os demais tratamentos (2 a 5).

A pequena diferença observada nas condições 1 e 2, quando comparadas com a condição Ø em baixo aumento, resultou do compromisso entre a criação de uma elevada textura sem conseqüente redução de espessura das chapas. Isto porque normalmente se utilizam implantes dentários rosqueados e o tratamento de superfície não pode afetar a integridade das roscas com conseqüente diminuição do diâmetro do implante. As brocas cirúrgicas usadas na perfuração óssea apresentam uma compatibilidade de diâmetro com o implante que permite uma fixação primária necessária para desencadear a interação osso-implante (ALBREKTSSON et al, 1981).

Nas imagens da figura IV.3, com 3000x de magnificação, fica mais evidente a texturização provocada pelos tratamentos de superfícies das condições 2 a 5, mostrando um padrão de rugosidade semelhante. Entretanto, o óxido desenvolvido com a finalidade de tornar a superfície bioativa não promove diferenças significativas nas imagens das condições 3, 4 e 5 em relação à 2, que não foi submetido a este tipo de tratamento. Esta análise de superfície está de acordo com os resultados obtidos por LIM et al (2001) e SUL et al (2002).

O óxido obtido por tratamento eletroquímico em superfície de titânio, nas condições aqui empregadas, é estimado em 80nm de espessura (SENA et al, 2002) com base no trabalho de CIGADA et al (1992). Este autor correlacionou as cores dos óxidos formados, obtidos a partir de variações no tratamento de chapas de titânio com

oxidação anódica, com suas espessuras. Para o autor, os óxidos de coloração azulada apresentavam uma espessura aproximada de 80nm. Outros autores apresentam resultados similares com metodologia semelhante. SUL et al, (2001) estudaram o comportamento do crescimento de óxidos anódicos em eletrólitos ácidos e alcalinos e especificam mais detalhadamente a correlação entre cor e espessura dos óxidos, como se pode observar no gráfico da figura V.1. De qualquer forma, a camada de óxido na espessura descrita não é perceptível na forma como foi analisada em MEV.

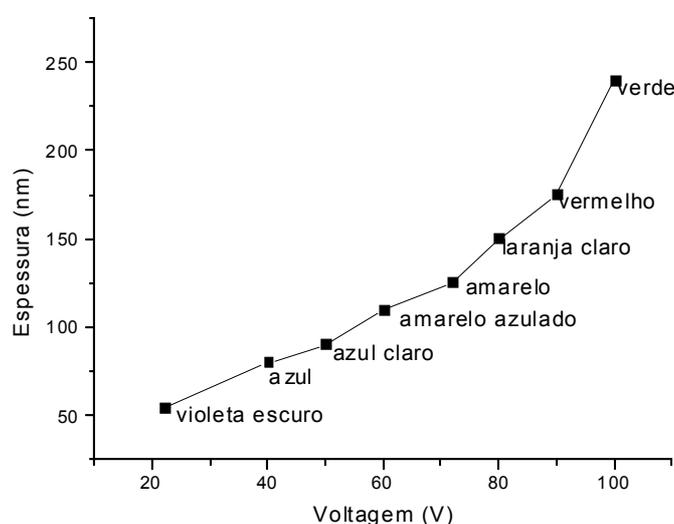


Figura V.1 –Cores relativas às espessuras dos óxidos de titânio obtidos por meio de oxidação anódica com diferentes voltagens (SUL et al, 2001).

Essas impressões sobre a rugosidade das placas de titânio verificadas em MEV devem ser analisadas com cautela pois não são suficientes para uma conclusão definitiva. Devido a sua grande profundidade de campo e acuidade de foco o MEV perde a capacidade de diferenciar alterações no eixo Z, sendo mais indicado para caracterizar aspectos de morfologia. A impressão de rugosidade verificada pode ser definida, na verdade, como diferenças ocorrendo no plano XY. Por isso, devemos empregar um método de caracterização complementar, como a perfilometria para suprir esta deficiência.

Os tratamentos de superfície empregados neste trabalho visaram promover uma texturização adequada para favorecer os eventos celulares que ocorrem na interface osso-implante. De acordo com diversos trabalhos, como os de COOPER (2000), SYKARAS et al (2000) e AMARANTE & LIMA (2001) está comprovado que esta texturização aumenta a área de contato para a aposição óssea, sendo de fundamental importância para um melhor desempenho biomecânico do implante.

