



**UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**



**HALINE DE LIMA CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE DA LIGA  
Ti-35Nb-7Zr-5Ta SUBMETIDA À ANODIZAÇÃO E SEUS  
EFEITOS NA ADESÃO BACTERIANA**

**Araraquara**

**2014**



UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



HALINE DE LIMA CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE DA LIGA  
Ti-35Nb-7Zr-5Ta SUBMETIDA À ANODIZAÇÃO E SEUS  
EFEITOS NA ADESÃO BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

Co-orientadora: Profa. Dra. Laiza Maria Grassi Fais

**Araraquara**

**2014**

Carneiro, Haline de Lima

Avaliação de propriedades de superfície da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta submetida à anodização e seus efeitos na adesão bacteriana / Haline de Lima Carneiro - Araraquara: [s.n.], 2014.

141 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

1. Interações hidrofóbicas e hidrofílicas 2. Propriedades de superfície 3. Streptococcus mutans 4. Titânio 5. Topografia I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Disleide Silvia Valério Gounella CRB-8/5629

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

HALINE DE LIMA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE DA LIGA  
Ti-35Nb-7Zr-5Ta SUBMETIDA À ANODIZAÇÃO E SEUS EFEITOS NA  
ADESÃO BACTERIANA

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

2º examinador: Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho

3º examinador: Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão

Araraquara, 19 de março de 2014.

## DADOS CURRICULARES

### **HALINE DE LIMA CARNEIRO**

NASCIMENTO	15 de Abril de 1989 – São Roque SP
FILIAÇÃO	Antonio Aparecido Carneiro Jane Garcia de Lima Carneiro
2007/2011	Curso de Graduação, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2012/ 2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia, Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr Universidade Estadual Paulista UNESP

# Dedicatória

A **Deus** por me oferecer a oportunidade de concretizar mais uma etapa.

“Mude suas opiniões, mantenha seus princípios. Troque suas folhas, mantenha suas raízes.”

**Victor Hugo**

Aos meus pais, **Antônio e Jane** que sempre me apoiaram. Obrigada pelo carinho e dedicação de vocês em propiciarem várias oportunidades em minha vida. Obrigada por estarem ao meu lado em TODOS os momentos. Eu não seria absolutamente nada sem vocês ao meu lado.

A minha irmã **Veridiana**, obrigada pelo convívio e pelos momentos de descontração, conselhos dados e apoio incondicional.

Ao meu namorado **Fabício**, pelo companheirismo e dedicação em todos os momentos da minha vida.

# Agradecimentos Especiais

Ao meu Orientador, Prof. Dr. **Luís Geraldo Vaz**, pela confiança depositada em mim. E por todos os ensinamentos como professor, orientador, e ser humano. Pela minha formação e participação no amadurecimento de meus conhecimentos. Obrigada por fazer parte de seu convívio.

A minha Co-Orientadora, Profa. Dra. **Laiza Maria Grassi Fais**, pela atenção e disponibilidade dispensada desde o início deste trabalho. Por tamanha paciência e dedicação ao me ajudar, ensinar e me acalmar. É muito bom poder contar com você profissionalmente e pessoalmente. Obrigada.

À Profa. Dra. **Ana Lúcia Roselino Ribeiro**, pelos ensinamentos base e parceria para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Luís Augusto Sousa Marques da Rocha**, por me inserir nesta linha de pesquisa e me dar suporte para realização da mesma.

À **Elaine Cristina Voltolini Pontes**. Muito obrigada pelo carinho, apoio e confiança depositada.

À Profa. Dra. **Denise Madalena Palomari Spolidório**, pelo aprendizado e suporte fornecido durante a execução dos testes microbiológicos.

À Profa. Dra. **Ligia Antunes Pereira Pinelli** por todos os ensinamentos proporcionados e pelo apoio.



# Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra **Andréia Affonso Barretto Montandon** e da Vice-Diretora, Profa. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Carlos Rossa Júnior**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa Odontologia, Área de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

A **CAPES** e à **FAPESP**, pelo auxílio financeiro que propiciaram o bom andamento desta pesquisa.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Júnior**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Profa. Dra. **Daniela Leal Zandim-Barcellos** que colaboraram com a minha formação e em especial a Profa. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico** pela orientação no estágio de docência.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, representado pelo Prof. Dr. **Francisco de Assis Mollo Junior**.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Fabiana, Lígia, Sâmara, Paulinha, Jack, Vinícius Paiva, Cássio, Suzane** pelo companheirismo e inúmeros momentos de descontração.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Regina Lúcia, Claudinha, Ester e Leandro**, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, José Alexandre e Cristiano**, pela gentileza, paciência e competência com que sempre me receberam.

Aos funcionários da Biblioteca, **Marley, Eliane, Odete, Adriano, Maria Inês, Sílvia Helena e Ceres**, pela disposição de sempre.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Carneiro HL. Avaliação de propriedades de superfície da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta submetida à anodização e seus efeitos na adesão bacteriana. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## RESUMO

Este estudo comparou as propriedades de superfície e a adesão *Streptococcus mutans* na liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta e no titânio comercialmente puro (Ti cp) antes e após a anodização. Foram utilizados discos ( $\varnothing 8\text{mm} \times 2\text{mm}$ ; N = 40) divididos em 2 grupos: T (Ti cp), TNZT (Ti-35Nb-7Zr-5Ta), e subdivididos conforme a realização ( $A^+$ ) ou não ( $A^-$ , controle) da anodização eletroquímica (300 V, 1 min) em  $\beta$ -glicerofostato de sódio + acetato de cálcio. As propriedades avaliadas foram: topografia de superfície e identificação qualitativa dos elementos químicos (microscópio eletrônico de varredura-MEV/EDS), energia livre de superfície (ELS, mensurada em goniômetro) e rugosidade média ( $R_a$ , determinada em rugosímetro). Para avaliação da adesão bacteriana, os discos foram contaminados com *Streptococcus mutans* (NTCC 25175) para determinação de UFC/mL e do padrão de adesão (MEV). Os valores de  $R_a$  e ELS de cada grupo foram comparados ( $A^-$  vs.  $A^+$ ) por meio do teste Kruskal-Wallis associado ao teste de Dun ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores de  $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ) e ELS (mN/m), respectivamente, foram:  $A^-$  - T=0,97/44,24; TNZT=0,17/36,68;  $A^+$  - T=1,21/56,88; TNZT=0,53/53,64, com aumento significativo de ambas propriedades ( $p < 0,05$ ) após a anodização. A análise em MEV/EDS indicou a formação de uma camada multiporosa, com deposição de íons Ca e P nos subgrupos  $A^+$ . Após a anodização houve

aumento na adesão do patógeno apenas na liga TNZT. Conclui-se que a anodização do Ti cp e da liga TNZT alteram as propriedades de superfície com potencial para melhorias na osseointegração, contudo há aumento na adesão de *S. mutans* na liga TNZT.

**Palavras-chave:** interações hidrofóbicas e hidrofílicas, propriedades de superfície, *Streptococcus mutans*, titânio, topografia.

Carneiro HL. Evaluation of the surface properties of the Ti-35Nb-7Zr-5Ta subjected to anodization and their effects on bacterial adhesion. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare the surface properties and the adhesion of *Streptococcus mutans* on Ti-35Nb-7Zr-5Ta and commercially pure titanium (cp Ti) before and after the anodization. Discs ( $\varnothing 8\text{mm} \times 2\text{mm}$ , N=40) were divided into 2 groups: T (cp Ti), TNZT (Ti-35Nb-7Zr-5Ta), and subdivided in untreated ( $A^-$ , control) or anodic treated ( $A^+$ ) in  $\beta$ -glycerofostato + calcium acetate (300 V, 1min). The evaluated surface properties were: surface topography and qualitative identification of chemical elements (in scanning electron microscope -SEM/EDS), surface free energy (SFE, measured with a goniometer), and the average roughness ( $R_a$ -determined in profimoleter). The discs were contaminated with *Streptococcus mutans* (NTCC 25175) for determination of CFU/mL; the surfaces with adhered viable cell were also analyzed with SEM. The values of  $R_a$  and ELS were compared ( $A^-$  vs .  $A^+$ ) by means of Kruskal-Wallis associated Dun test ( $\alpha=0.05$ ). The median  $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ) and ELS (mN/m), respectively, were:  $A^-$  T=0.97/44.24; TNZT=0.17/36.68;  $A^+$  T=1.21/56.88; TNZT=0.53/ 53.64. All groups showed significantly higher values of  $R_a$  and ELS ( $p < 0.05$ ) after anodizing. The analysis in SEM/EDS indicated the formation of a multiporous layer with deposition of Ca and P ions. Only anodic treated TNZT exhibited an increase in adhesion of *S. mutans*. It was concluded that the anodic treatment

of Ti cp and TNZT change the surface properties with potential improvements for osseointegration, despite the increase in the adhesion of *S. mutans* on TNZT.

**Key-words:** hydrophobic and hydrophilic interactions, surface properties, *Streptococcus mutans*, titanium, topography.

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	18
<b>2 Revisão de Literatura</b> .....	23
<b>2.1 Tratamentos de superfície do titânio e ligas a base de titânio e propriedades de superfície dos materiais odontológicos</b> .....	23
<b>2.2 Adesão Bacteriana em superfícies de titânio</b> .....	54
<b>3 Proposição</b> .....	68
<b>4 Material e Método</b> .....	69
<b>4.1 Obtenção das amostras</b> .....	69
<b>4.2 Preparo das amostras</b> .....	73
<b>4.3 Tratamento de superfície</b> .....	74
<b>4.4 Propriedades de Superfície</b> .....	77
<i>4.4.1 Topografia de superfície e composição química</i> .....	77
<i>4.4.2 Energia livre de superfície (ELS)</i> .....	77
<i>4.4.3 Medida da rugosidade média (Ra)</i> .....	79
<b>4.5 Avaliação da adesão bacteriana</b> .....	79
<i>4.5.1 Esterilização dos corpos-de-prova</i> .....	79
<i>4.5.2 Preparo dos meios de cultura</i> .....	79
<i>4.5.3 Preparo do patógeno</i> .....	80
<i>4.5.4 Contaminação das amostras</i> .....	81
<i>4.5.5 Diluição seriada e plaqueamento</i> .....	82
<i>4.5.6 Contagem de unidades formadoras de colônias</i> .....	83
<i>4.5.7 Análise em microscopia eletrônica de varredura</i> .....	83
<b>4.6 Estatística</b> .....	84
<b>5 Resultado</b> .....	85
<b>5.1 Análise das propriedades de superfície</b> .....	85
<i>5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	85
<i>5.1.2 Análise química (EDS)</i> .....	86



<b>5.1.3 Energia Livre de superfície (ELS)</b> .....	91
<b>5.1.4 Rugosidade média (Ra)</b> .....	93
<b>5.2 Análise da adesão bacteriana</b> .....	94
<b>6 Discussão</b> .....	97
<b>7 Conclusão</b> .....	110
<b>8 Referências</b> .....	111
<b>Anexos</b> .....	123

# 1 Introdução

Os implantes de titânio osseointegráveis são amplamente utilizados na Odontologia com o intuito de substituir perdas dentárias, sejam múltiplas ou unitárias<sup>3</sup>. Dentre os materiais empregados para a confecção destes dispositivos estão o titânio comercialmente puro (Ti cp) e a liga Ti-6Al-4V que destacam-se por possuírem adequadas propriedades físicas, químicas, e mecânicas.

A alta reatividade do titânio com o oxigênio permite a formação de inúmeros óxidos na superfície do metal, principalmente o  $TiO_2$ , de forma a criar uma camada de passivação<sup>14</sup>, densa e estável que possibilita elevada resistência à corrosão e boa biocompatibilidade ao material<sup>62</sup>. Enquanto o Ti cp destaca-se por possuir elevada resistência à corrosão e biocompatibilidade<sup>37,41,43</sup>, a liga Ti-6Al-4V apresenta melhores propriedades biomecânicas, em particular maior resistência mecânica e maior módulo de elasticidade quando comparado ao Ti cp, propiciando portanto, alta resistência à fratura<sup>43, 83</sup>.

No entanto, após a implantação de materiais metálicos como a liga Ti-6Al-4V no corpo humano, no qual trata de um meio salino que é bastante corrosivo<sup>67</sup>, esta pode vir a sofrer um processo de dissolução eletroquímica que desencadeia a desestabilização da camada de óxido, e conseqüentemente, a liberação de íons metálicos, como o vanádio e o alumínio<sup>52</sup>. Tal liberação tem sido fonte de preocupação devido à possibilidade de causar efeitos sistêmicos potencialmente prejudiciais e cancerígenos<sup>67</sup>. O

vanádio tem uma alta citotoxicidade, e o acúmulo de alumínio no organismo está relacionado a distúrbios neurológicos, mudanças de personalidade, problemas motores e mal de Alzheimer<sup>52</sup>.

Dessa forma, vários estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de novas ligas metálicas, nas quais os íons alumínio e vanádio possam ser substituídos por outros elementos como, por exemplo, o zircônio (Zr), tântalo (Ta), e nióbio (Nb). O Nb, em menor escala, e o Ta atuam como estabilizadores da fase  $\beta$  para formar uma solução sólida homogênea e, portanto, melhoram as propriedades mecânicas das ligas por apresentarem uma elevada dureza. Por outro lado, o Zr atua como um elemento neutro para formar uma solução sólida homogênea nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ . Além disso, Nb e Ta levam a uma redução no módulo de elasticidade quando associados ao Ti cp<sup>22, 68,86</sup>.

Paralelamente ao desenvolvimento destas novas ligas, diversas técnicas vêm sendo investigadas com o intuito de propiciar um aprimoramento das propriedades de superfície dos implantes, melhorando a osseointegração e o sucesso da reabilitação por meio de implantes. Apesar do alto índice de sucesso dos implantes, podem ocorrer falhas devido a diversos fatores, que culminam no fracasso do tratamento<sup>70</sup>. As perdas dos implantes podem ser divididas em precoces, quando ocorrem ainda durante o período de osseointegração, ou em tardias, causadas principalmente por sobrecargas oclusais e/ou doença perimplantar (peri-implantite)<sup>55, 70</sup>.

Para evitar as perdas de implantes e melhorar as propriedades do titânio em relação a sua compatibilidade com os tecidos,

vários métodos de tratamento de superfície já foram desenvolvidos. Dentre eles pode-se citar o recobrimento com hidroxiapatita por spray de plasma, o jateamento abrasivo com partículas de óxidos associado ou não com o ataque de ácidos, o tratamento alcalino seguido de tratamento térmico, e a oxidação anódica<sup>44</sup>.

O método de recobrimento com hidroxiapatita por spray de plasma<sup>7,73</sup> promove uma rápida e íntima osseointegração, porém possui a desvantagem de estar sujeito a um colapso na interface entre a hidroxiapatita e o metal como resultado da fraca união entre o pó cerâmico e o metal, conseqüentemente aumentando a liberação de íons no organismo, o que se torna prejudicial. Outro método é o jateamento abrasivo com partículas de óxidos, principalmente  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ , ou  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Este tratamento produz uma deformação plástica severa e aumenta a rugosidade da superfície, dependendo do tamanho, forma e energia cinética das partículas que atingem a superfície. Este método leva a uma diminuição acentuada da resistência à fadiga pela presença de microfissuras na superfície e concentração de tensões pronunciadas ao redor, devido às partículas que ficam embutidas na superfície<sup>54</sup>. No tratamento alcalino seguido de tratamento térmico as amostras de Ti são imersas em solução aquosa de NaOH ou KOH, com concentrações de 5 a 10 mols/L a 60°C durante 24 horas, e após este período são submetidas a tratamento térmico com temperaturas entre 600 e 800°C por 1 hora<sup>42</sup>. Há então a formação de uma camada superficial porosa sobre o titânio constituída por um filme amorfo de gel de titanato de sódio, no entanto, o filme de gel formado durante o tratamento alcalino é frágil podendo se desprender do substrato.

E por último, tem-se o método de anodização, o qual tem atraído atenções devido à simplicidade e reprodutibilidade da técnica<sup>19</sup>. A oxidação anódica ou anodização é um método que visa desencadear descargas a uma tensão eletrolítica elevada para formar superfícies ásperas e porosas de óxido, sendo que estas podem ser controladas pelo tempo de anodização e potencial aplicado<sup>47</sup>. Uma vantagem desse processo é a possibilidade de incorporar íons, como cálcio (Ca), fósforo (P) na superfície do titânio<sup>47, 73</sup>. O aumento da camada de óxido do titânio aumenta também a rugosidade de superfície dos implantes, que é um fator importante no processo de adesão e diferenciação celular, melhorando, portanto a resposta do tecido ósseo e a ancoragem do implante<sup>35, 45, 50</sup>.

Em uma pesquisa in vivo, realizada em ratos, Omar et al.<sup>57</sup> (2010) demonstraram que a incorporação de íons cálcio decorrente da técnica de anodização da superfície do titânio pode aumentar a fixação do implante, com indícios de alterações no recrutamento de células mesenquimais e expressão de genes, como por exemplo, fosfatase alcalina e osteocalcina, envolvidos na remodelação óssea. Os íons cálcio utilizados para as modificações de superfície de implantes, têm sido associados à promoção de adesão de osteoblasto in vitro<sup>24</sup> e osseointegração em modelos in vivo<sup>27</sup>.

Se por um lado estudos identificaram a importância da incorporação de íons nas superfícies dos metais ou ligas para melhor integração entre implante, osso e tecido mole, a superfície do implante não deve propiciar desenvolvimento de biofilmes microbianos patogênicos<sup>28</sup>. A associação entre tratamento de superfície com anodização e incorporação de íons cálcio e fósforo, ainda gera algumas dúvidas em relação à adesão

bacteriana, sendo, portanto, um tema atual e interessante a ser discutido. Dentre os microrganismos colonizadores do biofilme dental o *Streptococcus mutans*, um dos agentes etiológicos da cárie dental, facilita a colonização de microrganismos anaeróbios, como aqueles presentes na peri-implantite, sendo um dos microrganismos mais utilizado em testes para verificação da adesão bacteriana<sup>25</sup>.

Caous et al.<sup>15</sup>, (2013) avaliaram a adesão de microrganismos em superfícies de titânio usinado e anodizado com incorporação de íons cálcio, após incubação em co-cultura de *Streptococcus mitis* e *Actinomyces oris*, e variando os valores de pH. As condições de incubação utilizadas para a adesão das bactérias foram meio BHI suplementado com pH variando de 5,0 a 7,0. Os resultados demonstraram que em pH 5,0 houve diminuição significativa da adesão de *S. mitis*, sendo este patógeno encontrado em menor quantidade na superfície anodizada em comparação à superfície maquinada. O *A. Oris* teve adesão similar em ambas superfícies. Os autores concluíram que a superfície anodizada teve capacidade de diminuir adesão de *S. mitis* quando comparada a usinada, destacando a necessidade de mais pesquisas na área.

Dessa forma, julga-se oportuno avaliar as propriedades de superfície do Ti cp e de ligas a base de titânio, como a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, comparando-as após tratamento por meio de anodização com incorporação de íons Ca e P, e também avaliar os efeitos na adesão de *S. mutans*

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Tratamentos de superfície do titânio e ligas a base de titânio e propriedades de superfície dos materiais odontológicos**

Owens, Wendt<sup>58</sup>, em 1969, desenvolveram um método para medir a energia livre de superfície dos sólidos. Este método denominado como método de Owens e Wendt, foi realizado por meio de mensurações dos ângulos de contato (por meio do método da gota séssil) utilizando-se água e iodeto de metileno. Apesar de ser considerado um método trabalhoso a precisão obtida com este método é grande, de forma que foi evidenciado um valor finito para tensão interfacial entre sólido-líquido para ângulo de contato zero. Os autores concluíram que é um método aplicável para caracterizar a superfície de polímeros.

