



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MILAGROS DEL VALLE EL ABRAS ANKHA

**EFEITO *IN VIVO* DA DEPOSIÇÃO DE FILMES DE DLC COM
E SEM NANO-PARTÍCULAS DE PRATA SOBRE LIGA DE
TITÂNIO PARA UTILIZAÇÃO EM PRÓTESES
ARTICULARES**

2015

MILAGROS DEL VALE EL ABRAS ANKHA

**EFEITO *IN VIVO* DA DEPOSIÇÃO DE FILMES DE DLC COM
E SEM NANO-PARTÍCULAS DE PRATA SOBRE LIGA DE
TITÂNIO PARA UTILIZAÇÃO EM PRÓTESES
ARTICULARES**

Dissertação apresentada ao Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área em Patologia Bucal.

Orientadora: Prof. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho
Co-orientadora: Prof. Dra. Polyana Alves Radi Gonçalves

São José dos Campos
2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

El Abras Ankha, Milagros del Valle

Efeito in vivo da deposição de filmes de DLC com e sem nano-partículas de prata sobre liga de titânio para utilização em próteses articulares / Milagros del Valle El Abras Ankha. - São José dos Campos : [s.n.], 2015.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientadora: Yasmin Rodarte Carvalho

Co-orientadora: Polyana Alves Radi Gonçalves.

1. Prótese Articular. 2. Nano-tecnologia. 3. Hipersensibilidade. 4. Transtornos da Articulação Temporomandibular. 5. Osseointegração. I. Rodarte Carvalho, Yasmin, orient. II. Alves Radi Gonçalves, Polyana, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 14 de janeiro de 2015

E-mail: doc_elabras@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP- Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP- Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz

Curso de Odontologia

Universidade de Potiguar, Natal-RN

São José dos Campos, 14 de Janeiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Principalmente a Deus, por me dar saúde e ter dado a oportunidade de ter uma família e amigos maravilhosos.

A meus pais, Moein Ishak El Abras e Maha Ankha de El Abras, pelo amor, dedicação e apoio.

A meus irmãos, Antonio e Jul, que mesmo estando longe me deram alegria quando precisei.

A meu companheiro de vida, Alecsandro de Moura Silva, pelo carinho e apoio incondicional, além de ter contribuído no desenvolvimento desta pesquisa.

A meus amigos, que sempre estão presentes, mesmo nos momentos mais difíceis.

A meu avô, Antonio Sarkis El Abras, que em paz descanse, por me apoiar na minha carreira.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Virgem del Valle, pela vida que me deram e me permitir chegar até aqui e mais...

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial:

À minha Orientadora, a Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho, pela amizade, dedicação, ensino e em especial pela oportunidade.

À Profa. Dra. Luana Marotta R. de Vasconcellos, pela amizade e dedicação.

À Profa. Dra. Janete Dias de Almeida, pela amizade e dedicação.

À Profa. Dra. Estela K. Tango, pela amizade e dedicação.

À Prof. Dra. Renata Falchete do Prado, pela amizade e dedicação.

À Prof. Dra. Ana Lia Anbinder, pela dedicação e excelente ensino.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Polyana Alves R. Gonçalves, pela amizade e dedicação.

A meus companheiros da pós-graduação, pelo apoio e alegrias, em especial a: Renata Moraes, Renata Pilli Joias, Adriana Caris, Gabriela Santana, Maria Fernanda Villaça, Monica Gislaine Oliveira Alves, Rosana Ferreira Silva, Lara Tolentino, Gabriela Lima.

À aluna de pós-doutorado, Profa. Dra. Yonara Marques, pela amizade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo, pela amizade e dedicação.

Ao Laboratório de plasma do ITA-Instituto de Tecnologia de Aeronáutica de São José dos Campos, por conceder o espaço para minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Argemiro S. da Silva Sobrinho, da Divisão de Ciências Fundamentais do ITA, Departamento de Física, por conceder parte de seu tempo para desenvolver a minha pesquisa.

Ao Doutorando Leandro Lameiro, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa Espacial – INPE, por conceder espaço nos laboratórios de espectroscopia RAMAN e Perfilometria óptica, que ajudou a desenvolver o meu trabalho.

Aos Técnicos do laboratório de Patologia e histologia, do Departamento de Biociências do ICT – Unesp, Campus de São José dos Campos, em especial a Maria Salete Faria, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos Alunos de Iniciação Científica: Maiara Penteadó Camaliente, Mauricio Augusto Camargo, Juliana Mariano Beraldo, Daiane Acácia Griti Bueno, por contribuir neste trabalho.

Ao ICT-Unesp e seus funcionários, por manter um ótimo ambiente de estudo e trabalho.

A Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano Leite, do Departamento de Caracterização de Materiais, Laboratório de MEV do IPD da UNIVAP, por ter contribuído com este trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro concessão da bolsa

SUMARIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Biomateriais e suas propriedades ideais em próteses articulares	15
2.2 As próteses articulares e suas falhas	22
2.3 Filmes de carbono tipo diamante (DLC)	24
2.2.1 Deposição de filmes de carbono tipo diamante (DLC).....	26
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Grupos experimentais	30
4.2 Amostras	30
4.3 Animais	36
4.3.1 Procedimento cirúrgico.....	36
4.3.2 Eutanásia.....	38
4.4 Análise físico-químicas	40
4.5 Estudo histológico e histomorfométrico	42
4.5.1 Preparo do tecido ósseo.....	42
4.5.2 Análise quantitativa da neoformação óssea	44
4.6 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47

5.1 Caracterização das amostras	47
5.1.1 Microscopia eletrônica por varredura (MEV) e análise por espectrometria de dispersão de Rx (EDS).....	47
5.1.2 Análise dos espectros Raman dos filmes DLC e DLC-Ag	58
5.1.3 Análise de resistência elétrica.....	62
5.2 Análise macroscópica do tecido ósseo junto com a amostra.....	62
5.3 Análise histológica do tecido ósseo	63
5.4 Análise histomorfométrica da neoformação óssea.....	67
6.DISSCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÃO	82
8 REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	96
ANEXOS	97

Ankha MVA. Efeito *in vivo* da deposição de filmes de DLC com e sem nano-partículas de prata sobre liga de titânio para utilização em próteses articulares [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Materiais de revestimento duros para melhorar as propriedades biotribológicas das próteses articulares, estão sendo foco de pesquisa há algum tempo. Vários tipos de filmes de carbono têm sido descritos relatando falhas e sucessos e também sugerindo a necessidade de mais pesquisas. Frente a isso, este trabalho teve o objetivo de avaliar as características estruturais e de neoformação óssea de filmes de carbono tipo diamante com e sem nano-partículas de prata (DLC e DLC-Ag, respectivamente), aplicados por plasma (PECVD) em liga de titânio (Ti-6Al-4V). Sessenta amostras de Ti-6Al-4V, foram divididas em três grupos nos quais: 20 eram recobertas com filme de DLC, 20 com DLC-Ag e 20 sem recobrimento. Após a caracterização estrutural, as amostras foram fixadas bilateralmente no ângulo da mandíbula de 30 coelhos da raça Nova Zelândia. Após os períodos de 15 e 90 dias os animais foram eutanasiados e cinco amostras por grupo foram escolhidas aleatoriamente para a caracterização pós-operatória e cinco para análise qualitativa e quantitativa da neoformação óssea. Os dados foram tratados estatisticamente, por análise descritiva e inferencial, mediante o teste paramétrico ANOVA dois fatores de medidas repetidas e quando foi necessário o teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05\%$). Verificou-se que os filmes de DLC e DLC-Ag apresentaram alta resistência elétrica e não sofreram grandes modificações em seu espectro Raman, após os períodos de 15 e 90 dias. Na análise histológica após o período de 15 dias, observou-se trabéculas ósseas imaturas proliferando do osso preexistente em direção à amostra e, por vezes, recobrimo parcialmente a superfície da mesma. No período de 90 dias foi difícil delimitar a área de osso neoformado do preexistente, apresentando-se

com as características de osso maduro e organizado, abrangendo a interface quase na sua totalidade, na maioria dos casos. Isto foi observado nos três grupos, confirmando os resultados obtidos na análise histomorfométrica, em que não houve diferença estatística significativa em relação ao tipo de amostra ($p=0,3475$). Quando o fator tempo foi avaliado, observou-se maior neoformação óssea (69,649%) no grupo DLC no período de 90 dias, com relação a todos os grupos no período de 15 dias ($p=0,001$), não havendo diferença significativa entre os grupos no período de 90 dias. Em conclusão, pode se dizer que os filmes de DLC e DLC-Ag apresentaram resultados promissores quanto à sua estrutura e à neoformação óssea, não havendo diferença estatística significativa com relação ao Ti-6Al-4V, material que é usado como padrão ouro em próteses articulares e demais aplicações biomédicas.

Palavras - chaves: Prótese Articular. Nanotecnologia. Hipersensibilidade. Artropatias. Transtornos da Articulação Temporomandibular. Osseointegração.

Ankha MVA. Effect of Diamond Like Carbon film deposition with and without silver nanoparticles on titanium alloy to be used in joint prosthesis [*dissertation*]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

Hard coating materials to improve the biotribologic properties of joint prostheses have been the focus of research for some time. Various types of carbon films have been described, reporting failures and successes and also suggesting the need for more research. Because of that, the aim of this work was to evaluate the structural characteristics and biocompatibility of diamond-like carbon films with and without nano-particles of silver (DLC and DLC-Ag, respectively), applied by plasma (PECVD) on a titanium alloy (Ti-6Al-4V). Sixty samples of Ti-6Al-4V, were divided into three groups in which 20 were coated with DLC film, 20 with DLC-Ag and 20 without coating. After the structural characterization, samples were fixed bilaterally in the mandible angle of 20 rabbits of New Zealand race. After periods of 15 and 90 days the animals were euthanized and five samples per group were randomly assigned to postoperative characterization and five for qualitative and quantitative analysis of new bone formation. The data were treated statistically, using descriptive and inferential analysis, by ANOVA parametric test two factors for repeated measures and when necessary, the multiple comparison test of Tukey ($p < 0.05\%$). It has been found that the DLC and DLC-Ag films showed high electrical resistance and did not suffer significant changes in its Raman spectrum after periods of 15 and 90 days. Histological examination after 15 days showed proliferating immature bone trabeculae, from the preexisting bone in the direction of the sample and sometimes partially covering its surface. At 90 days it was difficult delineate the newly formed bone area of the preexisting. Mature and organized bone was seen within the interface, comprising almost its entirety, in

most cases. This was observed in all groups, confirming the results obtained in the histomorphometric analysis, there was no statistically significant difference regarding the type of sample ($p=0.347$). When the time factor was assessed, there was greater bone formation (69.649%) in group DLC in 90 days, with respect to all groups in the 15-day period ($p = 0.001$), with no significant difference among the groups within 90 days. In conclusion it may be said that the DLC and DLC-Ag films presented promising results regarding biocompatibility and bone formation, with no statistically significant difference with Ti-6Al-4V, material that is used as the gold standard in joint prostheses and other biomedical applications.

Key words: Joint Prosthesis. Nanotechnology. Hypersensitivity. Joint Diseases. Temporomandibular Joint Disorders. Osseointegration.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida média têm levado a uma maior incidência de casos de doenças articulares, tais como osteoartrose ou artrite reumatoide, que, em alguns casos, necessitam da substituição total ou parcial da articulação por implantes artificiais (Ariza et al., 2008). Os problemas surgem, em particular, nas articulações do quadril e do joelho, estendendo-se, em menor escala, a outras articulações como ombro, tornozelo e a articulação temporomandibular (ATM) (Wolford et al., 2014).

A substituição total da articulação por implantes ortopédicos fabricados com ligas metálicas, ancorados ao osso tanto por cimento quanto por contato direto entre o metal e o osso, tem sido utilizada como uma ferramenta de grande sucesso para aliviar a dor e melhorar a função, e assim, a qualidade de vida de pacientes em fase final de artrites (Kilgus et al., 1991). Apesar dos avanços técnicos, todos os implantes de substituição total podem sofrer alterações técnicas que ainda não foram resolvidas como: afrouxamento asséptico, osteólise (Gallo et al., 2013), lixiviação (extração de substância de um material sólido provocado pela dissolução de um líquido) de íons (Blumenthal, Cosma, 1989; Vijayaraghavan et al., 2012), metalose (geração de resíduos de partículas), incompatibilidade

do módulo de elasticidade (Guo et al., 2013) e hipersensibilidade aos componentes da liga metálica (Hallab et al., 2002).

Quando a liga Ti-6Al-4V é implantada no corpo humano ocorrem mudanças em sua camada protetora que propiciam a liberação de produtos de corrosão (Guo et al., 2013), podendo causar tanto alterações sistêmicas (Morais et al., 2007) quanto locais, e conseqüentemente a perda do implante ou prótese.

Tendo em vista a percentagem de falhas que têm sido descritas na literatura ortopédica (Trava-Airoldi et al., 2007; Hauert et al., 2013) em relação às próteses articulares, vários estudos têm sido feitos para melhorar as propriedades biotribológicas e mecânicas das mesmas, idealizando um filme protetor que seja capaz de diminuir o atrito entre as superfícies articulares, que apresente a dureza suficiente para suportar a carga da função e que evite a liberação de íons tóxicos a partir da liga metálica (Thomson et al., 1991; Trava-Airoldi et al., 2007; Li et al., 2011; Hauert et al., 2012)

O filme de carbono tipo diamante (Diamond like carbon - DLC) é um revestimento duro, semelhante ao diamante, biocompatível com células humanas (Lu et al., 1993; Trava-Airoldi et al., 2007) que apresenta alta resistência ao desgaste, baixo coeficiente de atrito, alta inercia química, amplo "band gap" semicondutor (sendo isolante) e com propriedades bactericidas (Lau et al., 2001).

O efeito bactericida do filme de DLC tem sido estudado nos últimos anos e foi constatado que a adição de nanopartículas de prata aumenta esse efeito contra *Staphylococcus aureus* (Cloutier et al., 2014b).

Na literatura existem vários estudos em relação a este filme, com variação dos parâmetros de deposição, composição e aplicação que tem demonstrado resultados tanto positivos (Hauert et al., 2013; Papo et al., 2004; Marciano et al., 2009; Roy ME et al., 2010; Li et al., 2011; Love et al., 2013; Okasaki, 2014) quanto negativos (Hauert et al., 2010; Cloutier et al., 2014a). As controvérsias encontradas sugerem a necessidade de mais estudos, em busca de um filme protetor de boa qualidade, com alta aderência e que apresente propriedades tribológicas adequadas, alta resistência à corrosão e isolante térmico e elétrico para ser usado como recobrimento de implantes para uso biomédico.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar algumas propriedades físico-químicas e o efeito na osseointegração do filme de DLC e de DLC dopado com nano-partículas de prata como recobrimento da liga Ti-6Al-4V antes e após permanência em *in vivo* para uso em próteses articulares.

A hipótese deste estudo é que o recobrimento de próteses articulares com filme de DLC e de DLC dopado com nano-partículas de prata irá servir como uma camada protetora em superfícies funcionais ou não, evitando a liberação de elementos tóxicos presentes na liga metálica, não interferindo com a osseointegração; diminuindo também, a sensibilidade causada pelo impulso elétrico neuromuscular em mudança de temperatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com o aumento no número de implantes inseridos cada ano, a diminuição na idade dos pacientes considerados para a substituição da articulação, e uma população que está vivendo mais, surge a necessidade do uso de implantes ou biomateriais de longa duração (Mercuri, Anspach, 2003). Isto está se tornando uma das maiores preocupações na atualidade (Love et al., 2013), sendo que a média de vida de 15 anos para implantes de quadril não é suficiente para uma população que pode exigir 30-40 anos de função (Ebramzadeh et al., 2011). Isto também deve ser considerado para as outras articulações do organismo (Mercuri, Anspach, 2003).

2.1 Biomateriais e suas propriedades ideais em próteses articulares

Biomaterial é qualquer substância, medicamento ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser usado por um período de tempo, como um sistema completo ou parte de um sistema de tratamento, aumentando ou substituindo qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Galletti, 1997).

Quando necessário o uso de um biomaterial para reconstruir ou substituir uma articulação, o sucesso do mesmo depende de vários fatores, principalmente da biocompatibilidade e da biofuncionabilidade (Krecisz et al., , 2012).

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material de ser tolerado pelo organismo vivo, por um determinado tempo, em uma determinada aplicação (Willians, 1987).

Biofuncionabilidade significa que o material deve ter as características mecânicas adequadas para cumprir a função desejada pelo tempo necessário (Choung, Young, 2003; Oréfice et al., 2006).

Material aloplástico, refere-se a um material capaz de ser colocado dentro de um organismo vivo e que mesmo sendo diferente, possa comportar-se de maneira semelhante ao tecido próprio do organismo, sendo tolerado por este (Bissada, Hangorsky, 1980).

A história das próteses aloplásticas tem sido caracterizada por falhas devido a desenhos inapropriados e a desatenção aos princípios biomecânicos (Quinn, 2000; Mercuri, 2000, 2006; Gispert et al., 2007). O sucesso das próteses aloplásticas depende das características, tanto estruturais quanto funcionais. Estas devem ser principalmente biocompatíveis, apresentar baixo coeficiente de atrito, escoamento e fadiga, e possuir adaptabilidade a estruturas anatômicas e suas funções (Sedarat et al., 2001; Wolford, 2006, Roy ME et al., 2010; Gustafson et al., 2014).

Em relação à biocompatibilidade e à adaptabilidade dos implantes aloplásticos, em especial os implantes não cimentados, é importante que exista o processo de osseointegração, para manter a sobrevivência e estabilidade do implante por um longo período de tempo (Brånemark et al., 2001; Goriainov et al., 2014).

O termo "osseointegração" é derivado do latim "os" (que significa osso) e "Integrare" (se tornar inteiro, fazer um só), foi inicialmente inventado pelo Professor Per-Ingvar Brånemark no final de 1950, após observar a integração do titânio ao osso (Brånemark et al., 2001), secundária à formação de um contato direto entre o osso e o implante (Linder et al., 1988).

A osseointegração é definida como o processo pelo qual é conseguida a fixação rígida, de materiais aloplásticos, clinicamente assintomática e mantida no osso durante a carga funcional (Zarb, Albrechtsson, 1991). Para que ocorra a osseointegração, se espera a ausência de qualquer resposta inflamatória e formação de tecido fibroso ou conjuntivo na interface osso-implante (Iezzi et al., 2014).

A osseointegração pode ser interrompida mais cedo, levando à perda da estabilidade primária e migração precoce, resultando no afrouxamento do implante (Karrholm et al., 1997). Atualmente, o afrouxamento asséptico é a causa mais comum de falhas em artroplastia de quadril e de joelho, em 40 e 32% de todos os casos, respectivamente. Esta alteração, provavelmente pode estar

associada à presença de um desenho inapropriado e ao material do implante (Goriainov et al., 2014).

Diferentes materiais têm sido usados para a fabricação das próteses articulares ou implantes ortopédicos, alguns já excluídos do mercado como o Silastic, conforme Schliephake et al. (1999), e o Proplast/Teflon, por ocasionar respostas indesejáveis, como reação de corpo estranho e osteólise respectivamente; outros ainda usados embora apresentem limitações ou problemas quanto à sua aplicabilidade, conforme citado adiante:

a) Vitallium

É uma liga de cobalto-cromo-molibdênio (Co-Cr-Mo), bem aceita pelos seres humanos em dispositivos ortopédicos desde 1960, atualmente usados como padrão ouro em próteses de quadril (Merritt, Brown, 1996; Mercuri, Anspach, 2003; Wolford, 2006). Reações de hipersensibilidade e osteólise foram relatadas em próteses articulares metal sobre metal, provavelmente provocados por partículas liberadas pelo atrito e desgaste das superfícies da prótese (Vijayaraghavan et al., 2012, Krecisz et al., 2012). Entretanto, quando combinaram o Co-Cr-Mo com o polietileno de alto peso molecular, a liberação de partículas de

desgaste diminuiu de 4 a 5 vezes, quando comparada com as próteses metal – metal (Jacobs et al., 1994; Wolford, 2006);

b) Polietileno de ultra-alto peso molecular (UHMWPE)

O UHMWPE é usado como componente articular por ser biocompatível, apresentar um módulo de elasticidade semelhante ao osso e baixo coeficiente de atrito e desgaste (Fook et al., 2007). Por outro lado, quando a prótese articular é confeccionada em combinação com metal, partículas do UHMWPE são liberadas por desgaste, ocasionando dor e perda da função, mas quando o mesmo é usado em combinação com a cerâmica a liberação dessas partículas se reduz em 50% (Donnet JB et al., 2008; Okasaki, 2014);

c) Liga de titânio-alumino-vanádio (Ti-6Al-4V)

Esta liga tem recebido especial atenção como biomaterial desde 1991, devido a suas propriedades de biocompatibilidade, alta resistência mecânica e alta resistência à corrosão (Jacobs et al., 1994; Turvey et al.,

2002). Entretanto, esta liga é mais vulnerável quando comparada com o titânio comercialmente puro, pois apresenta uma camada superficial de óxido de titânio e óxido de alumínio que facilita a lixiviação de íons, em especial de Ti e Al (Saldaña et al., 2006; Morais et al., 2007). Dos componentes desta liga metálica, o Al e o V são considerados os mais tóxicos (Sedarat et al., 2001; Latysh et al., 2006). O alumínio afeta localmente a proliferação, atividade metabólica e diferenciação dos osteoblastos (Saldaña et al., 2006) e quando relacionado com efeitos sistêmicos, este pode causar osteomalácia, granulomatose pulmonar (Sedarat et al., 2001), encefalopatias do tipo Alzheimer e demência senil (Liu et al., 2014).