As condições de tratamento utilizadas tinham esta finalidade específica e buscou-se fazer uma análise comparativa destas texturas. Para a texturização das superfícies, foram empregados ataques com ácidos sulfúrico/clorídrico e fluorídrico (tabela II.1), largamente relatados na literatura (DINIZ, 2001; BUSER et al, 1998). A análise de rugosidade das superfícies obtidas foi realizada por perfilometria de contato. Este método tem sido amplamente empregado devido a sua simplicidade e resolução apurada, principalmente em amostras em forma plana. Nos casos de análise de implantes industrializados, com roscas, seriam mais indicados os métodos “sem contato”, como o laser confocal (WENNERBERG & ALBREKTSSON, 2000).

Embora haja uma unanimidade em relação aos benefícios do tratamento de superfície de implantes osseointegrados, principalmente por meio de sua texturização, não se observa com clareza um consenso quanto à textura ideal. Isto pode se dever à heterogeneidade de critérios dos autores na seleção de parâmetros empregados na análise das amostras. Outro fator a se considerar é o tipo de técnica utilizada. Como exemplo, pode-se verificar na técnica de detecção de foco uma superestimativa da rugosidade proveniente de reflexões indesejadas durante a varredura do feixe de luz, enquanto que por contato pode haver uma subestimativa decorrente das dimensões físicas do sensor mecânico. Uma das formas de minimizar estes efeitos indesejados é obedecer aos critérios prescritos em normas sobre esta matéria. No caso da análise de implantes dentários ainda não há uma norma que defina como medir e que parâmetros usar.

A quantificação da rugosidade de uma superfície não pode ser expressa somente por meio de um parâmetro (STOUT & BLUNT, 1995). O parâmetro Ra (rugosidade média) é o mais utilizado, e muitas vezes único, representa a média dos

módulos das alturas dos picos e vales em relação a uma linha média. A rugosidade média é comumente considerada como medida de topografia, embora superfícies com mesma rugosidade possam apresentar, e frequentemente apresentam, diferenças topográficas significativas (RATNER et al, 1996). Num caso relatado na literatura, as cabeças de dois acetábulos com mesmo Ra foram implantadas em dois pacientes, resultando em desempenhos clínicos bastante distintos (STOUT & BLUNT, 1995). A falha de um dos acetábulos foi associada ao seu acabamento assimétrico – não expresso pelo Ra, sendo que os picos mais elevados atuaram como abrasivo.

Existem mais de cento e cinquenta parâmetros numéricos de rugosidade, sendo a grande maioria de pouco significado prático, pois não descrevem matematicamente a textura da superfície. A tabela IV.1 mostra os resultados obtidos na análise de perfilometria empregando-se parâmetros mínimos de amplitude, espaçamento e de natureza híbrida recomendados por um comitê da Comunidade Européia (STOUT et al, 1993). Cada parâmetro expressa um comportamento da rugosidade presente na superfície. Os doze primeiros (Sa, Sq, Sz, Ssk, Sku, Sds, Str, Std, SDq, Ssc, Sdr e Sal) representam medidas em 3D e os seis últimos (Ra, Rq, Rsk, Rku, Rsm e RDq) representam medidas em 2D. Há um relativo consenso que as medidas de rugosidade de superfícies em 3D apresentam melhor acuidade e representatividade do que as em 2D (WENNERBERG, 2000), portanto, neste trabalho, será dada ênfase à análise dos parâmetros 3D.

A tabela IV.1 mostra os valores obtidos na análise de rugosidade das superfícies das condições tratadas e não tratada. De acordo com os parâmetros empregados pode-se observar uma similaridade entre os valores de todas as condições, com exceção da condição 4, que apresentou valores muito discrepantes dos demais. Após a verificação desta diferença, realizou-se uma nova análise em uma amostra da mesma condição com resultados similares. Não há razão evidente que justifique essa discrepância, pois a única diferença entre esta condição e a condição 3 é o emprego adicional de um tratamento térmico que visara o espessamento da camada de óxido presente. Do mesmo modo, a única diferença entre as condições 4 e 5 consistia na exposição da amostra, após o tratamento térmico, em uma solução de NaF para incorporação de íons F.

Uma hipótese a se considerar é que a camada de óxido poderia apresentar fragilidade frente à ponta analisadora do perfilômetro e provocar um erro de leitura do aparelho. Entretanto, na condição 5 a situação se repete e não é verificada uma discrepância significativa de valores. Não há relato na literatura que apóie a hipótese da solução de NaF promover uma estabilização da camada de óxido, tornando-a mais resistente ao contato físico. Por outro lado, a solução de hidróxido de sódio é empregada com este propósito (NISHIGUCHI et al, 1999; WANG et al, 2001; FUJIBAYSHI et al, 2002), levando-nos a considerar a hipótese de que o elemento sódio, presente em ambas, teria a propriedade de tornar o óxido mais resistente a esforços mecânicos.