Busscher et al.<sup>12</sup> (1984) avaliaram a correlação entre os valores de ângulos de contato e a rugosidade de superfície em doze polímeros utilizando o método da gota séssil e cinco diferentes líquidos. Os resultados indicaram que superfícies inicialmente lisas ( $R_a < 0,1\mu\text{m}$ ) com ângulos de contato entre  $60^\circ$  e  $86^\circ$ , não exibem aumento nos valores de ângulo de contato caso a rugosidade aumente. Por outro lado, superfícies mais rugosas tendem a exibir aumento nos valores de ângulo de contato. Assim, os autores atestam haver uma grande semelhança na tendência prevista pela equação inicial de

Wenzel, que descreve a influência da rugosidade de superfície e de ângulos de contato, embora o parâmetro Ra não seja idêntico ao parâmetro r-teórico da equação de Wenzel.

Ishizawa, Ogino<sup>32</sup> (1995) caracterizaram os filmes de óxido formados na superfície do titânio por meio de anodização com eletrólitos de  $\beta$ -glicerofosfato e acetato de cálcio. Após o tratamento de superfície, as amostras foram caracterizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), energia dispersiva de raios-X (EDS) e difração de raios-X (DRX). Os resultados das micrografias demonstraram a formação de microporos e microprojeções. A análise por DRX não detectou nenhum pico de fosfato de cálcio, mas a incorporação de íons Ca e P (também verificada em EDS) em razão equivalente à hidroxiapatita (HA), além da presença de cristais de rutilo e anatase. Por meio dos achados, os autores concluíram que a anodização de superfícies de titânio em  $\beta$ -glicerofosfato e acetato de cálcio possibilita a incorporação de íons Ca e P, sendo totalmente válida e possível para os dispositivos de implantes.

Eisenbarth et al.<sup>21</sup>, em 1996, investigaram a influência da microestrutura de superfícies de titânio comercialmente puro, liga Ti-6Al-4V, e Ti-30Ta em relação à adesão e formato de fibroblastos. Após a obtenção das amostras com diferentes rugosidades por meio de molhamento em metilmetacrilato, e polimento, estas tiveram a rugosidade média analisada por meio de um perfilômetro. E em seguida, realizou-se a cultura de fibroblastos gengivais humanos sob as amostras utilizando fibroblastos da quinta e sétima passagem para cultivo. Após dois dias, as células foram fixadas e coradas para análise da adesão por meio de contagem e MEV. Independentemente do tipo



de material, os resultados indicaram maior número de células em virtude do aumento da rugosidade. A quantidade de células aderidas aumentou de 10% em superfície lisa ( $0,04\mu\text{m}$ ) para 60 a 72% em superfície rugosa ( $0,34 - 1,36\mu\text{m}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos com as ligas (Ti-6Al-4V e Ti-30Ta). Após um período maior de cultivo celular (quatorze dias), verificou-se que células cultivadas em Ti cp tinham um fator de formato médio de 1,76, as cultivadas em Ti-30Ta tinham um fator de formato de 1,58, ao passo que os fibroblastos cultivados em Ti-6Al-4V tinham formato de 0,93. Assim, os autores concluíram que superfícies rugosas propiciam maior adesão de fibroblastos e que a forma esférica desfavorável dos fibroblastos cultivados em Ti-6Al-4V após quatorze dias pode ser resultado local do aumento da concentração de íons vanádio, tóxico às células.

Cruz et al.<sup>18</sup>, em 2000, analisaram as propriedades dos filmes de óxido de titânio obtidos por meio da deposição de vapor químico a plasma (PECVD). As amostras de titânio foram submetidas a tratamento de superfície, no qual filmes contendo oxigênio e carbono foram depositados a partir da descarga utilizando plasmas de  $\text{O}_2$  (oxigênio), He (hélio) e Ar (argônio). A descarga foi gerada em uma câmara contendo dois eletrodos de aço inoxidável à vácuo com fonte de alimentação de 13,56MHz. Após os tratamentos, a estrutura dos filmes formados foram avaliadas por meio de espectroscopia de raios-X (XPS), e espectroscopia infravermelha. Os resultados demonstraram que filmes de  $\text{TiO}_2$  amorfo foram depositados em descargas de He e Ar e que a maior taxa de deposição ( $R=14,3\text{nm}/\text{min}$ ) foi obtida na descarga contendo oxigênio a 200V. O XPS detectou  $\text{TiO}_2$  nos espécimes que continham oxigênio e carbono adsorvidos juntos na superfície

do filme. Os autores concluíram que embora fosse possível visualizar no espectro óptico a absorção que ocorreu, os filmes foram obtidos com baixa absorção, e que, as variações da condutividade elétrica sugerem que a voltagem possa ser um parâmetro de controle de deposição bastante útil.

Zhu et al.<sup>87</sup>, em 2001, investigaram as características dos óxidos formados em superfícies de titânio comercialmente puro anodizados em solução de glicerofosfato de cálcio e acetato de cálcio (Ca-GP). Foram avaliadas as características topográficas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a rugosidade média por meio de um perfilômetro, composição química, estrutura e espessura dos óxidos formados por meio de difração de raios-X e MEV. Os resultados demonstraram a formação de superfícies com porosidades (diâmetro de  $2\mu\text{m}$ ), maior rugosidade média ( $0,5$  a  $0,90\mu\text{m}$ ) em relação à rugosidade inicial ( $0,27\mu\text{m}$ ) e elevada cristalinidade. Além disso, os óxidos apresentavam uma elevada espessura com incorporação dos íons cálcio e fósforo. Segundo os autores, as condições ótimas para a presença desses óxidos foram com  $0,02\text{M}$  de Ca-GP, densidade de corrente de  $70\text{ A/cm}^2$  e voltagem de  $350\text{V}$ . Os autores relataram que todas as propriedades dos óxidos formados pela anodização sugerem uma resposta biológica promissora, demonstrando, portanto, a eficiência deste método.

Visando avaliar o efeito da rugosidade de superfície sobre a molhabilidade de superfícies sólidas e porosas, Bico et al.<sup>8</sup> (2002), discutiram as variações de molhabilidade em superfícies com rugosidades designadas. Segundo os autores, a molhabilidade de superfícies texturizadas pode ser determinada pela rugosidade de superfície. Os ângulos de contato aparentes podem ser calculados em cada superfície segundo a equação de Young,

considerando a natureza química dos sólidos e líquidos. Foram descritos os casos de superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, destacando-se a possibilidade de espalhamento do líquido no interior das superfícies porosas em superfícies hidrofílicas.

Pelo fato das propriedades dos filmes de óxido que cobrem superfícies de implantes de titânio serem de importância crucial para a osseointegração bem sucedida, em especial, em locais de osso comprometido, Sul et al.<sup>74</sup> (2002), investigaram as propriedades de superfície de implantes de titânio anodizados, bem como, avaliaram os óxidos nativos presentes nas superfícies de titânio usinados. As amostras de titânio comercialmente puro (Ti cp) foram divididas em cinco grupos: GI – ti cp usinado (controle), GII a GV- Ti cp anodizados em eletrólito de CH<sub>3</sub>COOH com diferentes voltagens, sendo GII - 100V, GIII - 200V, GIV - 280V e GV - 380V. Depois de realizado os tratamentos de superfície, as seguintes propriedades de superfícies foram investigadas: topografia, por meio de microscopia eletrônica de varredura; composição química, por espectroscopia de raios-X; rugosidade de superfície média (Ra), por meio de perfilômetro, e análise da estrutura cristalina e espessura de óxido por meio de difratometria de raios-X. As superfícies anodizadas exibiram superfícies microporosas, com poros de diâmetro aproximado de 8µm e área de abertura entre 1,27 e 2,1µm<sup>2</sup>. A rugosidade de tais superfícies variou entre 0,96 e 1,03µm, havendo estruturas cristalinas do óxido de titânio amorfo, anatase, e uma mistura de rutilo e anatase. O grupo GI apresentou apenas óxido amorfo. As espessuras dos óxidos variaram segundo os grupos experimentais: GI - 17nm, GII - 200nm, GIII - 600nm, GIV - 800nm e GV - 1000nm. Apesar dos resultados obtidos, os autores descreveram que as

características dos óxidos de implantes anodizados e óxidos nativos devem ser analisados em estudos futuros, nos quais as sejam incluídas análises de reações biológicas.

Zhu et al.<sup>88</sup>, em 2002, investigaram a película de óxido formado na superfície do titânio anodizado em eletrólito de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio. Após realização do tratamento por meio da anodização, foram avaliadas a topografia, a rugosidade superficial, e a composição química. Os resultados apontaram superfícies com uma rugosidade intermediária (0,6 a 1,5 $\mu$ m). Além disso, as superfícies apresentavam uma mistura de óxidos amorfos, rutilo e anatase, com topografia multiporosa nas quais haviam poros interconectados com diâmetro entre 1,0 e 2,0 $\mu$ m. Os autores verificaram que o grau de cristalinidade do óxido formado aumentava conforme o aumento da tensão aplicada durante a anodização e com o aumento do cálcio incorporado às superfícies. Entretanto, o aumento na concentração de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio não alterou as propriedades avaliadas. Dessa forma, os autores concluíram que os parâmetros da anodização como tensão e densidade de corrente alteram de forma significativa a rugosidade, cristalinidade e composição dos óxidos formados, sendo a anodização um processo que pode beneficiar a osseointegração.

Com o intuito de aprimorar ligações físico-químicas entre o tecido ósseo e o implante, Keshmiri et al.<sup>36</sup> (2003) estudaram a morfologia dos revestimentos de TiO<sub>2</sub> por introdução de partículas esféricas sub-micrométricas resultantes do processo sol-gel em relação à formação de apatita. Após o revestimento das superfícies de titânio comercialmente puro por meio de duas técnicas citadas (A- tipicamente derivado de gel, partículas submicrométricas

finas, densas, e camadas lisas e (B) partículas mais espessas, camadas porosas formadas por deposição do pó sobre o substrato), a formação da apatita foi induzida pela imersão das amostras em fluido corpóreo simulado. Foram realizadas análises das superfícies por meio de difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios-X para avaliar a formação de apatita das microesferas de anatase comparadas aos filmes finos do processo sol-gel do mesmo óxido. Como resultado, as superfícies com microesferas de anatase depositadas induziram maiores taxas na formação de apatita quando comparadas aos filmes finos derivados do processo sol-gel. Assim, os autores concluíram que a morfologia de superfície das microesferas de  $\text{TiO}_2$  promovem uma rápida formação de apatita in vitro.

Albrektsson, Wenneberg<sup>2</sup>, em 2004, analisaram as propriedades topográficas e químicas de diferentes superfícies de implantes e a reação biológica por meio de testes in vivo. Foram avaliados neste estudo as ligações biomecânicas e bioquímicas dos implantes, e discutidas as mudanças de superfícies e osseointegração dos mesmos. Os resultados demonstraram que a qualidade da superfície dos implantes pode ser subdividida segundo as propriedades mecânica, topográfica e físico-químicas. As propriedades topográficas foram avaliadas com base em análises da rugosidade. As superfícies rugosas após os tratamento ( $R_a$  entre 1,0 e 2,0 $\mu\text{m}$ ) mostraram melhor resposta óssea, com maior contato de área do implante ao tecido ósseo quando comparadas às superfícies lisas (0,4  $\mu\text{m}$ ). Uma averiguação feita pelos autores foi que cada vez mais tem-se aumentado o número de estudos sobre as superfícies bioativas, tais como superfícies com fatores de crescimento presentes, proteínas, e enzimas. Dessa forma, concluiu-se que superfície

mais rugosas parecem ser vantajosas clinicamente, e que, implantes bioativos podem ser promissores.

Barrere et al.<sup>6</sup> (2004) investigaram a nucleação e o crescimento de fosfato de cálcio depositado em implantes após imersão em solução de fluido corpóreo simulado (SBF- água destilada; NaCl, CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O). Quarenta amostras de titânio foram divididas em dois grupos: um grupo com superfície lisa (rugosidade máxima < 0,10µm) e outro superfície rugosa (rugosidade máxima entre 0,10µm e 0,25µm). Em seguida as amostras foram imersas em SBF por períodos entre 10min a 5 h com o objetivo de induzir a formação de depósitos de Ca-P, os quais foram analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). Os resultados demonstraram que de acordo com o aumento do tempo de imersão, houve aumento nos depósitos de fosfato de cálcio cujos diâmetros iniciais eram de aproximadamente 10nm para a formação de glóbulos maiores, recobrando a superfície das amostras de ambos os grupos. A rugosidade das superfícies não afetou o desenvolvimento dos glóbulos de fosfato de cálcio, porém houve ruptura da matriz interfacial nas amostras do grupo liso. Diante dos resultados, os autores concluíram que a nucleação de fosfato de cálcio não depende da topografia da superfície, mas que a estabilidade mecânica deste tipo de revestimento requer um substrato com rugosidade superior a 0,10µm.

Visando caracterizar a camada de óxidos e identificar os melhores parâmetro para a realização de tratamentos de superfície no titânio por meio da técnica de oxidação anódica micro-arco (MAO) Li et al.<sup>46</sup> (2004) analisaram a microestrutura, composição de fases, composição química,

rugosidade média e respostas biológicas em superfícies de titânio submetidas ao tratamento por meio da MAO. As amostras de titânio comercialmente puro foram anodizadas em eletrólito de acetato de cálcio + glicerofosfato de cálcio com voltagens variando entre 190 e 600V. Após o tratamento, as amostras foram analisadas quanto a microestrutura e fase por meio de microscopia eletrônica de varredura e XRD, composição química por meio de EDS, rugosidade média por meio de um perfilômetro, e estrutura da camada de óxido por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Também foram realizados teste de cultura de células, e teste in vivo com implantação das amostras em coelhos para avaliação das respostas biológicas. Os resultados apresentaram formação de camadas porosas nas superfícies após o tratamento com MAO, com incorporação de íons cálcio e fósforo à camada de óxidos. A morfologia da camada de óxidos variou em função das voltagens aplicadas (100, 200, 300, 400, 500, e 600V) durante o tratamento, sendo que com o aumento da tensão também houve aumento da espessura do filme (2,5 - 15 $\mu$ m) e da rugosidade (0,5- 2,5 $\mu$ m). Em relação aos testes de cultura celular, foi verificado que o aumento da tensão aumentou a atividade da fosfatase alcalina (ALP) celular, mas diminuiu a proliferação celular. Os testes in vivo demonstraram melhora na capacidade de integração óssea para 270V. Dessa forma os autores concluíram que o tratamento de superfície do titânio com MAO propicia resultados benéficos, destacando a necessidade de maiores detalhamentos biológicos em estudos futuros.

Liu et al.<sup>48</sup>, em 2004, avaliaram, por meio de uma revisão de literatura (1990 a 2004), quais os métodos de tratamento de superfície utilizados em titânio e ligas de titânio propiciam os melhores aprimoramentos

das propriedades mecânicas e biológicas a partir da perspectiva da engenharia biomédica. Segundo os autores, os métodos para a modificação das superfícies podem ser classificados como mecânicos (usinagem, polimento e jateamento), químicos (oxidação anódica, processo sol-gel, e deposição química a vapor) e físicos (plasma spray e spray térmico) de acordo com o mecanismo de formação da camada de superfície. Atualmente os métodos mais utilizados são aqueles que promovem a incorporação de íons a superfície dos metais, sendo que estes métodos (anodização, deposição a vapor física, pulverização térmica) são extremamente versáteis, fáceis de serem executados e promovem grandes benefícios aumentando a biocompatibilidade dos metais, principalmente titânio e suas ligas. O tratamento de superfície adequado ao titânio expande seus usos para outras áreas biomédicas, como, por exemplo, dispositivos biomédicos para aplicações cardiovasculares. Com o desenvolvimento da engenharia de superfície, modificações na superfície do titânio com incorporação de íons como oxigênio, carbono, nitrogênio, cálcio e fósforo estão sendo introduzidos e realizados para melhorar as propriedades deste e atender às necessidades clínicas.

Rangel et al.<sup>65</sup>, em 2004 averiguaram a molhabilidade de amostras de silicone frente a diversas exposições a diferentes plasmas. Amostras de polidimetilsiloxano foram submetidas à banho ultra-sônico com álcool isopropílico para posteriormente serem submetidas ao tratamento a plasma utilizando de atmosferas de hidrogênio, oxigênio e também de argônio por um período de 120s. Após os tratamentos, foram avaliados os ângulos de contato das amostras por meio do teste da gota séssil e equação de Young-Dúpre. Também averigou-se a capacidade de recuperação hidrofóbica



investigada por meio de mensurações dos valores de energia livre de superfície e simulações teóricas no decaimento exponencial de grupos polares. Os resultados demonstraram que os tratamentos a plasma com H, O, e Ar diminuíram os valores de ângulo de contato do polímero, tornando mais hidrofílicos. Todas as modificações de superfície conseguiram recuperar parte da hidrofobicidade. Desta forma, os autores concluíram que com a diminuição das espécies polares, as superfícies dos polímeros recuperaram a hidrofobicidade.

As exigências clínicas da osseointegração precoce e efetiva têm motivado o desenvolvimento de novas superfícies, nas quais rugosidades de superfície em escala micrométrica são obtidas. Sul et al.<sup>75</sup> (2004) investigaram as reações do tecido ósseo em relação à uma nova superfície de implante desenvolvida por meio de anodização com incorporação de íons cálcio. Dez implantes de Ti cp com superfícies modificadas por meio da oxidação anódica a micro-arco, utilizando-se o método galvanostático e eletrólito contendo íons cálcio, foram comparadas com dez implantes sem superfície tratada (usinados). Por meio do emprego de microscopia eletrônica de varredura, interferometria ótica, difratometria de raios-X e espectroscopia de raios-X. Ainda foi realizada a inserção de 10 implantes usinados e 10 implantes anodizados com Ca em fêmur de coelhos. O contato osso-implante foi avaliado por meio do torque de remoção e análise por frequência de ressonância. Os resultados demonstraram não haver diferença estatística significativa em relação à rugosidade média dos implantes usinados ( $0,55\mu\text{m}$ ) e anodizados ( $0,64\mu\text{m}$ ), porém o grupo anodizado apresentava estruturas porosas em sua superfície (diâmetro igual ou inferior a  $1,5\mu\text{m}$ ). O grupo

controle apresentou uma camada cristalina amorfa em sua superfície, enquanto o grupo anodizado exibiu cristais de anatase e rutilo. Com relação à interação osso-implante, as medidas de torque de remoção e análise por frequência de ressonância demonstraram haver diferença estatística significativa com melhores resultados para o grupo anodizado. Desta forma, os autores relataram que a presença dos íons cálcio nos implantes promoveu aumento da resposta óssea, sugerindo uma interação bioquímica na interface osso-implante em associação a estabilidade mecânica, sendo assim a precoce e efetiva integração destes implantes com íons cálcio podem favorecer questões clínicas para carga imediata e melhor desempenho em ossos comprometidos.