Apesar de alguns autores relatarem ausência de sinais patológicos associados com a liberação de íons de titânio (Sedarat et al., 2001; Meyer et al., 2006), partículas deste metal podem promover a proliferação de fibroblastos, provocando fibrose ao redor do implante, e diminuição no número e atividade de osteoblastos, macrófagos e

leucócitos, prejudicando a osteogênese e conseqüentemente causando a perda da prótese (Rack, Qazi, 2006; Morais et al., 2007). Além disso, raros relatos têm sido descritos sobre a hipersensibilidade tipo IV e outras disfunções imunes em certos pacientes, quando expostos cronicamente ao titânio (Hallab et al., 2001; Sicilia et al., 2008; Vijayaraghavan et al., 2012).

Em relação ao vanádio, os efeitos da intoxicação crônica e aguda são bem documentados (Morais et al., 2007). O vanádio é citotóxico para macrófagos e fibroblastos (Heinemann et al., 2003; Tian et al., 2005), se liga a proteínas (ferritina e transferrina), afetando sua distribuição e acúmulo no corpo humano, provoca reações de hipersensibilidade locais e sistêmicas, inibe a proliferação celular e tem o potencial de causar lesões renais, por ser a excreção urinária sua principal via de eliminação (Sedarat et al., 2001; Heinemann et al., 2003).

Considerando as limitações que apresentam os biomateriais utilizados na fabricação de próteses articulares, a procura

de um material que apresente as propriedades ideais (tribológicas, físico-químicas e mecânicas) e que seja biocompatível, tem sido foco de pesquisa nos últimos anos. Tem-se buscado materiais de revestimento duros, com baixo coeficiente de atrito e desgaste, que garantam o mínimo de toxicidade e apresentem boa interação na interface entre o biomaterial e o meio biológico (Allen et al., 2001; Choung, Young, 2003; Wolford, 2006).

2.2 As próteses articulares e suas falhas

Na reconstrução de articulações, incluindo a articulação temporomandibular (ATM), várias técnicas e materiais têm sido utilizados, existindo algumas controvérsias sobre quais materiais proporcionariam melhores resultados aos pacientes. Por exemplo, quanto às próteses totais, as constituídas por metal-metal seriam melhor aceitas em próteses de quadril, enquanto nas demais articulações as de metal-polietileno seriam a melhor opção (Mercuri, 2000; Wolford, 2006).

Entretanto alguns problemas podem surgir com uso de próteses com componentes metálicos. A hipersensibilidade ao metal é um fenômeno bem estabelecido (Basketter et al., 1993; Amini et al., 2014). Íons e partículas metálicas podem ser libertados a partir de implantes em tecidos biológicos de três formas: dissolução, corrosão e desgaste (Furey et al., 2008). Detritos de desgastes são criados por meio da articulação de superfícies funcionais umas contra

as outras, essas partículas liberadas podem causar reação de hipersensibilidade e como consequência, perda da prótese (Quinn, 2000; Wolford, 2006; Krecisz et al., 2012; Okasaki, 2014).

A grande maioria dos metais e ligas possui uma camada de óxido que os protege da corrosão, essa camada é formada quando em condições ambiente adsorvem moléculas de gases presentes e oxidam (Landolt, 2007; Radi, 2012).

Os sintomas locais observados em pacientes com hipersensibilidade confirmada ao metal utilizado na prótese incluem dor na ATM, dor miofacial, espasmos musculares, cefaleia, dores de ouvido, zumbidos, vertigens e edema facial. Reações de hipersensibilidade sistêmica podem incluir, mas não estão limitados a, fadiga crônica, depressão, alterações de humor, fibromialgia, poliartralgia, pirexia, disfunção imune, problemas gastrointestinais, hiper-excitabilidade, vasculite, problemas neurológicos (centrais ou periféricos), vários problemas de saúde sistêmica, instabilidade cardíaca, insuficiência de órgãos e morte (Wolford, 2006).

Em relação à reconstrução da ATM, existem relatos que indicam parâmetros de melhoria subjetiva e objetiva após artroplastia de substituição, porém, muitas complicações pós-operatórias têm sido identificadas (Kanatas et al., 2012). Estas complicações incluem dor, infecção, deposição óssea heterotópica, danos aos nervos, formação de hematoma, fístula salivar, maloclusão e hipersensibilidade aos metais (Wolford, 2006). Estudos têm relatado uma redução na dor após reconstrução (Machon et al., 2012), mas, a

completa eliminação da dor ainda não foi mencionada na literatura, talvez devido a somatização da dor (Kothari et al., 2014).

Quando se compara a prótese de quadril com a prótese da ATM, considerando a carga funcional, pode-se dizer que uma prótese de quadril apresenta carga funcional de base que varia de 3,5 a 6 vezes o peso corporal do indivíduo, sendo que para uma pessoa de 100 libras, a carga funcional seria de 350 - 600 libras e quando é somado o ato de correr ou de elevação com impacto (pular), a carga funcional pode aumentar para 10 vezes o peso corporal (Harkess, 2003). Entretanto, a carga funcional máxima da ATM durante o ato da mastigação, é estimada entre 160 - 265 Newtons (entre 35 - 60 libras) (Throckmorton, 2000). Essa diferença substancial entre uma articulação de quadril e a ATM pode justificar a presença de células gigantes, provocada pela liberação de partículas de desgaste provenientes do polietileno de alto peso molecular em próteses de quadril e não em prótese de ATM (Mercuri et al., 1995, Mercuri, 2000; Wolford, 2006).

2.3 Filmes de carbono tipo diamante (DLC)

Os filmes de DLC possuem muitas características que são desejáveis em materiais para uso biomédico, tais como: biocompatibilidade, devido a sua composição de apenas carbono e hidrogênio, que são biologicamente compatíveis com células humanas

conforme Lu et al. (1993), Allen et al. (2001), Robertson (2002), Hasebe (2007), Trava-Airoldi et al. (2007), alta resistência ao desgaste e à corrosão, baixo coeficiente de atrito, alta inércia química e, dependendo do processo de deposição, podem ser altamente isolantes (Rasia, 2009).

A condutividade elétrica observada nestes filmes é usualmente da ordem de 10^{-10} a $10^{-12} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A adição de nanopartículas causa aumento desta condutividade. Os filmes de DLC são extremamente resistentes a ataques químicos por ácidos ou bases, e são estáveis em temperaturas de até 400 °C (Robertson, 2002; Trava-Airoldi et al., 2007).

Assim, esses filmes podem ser úteis para proteger as superfícies metálicas subjacentes às próteses articulares contra risco, corrosão e libertação de íons metálicos. Por apresentar estes benefícios o estudo deste filme é importante visando sua aplicação como revestimento de novos instrumentos e implantes na engenharia biomédica (Holmberg et al., 2000; Trava-Airoldi et al., 2007).

Os filmes de DLC são comumente usados em aplicações tribológicas na indústria biomédica, e têm sido propostos para aumentar a dureza de superfícies em substituição de uma articulação (Lappalainen et al., 1998a, 1998b; Robertson, 2002; Hauert et al., 2012; Cloutier et al., 2014a).

2.3.1 Deposição de filmes de carbono tipo diamante (DLC)

Além de vários tipos de deposição, diferentes parâmetros e substratos têm sido descritos (Love et al., 2013), alguns relatando bons resultados para serem aplicados como revestimento de próteses articulares (Liu et al., 2014; Cloutier et al., 2014a) e outros que têm falhado para tais aplicações, obtendo delaminação do DLC (Hauert et al., 2012). Dessa forma a aderência desses filmes se apresenta como um fator de alta importância para a aplicação desses filmes em próteses.

Para a deposição de filmes finos são conhecidos diferentes processos que envolvem deposição pela fase de vapor que podem ser divididos em duas grandes áreas: CVD (*Chemical Vapour Deposition*) e PVD (*Physical Vapour Deposition*). O processo de deposição por CVD envolve uma reação química de compostos voláteis para produzir outro composto químico não volátil que será depositado sobre o substrato. Diversas técnicas utilizam o processo por CVD, destacando-se entre elas a técnica assistida por plasma (PECVD – Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition), que foi utilizada neste trabalho (Robertson, 2002).

A deposição de filmes finos de DLC pela técnica descarga (DC) pulsada PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor deposition), trata-se de uma descarga em plasma de baixa pressão utilizando uma fonte chaveada pulsada para a geração do plasma e deposição dos filmes de DLC nos substratos (Trava-Airoldi et al., 2007, Marciano et al., 2009).

Revestimentos de DLC podem sofrer altos níveis de estresse residual por causa de sua estrutura. Este pode causar má adesão à superfície, levando à delaminação precoce. Uma das principais formas de combater a baixa adesão do filme na superfície (devido a diferenças de tensões residuais) é através da deposição de uma inter-camada, que promova a adesão do DLC ao substrato (Marciano et al., 2009). Os materiais usados comumente como interface são: o titânio (Ti), o carboneto de cromo (CrC) e o nitreto de silício (Si_3N_4). Uma camada intermediária, por exemplo, de silício, entre os diferentes tipos de substrato e os filmes de DLC tem sido utilizada para aumentar a aderência destes revestimentos. As melhores adesões são obtidas em substratos que formam carbetos, como o Si, Fe e Ti (Marciano et al., 2009; Love et al., 2013).

As intercamadas podem diminuir o estresse, e aumentar a resistência à corrosão reduzindo a formação de porosidades, melhorando as propriedades elétricas do filme ou diminuindo a sua condutividade (Kwok et al., 2007; Liu et al., 2014).

A dopagem de filmes de DLC com metais realizada por técnicas de deposição físico-química de vapor têm sido a chave para se obter uma nova classe de materiais (Lau et al., 2001), porém, a dificuldade em se dispersar homogeneamente partículas metálicas em filmes de DLC tem sido relatada, pois as partículas metálicas formam aglomerados na matriz do filme (Hussain et al., 2006).

Além disso, outra propriedade que o filme de DLC pode adquirir é o efeito bactericida e fungicida (Lau et al., 2001;

Betts et al., 2005; Hussain, Pal, 2007; Ishihara et al., 2006). Nanopartículas de prata dopadas no filme DLC potencializam esse efeito (Bell, Myrich, 2001; Marciano et al., 2009), em especial quando dopadas pelo sistema de PECVD (Marciano et al., 2009; Tamulevičius et al., 2014; Gayathri et al., 2015), sendo efetivo contra *Staphylococcus* (Narayan et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

Avaliar o efeito *in vivo* da deposição de filmes de DLC, com e sem nano partículas de prata, aplicados por via plasma em amostras de liga de titânio visando sua utilização futura como material para próteses articulares.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Comparar *in vivo* a resposta do tecido ósseo mandibular de coelho, em contato com amostras de liga de titânio recobertas com dois diferentes filmes, DLCH e DLCH-Ag, em relação a amostras de liga de titânio sem recobrimento;
- b) Avaliar as características estruturais dos filmes de DLC e DLC-Ag antes e após exposição *in vivo*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do campus de São José dos Campos/ICT - UNESP sob o protocolo n° 03/2013-PA/CEP (Anexo A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para o desenvolvimento deste projeto foram necessários 30 coelhos da raça Nova Zelândia com peso médio de 4,5kg que foram fornecidos pelo Biotério Central da UNESP.

Os animais foram divididos em três grupos de 10 e subdivididos de acordo ao período de eutanásia em 15 e 90 dias em seis grupos de cinco conforme Quadro 1.

Quadro 1- Disposição dos grupos de acordo o tipo de amostra e período de eutanásia

GRUPOS DE ANIMAIS (N=30)	TIPO DE AMOSTRA	PERÍODO (DIAS)	DIVISÃO DOS GRUPOS
C1 até C5	Ti-6Al-4V	15	G1 A
C6 até C10	Ti-6Al-4V	90	G1B
C11 até C15	DLC	15	G2A
C16 até C20	DLC	90	G2B
C21 até C25	DLC-Ag	15	G3A
C26 até C30	DLC-Ag	90	G3B

4.2 Amostras

Foram utilizadas sessenta (60) amostras de liga de titânio (Ti6Al4V), com formato quadrangular de bordas arredondadas, com dimensões de 10,0 x 10,0 x 0,5 mm e exibindo dois furos para a fixação na mandíbula dos coelhos (Figura 1).

Todas as amostras foram devidamente lixadas com lixas d'água de granulações 600 a 1200 em politriz automática (Erios /Brasil/ ICT/UNESP), para padronização e retirada de irregularidades das amostras.



Figura 1- Porta amostra contendo os corpos de prova polidos com lixa d'água com granulometria de 1200.

Vinte destas amostras foram recobertas com filme de DLC e vinte com filme de DLC-Ag. Estes foram depositados por plasma em um sistema CVD assistido por descarga DC pulsada (PECVD, do inglês- *plasma-enhanced chemical vapor deposition*) (Figura 2).

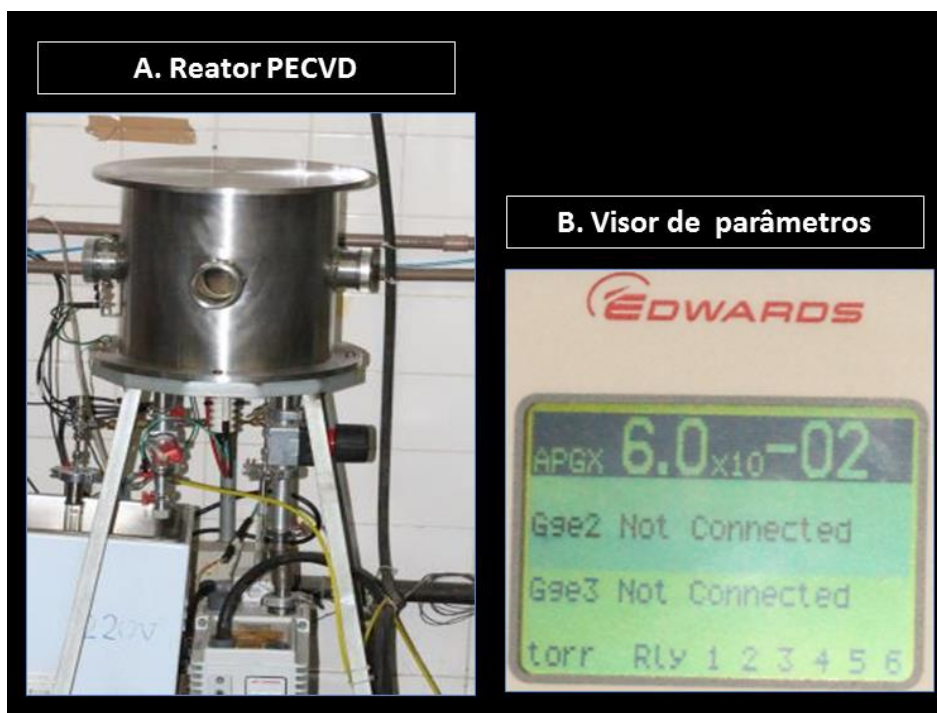


Figura 2- A) Reator de plasma (PECVD) e B) Visor de parâmetros do reator.

Inicialmente foi realizada uma limpeza superficial dos substratos, que consistiu na imersão em acetona P.A. durante 10 minutos em banho de ultrassom, para remoção de resíduos oleosos.

Após limpeza superficial, os substratos foram colocados sobre o catodo refrigerado no interior da câmara para uma limpeza física a partir de uma descarga com Argônio, a uma pressão de 6×10^{-2} Torr controlada por cerca de 10 minutos, utilizando uma tensão de auto polarização de -700V em uma fonte de descarga pulsada, com a finalidade de remover a camada de óxido e/ou outras sujeiras superficiais.

Para dar início ao processo de deposição dos filmes pela técnica de deposição química a vapor assistida por plasma

(PECVD), o sistema foi bombeado até obter uma pressão de $7,5 \times 10^{-4}$ Torr na câmara.

Previa deposição dos filmes foi crescida uma interface de silício (Si) e as amostras foram mantidas aquecidas a uma temperatura de 350 – 700 °C. A interface de silício amorfo foi crescida utilizando um plasma de hexametildisiloxano, gás volátil.

Posteriormente os filmes de DLC foram depositados. Todo o processo a plasma foi realizado em uma câmara a vácuo cilíndrica de 18 litros (Figura 2A), bombeada por uma bomba mecânica capaz de atingir uma pressão de base de $7,5 \times 10^{-4}$ Torr. O plasma foi gerado por uma fonte de potência DC negativa pulsada com frequência de 20 kHz (Figura 2B), sendo o porta amostras polarizado com a tensão negativa (catodo) e o corpo do reator com a tensão positiva (anodo), aterrado. A partir de plasma de metano (CH₄), foi depositado o filme de DLC e a deposição do filme dopado com prata, a partir de vapor de hexano (C₆H₁₄) contendo nanopartículas de prata da ordem de 30 a 50 nm (proveniente de suspensão de prata em hexano a 0,5 g/l). O fluxo de gases foi controlado por meio de fluxímetros e a potência de deposição foi mantida em torno de 200 W. A tensão do catodo e a corrente elétrica foram mantidas constantes durante todo o processo de deposição (Quadro 2).

Durante as deposições de DLC-Ag, a suspensão de hexano com prata foi agitada em ultrassom para que as partículas pudessem se dispersar homogeneamente.

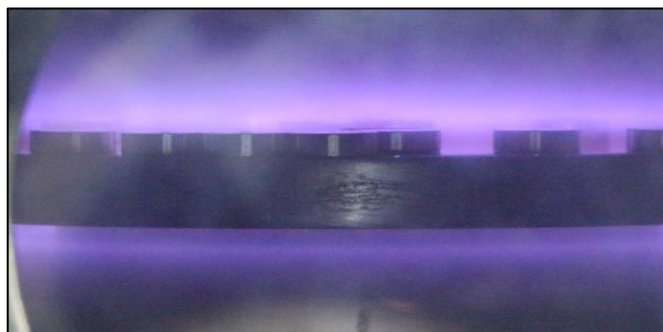


Figura 3 - Amostras dentro do reator durante a deposição do filme de DLC.

Quadro 2 - Parâmetros utilizados para realização das deposições pelo sistema PECVD

	Gás	Vazão (sccm)	Potência	Pressão total (Torr)	Tempo (min)
Limpeza	Argônio	20	-900 V	$3,0 \times 10^{-1}$	30
Deposição do camada de Si	Hexametildisiloxano + Argônio mantido	20	200 W	$1,0 \times 10^{-2}$	30
Inter-camada Si – DLC	Metano + Hexametildisiloxano	13		$1,6 \times 10^{-1}$	10
Filme DLC	Metano + Argônio mantido	13 5	200 W	$1,1 \times 10^{-1}$	90
Filme de DLC-Ag	Hexano + Metano mantido	5		$8,0 \times 10^{-2}$	5

Patente: BR 10 2014 032374 0

Após o crescimento dos filmes sobre o substrato Ti-6Al-4V, a fonte de corrente elétrica foi desligada, e o fluxo de gás para o interior da câmara foi bloqueado. Para a abertura do reator, foi efetuada a quebra do vácuo, aguardado um período de 30 minutos para que houvesse um resfriamento inicial das amostras. O porta amostra

foi removido do reator e, com o auxílio de uma pinça clínica, as amostras foram armazenadas em um recipiente seco e fechadas.

4.3 Animais

4.3.1 Procedimento cirúrgico

O estudo *in vivo* foi realizado no biotério do ICT-UNESP e o material foi preparado nos Laboratórios de Tecido Ósseo e de Patologia desta instituição.

Para a realização das cirurgias e eutanásia, os animais foram anestesiados com uma solução de 13mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum – Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

Após os procedimentos cirúrgicos de instalação das amostras, todos os animais receberam dose única de 1,35mg/Kg de antibiótico (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge) por via intramuscular. A antisepsia da região mandibular foi realizada com solução de gluconato de clorexidina 0,2%.

Na mandíbula foi realizada uma incisão linear na pele com lamina de bisturi nº 15, de extensão aproximada de 1,5 cm paralela e abaixo do bordo inferior da mandíbula do lado direito e

esquerdo e dissecação por planos, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até atingir-se a face lateral do ângulo da mandíbula. O passo seguinte foi promover o deslocamento das estruturas anatômicas linguais até a exposição da face medial do ângulo mandibular com o auxílio de um dissecador e afastador, desenhados para esta finalidade, a fim de permitir a fixação das amostras como observado na Figura 4A.

Para a adaptação e fixação das amostras foi utilizado um motor elétrico (Driller BLM 600 Plus) que permitiu o controle da velocidade em 960 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril durante a perfuração com uma broca carbide ½ (KG Sorensen) no osso da região onde foi fixada a amostra, utilizando um fio de sutura 4-0 de poliéster trançado (Ethicon – Johnson & Johnson) (Figura 4B)

A síntese dos tecidos das áreas experimentais foi realizada por planos, suturando-se primeiramente a camada muscular, com fio 4-0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson) e posteriormente a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson).