O propósito inicial de submeter as chapas da condição 5 à exposição de uma solução de fluoreto de sódio consistia em aumentar a deposição de fosfato de cálcio durante o teste *in vitro* de bioatividade com a solução simuladora. ELLINGSEN (1995) relata que o pré-tratamento com fluoreto de sódio aumentou em quatro vezes a retenção de implantes colocados em ulnas de coelhos submetidos a ensaio de remoção por torque. A microscopia eletrônica de varredura dos implantes submetidos a este tratamento evidenciou fraturas coesivas no osso sem comprometimento da união osso-implante. Entretanto, não foi possível observar resultados semelhantes em nosso trabalho, talvez em parte pela diferença de metodologia.

Os resultados da tabela IV.1 mostram também valores ligeiramente mais positivos para as condições tratadas em relação à condição como recebida. Os valores de Sa, Sq, Sds, SDq, Str, de um modo geral, apresentam-se maiores nas condições tratadas. A condição 5 apresenta valores muito próximos da condição Ø, o que pode representar uma conseqüência da camada espessa de óxido formada.

O parâmetro Sdr representa a razão da área retificada da amostra pelo plano XY, ou seja o aumento de superfície obtido no tratamento proposto. Neste caso, pode-se observar uma diferença significativa entre as condições Ø e 4 em relação às demais. Como o aumento de superfície é um objetivo importante e desejado no tratamento de superfície, pode-se supor que as condições 1, 2, 3 e 5 apresentariam condições mais favoráveis para a osseointegração.

As figuras IV.5 a IV.11 mostram as superfícies das amostras expostas à solução de SBF por até sete dias. Após um dia já foram observados depósitos ricos em cálcio e fósforo (figura IV.14) similarmente ao obtido em outros trabalhos (KIM et al, 1996; KIM et al, 1997), quando se identificou a presença de fosfatos de cálcio do tipo “apatita biológica”. Estes depósitos aparecem em maior quantidade nas amostras das condições 1, 2, 4 e 5. O aumento do tempo de exposição tende a aumentar a espessura da camada de apatita formada, embora algumas fotomicrografias indiquem o contrário. Este fato pode decorrer da instabilidade da camada formada que pode se dissolver e reprecipitar em face de alterações de pH ou agitação local.

Outro aspecto que parece afetar a precipitação de fosfatos de cálcio a partir de soluções ricas nesses elementos é a macro e microirregularidade da superfície em termos topográficos, químicos e de energia. De acordo com ELLINGSEN (1998), o tamanho e a distribuição das diferentes áreas dos óxidos se relaciona com a estrutura dos grãos do substrato, o que provavelmente reflete que grãos com diferentes planos cristalinos promovam a formação de diferentes morfologias de óxidos. Considerando-se que a camada de óxido atua de forma importante na deposição de fosfatos de cálcio (SUL et al, 2001; SENA, 2003) podemos supor que haverá pontos de maior e menor deposição ao longo da superfície. Em função disso, alguns autores condenam o lixamento mecânico prévio do metal empregado como substrato devido às alterações microestruturais impostas por este procedimento. O lixamento químico parece ser um procedimento mais indicado na preparação das amostras por não induzir tensões indesejáveis.

Em todos os processos de recobrimento a partir de hidroxiapatita em solução por eletroforese (SENA, 2001) ou a partir de soluções ricas em Ca e P (ANDRADE, 1999; VIDIGAL Jr, 2002) se observa dificuldades em se obter uma camada uniforme de apatita na superfície do substrato. Essa dificuldade parece estar também relacionada às propriedades de superfície, sendo de difícil controle a obtenção de superfícies energética e quimicamente homogêneas que possibilitassem uma nucleação uniforme dos fosfatos de cálcio.

Na figura IV.11 todas as superfícies tratadas, após 7 dias, estão recobertas com uma camada aparentemente uniforme de fosfato de cálcio com aspecto semelhante ao descrito por KOKUBO et al (2000). A presença desta “apatita biológica” é indicada como medida da bioatividade da superfície, podendo-se daí esperar um comportamento também favorável quando em contato com o tecido ósseo.