Zhu et al.<sup>89</sup>, em 2004 investigaram os efeitos das características e composição dos óxidos em superfícies de titânio anodizadas sobre o comportamento dos osteoblastos. As amostras de titânio comercialmente puro foram tratadas por meio do processo de anodização no qual foram utilizados dois tipos diferentes de eletrólitos: ácido fosfórico e glicerofosfato decálcio, sendo que o fósforo e o cálcio foram incorporados sob a forma de fosfato e glicerofosfato nas amostras. Faziam parte do estudo 8 grupos sendo que Grupo I- controle, Grupo II ao IV-grupo anodizado com  $H_3PO_4$ , e Grupo V ao VIII- grupo anodizado com Ca-GP, visto que os grupos anodizados apresentavam diferentes potenciais de voltagens aplicados de grupo para grupo. Após o preparo das amostras, as características de superfícies foram avaliadas dentre elas: rugosidade superficial, ângulo de contato e composição química. Além disso foram realizados testes de citotoxicidade e teste de adesão de osteoblastos na superfície das amostras. Os resultados demonstraram a presença de microporos nas superfícies

anodizadas sendo que o diâmetro destes poros variam de 0,5 até 2  $\mu\text{m}$  , dependendo do eletrólito utilizado. Em relação a rugosidade de superfície, esta foi aumentada nos grupos anodizados com Ca-GP, e diminuída nos anodizados com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  em relação ao grupo controle. Em relação aos ângulos de contato, estes foram mais baixos para o eletrólito de Ca-GP, e maiores ângulos de contato para o eletrólito  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , porém todas as superfícies se demonstraram hidrofílicas em relação ao grupo controle. Os experimentos de cultura celular apresentaram aumento da adesão de osteoblastos as superfícies anodizadas e ausência de citotoxicidade, as células mostraram um crescimento irregular e poligonal. Dessa forma os autores concluíram que com o aumento da tensão da anodização e aumento da espessura dos óxidos promoveu o aumento da adesão celular as superfícies tratadas.

O efeito da rugosidade em escala micro e nanométricas sobre as interações celulares foi avaliado por Zinger et al.<sup>90</sup>, em 2004. .As interações celulares foram estudadas utilizando uma análise morfológica cinética de adesão das células. Por meio de MEV e dupla imunofluorescência (vinculina e actina), os autores verificaram que em superfícies com rugosidade nanométrica, as células apresentaram maior espessura Na presença de nanoporos, as células exibiram maior propagação e eram mais numerosas quando comparadas às superfícies lisas. Em superfícies micrométricas com cavidades hemisféricas, as células foram capazes de se aderir e proliferar dentro das cavidades de 30 $\mu\text{m}$  assumindo um formato 3D, porém não reconheceram cavidades de 100 $\mu\text{m}$ . Tanto a rugosidade micro como a nanométrica exercem um efeito de sinergismo na proliferação celular. Os autores concluíram que os osteoblastos respondem a topografia e morfologia

de superfície alterada e que diferentes topografias de superfície, micrométrica, nanométrica ou a combinação de ambas influenciam diferentemente o comportamento celular.

Oh et al.<sup>56</sup> (2005) estudaram as características estruturais e o efeito dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$  em relação a morfologia e cinética de formação da hidroxiapatita (HA). Foram utilizadas amostras de Ti cp submetidas à anodização em eletrólito com flúor (F) para a obtenção dos nanotubos e seguidamente tratadas com NaOH para aumento da bioatividade. Para avaliar a bioatividade das amostras em relação ao crescimento ósseo, as amostras foram imersas em fluido corpóreo simulado (SBF, contendo água destilada juntamente com concentrações de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , e  $\text{SO}_4^{4-}$ ), idêntico ao fluido presente no plasma humano. As alterações morfológicas e microestruturais foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, energia dispersiva de raios-X, microscopia de transmissão elétrica e difratometria de raios-X. Os resultados demonstraram que a presença de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  induziu o crescimento de nanofibras extremamente finas titanato de sódio bioativo com espessura de 15nm. A imersão em SBF proporcionou o crescimento da fase de hidroxiapatita que teve cinética de formação acelerada na presença de nanoestruturas. Por meio dos resultados obtidos, os autores concluíram que matrizes com nanotubos de  $\text{TiO}_2$  podem favorecer formação da HA sendo úteis na superfície dos metais utilizados para a confecção de implantes ortopédicos e dentais.

Em 2005, Sul et al.<sup>76</sup> avaliaram as propriedades de superfície de implantes anodizados com incorporação de íons magnésio, analisando a resposta do tecido ósseo quando em contato com estas

superfícies. Com implantes de titânio foram divididos em cinco grupos: um grupo controle, com implantes usinados, e quatro grupos anodizados com íons magnésio (teste). Quarenta implantes foram utilizados para caracterização de superfície e os outros 60 (12 por grupo) foram inseridos em tibia de coelhos para avaliação do torque de remoção após um período de cicatrização de seis semanas. As superfícies anodizadas exibiram estruturas com diâmetros de poros variando entre 0,5 e 3 $\mu$ m. Os implantes controle apresentaram superfície lisa (0,3 $\mu$ m), em relação aos grupos testes que apresentaram maior rugosidade (0,68-0,98 $\mu$ m). Enquanto se observava a presença de cristais amorfos nas superfícies controle, nas superfícies anodizadas foram identificados cristais de anatase e rutilo. O teste de torque de remoção demonstrou maior integração dos implantes anodizados comparados aos implantes controle. Com isso os autores relataram que as propriedades dos óxidos estão diretamente associadas a resposta óssea, sendo os melhores resultados obtidos quando da incorporação de 9% de magnésio, com formação da camada de óxido de espessura de 1000 a 5000nm, formação de poros e aumento da rugosidade em 0,8 $\mu$ m.

Chen et al.<sup>16</sup>, em 2006 avaliaram filmes de óxido de titânio formados após tratamento por oxidação anódica micro-arco (MAO). A anodização foi realizada em fonte de fornecimento de pulso com as amostras imersas em eletrólito de acetato de cálcio monohidratado + bifosfato de sódio dihidratado. Os filmes formados foram caracterizados com base em análises da topografia, composição química e espessura, por meio de microscopia eletrônica de varredura, energia dispersiva de raios-X (EDS) e difração de raios-X (DXR). As superfícies tratadas exibiram topografia microporosas, com

poros de diâmetros variando entre 1,0 e 5,0 $\mu$ m. O EDS confirmou a presença e incorporação dos íons cálcio e fósforo, enquanto o XRD demonstrou que os filmes formados eram compostos de rutilo, anatase e hidroxiapatita. Dessa forma os autores concluíram que os filmes de óxido de titânio formados pela MAO tem papel clínico importante e podem ser utilizados em implantes dentais e próteses de quadril.

Devido ao efeito citotóxico causado pelos elementos Al e V e ao alto módulo da liga Ti-6Al-4V, comumente utilizada na confecção de implantes dentais e ortopédicos, Elias et al.<sup>22</sup> (2006) caracterizaram duas novas ligas a base de titânio, a liga Ti-41,1Nb-7,1Zr (TNZ) e a Ti-35,3Nb-7,1Zr-5,1Ta (TNZT), com base em análises de microestrutura, topografia e resistência à tração e dureza Vickers. As ligas experimentais foram obtidas por meio de fusão a arco-voltáico seguida de tratamento térmico. A microestrutura e topografia foram avaliadas com o auxílio de microscópios óptico e eletrônico de varredura, respectivamente. Os ensaios de tração foram realizados segundo a norma ASTM 08, com o intuito de se determinar a resistência máxima à tração, o escoamento e o módulo de elasticidade. Os resultados demonstraram a presença de fase  $\beta$  e  $\omega$ , valores de resistência máxima e módulo de elasticidade, respectivamente iguais a 490MPa e 65GPa para a liga TNZ, e iguais a 550MPa e 63GPa para a liga TNZT. Com relação aos valores de dureza Vickers, ambos foram semelhantes (TNZ – 173 VH; TNZT – 190VH). Desta forma, os autores concluíram que as ligas Ti-41,1Nb-7,1Zr (TNZ) e a Ti-35,3Nb-7,1Zr-5,1Ta possuem módulo de elasticidade inferior aos das ligas denominadas tradicionais, com propriedades mecânicas adequadas para uso em aplicações biomédicas.

Em 2007, Barbour et al.<sup>5</sup>, avaliaram um protocolo convencional de polimento (PP1) de pilares de implantes comparando-o com um protocolo simplificado (PP2) que pudesse ter vantagens sobre o primeiro. O PP1 foi realizado na seguinte sequência: fresa diamantada de granulação fina por 15s (em alta rotação), pedra verde carborundum por 15s, borracha de silicone marrom por 15s, borracha de silicone verde por 15s, e um pano contendo composto de carboneto de sílica/silicone. Na sequência, as amostras foram limpas em ultrassom com álcool 95% por 60s. O PP2 foi realizado na mesma sequência do PP1, porém sem utilizar broca de diamante e pedra verde de carborundum. A morfologia de superfície, rugosidade dos pilares e a adesão das bactérias orais foram avaliadas, utilizando-se, respectivamente, microscopia de força atômica, perfilometria óptica e microscopia eletrônica de varredura. Foi observado um comportamento semelhante em ambos os protocolos de polimento, sem diferenças significantes entre os valores de rugosidade final (0,25µm). No protocolo PP2 houve menor remoção de material da superfície e também houve menor adesão de *S. mutans* quando comparado ao PP1. Já em relação a *A. naeslundii*, verificou-se maior adesão em superfícies polidas do que não polidas. Os autores concluíram que o protocolo PP2 pode ser preferível ao invés do protocolo convencional PP1, por remover menor quantidade de material e proporcionar menores áreas ásperas remanescentes. Porém o processo de polimento não propiciou menor adesão de microrganismos.

Le Guéhennec et al.<sup>44</sup> (2007) realizaram uma revisão de literatura com os artigos do ano de 1995 a 2005, com o objetivo de comparar

as taxas de osseointegração de implantes de diferentes tipos de tratamento de superfície. Segundo os autores, na maioria dos estudos, as diferentes formas de modificação de superfície, jateamento, plasma-spray, ataque ácido, anodização ou recobrimentos com cálcio e fosfato levam ao aumento da rugosidade de superfície dos implantes que favorece a estabilidade biomecânica e ancoragem óssea. Todos estes tratamentos de superfície já demonstraram boa eficácia clínica, sendo o índice de sucesso >95% em cinco anos. Os estudos destacaram a aposição óssea e rápida fixação biológica como vantagens dos implantes com recobrimento de cálcio e fosfato. Entretanto, destaca-se que os estudos clínicos raramente compararam diferentes modificações de superfície. Os autores acreditam que ainda há muito que se compreender em relação às interações da superfície dos implantes com proteínas, células e tecidos, concluindo que o futuro da implantodontia dependerá das estratégias que melhorem o processo de osseointegração principalmente em áreas mais comprometidas com grande perda óssea e com isso promovam melhores resultados e sucesso em longo prazo.

Elias et al.<sup>23</sup>, em 2008, avaliaram as propriedades de superfície de diferentes tratamentos realizados em titânio comercialmente puro (Ti cp) visando obter um método que proporcione maior biocompatibilidade. Foram utilizadas amostras de Ti cp submetidas a diferentes tratamentos: Grupo usinado (GU, controle), Grupo ataque ácido (GAC, ácido sulfúrico e hidrocloreídrico), Grupo jateado (GJ, jateado com partículas de 70µm de TiO<sub>2</sub>), e Grupo anodizado (GA, incorporando íons cálcio). Após os tratamentos, foram avaliadas a rugosidade média das amostras em perfilômetro, o ângulo de contato em goniômetro, além do torque de remoção após inserção na tíbia de



coelhos e manutenção por um período de doze semanas. Os resultados demonstraram maior valor de rugosidade média para superfícies anodizadas em relação aos demais grupos (GU = 0,65 $\mu$ m, GAC = 0,51 $\mu$ m, GJ=0,75 $\mu$ m, GA=0,87 $\mu$ m), diminuição do ângulo de contato observado no grupo anodizado (GU = 85°, GAC = 96°, GJ = 80°, GA = 47°), e maior valor de torque de remoção para os implantes anodizados (83 N/cm). Dessa forma os autores concluíram que a rugosidade de superfície e o grau de molhabilidade dos implantes podem influenciar as respostas biológicas tais como o demonstrado pelo torque de remoção dos implantes.

Frojd et al.<sup>27</sup>, em 2008, compararam a formação óssea em função da utilização de implantes com diferentes tratamentos de superfície: implantes anodizados (Grupo Ox), em implantes anodizados incorporando íons cálcio (Grupo Ca) e implantes jateados (Grupo BI). O Grupo Ox foi anodizado com eletrólito de glicerofosfato de sódio hidratado apenas, Grupo Ca foi anodizado com eletrólito de acetato de cálcio + glicerofosfato de sódio hidratado, e Grupo BI foi jateado com 75 de partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e utilizados como controle. Após realização dos diferentes tratamentos de superfície, a topografia dos implantes foi avaliada por meio de um interferômetro óptico. Na sequência, realizou-se a inserção dos implantes no fêmur e na tíbia de coelhos para que após um período de 12 semanas, fossem realizadas análises histomorfométricas. Os resultados demonstraram diferentes valores de rugosidade média para os implantes, sendo os valores dos grupos Ca, Ox e BI respectivamente iguais a 0,3 $\mu$ m, 0,6 $\mu$ m e 0,9 $\mu$ m. Apesar de apresentar o menor valor de rugosidade de superfície, houve maior contato osso-implante no grupo Ca, resultado favorável e atribuído à incorporação de íons cálcio. Dessa

forma os autores concluíram que a topografia do implante foi modificada com a incorporação de cálcio favorecendo, portanto, o contato osso-implante.

Jonge et al.<sup>34</sup>, em 2008, investigaram por meio de revisão de literatura, componentes orgânicos e inorgânicos utilizados em tratamentos de superfície de implantes que visam o aumento do reparo ósseo. Os trabalhos avaliados no período de 1996 a 2007 relatam tratamento de superfície utilizando componentes orgânicos, como enzimas, fatores de crescimento, e componentes da matriz extracelular, e/ou inorgânicos, destacando o uso do fosfato de cálcio, componente do próprio tecido ósseo natural para estimular a formação óssea ao redor de implantes. Os autores concluíram que a combinação, de ambos os componentes orgânicos e inorgânicos poderá resultar revestimentos com composição muito próxima à do osso, propiciando o surgimento de uma nova geração de implantes de titânio com melhor funcionalidade e eficácia biológica.

Kim et al.<sup>38</sup> (2008) estudaram a influência de nanoestruturas e incorporação de íons flúor e fósforo na camada de óxido do titânio sobre a adesão e proliferação de células osteoblásticas. Foram realizados tratamentos de superfície no titânio por meio de anodização com diversas condições eletroquímicas (variando a concentração dos eletrólitos e voltagens) e utilizando soluções de ácido hidrófluorídrico (HF) e ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) como eletrólitos. A morfologia das amostras anodizadas e a caracterização dos óxidos formados foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia eletrônica de raios-X. Também se avaliou o crescimento e adesão celular por meio do teste de MTT. Os resultados da MEV demonstraram superfícies multiporosas com diferentes

diâmetros de nanoporos (100-200nm) em função do aumento da voltagem aplicada. A morfologia do óxido de titânio variaram de acordo com as condições eletroquímicas aplicadas além de ser constatada uma reação competitiva entre íons  $F^-$  e  $(PO_4)^{3-}$ , fato que propiciou a incorporação dos ânions no óxido formado. Com relação à adesão celular, verificou-se que os óxidos de titânio enriquecidos com íons  $F^-$  estimularam a fixação das células, enquanto que nos óxidos de titânio incorporados com fosfato propiciaram apenas a proliferação das células. De acordo com o estudo realizado, os autores concluíram que a adesão e proliferação celular são mais influenciadas pela presença dos ânions incorporados à camada de óxido do que pelas alterações na morfologia de superfície.

No ano seguinte, Tao et al.<sup>78</sup> avaliaram a topografia de superfície e a capacidade de formação de apatita em superfícies da liga Ti-24Nb-4Zr-7,9Sn (TNZS) submetida a oxidação anódica micro-arco. Para o tratamento de superfície, discos de TNZS foram anodizados (250V, por 10min) em solução aquosa de acetato de cálcio. Após o tratamento da superfície, realizou-se a caracterização das amostras por meio de microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X (XRD) e espectroscopia de fotoelétrons (XPS). A adesão e proliferação celular, também foram avaliadas utilizando-se uma linhagem osteoblástica. Os resultados demonstraram a formação de uma camada de óxidos fina, compacta e com porosidades nas amostras tratadas, as quais também exibiram aumento nos valores de rugosidade média superficial (0,30 $\mu$ m) em relação às superfícies não tratadas (0,08 $\mu$ m). A análise em XPS demonstrou a incorporação de íons cálcio e a formação de óxidos de  $TiO_2$ ,  $Nb_2O_5$  e  $SnO_2$ . O XRD identificou a presença de óxidos de titânio na forma de

rutilo e anatase. O teste celular in vitro demonstrou um aumento considerável na adesão celular, sugerindo que estas superfícies apresentam melhorias para a proliferação celular. Os autores concluíram que o tratamento de oxidação anódica micro-arco em TNZS promoveu aumento na habilidade de formação de apatita no filme de óxido formado aumentando, portanto, a proliferação de osteoblastos.

Afonso et al.<sup>1</sup>, em 2010, avaliaram o mecanismo de solidificação da liga  $\beta$ -Ti-Nb-Zr-Ta por meio de caracterização desta. Lingotes com 50g foram fundidos em forno com atmosfera de argônio (Ar), homogeneizados, laminados, encapsulados em quartzo e envelhecidos por período de 4h em temperaturas de 200, 300, 400, 500, 600 e 700 °C. Após isso, realizou-se caracterização microestrutural por meio das técnicas de difração de raios-X (DXR), energia dispersiva de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os resultados apresentaram que amostras solidificadas em temperatura de 400°C por um período de 4h foram as que apresentaram maiores valores de dureza. As micrografias confirmaram presença de uma interface coerente entre as fases separadas  $\beta$  e  $\beta_0$ , o que explica o mecanismo de solidificação da liga. Além disso, o mapa de deformação localizado apontou domínio das fases  $\beta$  e  $\beta_0$  (5-10nm). A liga apresentou além da dureza adequada, um baixo módulo de Young. Os autores concluíram que a flutuação de elementos como Nb e Ta induzem distorção no parâmetro de rede e a divisão nos picos de DXR.

Conserva et al.<sup>17</sup>, em 2010, compararam a adesão celular de osteoblastos e células mesenquimais em dois diferentes tipos de tratamento de superfície de implantes. Para tanto, foram utilizados 39 implantes para cada

grupo de tratamento de superfície, sendo as superfícies do Grupo J apenas jateadas, e as superfícies do Grupo JAA, jateadas e submetidas à ataque ácido. A estrutura dos implantes foi analisada topograficamente em microscopia eletrônica de varredura, e a composição química em EDS e EDX. Também foram realizados os testes de cultura celular (osteoblasto e mesenquimais) para avaliação da proliferação celular e atividade enzimática da fosfatase alcalina em contato com a superfície dos implantes. Os resultados demonstraram que apesar das duas superfícies apresentarem rugosidade semelhante ( $0,6\mu\text{m}$ ), o grau de porosidade foi maior nas superfícies atacadas por ácido. Não houve diferença estatística significativa para a atividade da fosfatase alcalina, porém a proliferação celular foi maior nas superfícies JAA. Com isso os autores concluíram que a maior quantidade de poros na superfície JAA facilitou a maior proliferação e adesão celular.