Em seguida foi feita a limpeza das regiões operadas com solução de clorexidina 0,2%. Após a cirurgia, os animais receberam dieta normal e água *ad libitum*.

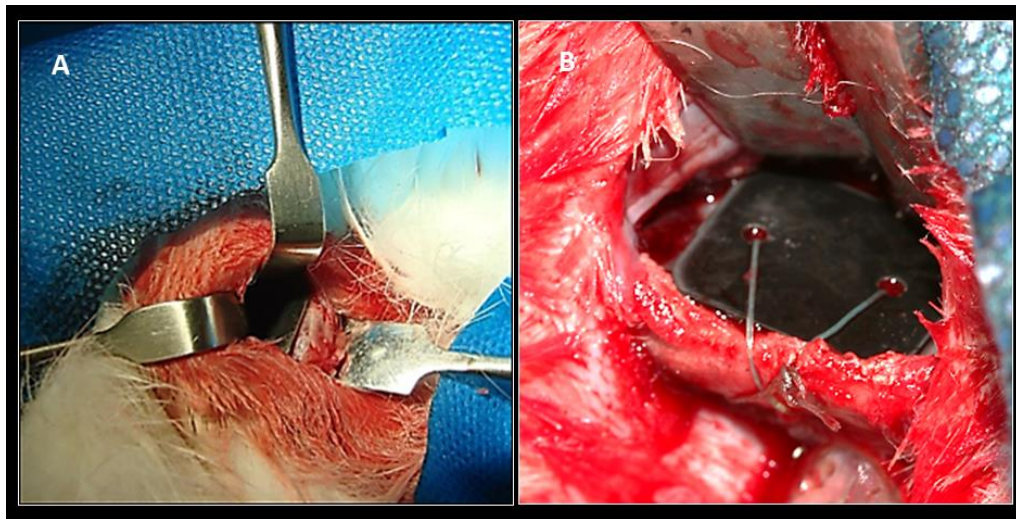


Figura 4. Procedimento cirúrgico. A) Amostra posicionada no osso na região do ângulo mandibular do coelho usando afastadores de Sean Miller; e B) Amostra fixada.

4.3.2 Eutanásia

Os animais foram submetidos para eutanásias com sobre dosagem do anestésico, três vezes a dosagem utilizada para sedação e posterior sangria, em dois períodos - 15 e 90 dias.

Em seguida, foram removidos fragmentos ósseos contendo as amostras do lado direito e esquerdo, as quais foram examinadas por meio de lupa estereoscópica para caracterização macroscópica (observa-se um exemplo nas Figuras 5 e 6). Posteriormente, as amostras foram fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas.

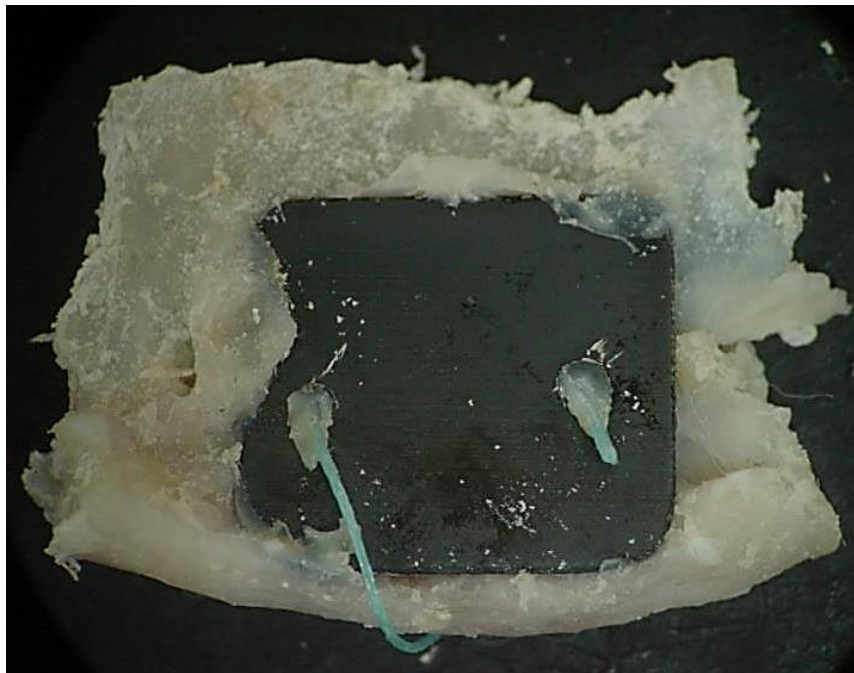


Figura 5 – Fragmento ósseo junto com a amostra com recobrimento de DLC após 15 dias, removido para inclusão e posterior análise, mostrando deposição parcial de tecido ósseo acima da amostra.

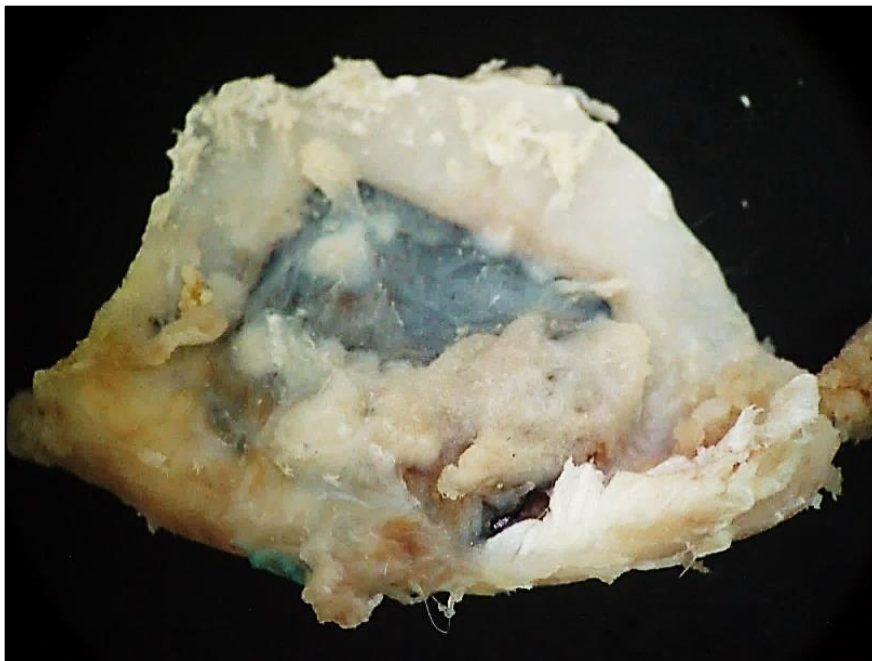


Figura 6 – Fragmento ósseo junto com a amostra de DLC após 90 dias, removido para inclusão e posterior análise, mostrando deposição de tecido ósseo acima da amostra.

4.4 Análises físico-químicas

A caracterização da superfície das amostras foi realizada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Zeiss EVO Ma10 acoplado a um espectrômetro de dispersão de raios-X (EDS) marca Oxford Instruments Inca Penta FET x3 (Figura 7). A análise das amostras foi realizada nos períodos pré e pós-operatório de 15 e 90 dias. Para análise do pós-operatório das amostras, estas foram removidas do osso e limpas superficialmente com uma gaze seca.



Figura 7- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Zeiss EVO Ma10.

A condutividade elétrica de cada amostra foi determinada através da medida da resistividade ou resistência média através de um multímetro (Figura 8) previamente à sua fixação no osso da mandíbula dos coelhos, com a finalidade de comprovar a capacidade do filme como isolante elétrico.



Figura 8 - Multímetro utilizado para verificar a capacidade dos filmes de recobrimento de isolar o Ti-6Al-4V.

A qualidade dos filmes foi analisada por espectroscopia de espalhamento Raman marca Renishaw 2000 (Gloucestershire, Reino Unido) com um laser de argônio de comprimento de onda de 514,5 nm, disponível no Laboratório de espectroscopia/Instituto Nacional de Pesquisa Espacial (Figura 9). Foi realizada a espectroscopia de espalhamento Raman dos filmes de DLC e DLC-Ag previamente à fixação das amostras nos animais e do tecido ósseo a fim de calibrar os espectros. Para análise das amostras após os períodos *in vivo*, as mesmas foram previamente limpas para remoção de resíduos ósseos visíveis na sua superfície.



Figura 9 - Espectroscópio de Espalhamento Raman.

4.5 Estudo histológico e histomorfométrico

4.5.1 Preparo histológico do tecido ósseo

Após fixação em formol 10% por 48 horas, os fragmentos ósseos contendo as amostras foram lavados abundantemente, submetidos a concentrações crescentes de álcool (60%, 70%, 80%, 90% e 100%) para desidratação e imersos em xilol (P.A.), para diafanização. A seguir, cada amostra foi embebida em solução resinosa, gradativamente, utilizando como reagentes o metilmetacrilato associado com dibutilfitalato na proporção de 85% e 15%, respectivamente, associado posteriormente a 1g de peróxido de benzoila.

O bloco de resina contendo a peça anatômica foi posicionado no aparelho de corte Labcut® 1010 (EXTEC) e

submetido ao disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro. A seguir, os cortes obtidos foram limpos, polidos em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC) com lixa d'água de granulação 1500 e colados com éster de cianocrilato (Super Bonder®) sobre uma lâmina de acetato.

A colagem foi realizada em um dispositivo para prensagem das lâminas, visando obter um maior paralelismo entre a lâmina e a superfície a ser desgastada, conseguindo-se, dessa maneira, uma fina e uniforme camada da cola. Com a utilização de um suporte para a placa de acetato, o corte foi desgastado em politriz Labpol® 8-12 (EXTEC), usando sequência crescente de lixas d'água (400, 600, 800, 1200 e 2500). No decorrer do desgaste, os cortes foram observados em microscópio óptico para a verificação de uma mínima espessura com o máximo de detalhes.

As análises histológicas foram realizadas primeiramente por MEV, para verificar a interfase osso-amostra (Figura 10). Em segundo lugar, por microscopia óptica após coloração com azul de toluidina (Figura 11), o qual é indicado para tecido ósseo, tecido osteoide e também núcleos de células como osteoblastos, osteoclastos e células da medula, permitindo observar a identificação das células na neoformação óssea (Bracroft, Cook, 1994).

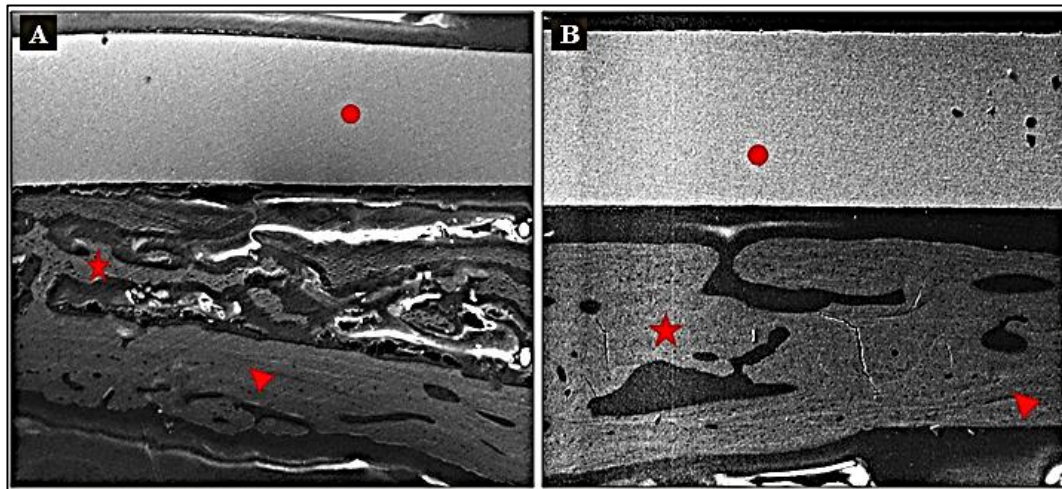


Figura 10 – Fotomicrografia de MEV (100x) da interface osso-amostra. A) Amostra DLC no período 15 dias; B) amostra DLC-Ag 90 dias. Em ambas: ponto indicando a amostra, estrela a área de neoformação óssea e seta o osso preexistente.

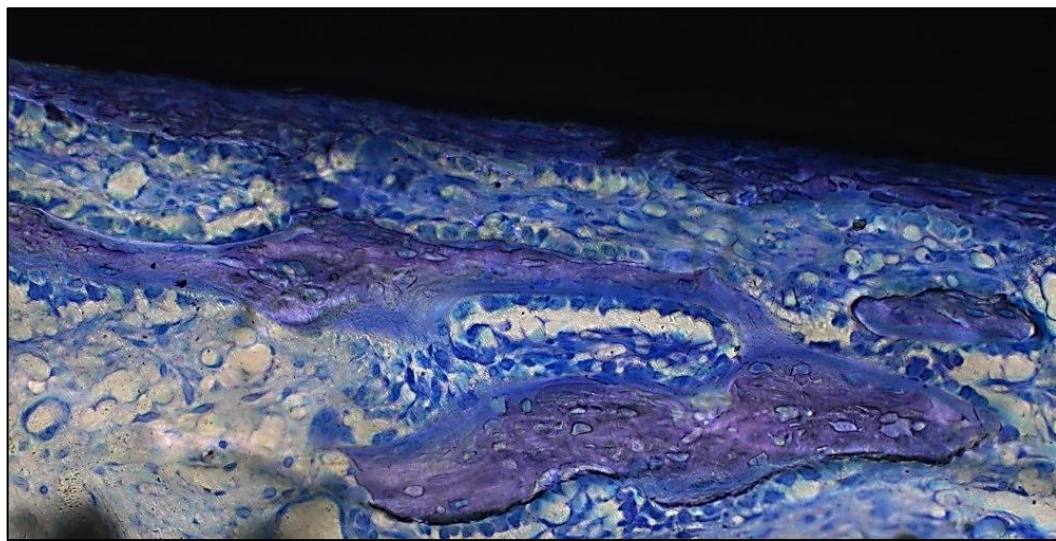


Figura 11 – Fotomicrografia mostrando corte histológico da interface osso-amostra do grupo DLC no período de 15 dias, corado com azul de toluidina. Aumento original 20x.

4.5.2 Análise quantitativa da neoformação óssea

Para a análise histomorfométrica da neoformação óssea foi selecionada aleatoriamente uma lâmina por cada fragmento osso-amostra. A captura da imagem de 3 campos por lâmina foi feita a

partir de um microscópio óptico Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com objetiva de 10x, sob um foco fixo, acoplado com uma câmera AxioCam MRC 5 (Zeiss) que permitiu a visualização das imagens digitalizadas diretamente no computador. Estas imagens foram submetidas à análise histomorfométrica, utilizando o programa AxioVision, o qual possibilitou delimitar e mensurar a área total da interface osso-amostra, e dentro da mesma, a área de osso neoformado.

Os parâmetros histomorfométricos calculados usando AxioVision Rel. 4.8 software foram:

- a) Área total por campo da interface osso-amostra em micrometros (μm);
- b) Área de neoformação óssea por campo em μm .
Observa-se um exemplo na Figura 12.

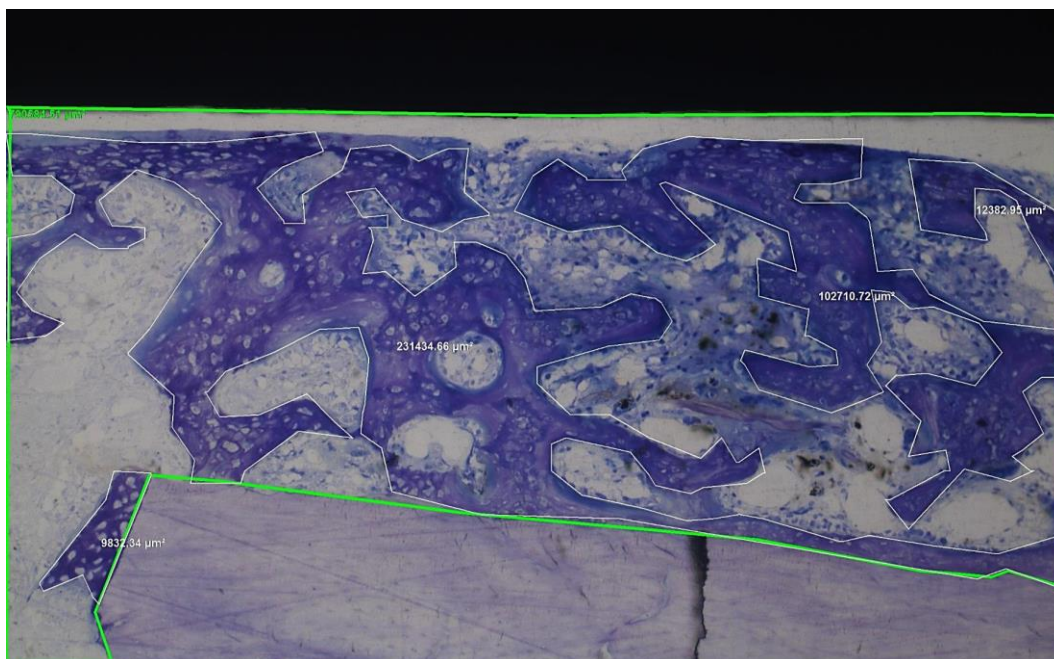


Figura 12 – Fotomicrografia de corte histológico de fragmento de tecido ósseo em conjunto com a amostra corados em azul de toluidina, mostrando linha verde delimitando área total da interface osso-amostra e linha branca contornando áreas de neoformação óssea. Aumento original de 10x.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística, utilizando o programa computacional STATISTIC (versão 5.5, StatSoft Inc., 2000).

Foi realizada a estatística descritiva (média e desvio-padrão) e a inferencial, mediante o teste paramétrico ANOVA dois fatores de medidas repetidas e, quando necessário, o teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrômetro de dispersão de raios-X (EDS)

Na análise das amostras de Ti-6Al-4V por MEV observou-se que as mesmas, previamente ao recobrimento, apresentavam uma rugosidade compatível com a granulometria da lixa d'água 1200 utilizada para dar acabamento e uniformidade para as amostras. Os grupos de amostras que receberam recobrimento com o filme de DLC e DLC-Ag apresentaram as mesmas rugosidades, indicando que os filmes acompanharam o formato da superfície (Figura 13, 14 e 15), não interferindo nas características topográficas das amostras.

O EDS das amostras foi feito para confirmar a composição química das mesmas nos períodos pré e pós-operatório de 15 e 90 dias, obtendo semi-quantitativamente os elementos presentes na liga: titânio (Ti), alumínio (Al) e vanádio (V), os quais estão representados na Figura 13. Observa-se também a análise por EDS das amostras com recobrimento DLC e DLC-Ag, representadas nas

Figuras 14 e 15, as quais confirmam a presença de carbono (C) e silício (Si) na amostra DLC, e C, Si e prata (Ag) na amostra DLC-Ag.

O MEV pós-operatório mostrou na maioria das amostras, independentemente do período avaliado, micro grânulos na superfície e algumas irregularidades topográficas compatíveis com a rugosidade preexistente, provocada pela granulação da lixa d'água.

No EDS observou-se nas amostras de DLC e DLC-Ag, tanto no período de 15 quanto no de 90 dias, a presença dos picos de cálcio (Ca) e fósforo (P). Na análise macroscópica das amostras, isto não era visível (Figuras 18,19, 20, 21). Entretanto, nas amostras sem recobrimento, em nenhum dos períodos foram observados o Ca e P.