Dada a sua simplicidade, os testes em soluções simuladoras de plasma humano têm sido largamente empregados na avaliação da bioatividade de biomateriais. Entretanto, a diferença nas composições das soluções, o fato de se trabalhar com pH fixo ou não, usar agitação ou não, tornam essa avaliação qualitativa e de certa forma subjetiva. Assim, esses testes podem, na melhor das hipóteses, indicar condições que possam vir a ter um bom desempenho na presença de células ou *in vivo*, sem prescindir destas outras formas de avaliação.

A figura IV.15 apresenta os histogramas da variação do teor de cálcio (mg/l) na solução SBF com os tempos de exposição previstos. A quantidade de cálcio presente na solução representa o quanto não foi depositado sobre as placas de titânio durante o ensaio. Podemos observar que nos tempos t1, t2 e t7 a CONDIÇÃO Ø apresenta valores significativamente maiores que as outras condições que receberam algum tipo de tratamento de superfície. Este fato estaria em concordância com os resultados clínicos que indicam que as superfícies lisas ou usinadas apresentam comportamento menos favorável que superfícies texturizadas em relação à deposição de fosfato de cálcio, durante o processo de integração biológica.

Em relação às outras condições, não é possível destacar uma condição que possua propriedades superiores às demais, com exceção das CONDIÇÕES 1 e 2 em relação às CONDIÇÕES 3, 4 e 5, onde pode-se observar, após 2 dias, uma diferença estatisticamente significativa (teste t de Student), favorável para as condições 3, 4 e 5. Entretanto, ao se observar o comportamento destas condições aos 7 dias de exposição, nota-se um nivelamento do teor de cálcio, conferindo a todas propriedades semelhantes.

Estes resultados estão de acordo com as observações feitas com as fotomicrografias em MEV. A impressão de que após o segundo dia de exposição teria havido uma dissolução do fosfato de cálcio na solução corrobora os resultados acima ao se observar um aumento do teor de cálcio nas CONDIÇÕES 1 e 2 de t1 para t2.

O papel da camada de óxido sobre os implantes de titânio é amplamente descrito na literatura. LARSSON et al (1994), em trabalho *in vivo*, relatam que implantes submetidos a tratamentos eletroquímicos, com voltagens diferentes (10V e 80V), para formação de uma camada de óxido espessa (21nm até 180nm) apresentaram um maior nível de contato com o tecido ósseo em comparação com implantes simplesmente usinados, por meio de análise de MEV. Entretanto, verificaram também que não houve diferenças significativas entre os implantes recobertos com camadas de óxidos com espessuras e cristalinidades distintas. As linhas de pesquisa que visam modificar o óxido, buscam a incorporação de elementos que atuem de forma a tornar a superfície do implante quimicamente atrativa a deposição óssea (ELLINGSEN & PINHOLT, 1995; ELLINGSEN, 1995; McALARNEY et al, 1996; SHIRKHAZADEH, 1998)

Embora de forma não conclusiva, dado ao pequeno número de amostras empregadas, os resultados da análise de Ca na solução parecem indicar que a presença do óxido, nas condições 3 e 5, pode acelerar a formação da camada rica em cálcio e fósforo.

Assim parece que o tratamento óxido associado a um tratamento que promova a texturização da superfície pode ser realmente uma forma de se acelerar a osseointegração. De fato, diversos fabricantes têm incluído em seus catálogos de produtos, superfícies com espessa camada de óxido em substituição aos implantes recobertos com hidroxiapatita. Existem hoje no mercado implantes recobertos com camadas da ordem de μm , o que pode ser questionado uma vez que as reações biológicas ocorrem nas camadas mais externas (da ordem de nm). À medida que a espessura do óxido aumenta, pode aumentar também a tendência ao deslocamento desta, a exemplo do que ocorre com implantes recobertos com hidroxiapatita.

A caracterização por XPS é importante na identificação dos elementos presentes nas camadas atômicas mais superficiais (aproximadamente 10nm) de uma amostra. Entretanto, ainda não se possui uma base de dados precisa que nos permita a identificação inequívoca de todos os espectros. A partir da energia de ligação são identificados as espécies presentes e comparados com valores tabelados para essas energias. Uma limitação aqui verificada é que nem todas as amostras puderam ser analisadas por XPS dado o tempo longo de análise e a elevada demanda do equipamento. A caracterização por XPS das amostras antes da exposição à solução simuladora permitiria a caracterização do óxido formado e a incorporação ou não do flúor na condição 5. Mesmo a condição Ø pós-SBF não pôde ser analisada por ter sido incorporada tardiamente ao planejamento experimental.