Diante da importância dos tratamentos de superfície de biomateriais como cerâmica, metais e polímeros, Liu et al.<sup>49</sup> (2010) avaliaram, por meio de uma revisão de literatura entre os anos de 1996 a 2010, os diferentes métodos para a funcionalização das superfícies de biomateriais que propiciam a formação de nanoestruturas. As nanoestruturas formadas durante o tratamento de superfície alteram as funções celulares e subcelulares e acabam por apresentar propriedades biológicas promissoras como aumento na adesão e proliferação de osteoblastos permitindo a osseointegração adequada. Apesar de existirem diversas técnicas para modificação de superfícies de biomateriais como, anodização, jateamento, plasma spray, sol-gel, oxidação anódica micro-arco, o desenvolvimento de técnicas mais simples e que propiciem um contato mais preciso em relação às nanoestruturas de superfície

ainda é necessário para tentar controlar as nanoestruturas de superfície mais precisamente. Dessa forma os autores concluíram que é extremamente importante avaliar a segurança das superfícies nanofuncionalizadas antes da utilização clínica.

O propósito de aumentar o processo de mineralização óssea fez com que Kim et al.<sup>39</sup> (2011) investigassem os efeitos da deposição biomimética em implantes de titânio anodizado após imersão em fluido corpóreo modificado (SBF). Discos de titânio usinado e anodizados com eletrólito de acetato de cálcio + glicerofosfato de sódio foram imersos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) ou em SBF modificado durante duas semanas. Os discos foram divididos em seis grupos de acordo com o material e as soluções utilizadas: Grupo 1- implante usinado sem imersão; Grupo 2- implante usinado e imerso em HBSS, Grupo 3- usinado e imerso em SBF, Grupo 4- implante anodizado sem imersão; Grupo 5- implante anodizado e imerso em HBSS, e Grupo 6- implante anodizado e imerso em SBF modificado. As superfícies foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), além de serem realizadas mensurações do ângulo de contato para obter os valores de energia livre de superfície. Para avaliar a proliferação celular nos discos de titânio, células de sarcoma osteogênico humano foram utilizadas. Foi analisado também a atividade da fosfatase alcalina após três e sete dias de cultura. Os resultados da MEV e EDS apresentaram a deposição de fosfato de cálcio nas amostras anodizadas e imersas em SBF, além de que a energia livre de superfície, a molhabilidade e a resposta dos osteoblastos incluindo proliferação e adesão celular, aumentaram nas superfícies anodizadas e imersas em SBF

quando comparadas as superfícies usinadas e anodizadas sem imersão. Diante dos resultados os autores concluíram que a deposição biomimética e efetividade da imersão em SBF promoveu aumento da interação entre a superfície anodizada e o ambiente biológico consequentemente com maior formação óssea.

Yu et al.<sup>85</sup> (2011) avaliaram as características de superfície, composição de fase, biocompatibilidade e osteocondução de filmes porosos de superfícies anodizadas da liga Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb (TLM) em comparação com a liga Ti-4Al-4V (TAV). As superfícies de ambas as ligas foram submetidas à oxidação anódica micro-arco (MAO) em eletrólito contendo acetato de cálcio monohidratado e  $\beta$ -glicerofosfato de sódio pentahidratado. Para avaliar as características de superfície e fases, foram utilizados microscopia eletrônica de varredura, XRD, XPS, e EDS. Para avaliar a biocompatibilidade foram realizados testes in vitro de cultivo de osteoblasto, além de avaliação da osteocondução por meio da imersão das amostras em fluido corpóreo simulado (SBF) e em seguida implantação destas no tecido ósseo. Os resultados demonstraram superioridade da liga TLM em relação a biocompatibilidade e osteocondução quando comparada ao TAV. A formação de apatita foi induzida nas camadas de poros da liga TLM após imersão em fluido corpóreo. A camada de poros ofereceu um ambiente de afinidade para os osteoblastos que se aderiram e aumentaram sua proliferação. De acordo com os resultados, os autores concluíram que a liga TLM com a superfície modificada incorporou um filme de cálcio e fosfato poroso, que promoveu excelente resistência a corrosão, boa biocompatibilidade e osteocondução que podem promover a proliferação celular e formação óssea.

Sabe-se que a osseointegração está associada à presença de uma fina camada de óxido de titânio na superfície do implante, a qual pode ser modificada para que os mecanismos envolvidos na osseointegração sejam acelerados, permitindo a colocação da prótese em menor tempo. Assim, Busquim et al.<sup>11</sup>, em 2012, avaliaram a espessura da camada de óxido, a rugosidade, a molhabilidade e a remoção por torque de diferentes tipos de implantes com superfícies tratadas. Três implantes comercializados foram selecionados com base no tipo de modificação de superfície: implantes anodizados (Vulcano Actives, Conexão Sistemas de Próteses, São Paulo), implantes submetidos a ataque ácido (Master Porous, Conexão Sistemas de Próteses, São Paulo) e implantes com deposição de íons (Porous Nano, Conexão). Os resultados demonstraram que quanto maior o valor de rugosidade superficial, maiores foram os valores de ângulos de contato dos implantes e maior o torque de remoção. Nos implantes anodizados, detectou-se a formação de uma camada mista de óxidos compostos por rutilo e anatase, e nos implantes tratados com ácido e com deposição de íons apenas a presença de óxido na forma de rutilo. Desta forma os autores concluíram que os implantes com superfície tratada possuem propriedades que podem favorecer os mecanismos envolvidos na osseointegração e propiciar um menor tempo de reparo.

Moretti.<sup>53</sup>, em 2012, avaliou a topografia de diferentes superfícies de implantes de titânio por meio de análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). Foram utilizados cinco tipos de implantes: TiUnite (Nobel Biocare), NanoTite(Biomet



3i), SLA(Straumann), Xive TG plus(Dentsply), e Exopro(P-I Branemark). Os implantes foram avaliados por meio das microscopias em três pontos distintos: apical, região de roscas (topos, flancos e vales) e região cervical, além disso, foi avaliada a rugosidade média de cada superfície. Os resultados demonstraram superfícies semelhantes para os implantes NanoTite, SLA, Xive TG plus, sendo que o implante Exopro apresentou pequenos sulcos e o TiUnite apresentou características vulcanóides. A rugosidade avaliada em MFA demonstrou maior valor para TiUnite (3,14  $\mu\text{m}$ ), em seguida NanoTite (2,1  $\mu\text{m}$ ), Exopro (1,07  $\mu\text{m}$ ), SLA (0,85  $\mu\text{m}$ ), Xive TG plus (0,51  $\mu\text{m}$ ), porém não foi possível comparação real devido a análise se restringir a pequenos pontos (nanométricos). Dessa forma, foi concluído que a melhor maneira de análise de comparação para rugosidade deve ser em escala micrométrica por meio de MEV ao invés da MFA, e que cada superfície promove um tipo de morfologia com benefícios celulares e moleculares, os quais devem ser estudados.

Santander et al.<sup>69</sup>, em 2012, avaliaram, a resposta celular das células mesenquimais derivadas da medula óssea humana em superfícies de titânio modificados biomimeticamente. Amostras de Ti cp na forma de discos foram obtidas e utilizadas sob duas condições: (1) após jateamento com óxido de alumínio, e (2) após jateamento com óxido de alumínio e anodização. Os discos tiveram a rugosidade de superfície avaliada em MEV e a caracterização química em XPS. Após estas avaliações, as amostras foram esterilizadas para serem submetidas ao teste de adesão celular. Os resultados apontaram que as superfícies tratadas têm rugosidade macro e microscópica devido ao impacto do jateamento e os poros (diâmetro de 1-2  $\mu\text{m}$ ) formados pela anodização estavam distribuídos uniformemente. A análise química demonstrou presença

de oxigênio, cálcio e fósforo incorporados após a anodização. No teste de adesão celular, houve um aumento das células aderidas em superfícies tratadas após período de 24h quando comparadas com não tratadas. Com isso os autores concluíram que, superfícies modificadas biomimeticamente têm efeitos benéficos nos processos relacionados à osteoindução.

Takebe et al.<sup>79</sup>, em 2012, analisaram o método de tratamento de superfície de implantes de titânio (Ti cp) por meio de descarga de oxidação anódica com eletrólito de acetato de cálcio +  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e em seguida tratamento térmico resultando na precipitação de cristais de hidroxiapatita (HA) na superfície destes implantes. Após a anodização com incorporação de íons Ca e P, e em seguida recobrimento com HA aumentando a cristalinidade das amostras e criando um filme de óxido de titânio nanoestruturado na superfície, as amostras tratadas foram comparadas com amostras apenas anodizadas com íons Ca e P. As superfícies tiveram suas topografias das superfícies analisadas em microscopia eletrônica de varredura e de força atômica (MFA). Ângulos de contato e energia livre de superfície também foram avaliados. Os resultados demonstraram a formação de superfícies com filmes de óxidos nanoestruturados para ambos os tratamentos. Foram observados menores valores de ângulo de contato nas superfícies anodizadas e tratadas termicamente (com HA) em comparação às superfícies apenas anodizadas. Assim, os autores atestam que as superfícies tratadas com anodização e tratamento térmico podem ter um papel importante na osteoindução durante processo de osseointegração.

Kim et al.<sup>40</sup> (2013) analisaram as propriedades de superfície e a bioatividade de superfícies de titânio anodizado. Os discos de

titânio cp grau II foram polidos com lixa de carbeto de silício granulação 240, lavados em ultrassom com acetona, etanol e água destilada por 10 minutos cada, para então serem divididos em dois grupos: G I- titânio usinado (sem tratamento), e G II- titânio anodizado (tratado). A anodização foi feita utilizando como eletrólito acetato de cálcio +  $\beta$ -glicerofosfato de cálcio por 30, 60 e 120 segundos. A morfologia de superfície foi avaliada em MEV e MFA. Foi realizado XRD, análise de rugosidade de superfície, avaliação de ângulo de contato, avaliação de resistência à corrosão e avaliação da resposta biológica. A superfície de titânio anodizada exibiu uma camada de óxido porosa e mais espessa quando comparado à superfície de titânio usinado. A esta camada de óxido mais espessa foi atribuída melhor resistência a corrosão. Não houve diferença estatística significativa entre os valores de rugosidade de superfície de ambos os grupos (GI = 0,24 $\mu$ m; GII = 0,28 $\mu$ m). A superfície de titânio anodizada apresentou ângulo de contato mais baixo do que o titânio usinado, e maior molhabilidade, resultados que propiciaram melhor adesão celular nas superfícies dos implantes anodizados. Por meio dos resultados obtidos, os autores ainda relataram que a modificação de superfície do titânio por meio do processo de oxidação anódica proporcionou aumento na resposta das células osteoblásticas após sete dias. Dessa forma os autores concluíram que houve aumento da atividade celular e da fosfatase alcalina em superfícies anodizadas comparadas às usinadas nos testes in vitro, e que estas propriedades poderiam favorecer aumento na resposta óssea devendo, portanto, ser avaliado in vivo.

Tran, Webster<sup>81</sup> (2013) avaliaram a molhabilidade de superfícies de titânio revestidas com partículas de selênio comparando-as com

superfícies sem o recobrimento, visto que o selênio já havia sido indicado para aumento da adsorção de proteínas e diminuição da adesão de bactérias. As partículas de selênio foram incorporadas à superfície do titânio por meio de reação de redução. Após o tratamento de superfície, foram avaliadas a topografia e área de superfície por meio de microscopia eletrônica de varredura. E por meio de vários modelos diferentes (modelo de Wenzel, modelo de Cassie-Baxter, e um modelo novo proposto pelos autores) foram avaliados o comportamento de molhabilidade das superfícies. Os resultados demonstraram que o aumento das nanopartículas de selênio esteve associado com o aumento dos valores de ângulo de contato e com a manutenção da hidrofobicidade, resultados considerados contrários aos modelos existentes para averiguar a umectação, descritos por Wenzel e Cassie-Baxter e desenvolvidos especialmente para superfícies rugosas e superfícies complexas, respectivamente. Assim, os autores propuseram e executaram uma nova metodologia para compreender melhor as propriedades de molhabilidade de superfícies recobertas com o selênio. Este novo modelo foi utilizado para averiguar a influência da rugosidade superficial e de bolhas de ar em relação a medidas de ângulo de contato, visto que ambos interferem nas propriedades de molhabilidade final. Diante dos resultados, os autores concluíram que este novo modelo pode ser bastante útil para superfícies biomédicas nanoestruturais e para avaliar a interação com os processos biológicos (proteínas, células e bactérias).

Huan et al.<sup>31</sup>, em 2014, estudaram a formação e o comportamento de estruturas híbridas micro/nano criadas na superfície de liga Ni-Ti após tratamento de superfície. Inicialmente, as amostras da liga foram

submetidas a um ataque eletroquímico com utilização de ácido nítrico para criação de microporos e aumento da rugosidade de superfície em escala micrométrica. E em seguida, as amostras de Ni-Ti passaram por um processo de anodização em ácido fluorídrico para obtenção de nanoestruturas. Foram realizadas avaliações das superfícies das amostras para análise da morfologia (MEV), da composição elementar (espectroscopia de raios-X), e da rugosidade de superfície. Também foram avaliados os ângulos de contato e a energia livre de superfície. De acordo com os resultados obtidos, após o ataque químico houve aumento na rugosidade de superfície, assim como após a anodização devido à formação de nanoporos. Além disso, após o tratamento os ângulos de contato foram reduzidos e a energia livre de superfície aumentou. Os autores concluíram que é possível criar estruturas híbridas em escalas micro/nanométricas nas superfícies da liga Ni-Ti por meio de ataque eletroquímico e anodização, e que estas estruturas podem aumentar a biofuncionalidade de superfície desse material em comparação aos implantes convencionais.

## 2.2 Adesão Bacteriana em superfícies de titânio

Quirynen et al.<sup>60</sup>, em 1990, estudaram a influência de propriedades de superfície, como rugosidade e energia livre de superfície, em relação ao acúmulo de placa em determinados substratos. Materiais em formato de placa de fluoretilenopropileno (FEP) e de acetato de celulose (CA) foram utilizados presos aos incisivos de voluntários, sendo que a superfície de cada material apresentava um lado rugoso (2,2 $\mu$ m) e outro liso (0,1 $\mu$ m). Estes materiais apresentavam energia livre de superfície de 20, e 58 erg/cm<sup>2</sup>, respectivamente. O acúmulo de placa nestas superfícies foi acompanhado por um período de seis dias, após isso as amostras foram removidas e analisada a adesão em microscopia de luz para avaliar bactérias fusiformes e cocóides. Após três dias houve diferença estatística apenas comparando superfície lisa com superfície rugosa, já em seis dias as amostras FEP lisa (19,4%) apresentavam menor adesão quando comparado com CA lisa (39,5%). Porém na adesão total não houve diferenças estatística significativa entre os grupos. Dessa forma os autores concluíram que a rugosidade pode ser um fator que influencie a adesão bacteriana mais prevalente do que a energia livre de superfície.

Quirynen et al.<sup>61</sup>, em 1993, avaliaram a adesão bacteriana em diferentes pilares de titânio. O estudo foi realizado com a participação de nove pacientes usuários de próteses fixas suportadas por implantes de titânio. Um grupo de pacientes recebeu um pilar com rugosidade padrão (controle), e no outro grupo, os pacientes receberam pilar de titânio com superfície áspera.

Os pacientes foram acompanhados por um período de três meses, sem modificarem a higienização oral habitual. Após este período, foram recolhidas amostras de placas dos pilares para análise por meio de microscopia de contraste de fase, sonda de DNA e cultura. Os resultados identificaram menor quantidade de microrganismos cocóides (64% versus 81%) na placa supragengival dos pilares padrão. As superfícies rugosas apresentaram menor densidade de organismos cocóides, apesar de possuírem 25 vezes mais bactérias aderidas em sua superfície. O aspecto de condição dentária do paciente foi o fator mais relacionado à presença e densidade de microrganismos patógenos periodontais do que as características dos pilares propriamente ditas. Dessa forma, os autores concluíram que para redução da colonização bacteriana e de patógenos periodontais, estudos futuros deverão buscar por superfícies com rugosidade considerada ideal para a redução da colonização bacteriana e da presença de patógenos periodontais.

Neste mesmo ano, de Quiryneen et al.<sup>62</sup>, avaliaram a adesão e presença de microrganismos na conexão protética dos implantes de titânio (parte intra-óssea do implante). Porções apicais de implantes de nove voluntários foram avaliadas por um período de três meses, utilizando-se microscopia de contraste por fase diferencial. Os resultados apresentaram as seguintes quantidades de microrganismos nos implantes: cocóides (86,2%), organismos sem motilidade (12,3%). Apenas esporadicamente foram encontrados organismos motis (1,3%) ou espiroquetas (0,1%). Os autores concluíram que a causa mais provável para contaminação dos implantes foi o espaçamento entre o pilar e a interface de fixação.

Busscher et al.<sup>12</sup>, em 1995, analisaram a hipótese de que a adesão bacteriana inicial teria um papel fundamental para a formação global do biofilme. Considerando que, o biofilme poderia ser removido por forças de cisalhamento presentes na cavidade oral, a pesquisa concentrou seu objetivo na forma de destacamento deste biofilme ao invés da adesão necessariamente. O experimento foi desenvolvido em uma câmara de fluxo, e após adesão de *Streptococcus* aderidos em lamínulas de vidro, realizou-se a simulação da ação uma força de cisalhamento por meio da passagem de uma bolha para remoção dos microrganismos aderidos. Os resultados demonstraram que, inicialmente, a tentativa de remover *Streptococcus* e *actinomicetos* não funcionou, porém em uma segunda tentativa com presença de película salivar houve um destacamento de *Streptococcus*, provavelmente pela falha coesiva do filme condicionado.

Quirynen, Bollen<sup>63</sup>, em 1995, analisaram por meio de um de revisão da literatura, a influência da rugosidade e da energia livre de superfície (ELS) no processo de adesão bacteriana. Segundo os autores a adesão bacteriana ocorre em 4 fases: inicialmente, ocorre o transporte da bactéria para a superfície, em seguida, a adesão inicial, logo depois, a adesão por interações específicas, e por último a colonização para formação do biofilme. Tanto os estudos in vitro quanto estudos in vivo avaliados nesta revisão demonstraram a importância das variáveis rugosidade de superfície e energia livre de superfície em relação a adesão bacteriana e formação de placa supragengival. Embora estes fatores interajam entre si, pôde-se estabelecer que a rugosidade de superfície possa ser mais influente que a ELS em relação



à adesão uma vez constatado que superfícies mais rugosas promoviam a formação e maturação da placa bacteriana, enquanto altos valores de ELS promoviam a ligação da placa com maior força ao substrato, além de, selecionarem bactérias específicas. Adicionalmente, a importância dessas duas propriedades é reduzida em ambiente subgengival, onde os microrganismos apresentam maior facilidade de sobrevivência. Dessa forma os autores concluem que, energia livre de superfície e rugosidade de superfície apresentarem grande impacto na adesão inicial e retenção dos microrganismos, o efeito dominante da rugosidade de superfície se sobrepõe e isto justifica a demanda de maior atenção clínica a este parâmetro.