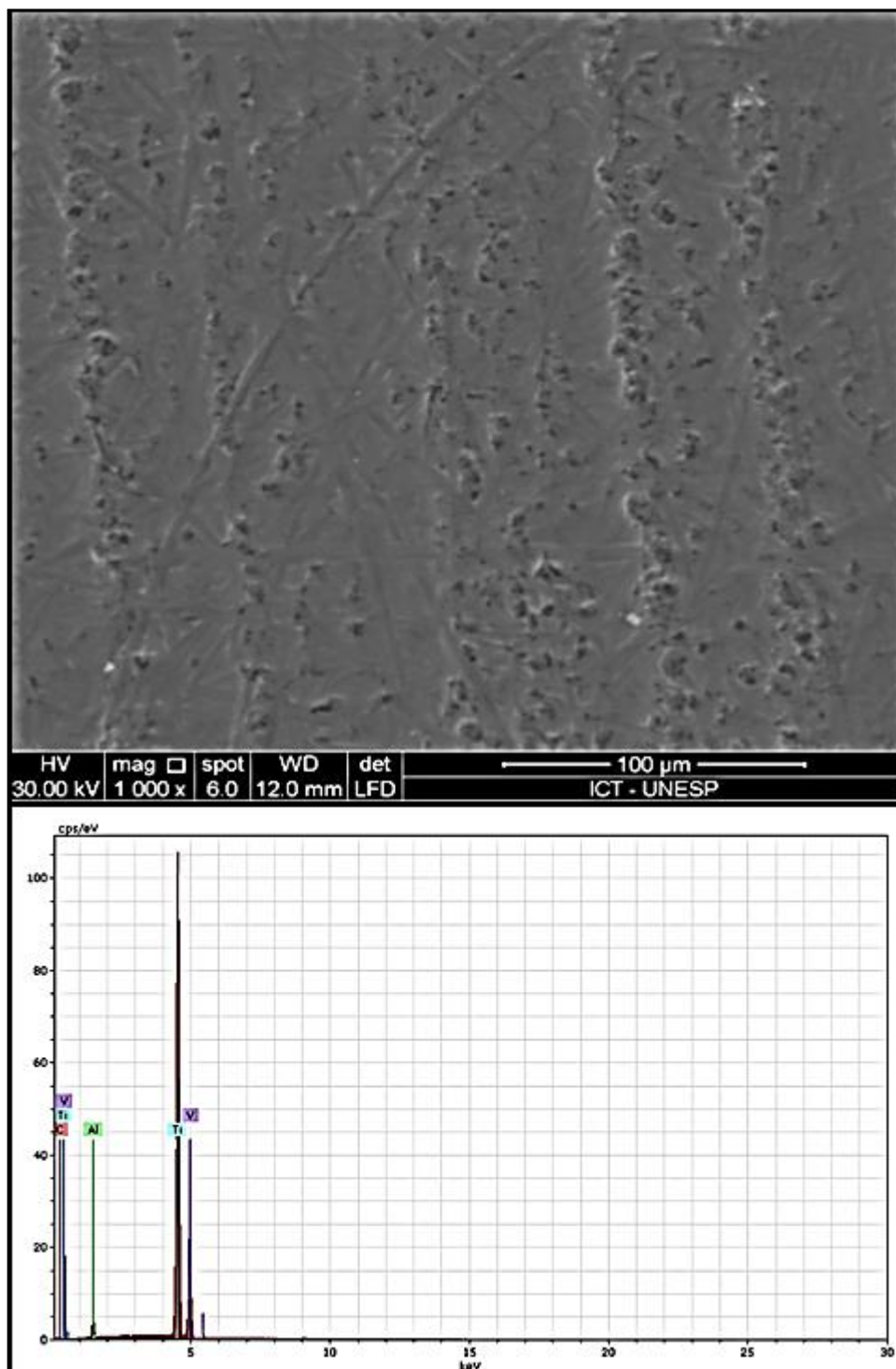


Figura 13 –MEV (superior) e EDS (inferior) pré-operatório da amostra Ti-6Al-4V sem recobrimento.

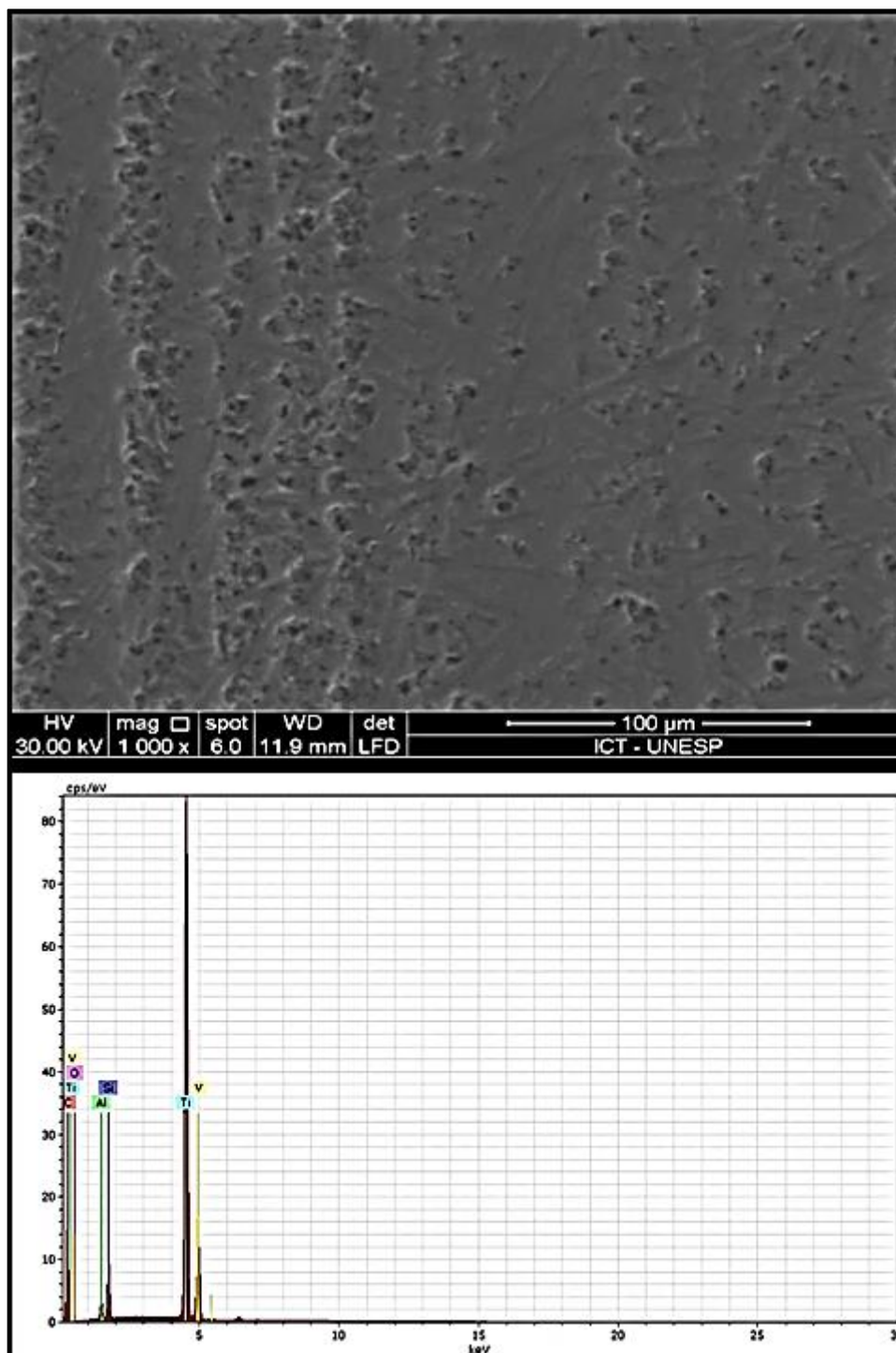


Figura 14 - MEV (superior) e de EDS (inferior) da amostra recoberta por filme de DLC no pré-operatório. O MEV mostra que o filme acompanha as rugosidades características da superfície da amostra.e o EDS demonstra a presença de C, Si, Ti, Al, V.

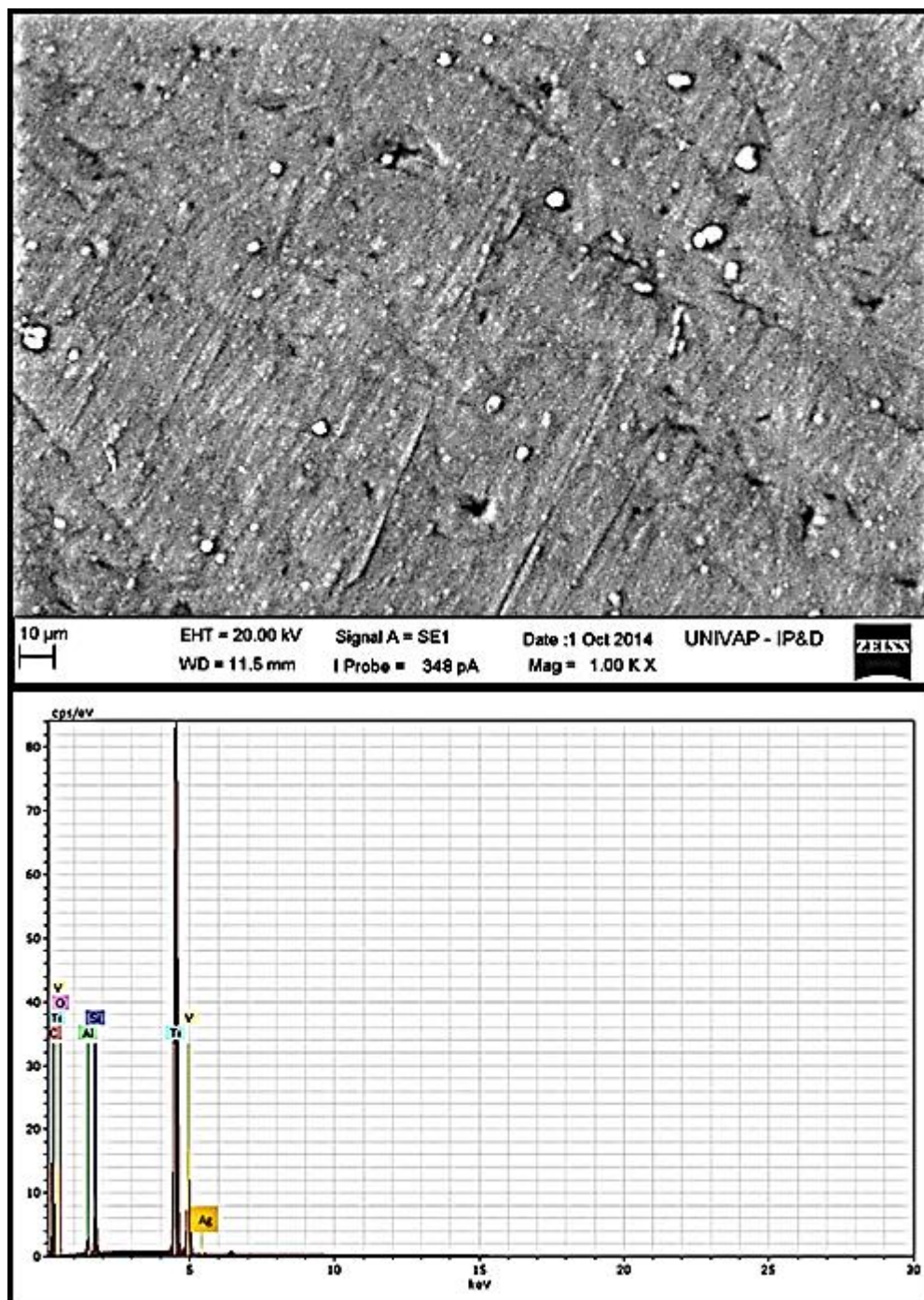


Figura 15 - MEV (superior) e de EDS (inferior) da amostra recoberta por filme de DLC-Ag no pré-operatório. O MEV mostra que o filme acompanha as rugosidades características da superfície da amostra, com poros de bordas arredondados e grânulos sugestivos de partículas de prata. o EDS demonstra a presença de C, Si, Ti, Al, V e Ag.

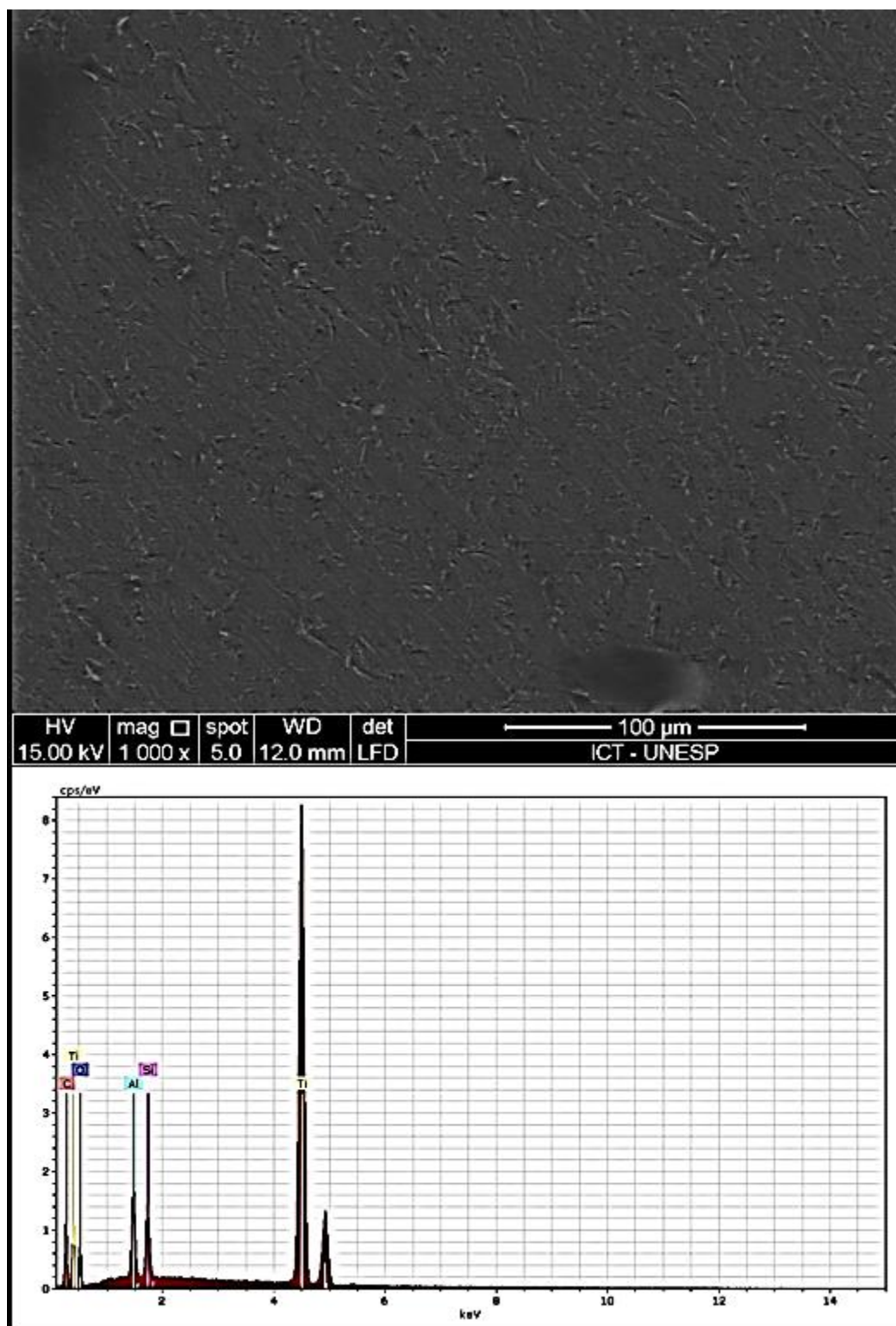


Figura 16 - MEV (superior) e EDS (inferior) da amostra Ti-6Al-4V sem recobrimento (C4) após o período de 15 dias. O MEV mostra algumas rugosidades e poros dispersos, o EDS demonstra a presença de Ti, Al, C, O e Si.

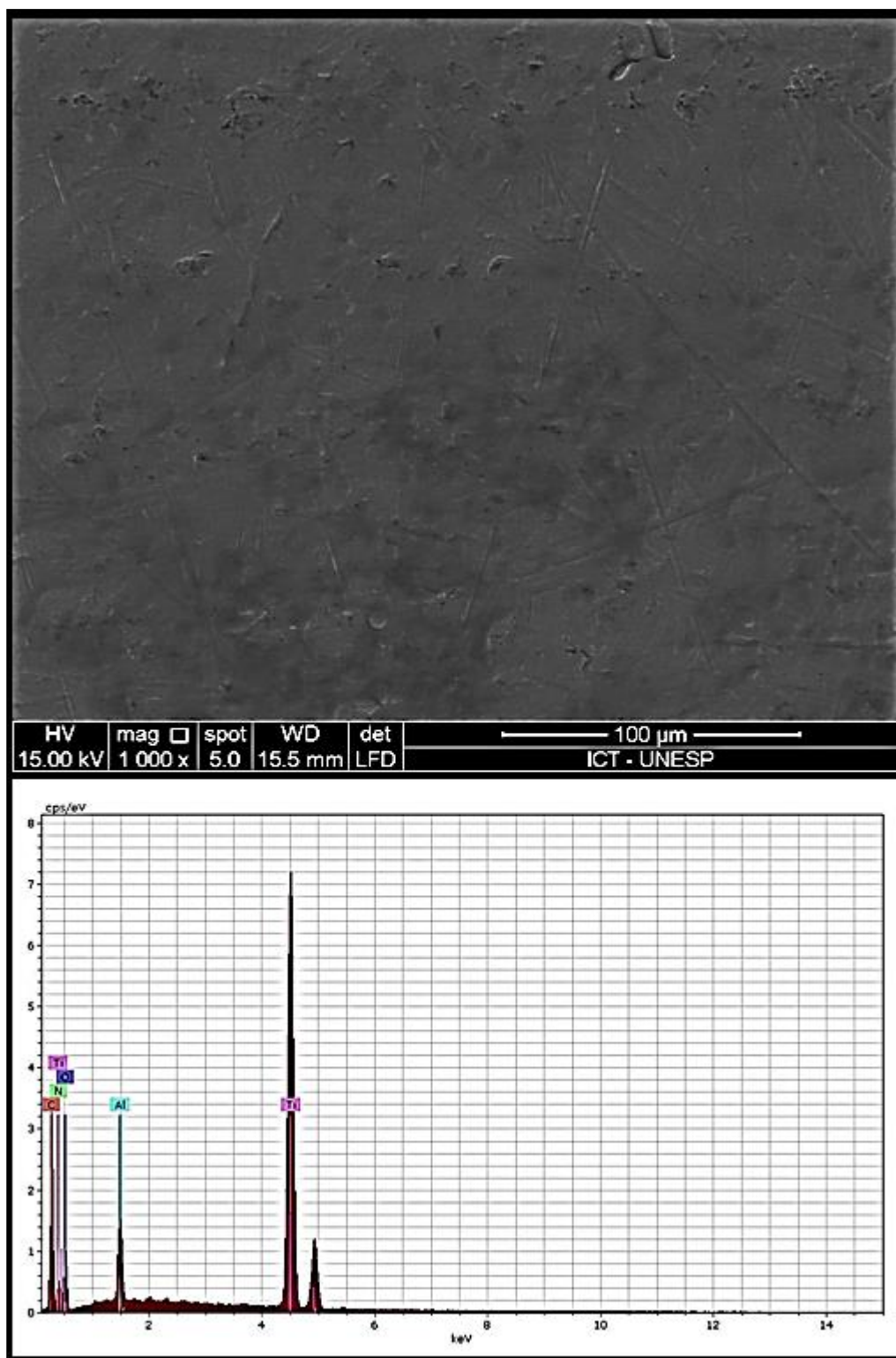


Figura 17 - MEV (superior) e EDS (inferior) da amostra Ti-6Al-4V sem recobrimento (C10) após o período de 90 dias. O MEV mostra algumas rugosidades e poros dispersos, o EDS demonstra a presença de Ti, Al, C, O e N.

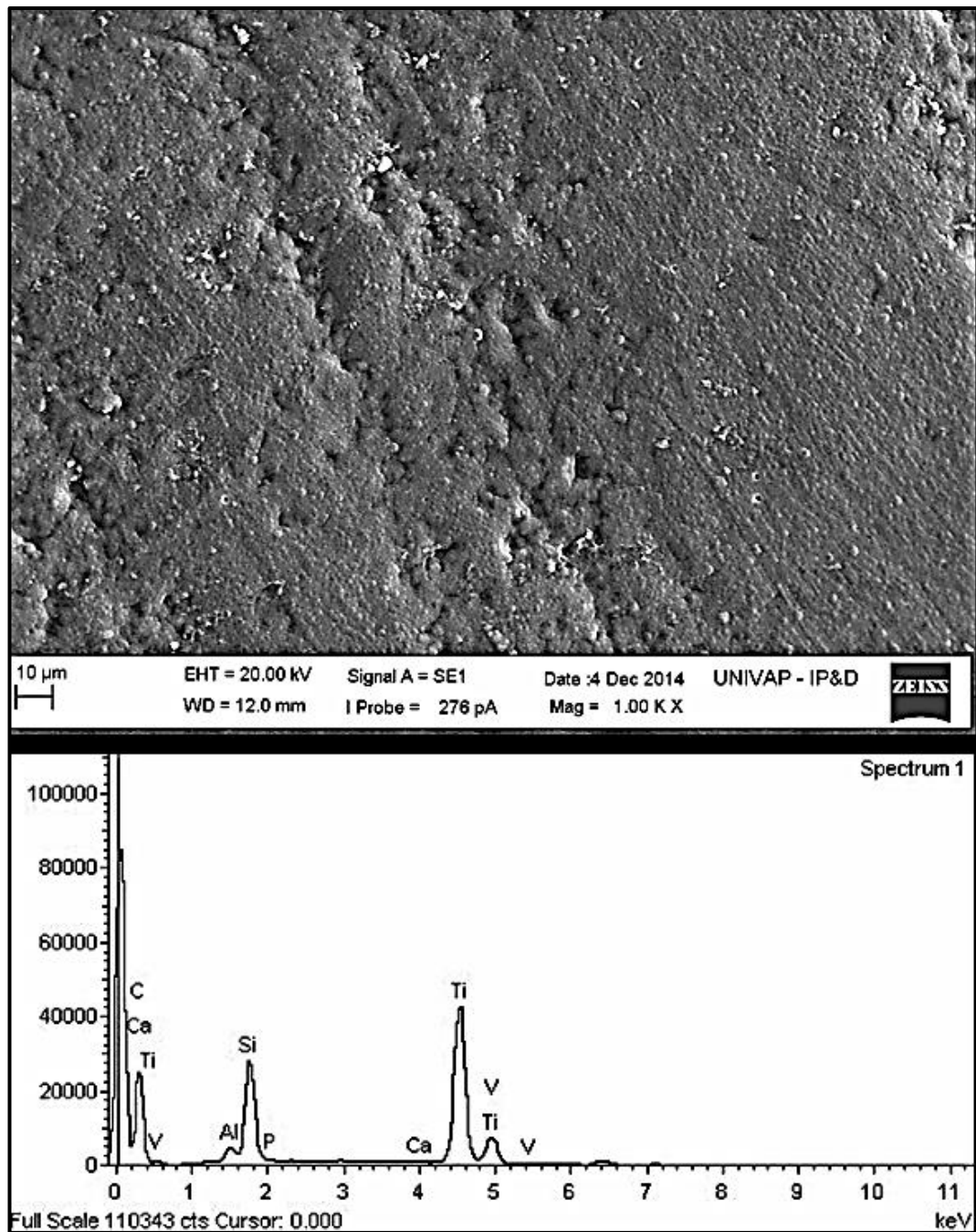


Figura 18 –MEV (superior) e EDS (inferior) de amostra de DLC (C14) após 15 dias. O MEV uma superfície rugosa e micro grânulos dispersos e o EDS demonstra Ca e P na composição.