Nas amostras analisadas podemos observar, na tabela IV.2, pouco ou nenhum fosfato incorporado (531.5 eV) nas condições 1 (0,0 %), 3 (0,2 %) e 4 (9,1 %). Na condição 2 há uma divisão equitativa entre as três espécies (24,0 – 13,0 – 12,5) e na condição 5 todo o oxigênio se apresenta na forma de fosfato. Isto indicaria uma maior quantidade de fosfato precipitado, possivelmente de cálcio, a partir da solução simuladora, nas condições 3 e 5.

A presença do carbono é comumente verificada devido à contaminação das amostras, sendo inclusive usada como fator de ajuste de escala dos diversos espectros, uma vez que o pico em 285.0 eV estará sempre presente. Diversos autores decompõem o espectro na região do carbono em 4 componentes de acordo com as seguintes energias de ligação: 285.0 eV, 286.3 eV, 288.3 eV e 289.8 eV, que são atribuídas a hidrocarbonetos aromáticos, grupos alcóolicos, grupos RCOO⁻ e carbonatos, respectivamente (TAKADAMA et al, 2001; SENA et al, 2003). Como a intensidade total do carbono era baixa (6,8%, 12,6%, 8,6%, 6,1% e 7,2%, respectivamente para as condições 1 a 5) optou-se por simplesmente indicar o valor dos dois picos que aparecem nos espectros. Em todos os espectros, a espécie carbonato (289.8 eV) está presente, sendo que com maior intensidade na condição 1. Isto sugere a incorporação de carbonato ao fosfato de cálcio formado, especialmente na condição 1. De fato, a chamada “apatita biológica” consiste numa hidroxiapatita

deficiente em cálcio, carbonatada (5 a 8%) e com incorporação de íons Na, Mg e outros.

A presença do cálcio pode sugerir a precipitação de fosfatos de cálcio na superfície das amostras. O espectro do cálcio apresenta dois picos distintos, Ca 2p_{3/2} e Ca 2p_{1/2}, como mostrado na figura IV.19. De acordo com o trabalho de TAKADAMA et al (2001), quando os valores de energia aproximam-se de 347.5 eV e 351.0 eV, podemos esperar a presença de hidroxiapatita na superfície da amostra. Os valores apresentados na figura IV.19 mostram-se compatíveis com os valores encontrados por TAKADAMA et al (2001), levando-nos a crer que houve formação de apatita biológica em todas as amostras analisadas.

Na tabela IV.7 foi indicada a razão Ca/P quantificada nos espectros de XPS. Mesmo considerando um erro de análise típico da ordem de 10%, a condição 5 apresenta razão Ca/P menor que 1,67 (razão estequiométrica), o que corresponde a uma hidroxiapatita cálcio-deficiente. Este resultado pode decorrer da forte presença de oxigênio na forma de fosfato nesta condição, provocando uma redução na razão Ca/P. De qualquer forma, a apatita biológica (presente como mineral no tecido ósseo) apresenta deficiência em cálcio, além dos íons carbonato, Na, Mg e outros.

Em resumo, a análise por XPS permitiu identificar em todas as chapas tratadas e expostas à solução simuladora de plasma humano por 7 dias, a formação de uma camada com composição compatível com a da chamada apatita biológica ou *bone like apatite*, sugerindo que os tratamentos propostos foram capazes de tornar as superfícies bioativas.

VI. CONCLUSÕES

Dentro das limitações da metodologia empregada, e baseado na análise dos resultados obtidos neste trabalho, é possível a formulação das seguintes conclusões:

1. Para a caracterização da textura de uma superfície, é recomendável associar o emprego de microscopia eletrônica (MEV) a uma técnica de análise de perfilometria para caracterizar, respectivamente, tanto sua morfologia quanto sua topografia.
2. A espectroscopia de fotoelétrons por RX (XPS) é fundamental na identificação das espécies químicas presentes na superfície de um material como forma de se correlacionar essas espécies com o comportamento do material *in vitro* ou *in vivo*.
3. A imersão das chapas de titânio cp produzidas em solução simuladora de plasma por 7 dias indicou que os tratamentos de superfície realizados promoveram formação de maior quantidade de uma camada rica em cálcio e fósforo em sua superfície, quando comparados às chapas não tratadas.
4. Nas chapas tratadas, imersas em solução por 7 dias, o depósito formado apresentou composição compatível com a chamada “apatita biológica” que é indicada como sendo o indutor do processo de formação óssea *in vivo*.
5. Em relação aos tratamentos empregados, não se observou diferença significativa quanto às propriedades bioativas das superfícies geradas.