Bollen et al.<sup>9</sup>, em 1996, avaliaram os efeitos do alisamento das superfícies de pilares intra-buciais em relação a adesão bacteriana em longo prazo. Participaram deste estudo seis pacientes que apresentavam implantes de titânio suportando próteses totais no maxilar inferior. Dois tipos de pilares diferentes: de titânio com superfície usinada ( $Ra = 0,2\mu m$ ), ou de material cerâmico altamente polido ( $Ra = 0,06\mu m$ ) foram instalados de forma aleatória nos pacientes. Após três meses de exposição intra-bucal, foram colhidas amostras de placa supra e subgengivais para análises em microscopia de contraste de fase. Ao redor de cada pilar foram registrados os parâmetros clínicos periodontais de profundidade de sondagem, recessão gengival, sangramento à sondagem e valor do Periotest. Após doze meses, repetiu-se a coleta de amostras, que adicionalmente, foram cultivadas em condições enriquecidas com  $CO_2$ . Após três meses, foram detectados espiroquetas e organismos com motilidade apenas subgengivamente aos pilares, enquanto que após 12 meses foram observados proporções iguais de espiroquetas e

organismos com motilidade, em ambos os tipos de pilares, tanto supra quanto subgengivalmente. Entre as bactérias potencialmente patogênicas, somente *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* foram detectadas para cultura anaeróbia, sem diferenças significantes entre os pilares. Diante dos resultados, os autores concluíram que uma redução da rugosidade de superfície, abaixo do limite de  $Ra=0,2\mu m$  não tem grande impacto sobre a composição microbiana supra e subgengival.

Quirynen et al.<sup>64</sup>, em 1996, estudaram a influência da rugosidade de superfícies de pilares de titânio em relação à adesão bacteriana. Participaram do estudo seis pacientes que estavam à espera de prótese fixa suportada por implantes de titânio. Para tanto, quatro pilares de titânio com diferentes rugosidades foram instalados em cada paciente de forma aleatória. Após um mês de exposição intra-oral, amostras de placa subgengival de cada tipo de pilar foram comparados por meio de microscopia de contraste de fase. Após três meses, foram analisadas amostras de placa supra e subgengival. Durante a visita para coleta das amostras foram mensurados alguns parâmetros periodontais como: profundidade de sondagem, recessão e sangramento à sondagem. Os resultados da microscopia de fase apontaram que, após um mês, apenas os dois pilares de titânio comercialmente puro mais rugosos abrigaram espiroquetas, e que, após três meses pouca variação nos diferentes tipos de pilares foram encontrados em relação à composição da flora bacteriana. Na análise de placa subgengival não houve diferenças na composição microbiológica entre os diferentes pilares. Os resultados clínicos demonstraram pequenas diferenças na profundidade de sondagem, além disso, pilares mais rugosos apresentaram algum ganho de inserção (0,2mm)

durante três meses e os outros pilares tiveram perda de inserção variando de 0,8 a superior a 1mm. Diante dos resultados, os autores enfatizaram que a redução na rugosidade de superfície (inferior a  $0,2\mu\text{m}$ ) não teve efeito significativo na composição microbiológica, entretanto avaliações clínicas indicam que certa aspereza nas superfícies é desejada para aumentar a resistência à sondagem.

Grossner-Shreider et al.<sup>30</sup> (2001) compararam a colonização bacteriana em cinco superfícies de implantes diferentes, porém com rugosidades similares. Os discos de titânio foram divididos em cinco grupos de acordo com os tratamentos realizados na superfície: A- deposição de vapor (PVD) com nitreto de titânio, B- PVD com nitreto de zircônio, C- oxidação térmica, D- estruturação com radiação laser, E- discos polidos (controle). Após o tratamento de superfície, foram avaliadas a topografia de superfície, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a rugosidade média, com auxílio de perfilômetro e a energia livre de superfície, mensurada por meio da obtenção dos ângulos de contato. Após esta fase de caracterização de superfície, os discos de titânio foram encubados em suspensão bacteriana (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*) por uma hora, e as unidades formadoras de colônias aderidas foram contadas por microscopia fluorescente. Os resultados mostraram que todas as superfícies apresentavam rugosidades superficiais entre  $0,14\mu\text{m}$  e  $1,0\mu\text{m}$ , sem diferenças significativas entre as medidas de ângulo de contato para as diferentes superfícies. Em relação à adesão bacteriana houve uma redução no número de bactérias aderentes em superfícies de titânio denominadas estáveis, tais como as com deposição de nitreto de titânio e nitreto de zircônio e as termicamente

oxidadas, em relação ao titânio polido. Dessa forma os autores comprovaram que revestimentos de superfície de titânio com nitreto de titânio e nitreto de zircônio são eficazes na redução bacteriana e com possibilidade de melhorias no comportamento clínico.

Steinberg et al.<sup>77</sup>, em 2002, avaliaram a formação de biofilme de *S. sobrinus* em diversos materiais restauradores utilizando um modelo que consiste em hospedeiro e constituintes bacterianos. Os materiais utilizados foram: amálgama (sem gama-2, Silmet, Israel), Charisma (Kulzer, Germany), Durafil (Kulzer, Germany), Prodigy (Kerr, USA), Z-100 (3M, USA), Fuji 2 LC e Fuji 2 GC (GC International Japan), Acrilic GC Unifast (GC, Japan). Foi determinado o padrão de adsorção da saliva nestes materiais por meio de eletroforese e densitometria computadorizada, também foi determinada quantia de proteínas da saliva adsorvida pelo método de Bradford. E avaliada a adesão bacteriana dependente de açúcar. Os resultados demonstraram que materiais dentários acrílicos apresentaram mais afinidade as proteínas salivares, e os materiais Fuji LC, e Fuji GC apresentaram maior quantidade de adesão de bactérias e viabilidade bacteriana. Dessa forma os autores concluíram que os diferentes tipos de materiais apresentaram um padrão de formação de biofilme, e que o acúmulo destas bactérias são causadoras das doenças orais.

Rosenberg et al.<sup>66</sup>, em 2004, avaliaram o padrão de falhas e longevidade dos implantes em paciente comprometidos periodontalmente e saudáveis. Os implantes foram instalados em pacientes saudáveis (PHP) e comprometidos periodontalmente (PCP), e foram avaliados de acordo com a rugosidade (lisos e rugosos), localização, diâmetro e comprimento de implante. Os resultados demonstraram 1511 implantes instalados em 334 pacientes,

sendo que a taxa de sobrevida global dos implantes semelhante para ambos os grupos PHP (93,7%) e PCP (90,6%). Foram identificados dois tipos de falhas de implantes, a primeira referente à perda de osseointegração que ocorre no início do tratamento em implantes com superfícies lisas, e a segunda, relacionada a Peri-implantite e mais prevalente no grupo PCP. Os autores relataram que são necessários mais estudos para averiguar a influência e suscetibilidade do hospedeiro em relação às falhas dos implantes.

Em 2006, Teughels et al.<sup>80</sup> analisaram, por meio de revisão de literatura, o impacto das características de superfície na formação do biofilme supragengival e subgengival. Foi realizada uma busca na base de dados Medline de 1966 até 2005, sendo incluídos as seguintes palavras-chave: “formação de biofilme”; “implantes orais”, “características de superfície e implantes”; “formação de biofilme e oral”; “placa, biofilme e rugosidade”; “placa, biofilme e energia de superfície”, “formação de placa e implantes”. Os resultados dos estudos clínicos selecionados apontaram que o aumento da rugosidade de superfície acima do limiar de 0,2µm e aumento da energia de superfície facilita a formação do biofilme em materiais restauradores, porém com a interação de ambos, a rugosidade se torna predominante. Os autores concluíram que a formação de biofilme pode ser facilitada quando há uma maior rugosidade superficial e energia de superfície.

Baca et al.<sup>4</sup>, em 2008, investigaram se os genótipos de *S. mutans* podem ser identificados efetivamente em amostras de saliva e de placa oriundos de molares e fissuras oclusais. O estudo foi realizado em 20 crianças com idades escolares entre seis e sete anos, nas quais a presença da bactéria *S. mutans* foi detectada pelo teste CRT, e que não estivessem utilizando

antibiótico (nos últimos 4 meses) e enxaguatórios bucais. Foram coletadas amostras de placa e saliva das crianças, para em seguida, serem executados os testes bioquímicos. Por meio de teste bioquímico, foram isolados até nove espécies compatíveis com *Streptococcus mutans*, os quais foram genotipados por meio de PCR. Os resultados obtidos identificaram 28 genótipos de *S. mutans*, sendo que 23 genótipos foram identificados na saliva, 23 na placa bucal, e 16 nas fissuras oclusais de molares. Com isso os autores concluíram que amostras de saliva foram tão eficazes quanto as amostras de placa bucal para identificação de genótipos de *S. mutans*, apesar de ambas não demonstrarem todos os genótipos presentes. Tanto amostras de placa como de saliva foram melhores para identificar o microrganismo do que nas amostras de fissuras oclusais.

Visai et al.<sup>82</sup>, em 2008, analisaram um tratamento eletroquímico desenvolvido na superfície de implantes visando melhorar a cicatrização ao redor de pilares, de impedir adesão bacteriana e de melhorar a estética devido a coloração adequada. Os implantes de titânio foram tratados pelo método de deposição anódica com solução enriquecida com fosfato de cálcio. A citocompatibilidade foi avaliada utilizando-se fibroblastos e células de osteossarcoma humano, e a adesão bacteriana analisada por meio de testes in vitro e in vivo. Os resultados demonstraram efeitos de citocompatibilidade positivos para ambas as células utilizadas, além da presença de efeito antibacteriano. Os autores concluíram que o tratamento realizado promoveu a incorporação de íons cálcio à superfície, a modificação da camada de óxidos com a presença de anatase, e a formação de uma superfície microporosa que

facilitou o contato com os tecidos (biocompatibilidade), além de uma coloração cinza mais clara, favorecendo a estética.

Um ano depois, Duarte et al.<sup>20</sup>, avaliaram a rugosidade média de superfícies de titânio e adesão de *S. sanguinis* após a realização de tratamentos de superfície por meio de laser Er:YAG, raspagem com curetas metálicas e de plástico e jateamento com um sistema abrasivo com bicarbonato de sódio. Foram utilizadas amostras de titânio comercialmente puro, sendo que para realização de cada tratamento foram utilizadas dois tipos de amostras: uma com superfície lisa (titânio usinado), e outra com superfície rugosa (titânio jateado com óxido de alumínio e ataque ácido com ácido nítrico). Foram utilizadas total de 10 amostras de superfície lisa e 10 de superfície rugosa em cada tipo de tratamento (laser Er:YAG, raspagem com curetas metálicas e de plástico e jateamento com um sistema abrasivo), sendo que após foi realizado averiguação da rugosidade média em um perfilômetro. Os resultados mostraram que superfícies lisas se tornaram as superfícies mais rugosas (Ra inicial= 0,17 $\mu$ m e Ra final = 0,40  $\mu$ m) com a utilização de curetas de metal. E para superfícies rugosas, o padrão destas não foi alterado por qualquer um dos tratamentos (Ra=0,70  $\mu$ m). Em relação a adesão bacteriana superfícies rugosas tratadas com laser, curetas metálicas e abrasão foram as que apresentaram menor adesão de bactérias (8-10UFC/log10). Desta forma os autores concluíram que as superfícies rugosas tratadas com cureta metálica, laser e abrasivo foram menos suscetíveis a adesão de bactérias provavelmente por modificar a superfície e por apresentar partículas do abrasivo. E que tratamento de raspagem com curetas metálicas não são recomendadas na superfície de titânio por danificar a estrutura.

Em 2009, Marciano et al.<sup>51</sup> investigaram a atividade antibacteriana dos filmes de óxido de carbono diamante (DLC) produzidos por deposição química a vapor reforçada por plasma. Foram utilizadas amostras de aço inoxidável nas quais foram realizadas a dispersão de TiO<sub>2</sub> em hexano por meio de deposição química a vapor reforçada a plasma. Também foram avaliadas a composição, a estrutura de ligação, a energia de superfície, e a rugosidade das películas formadas. A bactéria utilizada para os testes antibacterianos foi a *Escherichia coli* (*E. coli*). Os resultados demonstraram presença de grandes quantidades de TiO<sub>2</sub> em DLC confirmada por espectroscopia. A rugosidade destas superfícies aumentaram, os filmes presentes se tornaram mais hidrofílicos com maior energia de superfície, e a adesão de bactérias diminuiu, demonstrando que TiO<sub>2</sub> aumentou a atividade bactericida do DLC. Entretanto com o aumento da concentração de TiO<sub>2</sub> também aumentou a interação química da *E. coli* e os filmes estudados. Os autores concluíram que como a atividade bactericida do TiO<sub>2</sub> iniciou sua ação por dano oxidativo, houve diminuição na energia interfacial de adesão da bactéria. Desta forma, o DLC com TiO<sub>2</sub> pode ser útil para construir filmes com propriedades bactericidas.

Filoche et al.<sup>26</sup>, em 2010, avaliaram, por meio de revisão de literatura, os conceitos relacionados à ecologia microbiana e como esses conceitos se relacionam com o desenvolvimento do biofilme oral. Os avanços das técnicas moleculares propiciam melhor entendimento da diversidade e complexidade da microbiota humana, e o desenvolvimento da placa não deve ser considerado algo singular e sim um processo individualizado. Antigamente



acreditava-se que as doenças bucais eram caracterizadas de forma simples com os agentes causadores completamente identificados, atualmente sabe-se que estes tipos de doença são bastante complexas devido à extensa gama da ecologia microbiana oral. Com isso os autores concluíram que ainda há muito o que ser estudado e compreendido em relação ao desenvolvimento da placa e possíveis tratamentos das doenças bucais.

Scarano et al.<sup>72</sup> (2010) avaliaram a quantidade de bactérias que estavam recobrando as superfícies de titânio revestidas com nanopartículas de anatase por meio de microscopia eletrônica de varredura. Cada um dos dez pacientes receberam um implante controle e um implante teste (recobertos com anatase). Após um período de uma semana, os implantes foram removidos e analisados em microscopia para avaliar a adesão bacteriana. Os resultados demonstraram que a parte protética dos implantes não demonstraram diferenças estatísticas significantes para adesão bacteriana. Já na porção infra-óssea (corpo do implante), houve redução na adesão bacteriana para os implantes teste quando comparados ao controle. Com isso os autores concluíram que os revestimentos de anatase na superfície dos implantes podem ser um método adequado para diminuir a colonização bacteriana.

Xu et al.<sup>84</sup>, em 2010 avaliaram a implantação de íons zinco na superfície do titânio e investigaram a composição química e propriedades antibacterianas do íons zinco. Superfícies de titânio modificadas por meio de imersão a plasma para aumentar a concentração e deposição do íon zinco foram comparadas com superfícies de titânio sem tratamento. A composição elementar das superfícies foi avaliada por espectroscopia de raios-X (XPS) e a adesão de *S. mutans* por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os

resultados apontaram a presença de Ti, O e C em todas as superfícies de titânio (tratadas e não tratadas). Em relação à adesão de *S. mutans*, houve um número substancial de microrganismos aderidos ao titânio sem tratamento, enquanto que no titânio com deposição de zinco, a adesão de bactérias foi menor. Os autores concluíram que a introdução de íons zinco na superfície de titânio foi um sucesso.

Saravia et al.<sup>71</sup>, em 2011, avaliaram a eficácia de uma cultura média modificada por bacitracina e SB-20 (SB-20M) para facilitar a diferenciação e identificação bioquímica de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Cento e quarenta e cinco crianças participaram deste estudo, sendo que após coletada a saliva das crianças, esta foi adicionada em placas junto com SB-20M (foi feita modificação da sacarose por grânulos de açúcar) e incubados em microaerofilia a 37°C por 72h. Após o cultivo das bactérias nas placas, foi feita a identificação destas por meio de stereomicroscopia, e testes bioquímicos utilizando fermentação do açúcar, resistência a bacitracina, e produção de peróxido de hidrogênio. Os resultados demonstraram não haver diferenças estatísticas significantes entre a morfologia e identificação das bactérias, sendo que no teste bioquímico foram identificados 95,8% de *S. mutans* e 95,5 % de *S. sobrinus* em SB-20M, e no morfológico 98% eram *S. mutans* e apenas 2% *S. sobrinus*. Dessa forma os autores concluíram que a utilização de SB-20M para identificação destes microrganismos é um método bastante eficaz.

Fais et al.<sup>25</sup>, em 2013, averiguaram a adesão de *S. mutans* em superfícies de titânio comercialmente puro (Ti cp) e de Ti-6Al-4V (TAV) após após simulação de escovação por período de 10 anos. Amostras polidas de Ti cp e de TAV foram separadas em grupos de acordo com tipo de

tratamento: imersão (grupo I – controle) ou escovação (B) em água destilada imersão ou escovação com creme dental sem flúor (grupos TI e BT) e imersão ou escovação com dentifrício fluoretado (grupos IFT e BFT). As amostras foram imersas estaticamente ou escovadas em uma máquina de escovação linear ambos por um período de 244h. Foram avaliadas antes e após realização de tratamento a análise da rugosidade de superfície e microscopia de força atômica. A adesão bacteriana foi averiguada por meio da determinação dos valores de UFC/ml. Em relação à rugosidade os grupos BT e BFT apresentaram mudanças na superfície de Ti cp e Ti-6Al-4V. Não foram observadas diferenças significativas em relação à UFC/mL entre os grupos Ticp ou Ti-6Al-4V, com a adesão de *S. mutans* semelhante para todas as superfícies.

### 3 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da anodização da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta com solução de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio sobre as propriedades de superfície e adesão do patógeno *Streptococcus mutans*, comparando esta liga experimental com o titânio comercialmente puro.

As hipóteses nulas da pesquisa foram:

- A anodização com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio não altera as propriedades de superfície (composição química, topografia, rugosidade média e energia livre de superfície) da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta e do titânio comercialmente puro.

- A anodização com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio não altera a adesão de *Streptococcus mutans* nas superfícies da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta e do titânio comercialmente puro.

## 4 Material e Método

### 4.1 Obtenção das amostras

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados vinte discos ( $\varnothing$  8mm X 2mm) de Ti cp grau II e vinte discos de Ti-35Nb-7Zr-5Ta (n=40).

Os discos de Ti cp foram obtidos comercialmente na forma de barras (Realum-Soluções em titânio e altas ligas, São Paulo, SP, Brasil) e utilizados após a usinagem. Já para obtenção da liga Ti-35-Nb-7Zr-5Ta, uma liga experimental, foi realizada a fusão dos metais, com a confecção de lingotes de 30 a 70g. O equipamento utilizado para fusão e preparação dos lingotes foi um forno de fusão a arco-voltáico (Figura 1) com atmosfera inerte controlada por uma bomba a vácuo e fluxo de argônio.

Figura 1 – Forno de fusão a arco-voltáico do Laboratório de Cerâmica e Tratamento de Minérios, da Escola de Engenharia de Lorena - EEL USP. Lorena, 2013.