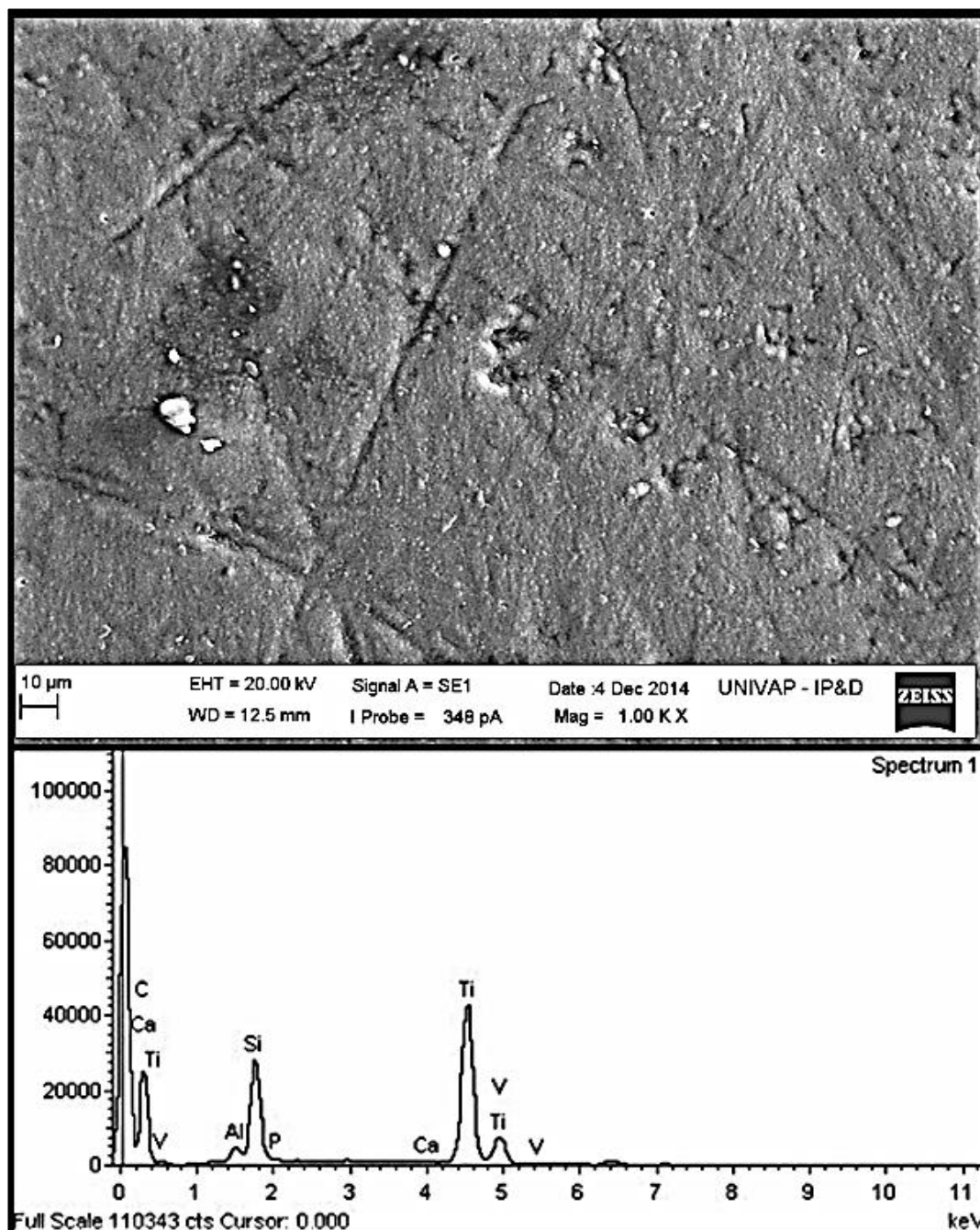


Figura 19 –MEV (superior) e EDS (inferior) de amostra de DLC (C18) após 90 dias. O MEV mostra uma superfície rugosa e micro grânulos, com alguns grânulos maiores dispersos e o EDS demonstra Ca e P na composição.

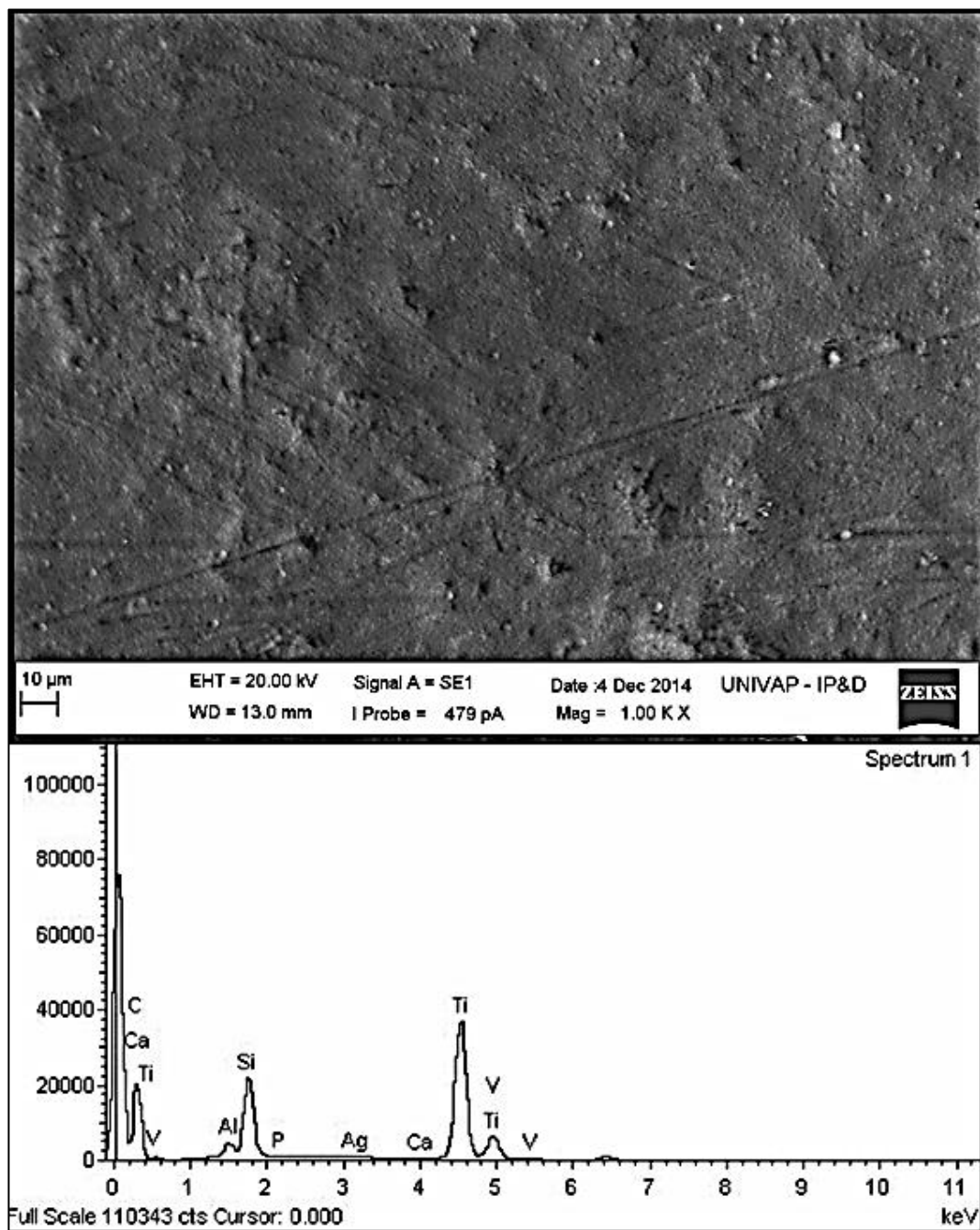


Figura 20 –MEV (superior) e EDS (inferior) DLC-Ag (C24) após 15 dias. O MEV mostra uma superfície rugosa, poros e micro grânulos dispersos e o EDS demonstra Ca e P na sua composição.

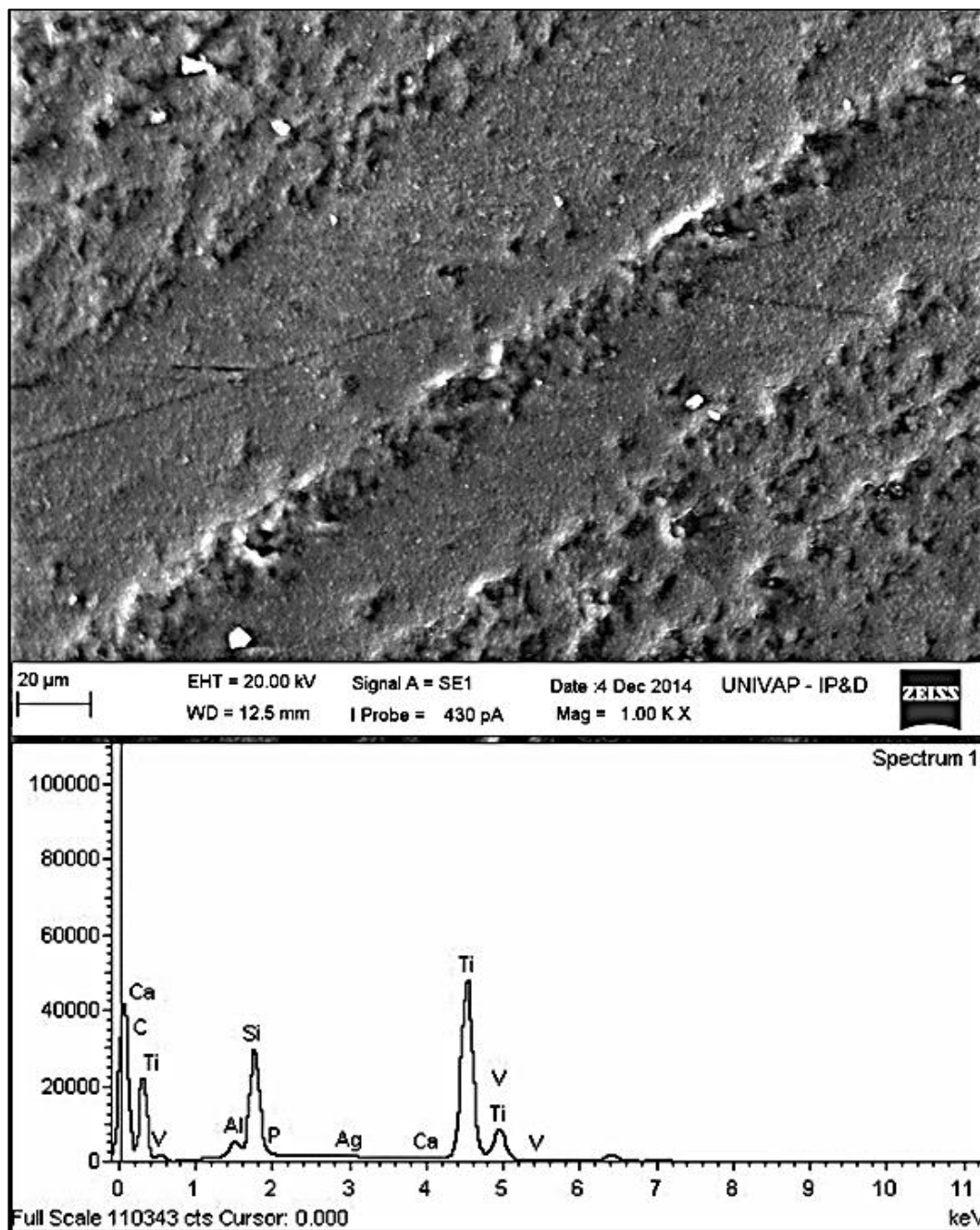


Figura 21 - MEV (superior) e EDS (inferior) DLC-Ag (C28) após 90 dias. O MEV mostra rugosidade da superfície e alguns micro grânulos dispersos e o EDS demonstra Ca e P na sua composição.

5.1.2 Análise dos espectros Raman dos filmes DLC e DLC-Ag

Para verificar se o tempo de permanência *in vivo* causou alguma alteração estrutural nos filmes de DLC e DLC-Ag, a análise por espectroscopia Raman foi realizada nos filmes nos períodos pré e pós-operatórios de 15 e 90 dias. Como as amostras estavam em contato com osso, possivelmente micro partículas do mesmo podiam estar presentes ou aderidas nos vales mais profundos das rugosidades que a amostra apresentava, então, foi realizada a análise do espectro Raman do osso como parâmetro de referência.

Pode ser observado na Figura 22 que filme de DLC apresentou aspecto típico de um filme de DLC, ou seja, picos referentes às bandas D e G, onde a banda G (1500 a 1600 cm^{-1}) é atribuída às ligações de estiramento de todos os pares de átomos sp^2 tanto em anéis quanto em cadeias e, a banda D (1200 a 1400 cm^{-1}) e D' (1600 - 1630 cm^{-1}), devido aos modos de respiração dos átomos sp^2 nos anéis. Após 15 dias os filmes mantiveram os dois picos, porém com um pequeno deslocamento ou aumento de intensidade, o que pode ser evidenciado no filme C11. Essa modificação pode ser atribuída à incorporação de material ósseo à amostra o que pode ser comprovado a partir do espectro Raman do osso que mostra que ele possui picos nas mesmas regiões do DLC (Figura 22). A adesão de material ósseo no filme de DLC também foi evidenciada nas análises por EDS acima (Figura 18).

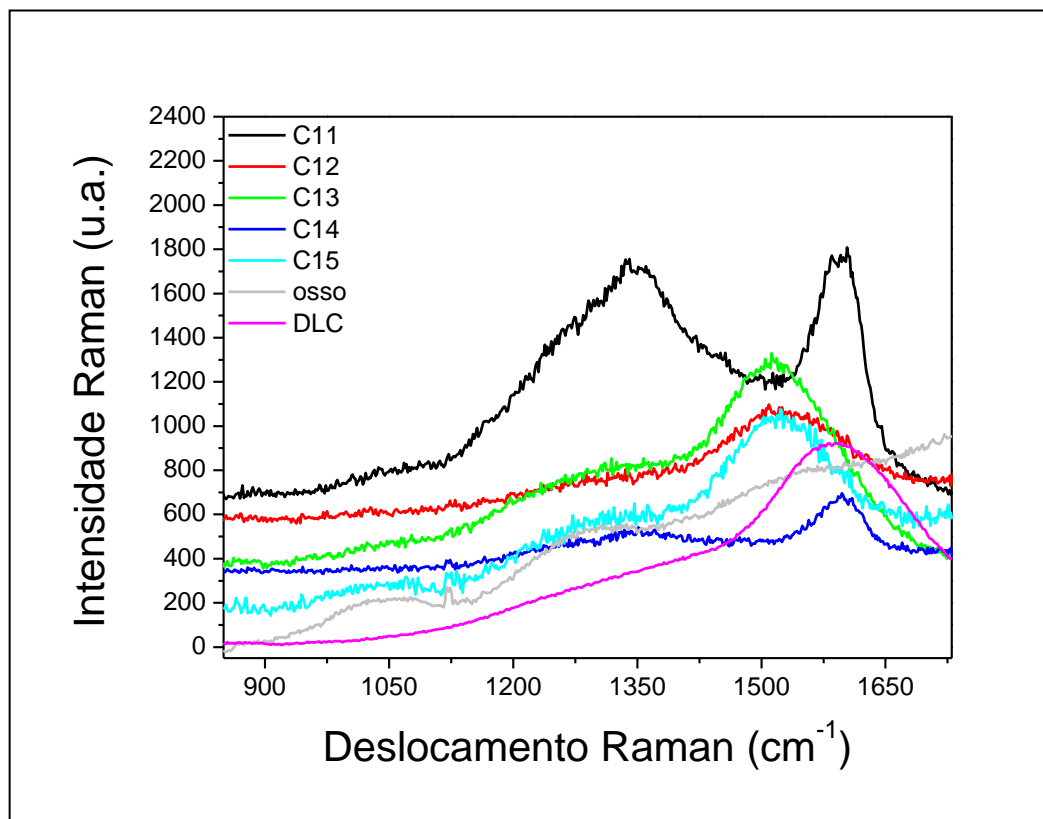


Figura 22 – Espectroscopia de espalhamento Raman para o grupo DLC 15 dias. Os espectros DLC do período inicial e do osso foram usados como parâmetro da análise.

No período de 90 dias os filmes DLC apresentaram picos na mesma região aos do DLC no período inicial. As amostras, C18, C19 e C20, apresentaram aumento de intensidade maior no pico centrado em 1300. Isto pode ser devido à incorporação seletiva de material ósseo à amostra (Figura 23).

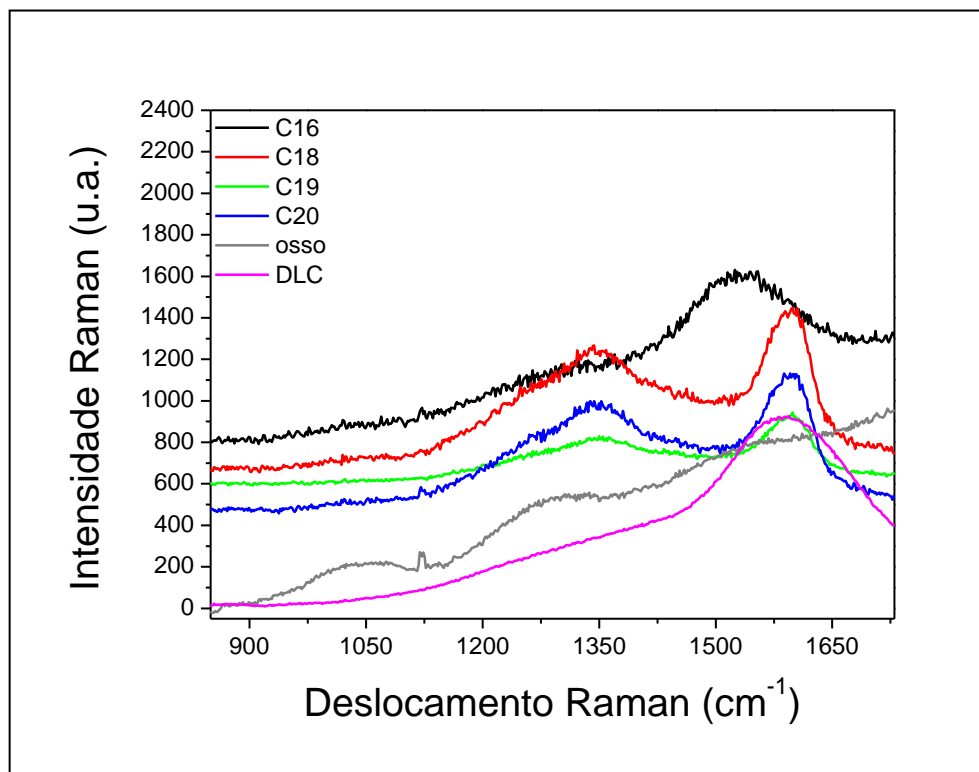


Figura 23 - Espectroscopia de espalhamento Raman para o grupo DLC 90 dias. Os espectros DLC do período inicial e do osso foram usados como parâmetro da análise.

Resultados similares foram observados nas análises dos espectros Raman dos filmes DLC-Ag no período de 15 dias (Figura 24) e 90 dias (Figura 25). Entretanto, o aumento de intensidade do pico centrado em 1300 foi menor que para os filmes de DLC puro, indicando que a prata interfira de alguma forma na adesão desses materiais.