VII. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Ensaio empregando cultura de células ou *in vivo*.
2. Caracterização da camada de óxido formada por processo eletroquímico e térmico.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M., MCCARTHY, M. B., GRONOWICZ, G., 1999, “An in vitro model for mineralization of human osteoblast -like cells on implants materials”, *Biomaterials*, v. 20, pp. 211-20.
- ALBREKTSSON, T., BRANEMARK, P.I., HANSSON, H. A., et al., 1981, “Osseointegrated titanium implants”, *Acta Orthop. Scand.*, v. 52, pp.155-70.
- AMARANTE, E. S., LIMA, L. A., 2001, “Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido: estado atual”, *Pesq. Odontol Bras.*, v. 15, pp. 166-73.
- ANDRADE, M.C., 1999, “Nucleação e crescimento de hidroxiapatita em titânio”. Tese D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- ANSELME, K., 2000, “Osteoblast adhesion on biomaterials”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 667-81.
- ANSELME, K., BIGARELLE, M., NOEL, B., et al., 2000a, “Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses”, *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 49, pp.155-66.
- ANSELME, K., LINEZ, P., BIGERELLE, M., et al., 2000b, “The relative influence of the topography and chemistry of TiAl₆V₄ surfaces on osteoblastic cell behaviour”, *Biomaterials*, v.21, pp.1567-77.
- ATHANASIOU, K. A., THOMA, B. S., LANCTOT, D. R., et al., 1999, “Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell”, *Biomaterials*, v. 20, pp. 2405-15.

- BAGAMBISA, F. B., KAPPERT, H. F., SCHILLI, W., 1994, "Cellular and molecular biological events at the implant interface", *J. Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v. 22, pp.12-7.
- BAIER, R. E., MEYER, A. E., NATIELLE, J. R., et al., 1984, "Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.18, pp.337-55.
- BERZINS, A., SHAH, B., WEINANS, H., et al., 1997, "Non destructive measurements of implant-bone interface shear modulus and effects of implant geometry in pull-out tests", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 34, pp.337-40.
- BLOEBAUM, R. D., BACHUS, K. N., MOMBERGER, N. G., et al., 1994, "Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, n. 5, pp.537-44.
- BOWERS, K. T., KELLER, J. C., RANDOLPH, B. A., et al., 1992, "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 7, pp. 302-10.
- BRANEMARK, P. I., ADELL, R., BREINE, U., et al., 1969, "Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies", *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, v. 3, n. 2, pp.81-100.
- BRUNETTE, D. M., 1988, "The effect of implant surface topography on the behaviour of cells", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 3, pp. 231-46.
- BUSER, D., SCHENK, R. K., 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.

- BUSER, D., NYDEGGER, T., HIRT, H. P., et al., 1998, "Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.13, pp. 611-19.
- BUSER, D., NYDEGGER, T., OXLAND, T., et al., 1999, "Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.45, pp. 75-83.
- CIGADA, A., CABRINI, M., PEDEFERRI, P., 1992, "Increasing of the corrosion resistance of the Ti6Al4V alloy by high thickness anodic oxidation", *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v. 3, pp. 408-412.
- COOPER L. F., 2000, "A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants", *J. Prosthet. Dent.*, v. 84, pp.522-34.
- COOPER L. F., MASUDA, T., WHITSON, S. W., et al., 1999, "Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces", *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v.14, pp.37-47.
- DAGNALL, H., 1986, "Exploring surface texture". Leicester, Rank Taylor Hobson Limited.
- DINIZ, M. G., SADER, M. S., SOARES, G. A., 2001, "Superfície de titânio modificada por jateamento mecânico e/ ou tratamento ácido", *Rev. Bras. Odontol.*, v.58, pp.135-138.
- EDELMAN, G. M., 1983, "Cell adhesion molecules", *Science*, v. 219, p. 450-57.
- ELLINGSEN, J. E., 1995, "Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone", *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v. 6, pp. 749-53.