Todos os metais utilizados para confecção da liga apresentavam pureza comercial, com graus iguais ou superiores a 99,00% (Tabela 1). O Ti, Nb e Ta adquiridos na forma de chapa e lâminas foram cortados e submetidos à decapagem (Tabela 2). O Zr adquirido na forma de esponja, e, portanto, isento de óxido não precisou ser decapado. Para a fundição de um lingote foram utilizados 15,9g de titânio, 10,5g de nióbio, 2,1g de Zr e 1,5g de tântalo, mensurados em balança semi-analítica digital (Sartorius BL-210S, Sartorius, Göttingen, Alemanha).

Tabela 1 – Metais utilizados para a fusão da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, composições químicas, lotes e fabricantes. Araraquara, 2013.

Metalo	Composição química*	Lote	Fabricante
Nióbio	Nb > 99,8%	812990	CBMM Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, Araxá, MG, Brasil
Tântalo	Ta ≥ 99,9%	MKBD6082 MKBG6813V MKBH9982V	Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, Estados Unidos
Titânio	Ti – 99,745%, C – 0,010%, Fe – 0,10%, H – 0,001%, N – 0,004%, O <sub>2</sub> – 0,140%	RLM 0756	Realum- Soluções em titânio e altas ligas, São Paulo, SP, Brasil
Zircônio	≥ 99,0%	03517AH	Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, Estados Unidos

\* Composição química fornecida pelo fabricante

Tabela 2 – Reagentes utilizados na decapagem dos metais. Araraquara, 2013.

Metalo	Solução (em volume)
Nióbio	H <sub>2</sub> O, HF, HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1:2:2:5)
Tântalo	HNO <sub>3</sub> , HF, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3:1:1)
Titânio	H <sub>2</sub> O, HF, HNO <sub>3</sub> (1:1:1)

HF- ácido fluorídrico, HNO<sub>3</sub>-ácido nítrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- ácido sulfúrico

Os metais foram cuidadosamente posicionados no cadinho no interior do forno de fusão a arco-voltáico. A etapa de fusão teve início após uma operação de vácuo no sistema, seguida de três purificações do forno por meio da injeção de argônio (purgas). Para garantir a homogeneidade composicional<sup>1,65</sup> da liga, logo após a fusão inicial, e com o lingote já formado, a fusão foi repetida num total de três vezes.

Após a obtenção dos lingotes (Figura 2), visando homogeneizar a estrutura metalúrgica da liga, iniciou-se o tratamento térmico. Para tanto, os mesmos foram encapsulados em vácuo utilizando-se tubos de quartzo (Corel resistências elétricas, Pirituba, São Paulo, Brasil). Na sequência, os mesmos foram acondicionados em forno para tratamento térmico, sendo mantidos a 1000° C por 8h horas, seguido de resfriamento lento no forno.

Figura 2 – Dois lingotes da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta inteiros e um lingote seccionado. Araraquara, 2013.



Para a obtenção de barras e posteriormente usinagem em discos, os lingotes, já submetidos ao tratamento térmico inicial, foram



aquecidos a 1000° C e forjados em equipamento específico até a obtenção de barras com diâmetro aproximado de 9,8mm. Na sequência, essas barras foram usinadas em um torno mecânico para a obtenção dos discos com 2mm de espessura e 8mm de diâmetro.

Visando alívio das tensões, após obtenção das amostras na forma de discos, os mesmos foram encapsulados à vácuo utilizando-se tubos de quartzo (Corel resistências elétricas, Pirituba, São Paulo, Brasil), acondicionados em forno para tratamento térmico, sendo mantidos a 1000° C por uma hora e, na sequência, retirados do forno e submetidos a resfriamento ao ar.

## **4.2 Preparo das amostras**

Todos os discos, seja de Ti cp ou de Ti-35Nb-7Zr-5Ta foram encaixados em uma matriz metálica e submetidos a procedimentos de acabamento e polimento em politriz (Aropol, Arotec, São Carlos, SP, Brasil). As amostras foram lixadas progressivamente com lixas de carbeto de silício (Hermes Schleifmittel GmbH & Co, Hamburg, Alemanha) de granulações 320, 600, 800 (30 segundos cada), 1200, 1500 e 2500 mesh (40 segundos cada) na presença de água, com velocidade de 300rpm e força controlada de 0,5kgf.

Após a obtenção de uma superfície uniforme, as amostras foram lavadas em água destilada e submetidas à limpeza com álcool isopropílico em aparelho de ultrassom (CD 4820, Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) durante 2 ciclos com 10min cada.

As amostras obtidas foram divididas em dois grupos, de acordo com o material de confecção – Grupo T (Ti cp) e Grupo TNZT (Ti-35Nb-7Zr-5Ta), e subdivididas em dois subgrupos com base na realização ou não do tratamento de superfície - Subgrupo A<sup>-</sup> (sem tratamento de superfície), Subgrupo A<sup>+</sup> (com tratamento de superfície) (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos experimentais de acordo com os procedimentos realizados. Araraquara, 2013.

Metais	Procedimentos	Nomenclatura
Ti cp	Sem tratamento de superfície (controle)	TA <sup>-</sup>
	Tratamento de superfície por anodização	TA <sup>+</sup>
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	Sem tratamento de superfície (controle)	TNZT A <sup>-</sup>
	Tratamento de superfície por anodização	TNZT A <sup>+</sup>

### 4.3 Tratamento de superfície

O tratamento para a funcionalização das superfícies foi baseado na técnica de anodização eletroquímica. Para tanto, foram confeccionadas células eletroquímicas de acrílico e realizada a aquisição de uma fonte de corrente (Figura 3) (N5771A, Agilent Technologies do Brasil São Paulo, SP, Brasil).

Figura 3 – Fonte de corrente modelo N5771A (Agilent Technologies do Brasil São Paulo, SP, Brasil). Araraquara, 2013.



Imediatamente antes do processo de anodização, as amostras foram submetidas à ataque químico em solução de Kroll ( $\text{HF}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ , 1:1:1) durante 8 segundos para remoção do filme passivo original. O ataque químico foi realizado em 5 amostras de cada vez, utilizando 3mL de solução de Kroll. Após o ataque químico, as amostras foram limpas em ultrassom (CD 4820, Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) com álcool isopropílico (10min) e água destilada (5min).

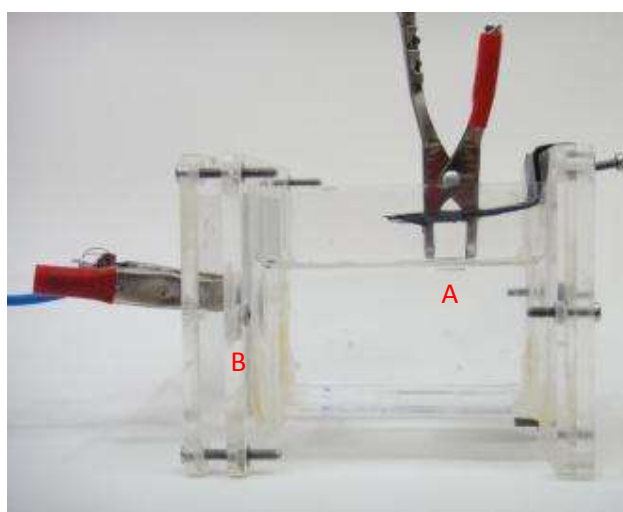
A amostra foi posicionada na célula eletroquímica conectada a um multímetro digital e à fonte de corrente. O disco metálico, de Ti cp ou de Ti-35Nb-7Zr-5Ta, atuava como ânodo e permanecia imerso na solução utilizada para anodização a uma distância fixa de aproximadamente 8cm de uma placa de aço inoxidável que atuava como cátodo.

Para a obtenção de superfícies funcionais com incorporação de Ca e P, foi utilizada uma solução composta por acetato de cálcio (0,35mol/L, Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, Estados Unidos)

$\beta$ -glicerofosfato de sódio (0,04mol/L, Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, Estados Unidos). Esta solução era preparada 24h antes do processo de anodização, sendo mantida durante este período em agitador magnético (ARE, Velp Scientifica, Usmate, Itália) sem aquecimento.

Após montagem da célula eletroquímica e posicionamento da amostra a ser anodizada (Figura 4), a fonte de corrente foi ajustada para a utilização de 300V e intensidade de corrente elétrica variada, iniciada em 2,5A. A solução, aproximadamente 140mL, foi vertida cuidadosamente no interior da célula eletroquímica evitando a formação de bolhas. Após um minuto de anodização, as amostras foram retiradas da célula e acondicionadas em béqueres para limpeza em ultrassom (CD 4820, Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) com álcool isopropílico (10min), e por fim limpas com água destilada imediatamente após a retirada do ultrassom.

Figura 4- Célula eletroquímica com solução para anodização, amostra (A-ânodo) e placa de aço inoxidável (B-cátodo). Araraquara, 2013.



## **4.4 Propriedades de Superfície**

A caracterização das superfícies, antes e após o processo de anodização, foi realizada por meio da mensuração da rugosidade média, avaliação da topografia superficial, energia livre de superfície e composição química.

### ***4.4.1 Topografia de superfície e composição química***

Amostras representativas dos grupos e subgrupos experimentais tiveram a topografia capturada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, Jeol JSM6610LV, Akishima, Tokyo, Japão), equipado com detector de energia dispersiva de raios-X (EDS) que permitiu avaliar a composição química qualitativa das amostras. O equipamento encontra-se alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

### ***4.4.2 Energia livre de superfície (ELS)***

Foram realizadas leituras de ângulos de contato em goniômetro automático localizado no Instituto de Química de Araraquara-UNESP para obtenção da Energia Livre de superfície (ELS).

O valor da ELS pode ser determinado físico-matematicamente<sup>21</sup> a partir das mensurações de ângulos de contato com um ou mais líquidos teste totalmente caracterizados. Os líquidos selecionados neste estudo foram água destilada, etilenoglicol, polietilenoglicol, e diiodometano. Tal escolha fora realizada com base nas polaridades diferentes:

água (polaridade 52), etilenoglicol (polaridade 19), polietilenoglicol (polaridade 13) e diiodometano (polaridade 2), além de não haver reação dos líquidos com os materiais avaliados.

Desta forma, a energia livre de superfície foi estimada pela mensuração do ângulo de contato estático ( $\theta$ ) com o uso dos quatro líquidos selecionais usando o método da gota sésil (vídeo-câmera com base instrumento de software SCA 20, Dataphysics, Filderstadt, Alemanha). Foram realizadas quatro medidas de ângulos de contato em cada corpo-de-prova. Após isso um valor médio de  $\theta$  foi obtido a partir da equação Young-Laplace e utilizado para o cálculo da energia livre de superfície de seus componentes polar e dispersivo de acordo com o método Owen-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK)<sup>58</sup>.

Foi utilizada a equação de Owen-Wendt-Rabel-Kaelble,<sup>58</sup> esta é conhecida como aproximação da média geométrica e fornece a maneira de estimar a energia livre de superfície de um sólido, usando um líquido com  $\sigma_{1L}^D$  e  $\sigma_{1L}^P$  (componentes dispersivo e polar) conhecidos e a medida do ângulo de contato do sólido, pode-se facilmente determinar  $\sigma_{2S}^D$  e  $\sigma_{2S}^P$  do sólido, resolvendo a equação de Owen-Wendt-Rabel-Kaelble :

$$W_A = 2(\sqrt{\sigma_1^D \cdot \sigma_2^D} + \sqrt{\sigma_1^P \cdot \sigma_2^P})$$

Sendo que  $W_A$  corresponde ao valor de energia livre de superfície,  $\sigma_{1L}^D$  e  $\sigma_{1L}^P$  (componente dispersivo e polar do líquido), e  $\sigma_{2S}^D$  e  $\sigma_{2S}^P$  (componente dispersivo e polar do sólido).

#### **4.4.3 Medida da rugosidade média (Ra)**

Tendo em vista a possível influência da rugosidade na adesão de microrganismos, a rugosidade média (Ra) de todas as amostras (N=40) foram mensuradas antes e após os procedimentos de anodização, em um rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japão) localizado na Faculdade de Odontologia de Araraquara, com precisão de leitura de 0,01 $\mu$ m, comprimento de leitura de 2,4mm, velocidade da ponta ativa de 0,5mm/s e raio da ponta ativa de 5 $\mu$ m. Foram realizadas duas medidas em cada superfície e a média entre as leituras foi determinada como o valor da Ra ( $\mu$ m) de cada amostra. Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

### **4.5 Avaliação da adesão bacteriana**

#### **4.5.1 Esterilização dos corpos-de-prova**

Os corpos-de-prova foram acondicionados em envelopes (Medstéril, São Paulo, SP, Brasil) devidamente identificados e enviados ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, na USP de São Paulo, para realização do processo de esterilização por meio de radiação gama utilizando como parâmetro radiação de 25kGy.

#### **4.5.2 Preparo dos meios de cultura**

A reativação e incubação do *Streptococcus mutans* foi realizada utilizando-se o meio de cultura infusão cérebro e coração (BHI) (Becton Dickison and Company Sparks, MD, USA). Segundo as

recomendações do fabricante, 37g de pó do meio de cultura foram adicionados em um béquer contendo 1.000mL de água destilada. Após dissolução completa do meio, alíquotas de 5mL do meio de cultura preparado foram dispensadas em tubos de ensaio que foram esterilizados em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 121°C por 15min. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos de ensaio foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização.

Para o preparo do meio de cultura Ágar Mitis Salivarius (MSB) (Becton Dickison and Company Sparks, MD, USA), utilizado na semeadura das placas de Petri, foram proporcionados 90g do pó do meio de cultura e adicionados em um béquer contendo 1.000mL de água destilada. Após dissolução completa, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave (121°C; 15min). Após o resfriamento a aproximadamente 50°C, ainda na fase líquida, o meio foi dispensado em placas de Petri estéreis, que após solidificação e até o momento da semeadura do meio de cultura, foram armazenadas em geladeira a 5°C.

#### **4.5.3 Preparo do patógeno**

A cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi descongelada e 500µL da suspensão de microrganismos foram inoculados em um tubo de ensaio contendo 5mL de BHI. Para a reativação, o tubo de ensaio foi mantido em jarra de microaerofilia a 37°C<sup>5</sup> por 24h. A seguir, o tubo de ensaio foi agitado durante 30s. Três alçadas da suspensão foram semeadas em placa de Petri com meio de cultura Ágar Mitis Salivarius,<sup>71</sup> e levados à estufa bacteriológica a 37°C em jarra de microaerofilia<sup>5, 20, 25</sup> por 48h<sup>77, 83</sup>.



Concretizado o período de crescimento, a morfologia das colônias foi avaliada para confirmação macroscópica dos microrganismos. Verificada a viabilidade da cepa, a inoculação 500µL da suspensão de microrganismos em 5mL de BHI foi repetida, mantendo-se as mesmas condições e tempo de crescimento para posterior contaminação das amostras.

#### **4.5.4 Contaminação das amostras**

Para padronização da contaminação, a concentração do inócuo foi determinada em espectrofotômetro, utilizando-se densidade óptica de 600nm, 400µL de BHI como blank e o valor de 1,25 de absorbância como sendo a concentração equivalente a  $10^7$  UFC/mL de *Streptococcus mutans*.

Para a contaminação, os discos foram colocados, individualmente, em placas de microtitulação contendo 2mL de BHI. A seguir, 100µL de inócuo com concentração correspondente a  $10^7$  UFC/mL de *Streptococcus mutans* foram pipetados sobre as superfícies das amostras. As placas de microtitulação foram acondicionadas em jarra de microaerofilia<sup>5,20,25</sup> e mantidas durante 2h em incubadora com *shaker* a 37°C e com agitação de 75rpm<sup>25</sup>.

Para a remoção dos microrganismos não aderidos, após o período de 2h, as amostras foram assepticamente transferidas para novas placas de microtitulação e lavadas duas vezes em 0,6mL de solução salina. As placas de microtitulação foram posicionadas em jarra de microaerofilia e mantidas em incubadora com *shaker* a 37°C e com agitação de 75rpm durante

24h. Após este período, as amostras foram assepticamente transferidas para novas placas de microtitulação e lavadas duas vezes em 0,6mL de solução salina para remoção de microrganismos não aderidos.

Para o desprendimento dos microrganismos aderidos, as amostras foram assepticamente transferidas para eppendorfs contendo 1mL de solução salina. Os eppendorfs foram colocados em um suporte e mantidos em ultrassom durante 20min<sup>25</sup>.

#### **4.5.5 Diluição seriada e plaqueamento**

Após o período de 20min em ultrassom, 100µL do conteúdo do eppendorf com os microrganismos desprendidos foram transferidos para outro eppendorf contendo 900µL de solução salina. Este eppendorf foi agitado vigorosamente por 1min. Uma alíquota de 100µL foi removida deste eppendorf e transferida para um novo eppendorf. Tais procedimentos foram realizados mais cinco vezes, obtendo-se diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Após as diluições seriadas, uma alíquota de 25µL foi removida de cada eppendorf ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) e semeada em um dos quadrantes de uma placa de Petri com meio Ágar Mitis Salivarius. A solução foi espalhada com alça Drigalsky estéril em cada quadrante. Todo o procedimento de semeadura foi realizado em triplicata. As placas de Petri foram colocadas em jarra de microaerofilia e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h.

#### **4.5.6 Contagem de unidades formadoras de colônias**

A contagem das colônias para determinação do número de microrganismos viáveis (unidades formadoras de colônias - UFC/mL) foi realizada após 48h de incubação para crescimento dos microrganismos. Para cada triplicata, a contagem de colônias foi realizada nos quadrantes com valores entre 30 e 300 colônias. O cálculo de UFC/mL foi feito com base na seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times v \cdot 10^n}{q}$$

Sendo v equivalente ao volume total do eppendorf, n ao número absoluto da diluição (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), e q igual a quantidade pipetada em cada quadrante (25µL = 0,02mL). Os valores de UFC/mL obtidos foram transformados em logaritmo na base 10.

#### **4.5.7 Análise em microscopia eletrônica de varredura**

Para ilustrar a adesão de *Streptococcus mutans*, foram selecionadas amostras representativas de cada um dos grupos/subgrupos experimentais. Todos os procedimentos para a contaminação foram repetidos. Para análise em MEV, foram realizados procedimentos para a fixação das bactérias aderidas por meio da imersão dos discos em glutaraldeído 2,5% por 1h e subsequentemente, em solução alcoólica a 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20min cada. Com os microrganismos fixados à superfície da amostra, foi realizada a deposição de ouro e posteriormente, a adesão dos microrganismos foi visualizada no MEV.

## **4.6 Estatística**

Os dados qualitativos obtidos foram organizados em tabelas no programa Excel e analisados estatisticamente no programa Biostat 4.0.

Para análise e avaliação descritiva dos resultados obtidos foram utilizados média, desvio padrão, medianas. Os dados que não se ajustaram à curva de distribuição normal foram comparados por meio da análise de variância de Kruskal-Wallis associado ao teste de Dunn, ambos com nível de significância de 5%. Por outro lado, quando os resultados exibiram distribuição normal, foram analisados por meio da análise de variância a um fator, *one-way* ANOVA seguida do Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## 5 Resultado

### 5.1 Análise das propriedades de superfície

#### 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A topografia das superfícies das amostras de Ti cp e da liga TNZT com ( $A^+$ ) ou sem a realização de anodização ( $A^-$ ) são apresentadas nas Figuras 5 e 6. As micrografias das superfícies não anodizadas (Figuras 5a e 6a) exibem uma topografia regular com presença de grãos evidenciados pelo ataque químico com Kroll. A realização da anodização originou superfícies com topografia multiporosa, com a distribuição de poros de diferentes dimensões (Figuras 5b e 6b). De forma geral, o Ti cp apresentou maior número de camadas e poros mais regulares em relação à liga TNZT.