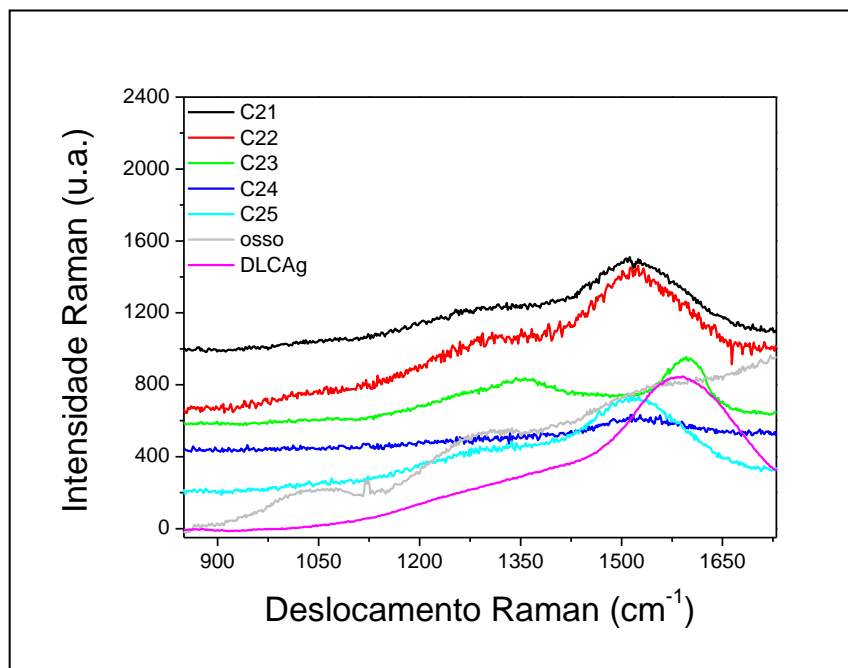


Figura 24 – Espectroscopia de espalhamento Raman para o grupo DLC-Ag 15 dias. Os espectros DLC-Ag do período inicial e do osso foram usados como parâmetro da análise.

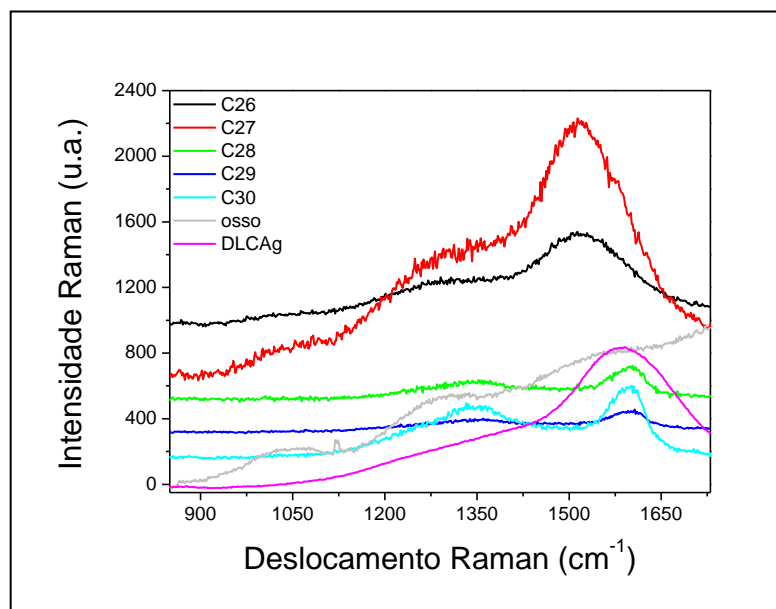


Figura 25 – Espectroscopia de espalhamento Raman para o grupo DLC-Ag 90 dias. Os espectros DLC-Ag do período inicial e do osso foram usados como parâmetro da análise.

5.1.3 Análise da resistência elétrica

Através de um multímetro foi realizada a medição da resistência média ou resistividade elétrica das amostras, obtendo como resultado os valores conforme o quadro 3. Os resultados demonstram que o recobrimento com filmes DLC com ou sem nano-partículas de prata, atuam como isolante elétrico do substrato Ti-6Al-4V onde foram depositados. Pode ser observado também que a adição das nano-partículas de prata não afeta a capacidade isolante do filme de DLC.

Quadro 3 – Resultados do teste de resistência média ou resistividade elétrica, obtidos pelo multímetro

Amostra	Resistencia media (Ω)	Resposta
G1: Ti-6Al-4V	100 M ω	Condutor
G2: DLC	- 1 M Ω	Sem condução
G3: DLC-Ag	- 1 M Ω	Sem condução

5.2 Análise macroscópica do tecido ósseo junto à amostra

A análise macroscópica foi feita através de uma lupa estereoscópica após fixação das peças em formol.

No período de 15 dias observou-se a amostra bem posicionada no local onde foi fixada e estável. Por vezes, apresentava tecido endurecido esbranquiçado, semelhante a tecido osso, recobrendo parcialmente a superfície da amostra e dificultando sua

separação do osso. Além disso, também se observou tecido de consistência elástica e tecido de consistência semelhante à da cartilagem, independentemente do grupo (Figura 6). No período de 90 dias, as amostras apresentavam tecido duro semelhante a tecido ósseo na sua superfície, sendo que algumas estavam recobertas quase na sua totalidade por esse material. Além disso, observou-se também tecido mole de consistência borrachosa por vezes acima do osso e por vezes acima da amostra.

5.3 Análise histológica do tecido ósseo

Microscopicamente, os espécimes avaliados apresentavam secções transversais de osso gnático, com a amostra posicionada acima da cortical óssea, formada por tecido ósseo compacto. Este exibia numerosos sistemas de Havers formados por lamelas ósseas concêntricas dispostas em torno de um canal central. Tais lamelas continham lacunas de osteócitos, também dispostas em anéis concêntricos, que se intercomunicavam por canalículos.

Em todos os animais sacrificados, foi observada neoformação óssea na interface osso preexistente - amostra, permitindo uma união estável da mesma ao osso onde foi fixada (Figura 26 e 27). Sinais de remodelação do tecido ósseo foram observados em todos os grupos e em ambos os períodos.

No período de 15 dias notou-se ainda delimitação entre o tecido ósseo neoformado e a cortical óssea preexistente. O osso neoformado apresentou trabéculas imaturas delicadas, constituídas por tecido osteóide parcialmente calcificado, formadas a partir do osso preexistente em direção à amostra. Tais trabéculas foram observadas inclusive junto à amostra e exibiam osteócitos volumosos dentro de lacunas amplas e osteoblastos arranjados em fileira contornando-as. Células gigantes sugestivas de osteoclastos também foram observadas na periferia de algumas trabéculas, independente do grupo (Figura 26 A, 26B e 27 A, 27B).

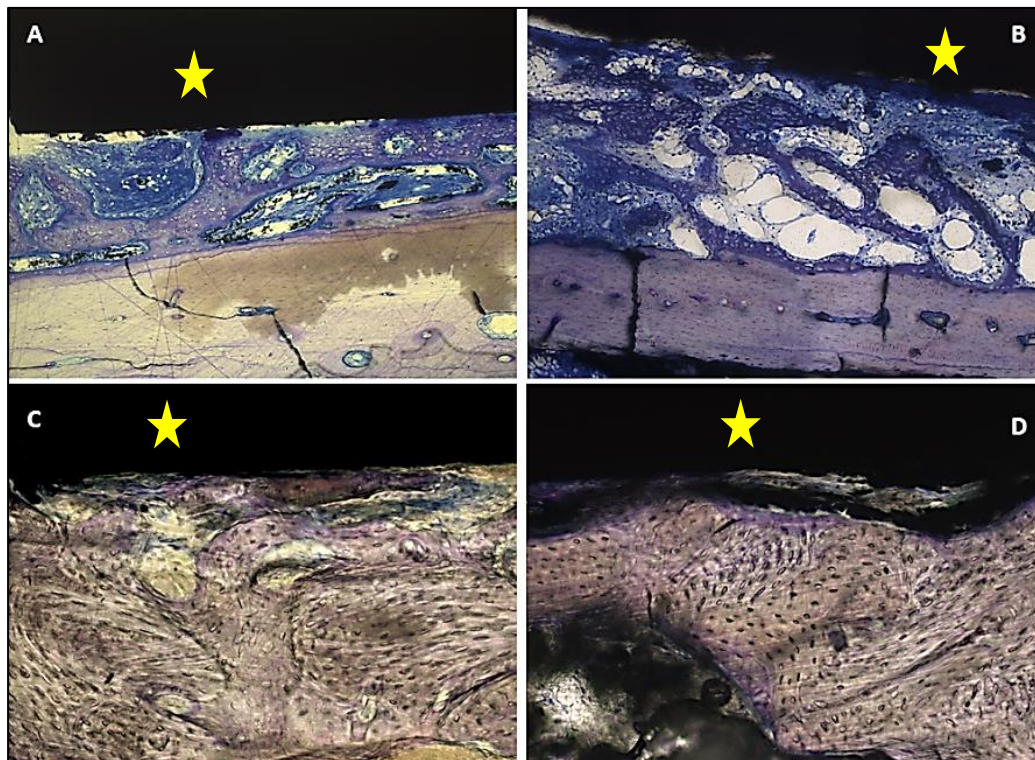


Figura 26 - Fotomicrografia comparativa dos aspectos histológicos observados entre os grupos com filme de recobrimento com DLC e o grupo sem recobrimento após períodos de 15 e 90 dias. A DLC 15 dias; B Ti-6Al-4V 15 dias; C DLC 90 dias e D Ti-6Al-4V 90 dias. A estrela amarela representa a amostra. (corado em azul de toluidina, aumento original de 10x).

No período de 90 dias o osso neoformado se confundiu com o preexistente, o mesmo apresentou-se com maior grau de maturidade e organização que no período de 15 dias, sendo altamente celularizado, exibindo diversas lacunas de osteócitos e sistemas de Havers na proximidade da amostra independentemente do grupo avaliado (Figura 26 C, 26D e Figura 27 C, 27D). Em alguns casos ainda pode-se observar áreas de osso imaturo proliferando em direção à amostra, talvez devido à irregularidade apresentada na superfície do osso pré-existente onde foi fixada a amostra, não favorecendo o contato total da amostra com a superfície onde foi fixada. Além disso, foi observado na maioria dos casos deposição de tecido ósseo acima da amostra, especialmente no período de 90 dias, nos três grupos, indicando que os materiais utilizados nos três grupos favoreceram a osseointegração. Observa-se um exemplo na Figura 28.

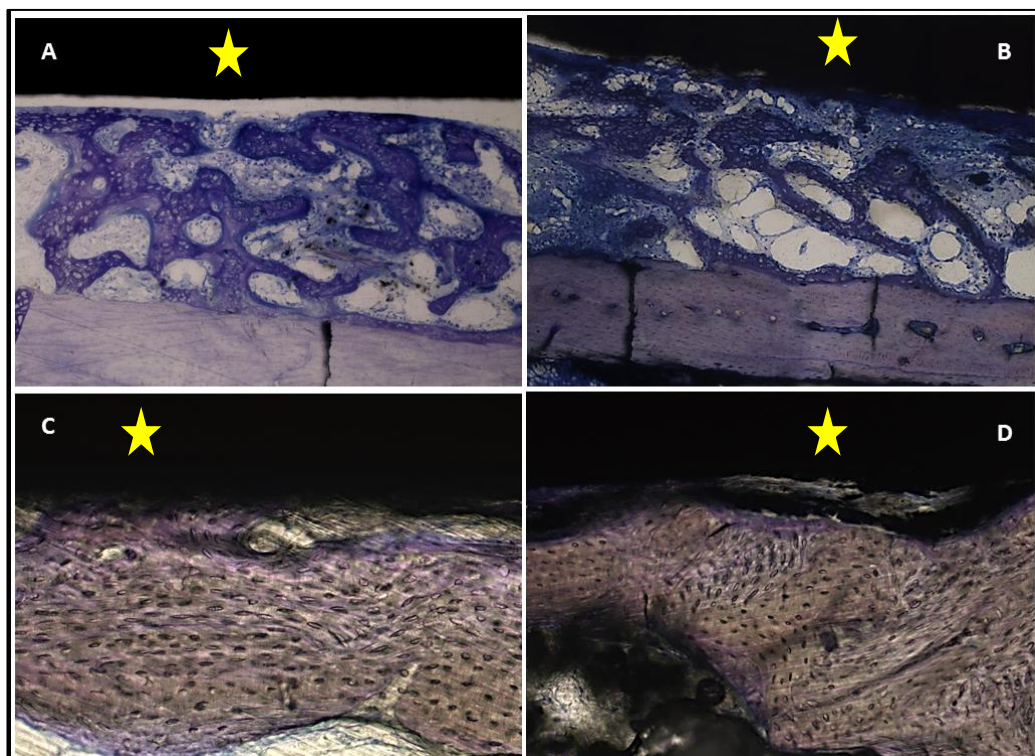


Figura 27 - Fotomicrografia comparativa dos aspectos histológicos observados entre os grupos com filme de recobrimento com DLC-Ag e o grupo sem recobrimento após os períodos de 15 e 90 dias. A). DLC-Ag 15 dias; B). Ti-6Al-4V 15 dias; C). DLC-Ag 90 dias e D). Ti-6Al-4V 90 dias. A estrela amarela representa a amostra (corado em azul de toluidina, aumento original 10x).

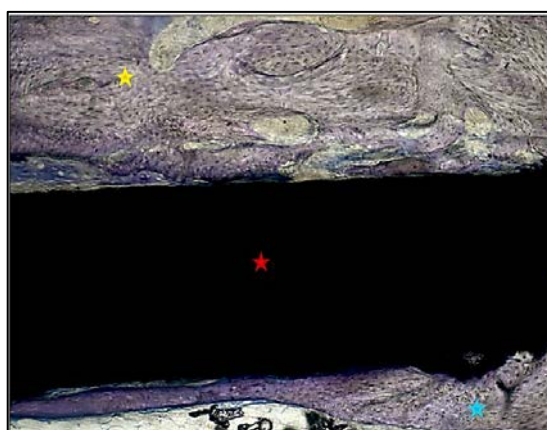


Figura 28 – Fotomicrografia de corte histológico mostrando área superior (estrela amarela) e inferior (estrela azul) à amostra (estrela vermelha) no período de 90 dias, demonstrando tecido ósseo maturo em ambas as superfícies da amostra. Coloração em azul de toluidina-Aumento original 10x.

5.4 Análise histomorfométrica da neoformação óssea

A influência das três condições de amostras (G1: Ti-6Al-4V sem recobrimento; G2: Ti-6Al-4V com recobrimento de DLC; G3: Ti-6Al-4V com recobrimento de DLC-Ag) sob dois diferentes tempos de eutanásia (15 e 90 dias) em relação a porcentagem de neoformação óssea, que está representada no Quadro 4, constitui seis condições experimentais a serem estudadas (3 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na Tabela 3 e representada na Figura 29. O teste de normalidade dos valores residuais do modelo experimental foi feito para verificar o poder da amostra (teste de Anderson Darling, $p\text{-valor} = 0,546 > 0,05$), o qual encontra-se representado no Apêndice A.

Quadro 4 - Valores obtidos em porcentagem (%) da neoformação óssea média em cada animal por grupos (n=5) em relação ao período de eutanásia

15 dias			90 dias		
DLC	DLC+Ag	Ti-6Al-4V	DLC	DLC+Ag	Ti-6Al-4V
41.2234	14.4813	13.3732	94.2800	21.6505	66.1356
36.7829	14.2016	16.0996	72.7871	77.6674	20.3963
5.9806	15.4639	12.8927	39.7866	34.4795	78.9639
12.6676	15.0901	6.7468	64.8878	59.4506	41.5203
14.5284	21.6017	59.1902	76.5020	70.6165	37.6641

Os dados obtidos para cálculo da porcentagem de neoformação óssea encontram-se disponíveis no Apêndice B.

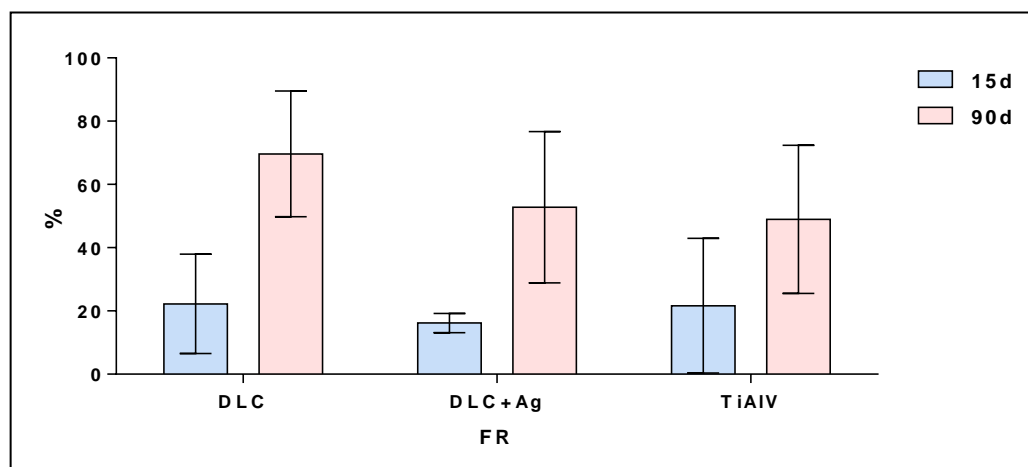


Figura 29.- Gráfico de colunas (média \pm dp) dos valores de neoformação óssea, segundo as condições experimentais estabelecidas pelo tipo de amostra e o período.

Tabela 3- Estatística descritiva dos valores de neoformação óssea obtidos em cinco animais (amostras) por grupo em relação ao período e tipo de recobrimento

Período (dias)	Tipo de Recobrimento	Média	DP	CV(%)	Mínimo	Máximo	Faixa
15	DLC	22,24	15,71	70,65	14,53	41,22	35,24
	DLC+Ag	16,17	3,08	19,04	15,09	21,60	7,40
	TiAlV	21,66	21,26	98,14	13,37	59,60	52,44
90	DLC	69,65	19,86	28,52	39,79	94,28	54,49
	DLC+Ag	52,80	23,90	45,30	21,70	77,70	56,00
	TiAlV	48,90	23,40	47,86	20,40	79,00	58,60

DP: desvio padrão; CV%: coeficiente da variação.

Para determinar a influência das variáveis, tipo de recobrimento e período de eutanásia, foi aplicado o teste ANOVA dois fatores (Figura 30), no qual se observou que não houve diferença estatística significativa quando considerado o tipo de amostra ($p =$

0,3475) (Tabela 4). Mas, em relação ao fator tempo, o mesmo se apresentou estatisticamente significativo ($p = 0,0001^*$), sendo que no período de 90 dias houve maior neoformação óssea ($57,12 \pm 22,79\%$) em relação ao período de 15 dias ($20,02 \pm 14,50\%$). Os resultados estão representados na tabela 5. Para evidenciar onde houve diferença em relação ao tempo foi realizado o teste comparativo múltiplo de Tukey (Tabela 6).

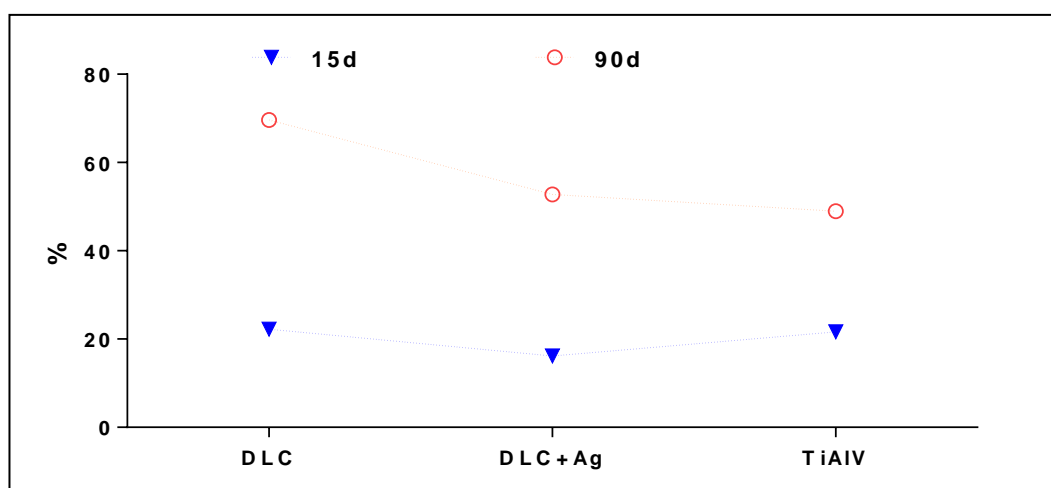


Figura 30 – Gráfico mostrando as médias de porcentagem de neoformação óssea (%) em relação aos períodos analisados.

Tabela 4 – Análise estatística do teste ANOVA 2 fatores para os dados obtidos da porcentagem de neoformação óssea na interface osso – amostra, $n = 5$ em seis condições experimentais

Efeito	Gl	SQ	QM	razão F	p-valor
Grupos	2	818,70	409,30	1,11	0,3475
Período	1	10321,70	10321,70	27,86	0,0001*
Interação	2	507,80	253,90	0,69	0,5135
Resíduo	24	8890,60	370,40		
Total	29	20538,8			

* $p < 0,05\%$. Gl: Grau de liberdade; SQ: Soma; QM: quadrado médio.