- ELLINGSEN, J. E., 1998, "Surface configuration of dental implants", *Periodontology 2000*, v.17, pp.36-46.
- ELLINGSEN, J. E., 2000, "On the Properties of Surface-Modified Titanium". In: Davies, J. E., *Bone Engineering*, pp. 183-9, Toronto, Canada, EM².
- ELLINGSEN, J. E., PINHOLT, E. M., 1995, "Pretreatment of titanium implants with lanthanum ions alters the bone reaction", *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v. 6, pp. 125-29.
- ESPOSITO, M., LAUSMAA, J., HIRSCH, J., et al., 1999, "Surface analysis of failed oral titanium implants", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 48, pp. 559-68.
- FUJIBAYASHI, S., NAKAMURA, T., NISHIGUCHI, S., et al., 2001, "Bioactive titanium: effect of sodium removal on the bone-bonding ability of bioactive titanium prepared by alkali and heat treatment", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 56, pp.562-70.
- GLANTZ, P-O., ARNEBRANT, T., NYLANDER, T., et al., 1999, "Bioadhesion: a phenomenon with multiple dimensions", *Acta Odontol. Scand.*, v. 57, pp.238-41.
- HANSSON, S., NORTON, M., 1999, "The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants: a mathematical model", *J. Biomechanics*, v. 32, pp.829-36.
- HOWLETT, C. R., EVANS, M. D., WALSH WR, et al., 1994, "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture", *Biomaterials*, v. 15, pp.213-22.
- HURÉ, G., DONATH, K., LESOURD, M., et al., 1996, "Does titanium surface treatment influence the bone-implant interface? sem and histomorphometry in a 6-month sheep study", *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v.11, pp.506-11.

- JAFFIN, R. A., BERMAN, C. L., 1991, "The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis", *J. Periodontol.*, v. 62, n. 1, pp. 2-4.
- JONES, F. H., 2001, "Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials", *Surface Science Reports*, v. 42, pp. 75-205.
- KELLER, J. C., STANFORD, C. M., WIGHTMAN, J. P., et al., 1994, "Characterizations of titanium implant surfaces (III)", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 28, pp.939-46.
- KIM, H. M., MIYAJI, F., KOKUBO, T., et al., 1996, "Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 32, pp. 409-17.
- KIM, H. M., MIYAJI, F., KOKUBO, T., et al., 1997, "Effect of heat treatment on apatite-forming ability of Ti metal induced by alkali treatment", *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v.8, pp. 341-47.
- KIM, K., M. KISHIMOTO, K., MIYAJI, F., et al, 1999, "Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products", *J Biomed Mater Res.*, v.46, pp. 228-35.
- KIM, H. M., KOKUBO, T., MIYAJI, F., et al., 2001, "Revised simulated body fluid". In: *Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine*, pp 47-50, Bologna, Italy, Nov.
- KLOHHEVOLD, P. R., NISHIMURA, R. D., ADACHI, M., et al, 1997, "Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit", *Clin. Oral Impl. Res.*, v. 8, pp.442-7.

- KOKUBO, T., KUSHITANI, H., EBISAWA, Y., et al, 1989, "Apatite formation on bioactive ceramics in body environment", In: OONISHI, H., AOKI, H., SAWAI, K. (eds), *Bioceramics*, vol. 1. Tokyo, Japan, Ishiyaku EuroAmerica.
- KOKUBO, T., KUSHITANI, H., SAKKA, S., et al, 1990, "Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W". *J. Biomed. Mater. Res.*, v.24, pp.721-34.
- KOKUBO, T., KIM, H. M., KAWASHITA, M., et al., 2000, "What Kinds of Materials Exhibit Bone-Bonding?" In: DAVIES, J. E., *Bone Engineering*, pp. 190-4, Toronto, Canada, EM².
- LAMPIN, M., WAROCQUIER-CLÉROUT, R., LEGRIS, C., et al., 1997, "Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.36, pp.99-108.
- LARSSON, C., THOMSEN, P., LAUSMAA, J., et al., 1994, "Bone response to surface modified titanium implants: studies on eletropolished implants with different oxide thicknesses and morphology", *Biomaterials*, v.15, pp.1062-74.
- LARSSON, C., 2000, "The interface between bone and implants with different surface oxide properties", *Applied Osseointegration Research*, v.1, pp. 9-14.
- LAUSMAA, J., MATTSSON, L., ROLANDER, U., et al., 1986, "Chemical composition and morphology of titanium surface oxides". In: Williams, J. M. et al., *Biomedical Materials, Materials Research Society*, pp. 351-9, Pittsburgh, USA.
- LEVENTHAL, G. S., 1951, "Titanium: a metal for surgery", *J. Bone Joint Surg.*, v. 33A, pp. 473.