Figura 5- Micrografias do grupo T, subgrupos  $A^-$  (a) e  $A^+$  (b). Nota-se presença de grãos regulares evidenciados pelo ataque com Kroll, em (a) e a presença de poros em diferentes camadas em (b). Araraquara, 2013.

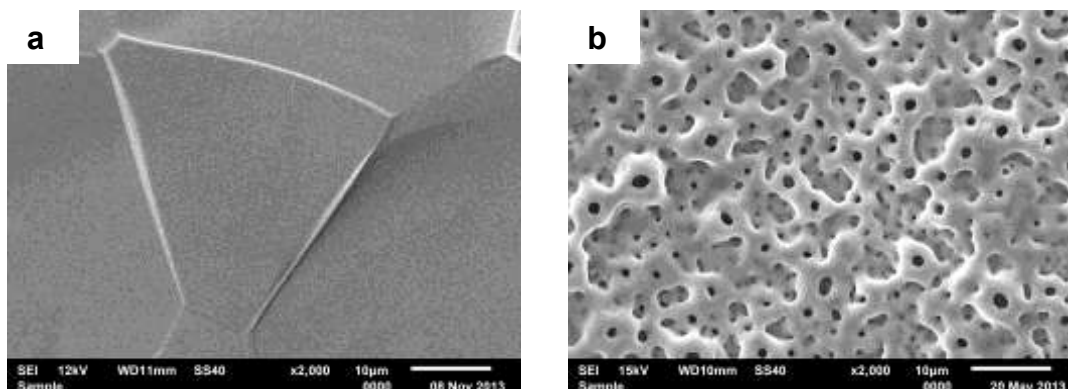
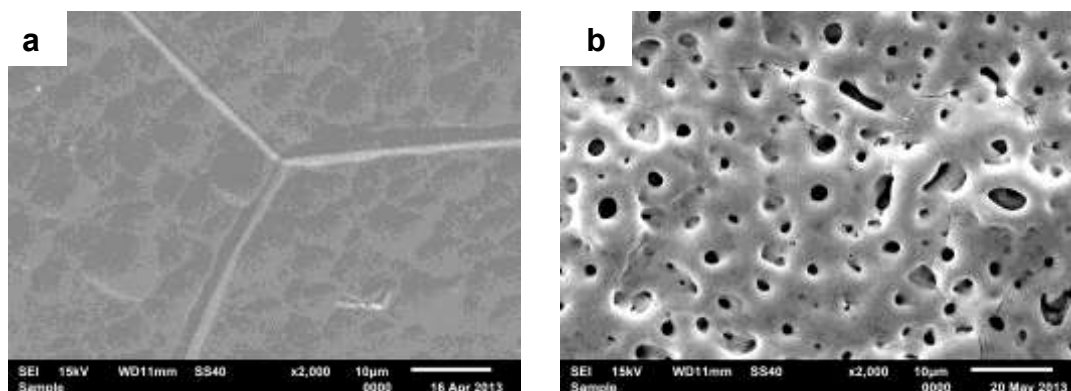


Figura 6- Micrografias do grupo TNZT, subgrupos A<sup>-</sup>(a) e A<sup>+</sup> (b). Nota-se presença de grãos regulares evidenciados pelo ataque com Kroll, em (a) e a presença de poros em diferentes camadas em (b). Araraquara, 2013.



### 5.1.2 Análise química (EDS)

Os espectros referentes à composição química qualitativa obtidos em EDS são apresentadas nos Gráficos de 1 a 4. Pode-se observar que a anodização com solução de  $\beta$ -glicerofosfato + acetato de cálcio propiciou a incorporação de íons cálcio e fósforo às superfícies das amostras anodizadas, fato confirmando quando se realizou o mapeamento das superfícies (Figuras 7 e 8)

Gráfico 1 - Composição química qualitativa de amostra do grupo T, subgrupo A<sup>-</sup> obtida pela técnica de EDS, apresentando picos de Ti. Araraquara, 2013.

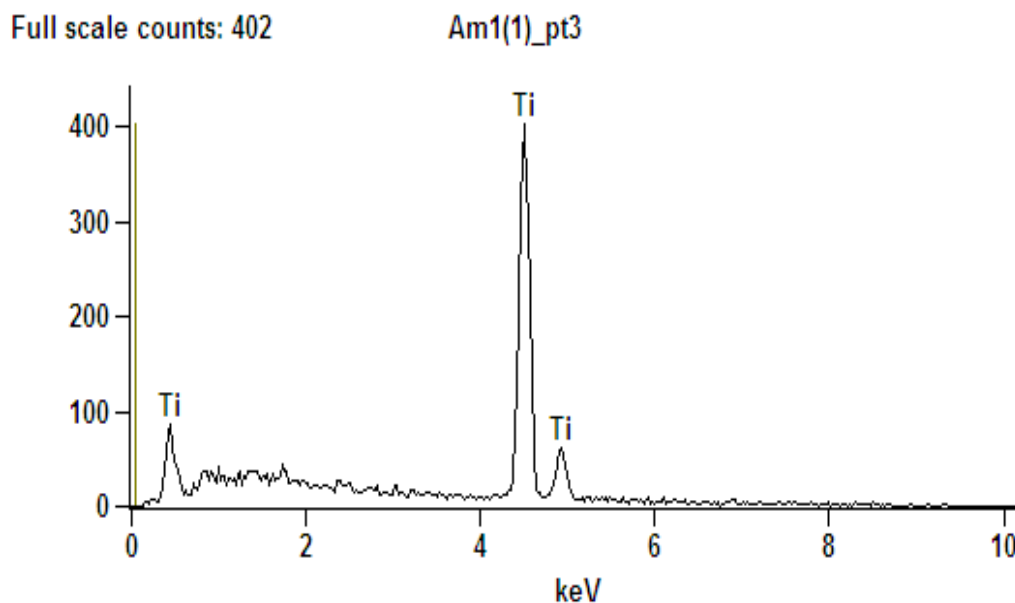


Gráfico 2 - Composição química qualitativa de amostra do grupo T, subgrupo A<sup>+</sup> obtida pela técnica de EDS. Nota-se além dos picos referentes ao elemento químico Ti, a presença oxigênio, cálcio e fósforo. Araraquara, 2013.

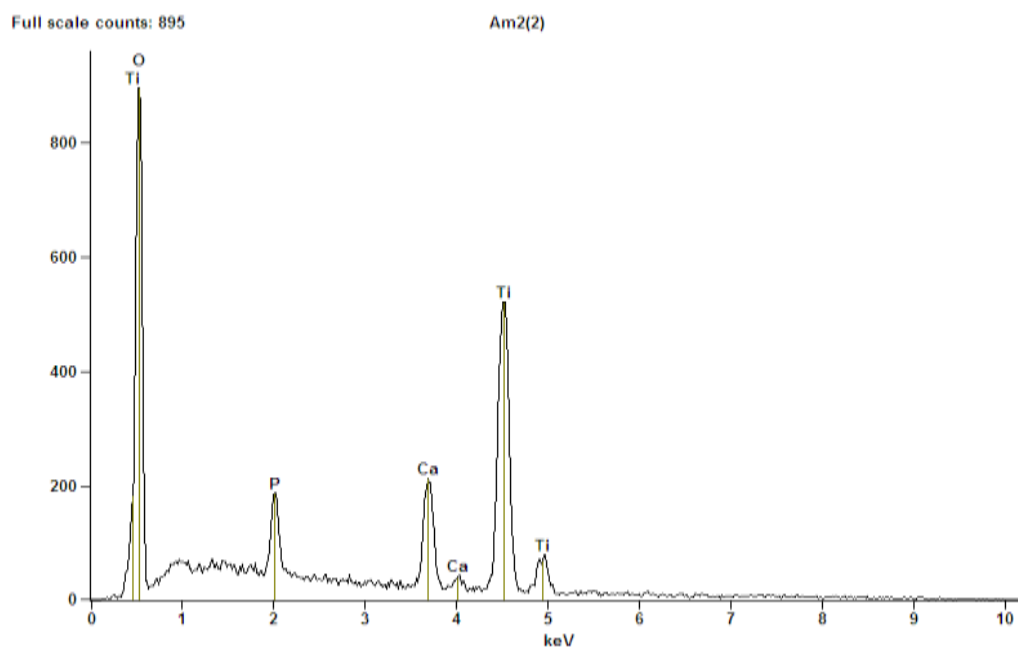


Gráfico 3 - Composição química qualitativa de amostra do grupo TNZT, subgrupo A<sup>-</sup>, obtida pela técnica de EDS, com picos de Ti, Nb, e Zr, além da presença de Ta. Araraquara, 2013.

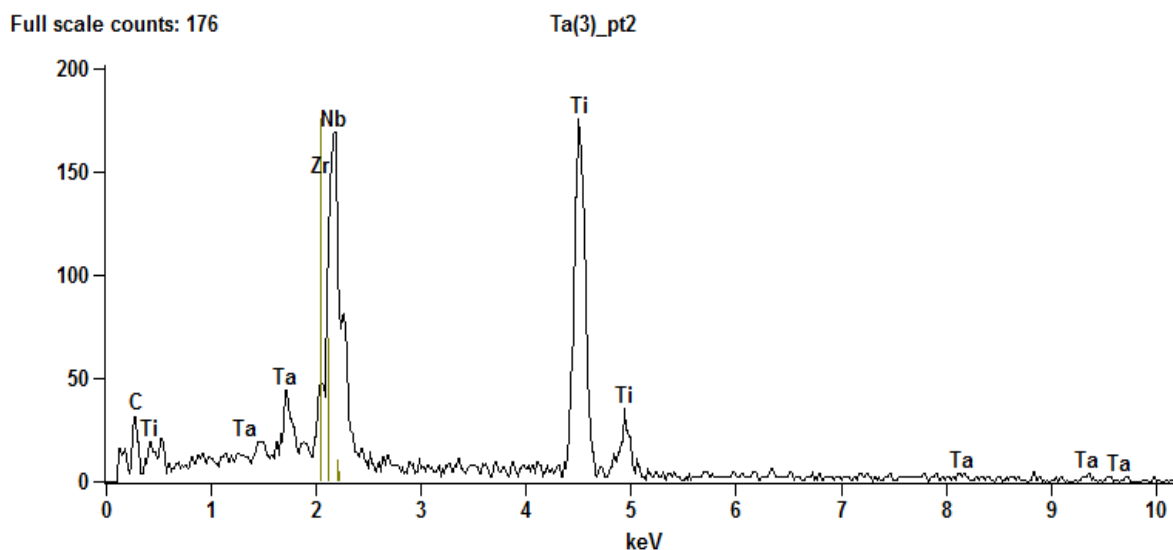


Gráfico 4 - Composição química qualitativa de amostra do grupo TNZT, subgrupo A<sup>+</sup>, obtida pela técnica de EDS. Observa-se além dos picos referentes aos elementos químicos Ti, Nb, Zr e Ta, a presença de oxigênio, cálcio e fósforo. Araraquara, 2013.

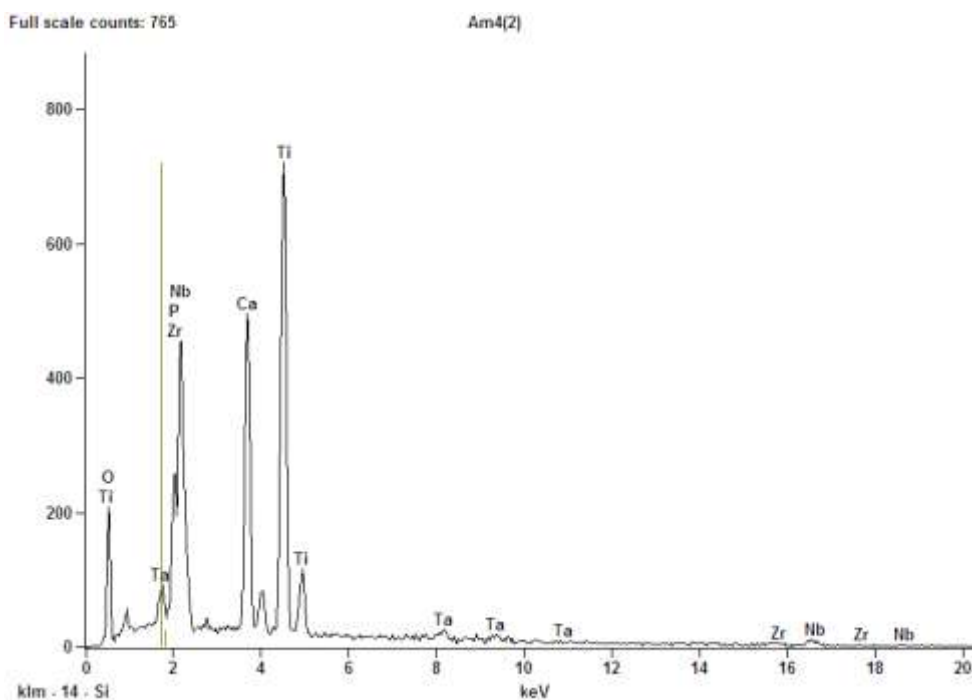




Figura 7- Mapeamento da superfície de uma amostra do grupo T, subgrupo A+. A- amostra, B- distribuição do oxigênio, C- distribuição do titânio, D- distribuição do cálcio, e E- distribuição do fósforo. Araraquara, 2013.

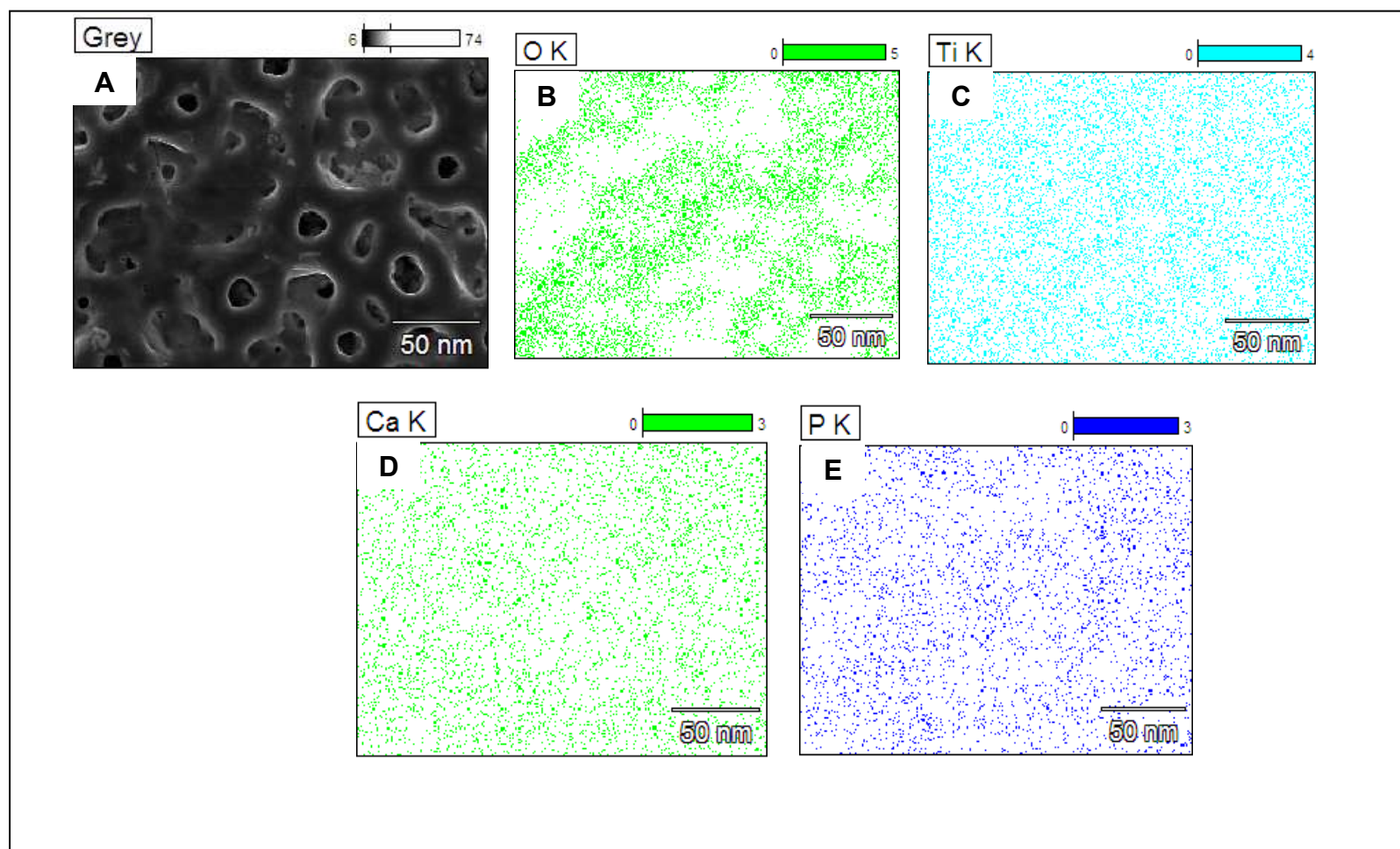
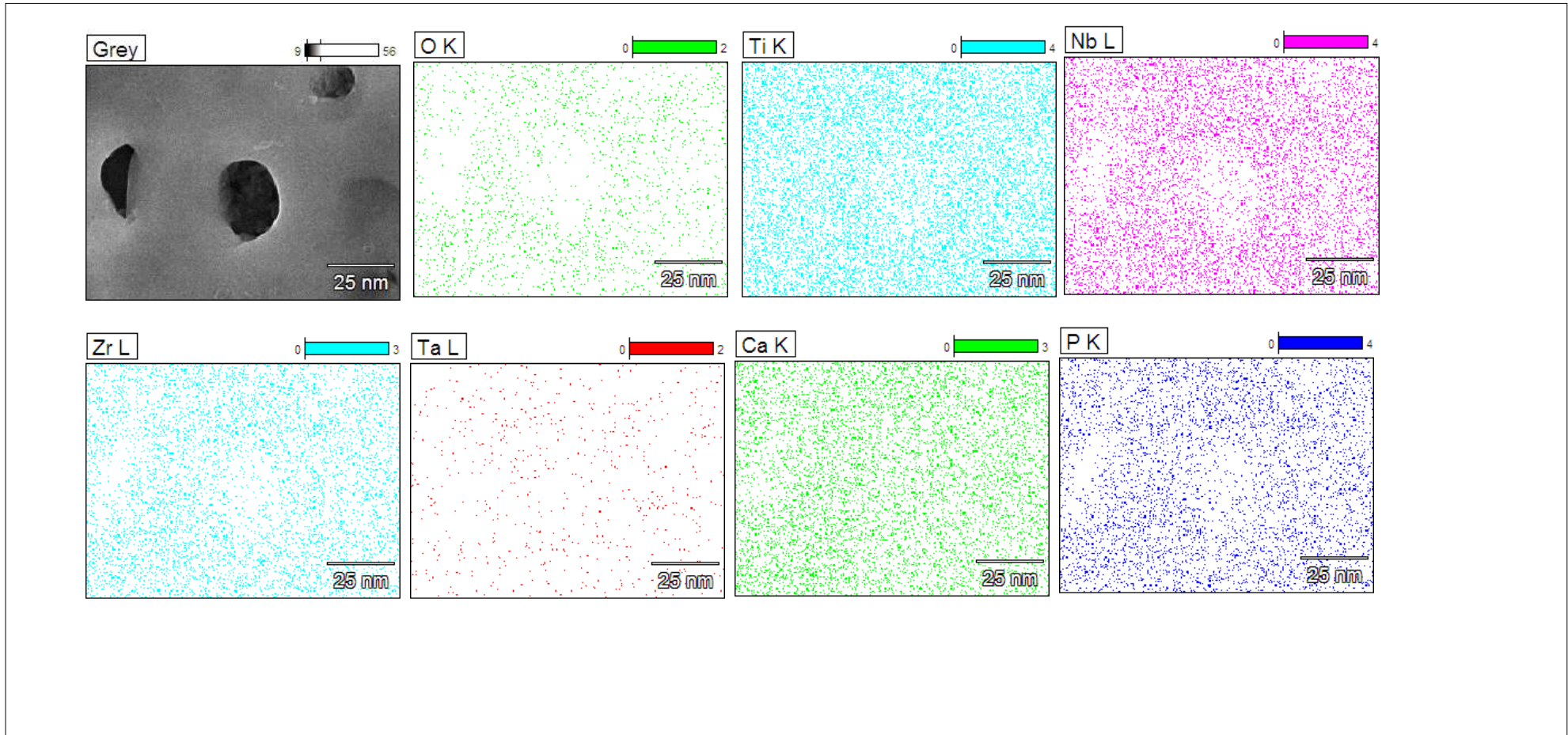


Figura 8- Mapeamento da superfície de uma amostra do grupo TZNT, subgrupo A<sup>+</sup>. A- amostra, B- distribuição de oxigênio, C- distribuição do titânio, D- distribuição do nióbio, E- distribuição de zircônio, F- distribuição de tântalo, G- distribuição de cálcio, H- distribuição de fósforo. Araraquara, 2013.