Tabela 5 - Resultados da média e desvio padrão da porcentagem de neoformação óssea em relação aos períodos

Variável	Período	N	Media	Dp	CV
Neoformação Óssea (%)	15	15	20.02	14.50	72.44
	90	15	57.12	22.79	39.90

DP: desvio padrão; CV%: coeficiente da variação.

Tabela 6 - Análise estatística comparativa de Tukey em relação a média de porcentagem de neoformação óssea em relação ao tempo e tipo de recobrimento

Grupos	Periodo	Media	GH
DLC	90	69.649	A
DLC-Ag	90	52.773	A B
Ti-6Al-4V	90	48.936	A B
DLC	15	22.237	B
Ti-6Al-4V	15	21.661	B
DLC-Ag	15	16.168	B

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Na análise comparativa de Tukey, observou-se que o grupo de DLC no período de 90 dias (A) apresentou maior porcentagem de neoformação óssea que aos grupos DLC, DLC-Ag e Ti-6Al-4V no período de 15 dias (B). Porém, os grupos DLC-Ag e Ti-6Al-4V no período de 90 dias não apresentaram diferença estatística significativa com os demais grupos. O grupo que obteve menos porcentagem de neoformação óssea foi o DLC-Ag no período de 15 dias e o Ti-6Al-4V sem recobrimento, no período de 90 dias.

6 DISCUSSÃO

Em uma articulação natural normal, dificilmente ocorre desgaste, porque existe o fluido sinovial e o tecido cartilaginoso que garantem lubrificação eficiente entre as superfícies articulares. Contudo, quando uma articulação perde a sua estrutura e com isso sua função, esta necessita ser substituída por um implante aloplástico ou prótese articular (Mercuri et al., 1995; Quinn, 2000; Poliakov et al., 2004; Wolford, 2006).

As propriedades tribológicas das superfícies funcionais das articulações artificiais totais constituem um dos aspectos mais importantes que determinam a evolução das mesmas (Donnet JB et al., 1998; Robertson, 2002; Poliakov et al., 2004; Erdemir, Donnet, 2006; Trava-Airoldi et al., 2007; Radi, 2012). As primeiras articulações metal/metal não tiveram muito sucesso e sofreram quase que uma completa erradicação após vários casos de falhas prematuras, devido aos altos torques de fricção produzidos durante a função. Na realidade, o intenso atrito na articulação metal/metal produz uma forma de desgaste adesivo bastante intenso que literalmente “solda” as superfícies articulares (Bremond et al., 2003; Jacobs et al., 1996; Gispert et al., 2007). Por isto, foi introduzido na indústria das próteses articulares o metal – UHMWPE, por este último apresentar baixo nível de atrito, mesmo em ambientes

não lubrificadas, já que o UHMWPE atua como um lubrificante sólido (Poliakov et al., 2004).

Entretanto, problemas decorrentes do desgaste das superfícies articulares artificiais são uma das principais falhas das próteses articulares de quadril e joelho, nas quais partículas de desgaste provenientes do UHMWPE ocasionam inúmeras perdas de próteses (Karrholm et al., 1997; Lu et al., 1993; Donnet JB, 2008; Ebrahimzadeh et al., 2011; Gallo et al., 2013; Okasaki, 2014; Gustafson et al., 2014).

Além de partículas de desgaste do UHMWPE, partículas de superfícies metálicas e íons podem ser gerados por corrosão e estes, após estimulação repetida, poderão iniciar uma resposta de corpo estranho, metalose e osteólise (Hallab et al., 2002; Morais et al., 2007; Kanatas et al., 2012; Gustafson et al., 2014). Além disso, relatos de alergia ou hipersensibilidade aos metais, em especial ao Ni, Co, Cr, Al e V, têm ocasionado dor crônica, edema e sinais e sintomas de dermatites (Sicilia et al., 2008; Thyssen, Menne, 2010; Krecisz et al., 2012; Guo et al., 2013). Por outro lado, existem relatos de que o Ti também causa reações de hipersensibilidade, podendo inibir a osteogênese. (Rack, Qasi, 2006; Morais et al., 2007). Estes problemas antigamente não eram causas de insucesso das próteses articulares, mas hoje, se sabe que a hipersensibilidade aos metais é um fenômeno bem estabelecido e pode provocar a perda da prótese (Basketter et al., 1993; Vijayaraghavan et al., 2012; Amini et al., 2014). Isto talvez se deva ao fato de que atualmente pessoas mais jovens têm precisado do uso de próteses articulares, que no passado

eram usadas principalmente em indivíduos mais velhos (Ariza et al., 2008).

Somado às falhas que têm sido descritas em relação ao desgaste e corrosão de superfícies articulares aloplásticas, também a biocompatibilidade e integração destes biomateriais aloplásticos têm sido motivo de pesquisas (Marino et al., 2001; Gallo et al., 2013; Okasaki, 2014). O paradigma da biocompatibilidade envolve, embora distintas, mas potencialmente correlacionadas, respostas das duas fases do complexo, biomaterial-tecido e a interface do fenómeno que entra em ação quando se dá o contato. Provavelmente, o mais importante é que os mecanismos pelos quais os materiais e os tecidos humanos interagem, não são únicos, mas sim, existem variações do processo natural que ocorre nas reações biológicas e nos próprios materiais.

O recobrimento com filmes de DLC parece ser interessante para ser aplicado como recobrimento de superfícies funcionais que deslizam entre si, já que estes apresentam elevada resistência ao desgaste abrasivo *in vivo*, podendo evitar a libertação de íons metálicos e detritos de desgaste provenientes tanto do metal quanto do UHMWPE (Roy JS et al., 2010; Cloutier et al., 2014a; Okasaki, 2014). Em outras aplicações biomédicas que não envolvam superfícies funcionais, também seria interessante a aplicação deste filme, já que evitaria a libertação de íons metálicos potencialmente tóxicos para o organismo.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar *in vivo* as características estruturais de amostras revestidas por filmes de DLC

e DLC-Ag, depositados no substrato Ti-6Al-4V pelo sistema PECVD, na procura de um filme protetor para ser aplicado como recobrimento de superfícies de próteses articulares para melhorar as propriedades tribológicas e proporcionar adequada osseointegração.

Diversos estudos avaliaram os filmes de DLC em próteses articulares e em outros materiais de uso biomédico, aplicando estes filmes em substratos e sistemas de deposição diferentes, a maioria mostrando bons resultados (Allen et al., 2001; Papo et al., 2004; Marciano et al., 2009; Roy ME et al., 2010; Li et al., 2011; Love et al., 2013; Okasaki, 2014). Entretanto, outros têm relatado resultados desfavoráveis, sugerindo a procura de um filme de revestimento que apresente as propriedades ideais para ser utilizado em próteses articulares (Hauert et al., 2010, 2012, 2013; Cloutier et al., 2014a).

Hauert et al. (2012), observaram uma taxa de sobrevivência de próteses de quadril recobertas com filme de DLC de 54% em 8,5 anos de uso. Após remoção destas próteses, observaram formação de numerosas fossas e delaminação dos revestimentos de DLC que ocasionaram desgaste excessivo da contraparte UHMWPE, com conseqüente osteólise e pigmentação negra da membrana sinovial.

As falhas descritas acima em relação aos filmes de DLC poderiam ser atribuídas a uma alteração química estrutural, ao estresse do filme ou à deficiente adesão do mesmo ao substrato (Cheng, Zheng, 2006; Choi et al., 2007; Anandan et al., 2014). Nos filmes aplicados em nosso estudo, não foi observado delaminação

após permanência *in vivo*, conforme demonstrado pelas análises estruturais, comprovando a qualidade dos mesmos.

A adição de nano-partículas metálicas aos filmes sólidos de carbono produz novas propriedades que estão além dos componentes individuais, reduzindo a probabilidade de corrosão e o estresse, conferindo ao filme maior resistência (Schimid; 1992; Kwok et al., 2007; Marciano et al., 2009; Liu et al., 2014; Anandan et al., 2014). Testes adicionais, como o de atrito, são necessários para confirmar se as nano-partículas de prata, adicionadas ao filme de DLC neste estudo, realmente melhoram suas propriedades.

Uma das formas de avaliar a qualidade dos filmes de DLC é a partir da análise por espectroscopia de espalhamento Raman. Esta técnica fornece informações sobre a estrutura de materiais como o DLC e é bastante utilizada por ser relativamente simples e não destrutiva (Bonetti, 2008).

Após avaliação da estrutura por espectroscopia de espalhamento Raman dos grupos com filme de recobrimento neste estudo, se observou que estes não mostraram alterações químicas estruturais importantes, apresentando espectros Raman que mantinham picos semelhantes aos picos típicos de um filme DLC e DLC-Ag. Tal aspecto foi observado na maioria das amostras e nos dois períodos estudados (15 e 90 dias). Entretanto, algumas amostras apresentaram um aumento da intensidade e um leve deslocamento dos picos Raman, os quais eram compatíveis com o espectro Raman do osso. Uma possível explicação para este achado seria a ocorrência de ligação entre o osso e os filmes, confirmada por EDS, no qual se

constatou a presença de Ca e P na superfície das amostras, tanto nas de DLC, quanto nas de DLC-Ag, após os períodos de 15 e 90 dias.

Um resultado semelhante ao nosso, foi observado também em filmes DLC dopados com Mo em substrato de NiTi, em que houve formação de uma camada de fosfato de cálcio acima dos filmes. O Ca e o P são minerais constituintes do osso que se ligam formando cristais de hidroxiapatita, os quais, ao serem depositados na substância orgânica do osso, atribuem a este uma rigidez característica (Anandan et al., 2014).

Quando foi feito o EDS das amostras do grupo Ti-6Al-4V sem recobrimento, após os períodos de 15 e 90 dias, não foram observados Ca e P, como nos grupos com recobrimento de DLC e DLC-Ag. Provavelmente, isto pode ser devido a mudanças na sua camada protetora, as quais influenciaram a liberação de produtos de corrosão, evitando assim, a interação de Ca e P com os componentes da liga de titânio (Hanawa, 2004). As células corpóreas interagem bem com uma superfície de titânio puro (recoberta com película de TiO₂), mas não resistem a um ambiente contendo Al e V, sofrendo intoxicação. Para a liga de Ti-6Al-4V, usualmente utilizada em implantes médicos, tem-se que 25,1% de sua superfície não possui Ti, de modo que não há adesão de células; isto é, adesão do osso ao implante da liga nesta região (Yang, Hsiung, 2010).

Analisando os resultados obtidos pelo EDS nos grupos com e sem recobrimento, acredita-se que possa ter ocorrido uma ligação química, entre as moléculas de Ca e P e as dos filmes de carbono, o que não ocorreu com a liga de titânio sem recobrimento,

talvez devido à presença de óxido de alumínio na superfície das amostras.

Na análise realizada no presente estudo, a incidência do EDS foi feita em um campo aleatório da amostra, o que não permite afirmar que em outras áreas não houvesse a presença de Ca e P. Para confirmar esta hipótese teria que ser realizada uma análise completa da superfície da amostra sem recobrimento.

A corrosão metálica da liga Ti-6Al-4V em implantes ortopédicos, placas de fixação e *brackets* ortodônticos tem sido relatada. Apesar de alguns autores relatarem ausência de sinais patológicos associados com a liberação de íons de titânio, partículas deste metal podem promover proliferação de fibroblastos, importante fator no desenvolvimento de cápsula fibrosa ao redor dos implantes. Além disso, a fagocitose das partículas pode causar osteólise peri-implante. Os íons de Ti também induziriam a diminuição no número e atividade de osteoblastos, macrófagos e leucócitos, prejudicando a osteogênese (Morais et al, 2007).

Estas alterações ocorrem por diversos motivos: pela concentração de íons de cloro encontrados no soro sanguíneo e nos fluidos intersticiais, os quais geram um ambiente altamente corrosivo para materiais metálicos; pelo pH do tecido ósseo onde o material é implantado, o qual diminui e só retorna ao valor normal após 2 semanas; pelos fluidos corporais, que são constituídos por aminoácidos e proteínas que influenciam a corrosão metálica; pela concentração de oxigênio dissolvido nos fluidos corporais, o qual é um quarto daquela do ar, atrasando a formação do filme de óxido

superficial; e pelas células, que atuam como corpos com carga que podem influenciar a corrosão de materiais metálicos (Hanawa, 2004). O recobrimento com um filme isolante, biocompatível e ósseo-integrável, impediria a corrosão da liga metálica e o contato de íons metálicos com o tecido.

O filme DLC pode ser aplicado em duas situações: primeiro, para substituir articulações pares pequenas ou grandes, as quais podem ser iguais ou totalmente diferentes, por este apresentar propriedades tribológicas ideais; e em segundo lugar, em implantes feitos de materiais que podem causar uma resposta negativa ao organismo como, por exemplo, ligas contendo níquel, cobalto, cromo, alumínio, vanádio, etc. Neste último caso, o filme de DLC, funcionaria como uma camada ou barreira bioinerte, capaz de eliminar o processo de corrosão adverso, associado com a libertação de produtos solúveis de corrosão no organismo (Cheng, Zheng, 2006; Joska et al., 2014). Filmes semelhantes aos utilizados neste estudo foram anteriormente estudados quanto à sua aderência e resistência à corrosão, e foi observado que estes apresentaram alta aderência, bem como, eficiência protetiva (Radi, 2012).

Para os implantes aloplásticos que entram em contato com osso, a osseointegração é um fenômeno esperado nos implantes não cimentados. Na osseointegração se espera a ausência de qualquer resposta inflamatória e de formação de tecido fibroso ou conjuntivo na interface osso-implante (Iezzi et al., 2014). Em relação aos resultados obtidos em nosso estudo, mesmo não tendo sido observado Ca e P no grupo Ti-6Al-4V sem recobrimento, na análise

macro e microscópica houve osseointegração das amostras em ambos os períodos. Os grupos com recobrimento com DLC e DLC-Ag também mostraram neoformação óssea na interface osso-amostra, tanto no período de 15 quanto no período de 90 dias. Além disso, em todos os grupos foi observada neoformação óssea recobrindo as amostras.

A neoformação óssea, na interface com a amostra, foi maior no grupo DLC em relação aos grupos DLC-Ag e Ti-6Al-4V, em ambos os períodos, sendo significativamente maior no período mais longo. Quanto ao grupo de DLC-Ag, a porcentagem média de neoformação óssea foi maior do que no grupo sem recobrimento no período mais longo, porém, sem diferença estatística significativa.

Resultados similares aos nossos foram observados com a utilização de substratos de cobalto-cromo recobertos com DLC, os quais foram implantados em locais transcorticais em ovelhas, e demonstraram osseointegração após 90 dias (Allen et al., 2001).

Em outro estudo utilizando implantes dentais de titânio comercialmente puro, em Beagles, não foi observada maior porcentagem de contato ósseo entre implantes recobertos com DLC e implantes ionizados, após os períodos de 90 e 180 dias. Neste estudo, os implantes recobertos com DLC apresentaram maior porcentagem de contato osso – implante em comparação com o grupo controle (titânio comercialmente puro), porém, sem diferença estatística significativa (Maetzu et al., 2007).

A infecção é outra das falhas que têm sido descritas em relação às próteses aloplásticas, ocasionando risco de

perda de várias próteses articulares da ATM (Mercuri, 2006; Wolford et al., 2010). Isto foi observado em pacientes fumantes, com artrite reumatoide, osteopenia, rinite alérgica, permanência recorrente em unidade de tratamento intensivo (UTI), entre outras, estando estas situações associadas ou não à infecção no local da prótese (Mercuri, 2006; Wolford et al., 2010).

Segundo descreve Lau et al. (2001), Betts et al. (2005), Ishihara et al. (2006), Hussain e Pal (2007) outras das propriedades que os filmes de DLC possuem é o efeito bactericida e, nano-partículas de prata dopadas no filme DLC potencializam esse efeito, sendo esta efetiva contra *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli* (Bell, Myrick, 2001; Marciano et al., 2009; Narayan et al., 2005; Tamulevičius et al., 2014; Cloutier et al., 2014b; Liu et al., 2014; Gayathri et al., 2015). Esta propriedade é de suma importância em materiais que serão implementados para aplicações biomédicas, em especial, para serem usados implantes aloplásticos.

O filme de DLC-Ag em nosso estudo apresentou osseointegração semelhante ao observado nos demais grupos, demonstrando que as nano-partículas de prata presentes não interferiram neste processo. Estes achados confirmam os resultados obtidos por Cardoso (2013) em estudo *in vitro* com implantes dentários recobertos pelo mesmo tipo de filme.

Além do discutido acima, outra propriedade que foi analisada neste estudo foi a condutividade elétrica dos filmes de DLC e DLC-Ag. Os resultados demonstraram que ambos os filmes não são condutores, o que seria uma vantagem adicional, pois os

mesmos impediriam a transmissão de estímulo elétrico para o osso, evitando a sensibilidade dolorosa. Esta propriedade, não entanto, precisa ser melhor estudada, a fim de que se possa chegar a uma conclusão sobre a relevância do efeito isolante elétrico dos filmes no funcionamento da prótese.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que houve osseointegração das amostras recobertas por filmes de DLC e DLC-Ag, demonstrando que os mesmos são ósseo-integráveis e não sofrem alterações estruturais no decorrer do tempo de permanência *in vivo*. Portanto, o recobrimento com estes filmes é promissor para uso em próteses articulares, pois o comportamento é similar ou superior ao do Ti-6Al-4V sem recobrimento, material que é usado como padrão ouro em próteses articulares e outras aplicações biomédicas, porém, estes filmes apresentam propriedades adicionais que o Ti-6Al-4V não possui, como: efeito bactericida, ausência de elementos tóxicos para o organismo e isolamento elétrico.

8 REFERÊNCIAS*

Allen M, Myer B, Rushton N. In vitro and in vivo investigations into the biocompatibility of diamond-like carbon (DLC) coatings for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res.* 2001 May 1;58(3):319-28.

Amini M, Mayes WH, Tzeng A, Tzeng TH, Saleh KJ, Mihalko WM. Evaluation and management of metal hypersensitivity in total joint arthroplasty: a systematic review. *J Long Term Eff Med Implants.* 2014;24(1):25-36.

Anandan C, Mohan L, Dilli Babu P. Electrochemical studies and growth of apatite on molybdenum doped DLC coatings on titanium alloy β -21S. *App Surf Sci.* 2014;296:86–94.

Ariza J, Euba G, Murillo O. Orthopedic device-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(6):380-90.

Basketter DA, Briatico-Vangosa G, Kaestner W, Lally C, Bontinck WJ. Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis.* 1993 Jan;28(1):15-25.

Bell WC, Myrick ML. Preparation and Characterization of Nanoscale Silver Colloids by Two Novel Synthetic Routes. *Colloid Interface Sci.* 2001;242(2):300-5.

Betts AJ, Dowling DP, Mcconnell ML, Pope C. The influence of platinum on the performance of silver–platinum anti-bacterial coatings. *Materials & Design.* 2005;26(3):217-222.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bissada NF, Hangorsky U. Alveolar bone induction: alloplasts. *Dent Clin North Am.* 1980;24(4):739-49.

Blumenthal NC, Cosma V. Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. *J Biomed Mater Res.* 1989 Apr;23(A1suppl):13-22.

Bonetti LF. Otimização das propriedades mecânicas e tribológicas de filmes de DLC crescidos sobre substratos metálicos objetivando aplicações espaciais e industriais [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA; 2008.

Bracroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques and their diagnostic application.* Longman Singapore Publishers Ltd; 1994.

Brånemark R, Brånemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 2001;38(2):175–81.

Bremond F, Fournier P, Platon F. Test temperature effect on the tribological behavior of DLC-coated 100C6-steel couples in dry friction. *Wear.* 2003;254(7-8):774–83.

Cardoso M. Influência da deposição de filmes de carbono tipo diamante na infiltração bacteriana pela interface entre implantes e pilares protéticos [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

Cheng Y, Zheng YF. The corrosion behavior and hemocompatibility of TiNi alloys coated with DLC by plasma based ion implantation. *Surf Coat Tech* 2006; 200(14-15):4543-8;

Choi HW, Choi JH, Lee KR, Ahn JP, Oh KH. Structure and mechanical properties of Ag-incorporated DLC films prepared by a hybrid ion beam deposition system. *Thin Solid Films* 2007;516(2-4):248–51.

Choung EW, Yang F. Slipped capital femoral epiphysis in an obese teenager. *Phys Sportsmed.* 2003 Jul;31(7):39-45.

Cloutier M, Harnagea C, Hale P, Seddiki O, Rosei F, Mantovan D. Long-term stability of hydrogenated DLC coatings: Effects of aging

on the structural, chemical and mechanical properties. *Diam Relat Mater.* 2014a;48:65–72.

Cloutier M, Tolouei R, Lesage O, Lévesque L, Turgeon S, Tatoulian M, et al. On the long term antibacterial features of silver-doped diamond like carbon coatings deposited via a hybrid plasma process. *Biointerphases.* 2014b;9(2):029013.

Cramer SC, Nelles G, Schaechter JD, Kaplan JD, Finklestein SP. Computerized measurement of motor performance after stroke. *Stroke.* 1997 Nov;28(11):2162-8.