- LIM, Y. J., OSHIDA, Y., ANDRES, C. J., et al., 2001, "Surface Characterizations of variously treated titanium materials", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.16, pp. 333-42.
- MAURER, A. M., 1997, "Surface chemistry and cell reactions". *10th Eur. Conf. Biomaterials*, Davos, Suíça.
- McALARNEY, M. E., OSHIRO, M. A., McALARNEY, C. V., 1996, "Effects of titanium dioxide passive film crystal structure, thickness, and crystallinity on C3 adsorption", *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v.11, p. 73-80.
- MISCH, C. E., 2000, "Implantes Dentários Contemporâneos". 2 ed. São Paulo, Santos.
- MORGAN, J. R., YARMUSH, M. L., 1999, "Tissue engineering methods and protocols". USA, Humana Press.
- NISHIGUSHI, S., NAKAMURA, T., KOBAYASHI, M., et al., 1999, "The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium", *Biomaterials*, v. 20, pp. 491-500.
- QUIRYNEN, M., NAERT, I., VAN STEENBERGHE, D., et al., 1992, "Periodontal aspects of osseointegrated fixtures supporting a partial bridge: an up to 6-years retrospective study", *J. Clin. Periodontol.*, v . 19, n. 2, pp.118-26.
- RATNER B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., et al., 1996, "Biomaterials science – An Introduction to Materials in Medicine,". Inglaterra, Academic Press.
- REZANIA A., THOMAS, C. H., BRANGER, A. B., et al., 1997, "The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.37, pp.9-19.

- SCHENK R. K., BUSER, D., 1998, "Osseointegration: a reality", *Periodontology* 2000, v. 17, pp.21-35.
- SENA, L. A., ROCHA, N. C. C., ANDRADE, M. C., et al., 2003, "Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with tick oxide film", submetido a publicação.
- SHIRKHZANZADEH, M., 1998, "Nanoporous alkoxy-derived titanium oxide coating: a reactive oberlayer for funcionalizing titanium surface", *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v. 9, pp. 355-362.
- SILVA, M. H. P., 1999, "Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: Desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro". Tese D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- STEINEMANN, S. G., 1998, "Titanium: the material of choice?", *Periodontology* 2000, v. 17, pp.7-20.
- STOUT, K. P., SULLIVAN, P. J., DONG, W. P., et al., 1993, "The development of methods for the characterization of roughness in 3D", Commission of the European Communities, Birmingham, Inglaterra.
- STOUT, K. J., BLUNT, L. A., 1995, "Application of 3D Topography to Bio-Engineering", *Int. J. Mach. Tools Manufact.*, v. 35, n.2, pp219-29.
- SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., JEONG, Y., et al., 2001, "The eletrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline eletrolytes", *Medical Engineering and Physics*, v. 23, pp. 329-46.
- SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., PETRONIS, S., et al., 2002, "Characteristics of the surface oxides on turned and eletrochemically oxidized thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition", *Biomaterials*, v. 23, pp. 491-501.

- SYKARAS, N., IACOPINI, 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. 675-90.
- TAKADAMA, H. M., KIM, H. M., KOKUBO, T., et al., 2001, "An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.55, n. 2, pp.185-93.
- TRUSKEY, G. A., PIRONE, J. S., 1990, "The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 24, pp.1333-53.
- UNGERSBÖCK, A., RAHN, B., 1994, "Methods to characterize the surface roughness of metallic implants", *J. Mater. Sci: Mater. Med*, v.5, pp.434-40.
- VIDIGAL Jr, G. M., 2002, "Caracterização da Resposta dos Tecidos Ósseos Sadios e Osteoporóticos aos Implantes de Titânio e Implantes Recobertos com Hidroxiapatita". Tese (M.Sc). COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- VON RECUM, A. F., 1999, "Handbook of biomaterials evaluation". 2. ed. USA, Taylor & Francis.
- WANG, X., HAYAKAWA, S., TSURU, K., et al., 2001, "A comparative study of *in vitro* apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.* v. 54, pp. 172-8.
- WENNERBERG, A., 1996, "On surface roughness and implant incorporation". Ph.D. dissertation, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden.
- WENNERBERGER, A., ALBREKTSSON, T., 2000, "Suggested Guidelines for The Topographic Evaluation of Implant Surface", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.15, pp. 331-44.

WILKE, H. J., CLAES, L., STEINEMANN, S., 1990, "The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone." In: HEIMKE, G., SOLTÉSZ, U., LEE, A. J. C. (eds), *Advanced Biomaterials*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp 309-314.

WONG, M., EULENBERGER, J., SCHENK, R., et al., 1995, "Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone", *J. Biomed. Mater. Res.*, v.29, pp.1567-75.