Donnet JB, Ridaoui H, Balard H, Barthel H, Gottschalk-Gaudig T. Evolution of the surface polar character of pyrogenic silicas, with their grafting ratios by dimethylchlorosilane, studied by microcalorimetry. *J Colloid Interface Sci.* 2008 Sep 1;325(1):101-6.

Donnet C. Recent progress on the tribology of doped diamond-like and carbon alloy coatings: a review. *Surf Coat Tech.* 1998;100(101):180-6.

Ebrahimzadeh E, Campbell PA, Takamura KM, Lu Z, Sangiorgio SN, Kalma JJ, et al. Failure mode so f433 metal-on-metal hip implants: how, why, and wear. *Orth Clin North Am.* 2011;42(2):241–50.

Erdemir A, Donnet C. Tribology of diamond-like carbon films: recent progress and future prospects; *J Phys D Appl Phys.* 2006;39(18):R311–27.

Fook MVL, Aparecida AH, Marcelino ACB, Medeiros KM, Guastaldi AC. Desenvolvimento de técnica de modificação da superfície do PUAPM para deposição biomimética de apatita. *Rev Mat Proc.* 2007;(2):133-41.

Furey JS, Fredrickson HL, Richmond MJ, Michel M. Effective elution of RDX and TNT from particles of Comp B in surface soil. *Chemosphere.* 2008 Jan;70(7):1175-81.

Galletti P. Biomaterials and availability. *ASAIO J.* 1997 Nov-Dec;43(6):882-3.

Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Wimmer MA, Holinka M. Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomater.* 2013 Sep;9(9):8046-58.

Gayathri S, Kumar N, Krishnan R, Ravindran TR, Amirthapandian S, Dash S, et al. Influence of transition metal doping on the tribological properties of pulsed laser deposited DLC films. Original Research Article. *Ceram Int.* 2015;41(1 Part B): 1797-805.

Gispert MP, Serro AP, Colaço R, Botelho do Rego AM, Alves E, da Silva RC, et al. Tribological behaviour of Cr-implanted TiN coatings for biomedical applications. *Wear.* 2007;262(11-12):1337-45.

Goriainov V, Cook R, M Latham J, G Dunlop D, Oreffo RO. Bone and metal: an orthopaedic perspective on osseointegration of metals. *Acta Biomater.* 2014 Oct;10(10):4043-57.

Guo Y, Chen D, Cheng M, Lu W, Wang L, Zhang X. The bone tissue compatibility of a new Ti₃₅Nb₂Ta₃Zr alloy with a low Young's modulus. *Int J Mol Med.* 2013 Mar;31(3):689-97.

Gustafson K, Jakobsen SS, Lorenzen ND, Thyssen JP, Johansen JD, Bonfeld CM, et al. Metal release and metal allergy after total hip replacement with resurfacing versus conventional hybrid prosthesis. *Acta Orthop.* 2014 Aug;85(4):348-54.

Hallab NJ, Mikecz K, Vermes C, Skipor A, Jacobs JJ. Orthopaedic implant related metal toxicity in terms of human lymphocyte reactivity to metal-protein complexes produced from cobalt-base and titanium base implant alloy degradation. *Mol Cell Biochem.* 2001; 222(1-2):127-136.

Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;60(3):420-33.

Hanawa T. Metal ion release from metal implants, *Mater Sci Eng C.* 2004;24(6-8):745-52.

Harkess JW. Arthroplasty. In: Canale ST, (Ed). *Campbell's operative orthopaedics.* 10th ed. St. Louis: Mosby; 2003. p.315-482.

Hasebe T, Hotta A, Kodama H, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Recent advances in diamond like carbon films in the medical and food packing fields. *New Diamond and Frontier Carbon Technology*, Tokyo. 2007;17(6):263-279

Hauert R, Thorwarth K, Thorwarth G. An overview on diamond-like carbon coatings in medical applications. *Surf Coat Tech.* 2013; 233:119–30.

Hauert R, Thorwartha G, Müllera U, Stiefela M, Faluba CV, Thorwartha K, et al. Analysis of the in-vivo failure of the adhesive interlayer for a DLC coated articulating metatarsophalangeal joint. *Diam Relat Mater.* 2012;25:34–39.

Hauert R.,Thorwarth G, Falub CV, Müller U, Weisse B, Voisard C, et al. Tribological behavior of DLC-coated articulating joint implants. *Acta Biomater.* 2010a;6(6):2335-41.

Heinemann G, Fichtl B., Vogt W. Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of vanadium containing albumin solution. *Br Clin Pharmacol.* 2003;55(3):241-5.

Holmberg K, Ronkainen H, Matthews A. Tribology of thin coatings. *Ceram Int.* 2000; 26(7):787-95.

Hussain S, Pal AK. Synthesis of composite films of mixed Ag–Cunanocrystallites embedded in DLC matrix and associated surfaceplasmon properties. *Appl Surf Sci.* 2007;253: 3649-57.

Hussain S, Roy RK, Pal AK. Incorporation of silver nanoparticles inDLC matrix and surface plasmon resonance effect. *Mater Chem Phys.* 2006;99(2-3):375-81.

Iezzi G, Piattelli A, Mangano C, Shibli JA, Vantaggiato G, Frosecchi M, et al. Peri-implant bone tissues around retrieved human implants after time periods longer than 5 years: a retrospective histologic and histomorphometric evaluation of 8 cases. 2014 Jan;102(1):116-21.

Ishihara M, Kosaka T, Nakamura T, Tsugawa K. Hasegawa M, Kokai F, et al. Antibacterial activity of fluorine incorporated DLC films. *Diam Relat Mater.* 2006;15(4-8):1011-14.

Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM. Corrosion of metallic implants. In Stauffer RM et al, eds. *Advances in total joint arthroplasty*. St. Louis: Mosby; 1994. p.279–319.

Jacobs JJ, Skipor AK, Doorn PF, Campbell P, Schmalzried TP, Black J, Amstutz HC. Cobalt and chromium concentrations in patients with metal on metal total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(329 Suppl):S256–63.

Joska L, Fojt J, Cvrcek L, Brezina V. Properties of titanium-alloyed DLC layers for medical applications. *Biomater*. 2014;4. pii: e29505. doi: 10.4161/biom.29505

Kanatas AN, Needs C, Smith AB, Moran A, Jenkins G, Worrall SF. Short-term outcomes using the Christensen patient-specific temporomandibular joint implant system: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012;50(2):149–53.

Karrholm J, Herberts P, Hultmark P, Malchau H, Nivbrant B, Thanner J. Radiostereometry of hip prostheses. Review of methodology and clinical results. *Clin Orthop Relat Res*. 1997;(344):94–110.

Kilgus DJ, Dorey FJ, Finerman GA, Amstutz HC. Patient activity, sports participation, and impact loading on the durability of cemented total hip replacements. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991;(269):25-31.

Kothari FS, Baad-Hansen L, Andersen K, Svensson P. Neurosensory assessment in patients with total reconstruction of the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(9):1096–103.

Krecisz B, Kieć-Świerczyńska M, Chomiczewska-Skóra D. Allergy to orthopedic metal implants – prospective study. *Int Occup Med Environ Health*. 2012;25(4):463–9.

Kwok SCH, Zhang W, Wan GJ, McKenzie DR, Bilek MMM, Chu PK. Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diam Relat Mater*. 2007;16:1353-60.

Landolt D. Corrosion and surface chemistry of metals. Lausanne, Switzerland: EFPL; 2007.

Lappalainen R, Anttila A, Heinonen H. Diamond coated total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res*. 1998a;(352):118–27.

Lappalainen R, Heinonen H, Anttila A, Santavirta S. Some relevant issues related to the use of amorphous diamond coatings for medical applications. *Diam Relat Mater*. 1998b;7(2–5): 482-5.

Latysh V, Krallics G, Alexandro Vi, Fodor A. Application of Bulk Nanostructured Materials in Medicine. *Current Applied Physics*. 2006;6(2):262-6.

Lau, SP, Li YJ, Tay BK, Sun Z, Chen GY, Chen JS, Ding XZ. Field emission from metal-containing amorphous carbon composite films. *Diamond and Related Materials*. 2001;10(9-10):1727-31.

Li Q, Xia YY, Tang JC, Wang RY, Bei CY, Zeng Y. In vitro and in vivo biocompatibility investigation of diamond-like carbon coated nickel-titanium shape memory alloy. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2011 Jun;39(3):137-42.

Linder L, Carlsson A, Marsal L, Bjursten LM, Brånemark PI. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70(4):550–5.

Liu F, Tang C, Wang Z, Sui C, Ma H. A new dielectric ta-C film coating of Ag-nanoparticle hybrids to enhance TiO₂ photocatalysis. *Nanotechnology*. 2014;25(12):125703

Love CA, Cook RB, Harvey TJ, Dearnley PA, Wood RJK. Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants—a review. *Tribol Inter*. 2013;63: 141-50.

Lu L, Jones MW, Wu RL. Diamond-like carbon as biological compatible material for cell culture and medical application. *Biomed Mater Eng*. 1993;3(4):223-8.

Machon V, Hirjak D, Beno M, Foltan R. Total alloplastic temporomandibular joint replacement: the Czech-Slovak initial experience. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(4):514–7.

Maeztu MA, Braceras I, Alava JI, Sánchez-Garcés MA, Gay-Escoda C. Histomorphometric study of ion implantation and diamond-like carbon as dental implant surface treatments in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(2):273-9.

Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films. *Appl Surf Sci*. 2009;255(20):8377-82.

Marino CEB, Oliveira EM, Rocha-Filho RC, Biaggio SR. On the stability of thin-anodic-oxide films of titanium in acid phosphoric media. *Corrosion science*. 2001;43(8):1465–76.

Mercuri LG, Anspach WE 3rd. Principles for the revision of total alloplastic TMJ prostheses. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Aug;32(4):353-9.

Mercuri LG, Wolford LM, Sanders B, White RD, Hurder A, Henderson W. Custom CAD/CAM total temporomandibular joint reconstruction system: preliminary multicenter report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(2):106–15.

Mercuri LG. TMJ Concepts patient fitted total temporomandibular joint reconstruction prosthesis. *Oral Maxillofac Clin North Am*. 2000;12(1):73–91.

Mercuri LG. Total joint reconstruction-autologous or alloplastic. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2006 Aug;18(3):399-410, vii.

Merritt K, Brown SA. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin Orthop Relat Res* 1996;(329 Suppl):S233–43.

Meyer U, Bühner M, Büchter A, Kruse-Löster B, Stamm T, Wiesmann HP. Fast element mapping of titanium wear around implants of different surface structures. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(2):206-11.

Morais LS, Serra GG, Muller CA, Palermo EFA, Andrade LR, et al. Liberação in vivo de íons metálicos por mini-implantes ortodônticos de Ti-6Al-4V. *Matéria (Rio J)*. 2007;12(2):290-7.

Narayan RJ, Abernathy H, Riester L, Berry CJ, Brigmon R. Antimicrobial properties of diamond-like carbon- silver-platinum nanocomposite thin films. *Journal of Mater Eng Perform.* 2005;14(4):435-40

Okasaki Y. Effect of head size on wear properties of metal-on-metal bearings of hip prostheses and comparison with wear properties of metal-on-polyethylene bearings using hip simulator. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;31:152-63.

Oréfica RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomaterias Fundamentos & Aplicações.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. 537 p.

Papo MJ, Catledge SA, Vohra YK, Machado C. Mechanical wear behavior of nanocrystalline and multilayer diamond coatings on temporomandibular joint implants. *J Mater Sci Mater Med.* 2004 Jul;15(7):773-7.

PoliakovVP, SiqueiraCJ, Veiga W, Hümmengen IA, Lepienski CM, Kirpilenko GG. Physical and tribological properties of hard amorphous DLC films deposited on different substrates. *Diam Relat Mater.* 2004;13(4-8):1511-5.

Quinn P. Alloplastic reconstruction of the temporomandibular joint. IN Fonseca RJ. *Oral and maxilofacial surgery. Temporomandibular disorders,* Philadelphia: WB Saunders Company; 2000. Cap 17. p. 316-32.

Rack H, Qazi J. Titanium alloys for biomedical applications. *Mater Sci Eng C.*2006;26(8):1269-77.

Radi PA. *Triboquímica analítica: estudo da dependência dos parâmetros tribológicos com a modificação superficial em filmes à base de carbono [tese].* São José dos Campos (SP): INPE-Instituto Nacional de Pesquisa espacial; 2012.

Rasia, LA. *Estudo e aplicação da propriedades elétricas, térmicas e mecânicas de materiais amorfos piezo resistivos em transdutores de pressão [tese].* São Paulo (SP): Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; 2009.

Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R*. 2002;37(4-6):129–281.

Roy JS, Macdermid JC, Faber KJ, Drosdowech DS, Athwal GS. The simple shoulder test is responsive in assessing change following shoulder arthroplasty. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2010 Jul;40(7):413-21.

Roy ME, Whiteside LA, Xu J, Katerberg BJ. Diamond-like carbon coatings enhance the hardness and resilience of bearing surfaces for use in joint arthroplasty. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1619-24.

Saldaña L, Barranco V, García-Alonso MC, Vallés G, Escudero ML, Munuera L, Vilaboa N. Concentration-dependent effects of titanium and aluminium ions released from thermally oxidized Ti6Al4V alloy on human osteoblasts. *Biomed Mater Res A*. 2006;77(2):220-9.

Schimid G. Large clusters and colloids. Metals in the embryonic state. *Chem Rev*. 1992;92(8):1709-27.

Schliephake H, Schmelzeisen R, Maschek H, Haese M. Long-term results of the use of silicone sheets after discectomy in the temporomandibular joint: clinical, radiographic and histopathologic findings. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999 Oct;28(5):323-9.

Sedarat C, Harmand MF, Naji A, Nowzari H, ~~In~~ *In Vitro* Kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. *Periodont Res*. 2001;36(5):269:74.

Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E et al Titanium allergy in dental implant patients. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(8):823–35.

Tamulevičius T, Tamulevičienė A, Virganavičius D, Vasiliauskas A, Kopustinskas V, Meškinis Š, et al. Structuring of DLC:Ag nanocomposite thin films employing plasma chemical etching and ion sputtering. *Nucl Instrum Meth B*. 2014;341:1-6.

Thomson A, Law F, Rushton N, Franks J. Biomcompatibility of diamond-like carbon coating. *Biomaterials*. 1991;12(1):37-40.

Throckmorton GS. Temporomandibular joint biomechanics. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2000;12(1):27–42.

Thyssen JP, Menne T. Metal allergy a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(2):309-18.

Tian YS, Chen CZ, Li ST, Huo QH. Research progress on laser surface modification of titanium alloys. *Appl Surf Sci.* 2005;242(1-2):177-84.

Trava-airoldi VJ, Santos LV, Bonetti LF, Capote G, Radi PA, Corat EJ. Tribological and mechanical properties of DLC film obtained on metal surface by enhanced and low-cost pulsed DC discharge. *Int Surf Sci Eng.* 2007 Dec;1(4):417-27.

Turvey TA Bell RB, Tejera TJ, Proffit WR. The use of self-reinforced biodegradable bone plates and screws in orthognatic surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(1):59-6.

Vijayaraghavan V, Sabane AV, Tejas K.. Hypersensitivity to titanium: a less explored area of research. *J Indian Prosthodont Soc.* Dec 2012;12(4):201–7.

Williams DF. *Definitions in biomateriais.* New York, NY.: Elsevier; 1987.

Wolford LM, Mercuri LG, Schneiderman ED, Movahed R, Allen W. Twenty-year follow-up study on a patient-fitted temporo-mandibular joint prosthesis: the techmedica/TMJ concepts device. *Oral Maxillofac Surg* [in press]. 2015.[cited 2014 Nov. 01]:[9p]. available from: doi:10.1016/j.joms.2014.10.032.

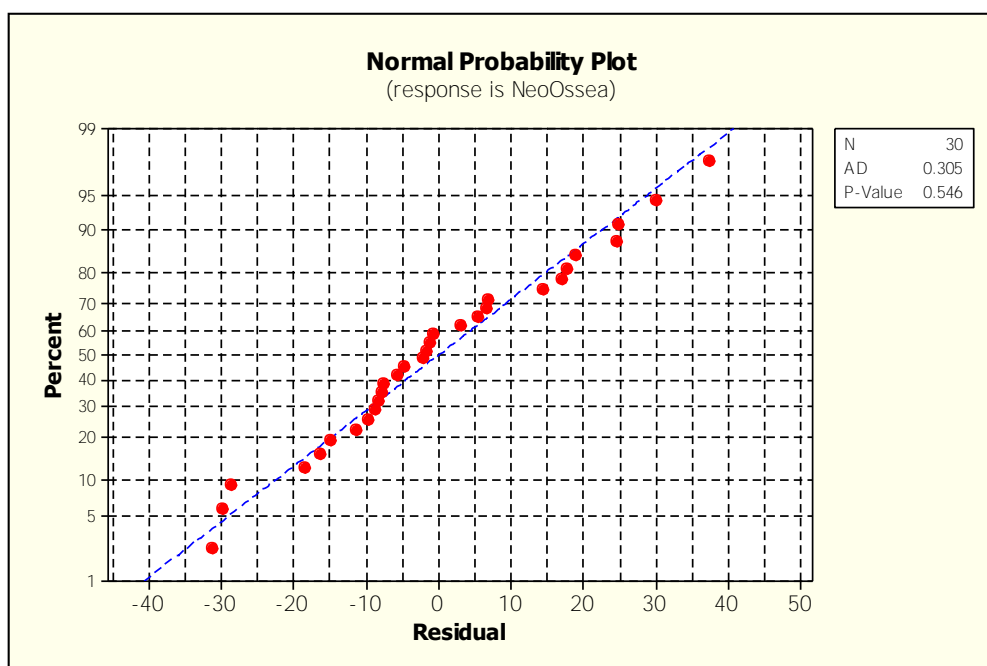
Wolford LM. Factors to consider in joint prosthesis systems. *Proc (Bay Univ Med Cent).* 2006 Jul;19(3):232-8.

Wolford LM, Rodrigues DB, McPhillips A. Management of the infected temporomandibular joint total joint prosthesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Nov;68(11):2810-23.

Yang W, Hsiung H. Improving the biocompatibility of titanium surface through formation of a TiO₂ nano - mesh layer. *Thin Solid Films*. 2010;518(24):7545–50.

Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1991;11(2):88–91.

APÊNDICE A – Teste de Anderson Darling demonstrando a normalidade da amostra



P valor = 0,546 > 0,05.

Figura 31 – Gráfico mostrando probabilidade normal da amostra em relação a neoformação óssea.

APÊNDICE B – Dados obtidos para análise da porcentagem de neoformação óssea

Tabela 7 – Resultados obtidos na análise histomorfométrica da interface osso-amostra dos grupos em relação aos períodos analisados

Período (dias)	Animal	Tipo de amostra	Área total da interface osso-amostra (μm)	Área total de neoformação óssea (μm)	Porcentagem de neoformação óssea (%)
15	C1	TiAIV	2044016	273350	13.3732
15	C2	TiAIV	2950119	474957	16.0996
15	C3	TiAIV	3000136	386799	12.8927
15	C4	TiAIV	3696098	249370	6.7468
15	C5	TiAIV	823541	487455	59.1902
15	C11	DLC	981094	404440	41.2234
15	C12	DLC	2911041	1070766	36.7829
15	C13	DLC	1497578	89565	5.9806
15	C14	DLC	364443	46166	12.6676
15	C15	DLC	3495124	507785	14.5284
15	C21	DLC-Ag	2793852	404585	14.4813
15	C22	DLC-Ag	2409351	342167	14.2016
15	C23	DLC-Ag	3527253	545452	15.4639
15	C24	DLC-Ag	3881813	585768	15.0901
15	C25	DLC-Ag	2980208	643777	21.6017
90	C6	TiAIV	707429	467862	66.1356
90	C7	TiAIV	1862504	379883	20.3963
90	C8	TiAIV	1885119	1488563	78.9639
90	C9	TiAIV	1647371	683993	41.5203
90	C10	TiAIV	968181	364656	37.6641
90	C16	DLC	2562491	2415915	94.2800
90	C17	DLC	3093690	2251809	72.7871
90	C18	DLC	2923643	1163217	39.7866
90	C19	DLC	2782564	1805545	64.8878
90	C20	DLC	2663824	2037879	76.5020
90	C26	DLC-Ag	1252144	271096	21.6505
90	C27	DLC-Ag	861020	668732	77.6674
90	C28	DLC-Ag	2004340	691086	34.4795
90	C29	DLC-Ag	1638585	974149	59.4506
90	C30	DLC-Ag	2369730	1673421	70.6165

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / tangos@fotsc.unesp.br



CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **03/2013-PA/CEP**, sobre “Efeito do filme de carbono aplicado por plasma como recobrimento do titânio para utilização em prótese totais da ATM”, sob a responsabilidade da Profa. Titular **YASMIN RODARTE CARVALHO**, tendo como orientada a aluna **MILAGROS DEL VALLE EL ABRAS ANKHA** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – **CONCEA** e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 04 de junho de 2013.



Prof.Assist.Dr. RÚBENS NISIE TANGO
Coordenador

Serão utilizados 38 coelhos – Nova Zelândia