### 5.1.3 Energia Livre de superfície (ELS)

As Tabelas 4 e 5 apresentam as medianas referentes ao ângulo de contato de cada subgrupo experimental para cada um dos líquidos utilizados, bem como os valores da energia livre de superfície (ELS) determinados por meio do método Owen-Wendt-Rabel-Kaelble. Como os resultados não se ajustaram à curva de distribuição normal foram analisados por meio de análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis associado ao teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabela 4 – Medianas do ângulo de contato e resultados referentes ao teste de Kruskal-Wallis\*. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZA A <sup>-</sup>	TNZA A <sup>+</sup>	P
Água	70,20 <sup>b</sup>	31,60 <sup>a</sup>	68,60 <sup>b</sup>	38,00 <sup>a</sup>	< 0,0001
Etilenoglicol	32,30 <sup>bc</sup>	21,65 <sup>a</sup>	56,35 <sup>c</sup>	25,40 <sup>ab</sup>	< 0,0001
Polietilenoglicol	25,70 <sup>b</sup>	19,60 <sup>a</sup>	32,90 <sup>b</sup>	20,75 <sup>a</sup>	< 0,0001
Diiodometano	24,30 <sup>b</sup>	28,55 <sup>a</sup>	31,45 <sup>b</sup>	25,20 <sup>a</sup>	< 0,0001

Letras minúsculas iguais no sentido horizontal indicam igualdade entre as colunas

As comparações entre os subgrupos para um mesmo líquido indicaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Observa-se que os valores de ângulo de contato variaram apenas em função da realização da anodização uma vez que os subgrupos equivalentes não

\*Os resultados originais são apresentados nas Tabelas A7 a A18, e Figuras A9 a A12 do APÊNDICE.

exibiram diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, a diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) para a realização da anodização, tratamento que resultou em diminuição dos valores de ângulo de contato das amostras. Assim, de forma geral, pode-se dizer que a liga experimental (TNZT) exibiu valores similares aos do Ti cp e que a anodização diminuiu os valores de ângulo de contato de ambos, Ti cp e TNZT.

Com relação à ELS (Tabela 5), observou-se variação de valores em função da anodização, ou seja, o tratamento de superfície realizado aumentou os valores de ELS em ambos metais, Ti cp e TNZT. Também são apresentados nesta tabela, os componentes: d referente a componente de dispersão (apolar) e p a componente polar (segundo equação de OWRK), incluindo todas as interações entre o sólido e o líquido: dipolo-dipolo, dipolo induzido- dipolo, e pontes de hidrogênio.

Tabela 5 – Médias da Energia Livre de superfície (ELS), em mN/m, e suas partes dispersiva e polar. Araraquara, 2013.

	ELS	Dispersiva (d)	Polar (p)
Ti cp A <sup>-</sup>	44,24	37,81	6,43
Ti cp A <sup>+</sup>	56,88	19,41	37,47
TNZT A <sup>-</sup>	36,68	30,37	8,31
TNZT A <sup>+</sup>	53,64	21,67	31,97

### 5.1.4 Rugosidade média (Ra)

Os valores médios de Ra referentes aos subgrupos deste estudo são apresentados na Tabela 6. Como os resultados não se ajustaram à curva de distribuição normal foram analisados por meio de análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis associado ao teste de Dunn ( $\alpha = 0,05$ )<sup>1</sup>. Diferenças significantes foram obtidas tanto entre os diferentes metais testados como em função da realização da anodização, ou seja, a anodização aumentou a rugosidade das amostras e a liga experimental (TNZT) apresentou rugosidade média inferior a do Ti cp.

Tabela 6 – Medianas da rugosidade média (Ra, em  $\mu\text{m}$ ) segundo os grupos e subgrupos experimentais e resultados referentes ao teste de Kruskal-Wallis. Araraquara, 2013.

	Ti cp	TNZT	P
Sem anodização (A <sup>-</sup> )	0,975 <sup>Aa</sup>	0,175 <sup>Ab</sup>	< 0,05
Superfície Anodizada (A <sup>+</sup> )	1,210 <sup>Ba</sup>	0,531 <sup>Bb</sup>	< 0,05
P	< 0,05	< 0,05	

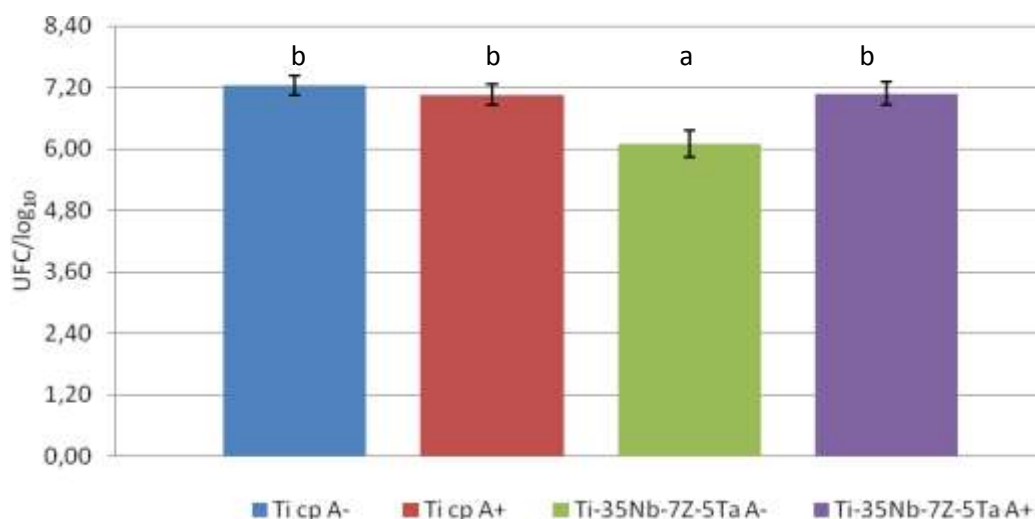
Letras maiúsculas sobrescritas indicam comparações entre as linhas; letras minúsculas sobrescritas indicam comparações entre as colunas

<sup>1</sup> Os resultados originais são apresentados nas tabelas 19 a 24 do APÊNDICE.

## 5.2 Análise da adesão bacteriana

As médias de UFC/mL na forma de logaritmo na base 10, referentes à avaliação da adesão do patógeno *S. mutans* na superfície das amostras são apresentados no Gráfico 5. Como os resultados se ajustaram à curva de distribuição normal foram analisados por meio da análise de variância a um fator (one-way ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ) associado ao teste de Tukey<sup>2</sup>. De acordo com o valor de  $p$  ( $< 0,00001$ ) resultante da análise estatística de variância, houve diferença significativa entre os subgrupos. As comparações resultantes do teste de Tukey indicaram que a anodização aumentou a adesão do patógeno apenas na liga experimental (TNZT).

Gráfico 5 – Médias e desvios-padrão referentes à adesão de *S. mutans* (em UFC/log<sub>10</sub>) segundo os grupos e subgrupos experimentais. Letras minúsculas diferentes indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ). Araraquara, 2013.



<sup>2</sup> Os resultados originais são apresentados nas tabelas 25 a 27 do APÊNDICE.

As Figuras 9 e 10 apresentam as micrografias (aumento de 3000 vezes) das superfícies Ti cp e TNZT com a adesão de *Streptococcus mutans*. Nenhuma diferença no padrão de adesão pôde ser detectada entre os subgrupos experimentais T A<sup>+</sup> e TNZT A<sup>+</sup>, corroborando a igualdade nos valores de UFC/mL apresentados anteriormente. Porém nos subgrupos experimentais T A<sup>-</sup> e TNZT A<sup>-</sup> percebe-se menor número de microrganismos aderidos em TNZT A<sup>-</sup> do que em T A<sup>-</sup>.

Figura 9- Adesão de *Streptococcus mutans* às superfícies: (a) subgrupo T A<sup>-</sup>, e (b) subgrupo T A<sup>+</sup>. Observa-se grande quantidade de microrganismos aderidos em ambas às superfícies. Araraquara, 2014.

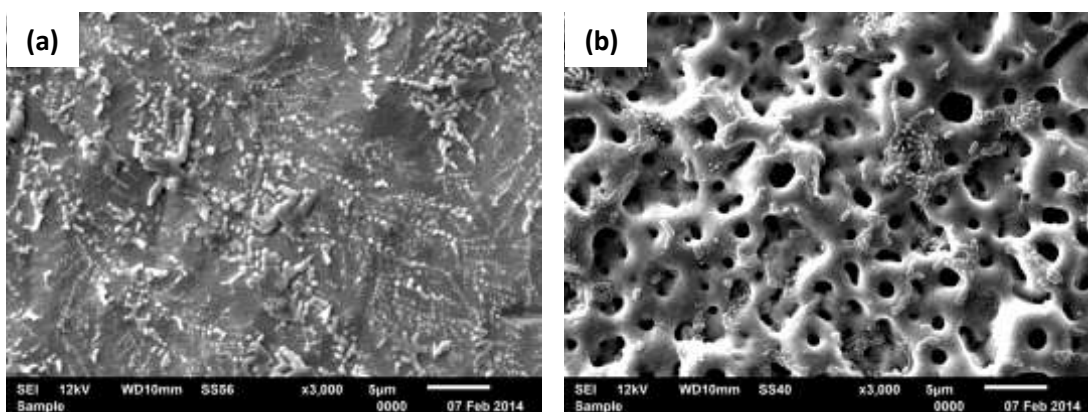
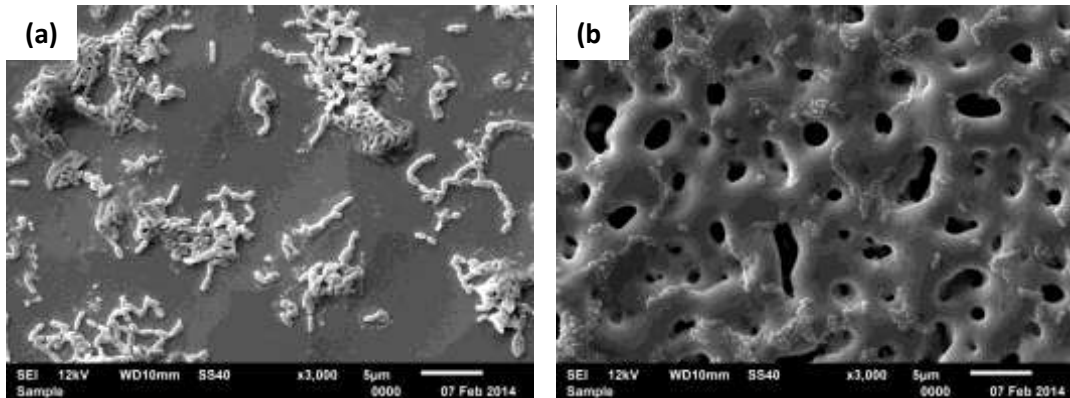


Figura 10- Adesão de *Streptococcus mutans* às superfícies: (a) subgrupo TNZT A<sup>-</sup>, e (b) subgrupo TNZT A<sup>+</sup>. Observa-se grande quantidade de microrganismos aderidos em ambas às superfícies. Araraquara, 2014.





## 6 Discussão

Nas últimas décadas, verifica-se que a implantodontia vem dispensando especial atenção ao estudo e desenvolvimento de materiais e técnicas que visem aperfeiçoar a interação entre a superfície do implante e os tecidos circundantes<sup>53</sup>. Diferentes métodos, tais como ataque ácido, ataque ácido + deposição de íons Ca e P, jateamento com alumina, jateamento com TiO<sub>2</sub>, jateamento com TiO<sub>2</sub>, + tratamento com ácido fluorídrico, jateamento com fosfato de cálcio e anodização são utilizados pela indústria. Além das vantagens e desvantagens inerentes ao uso de cada uma das técnicas, destaca-se na literatura que apesar dos tratamentos de superfície melhorarem os índices de sucesso do ponto de vista cirúrgico, podem causar complicações inflamatórias nos tecidos circundantes<sup>66</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo consistiu em analisar as propriedades de superfície de uma nova liga de titânio, a liga TNZT, com ou sem a realização de anodização com íons Ca e P, bem como a adesão de *S. mutans* sobre estas superfícies, comparando a liga TNZT com o Ti cp. Com relação à primeira etapa do trabalho, a qual consistiu na avaliação das propriedades de superfície, rejeitou-se a hipótese nula uma vez que a anodização com β-glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio alterou a composição química, topografia, rugosidade média, ângulo de contato e energia livre de superfície da liga TNZT e do Ti cp.

O titânio é um metal altamente reativo com o oxigênio. Em contato com o ar forma naturalmente uma camada de óxido inicialmente

bioinerte devido ao baixo grau de organização de suas estruturas cristalinas, uma vez que este óxido formado apresenta fina espessura. Conforme ocorre o aumento da espessura do óxido do titânio aumenta também a cristalinidade deste óxido<sup>16</sup>. Assim, modificação de superfície deste metal por meio da anodização é capaz de produzir óxidos cristalinos altamente organizados e com maior espessura que promoveram mudanças nas propriedades de superfície do titânio, tais como: topografia, ângulo de contato, energia livre de superfície, e rugosidade superficial<sup>38,48</sup>.

Antes da realização do tratamento de superfície, as amostras de Ti cp e da liga TNZT exibiam topografia regular com a evidenciação de grãos devido ao ataque químico com solução de Kroll (Figuras 5a e 6a). Após a anodização, as amostras passaram a exibir uma superfície multiporosa com incorporação de íons Ca e P em toda a superfície (Figuras 7 e 8). As amostras apresentaram distribuição de poros com orifícios de diâmetros aproximados de 1,60  $\mu\text{m}$ , valores semelhantes (1,67  $\mu\text{m}$ ) aos relatados por Ishizawa, Ogino<sup>33</sup> (1995). As amostras de Ti cp (Figura 5b) parecem exibir maior número de camadas e de microprojeções em relação à liga TNZT (Figura 6b), cuja estrutura e topografia parecem ser menos organizadas.

A técnica de anodização eletroquímica por meio do método potencioestático que foi utilizado neste estudo consiste na aplicação de voltagem constante e corrente elétrica variável entre um ânodo e cátodo. Dessa forma, ocorrem reações no eletrodo (oxidação e redução) em combinação com a difusão dos íons em direção ao ânodo que levam a formação de uma camada de óxido na superfície do ânodo. Segundo Liu et al.<sup>49</sup> (2010) e Yu et al.<sup>85</sup> (2011), as reações de oxirredução propiciam aumento

da temperatura na interface metal/eletrólito bem como a liberação de oxigênio e/ou vapor de água, os quais levam à formação de multicamadas porosas. O crescimento desta camada de óxido depende da voltagem e corrente aplicada, composição do eletrólito, e tempo de anodização <sup>16,38</sup>.

Ainda como resultado da reação de oxirredução, pode ocorrer a incorporação dos íons às superfícies multiporosas formadas durante o processo de anodização devido às descargas elétricas que atraem os íons do eletrólito para a superfície, <sup>74</sup> justificando, portanto, a incorporação de Ca e P observadas no mapeamento das superfícies anodizadas (Figuras 7 e 8).

A incorporação destes íons na superfície do titânio e suas ligas já foi relatada anteriormente, sendo associada ao aumento da osseointegração <sup>27,75</sup> devido aos íons Ca e P serem adsorvidos à camada de TiO<sub>2</sub> e fornecerem uma ponte bioquímica entre o implante e as macromoléculas. Estas macromoléculas apresentam alta afinidade, principalmente pelo cálcio, e se ligam a este desencadeando um mecanismo de adsorção de proteínas, que culminará em maior quantidade de tecido ósseo neoformado. Outros estudos vêm avaliando a bioatividade das superfícies dos implantes de titânio, com constatações de que superfícies com topografia microporosa podem aumentar a bioatividade dos implantes <sup>6,36,56</sup>, uma vez que a estrutura de poros formada nas superfícies tratadas facilita a ancoragem de osteócitos, aumentando a formação de tecido ósseo e melhorando, portanto, a osseointegração <sup>78,90</sup>.

Corroborando os resultados deste estudo, segundo Le Guehenec et al.<sup>44</sup> (2007), e Yu et al.<sup>85</sup> (2011), além das alterações

composicionais e topográficas (incorporação de cálcio e fósforo e formação de poros), também podem ocorrer alterações na energia livre de superfície, ângulo de contato, e rugosidade de superfícies após anodização na presença de íons cálcio e fósforo. Tais propriedades são destacadas por Elias et al<sup>23</sup>. (2008) como aquelas consideradas mais importantes quando do desenvolvimento de novos implantes. As interações hidrofóbicas e hidrofílicas (molhabilidade) desempenham um papel fundamental na interação entre a superfície de biomateriais e elementos biológicos como proteínas, bactérias e células<sup>81</sup>. Por exemplo, regiões hidrofílicas de proteínas tem afinidade e aderem às superfícies hidrofílicas de um material, sendo repelida por superfícies hidrofóbicas. Assim o aumento de adsorção de proteínas pelos biomateriais pode levar a um aumento no número de células aderentes (propiciando maior deposição de cálcio, por exemplo), favorecendo a osseointegração<sup>81</sup>.

Para definir a hidrofobicidade/hidrofilicidade de um material é necessário realizar mensurações do ângulo de contato de sua superfície<sup>58</sup>. De maneira geral, o conceito de hidrofobicidade e hidrofilicidade é determinado em relação à interação com a água, líquido que possui caráter polar. Quando há formação de um ângulo de contato menor que 90°, esta superfície é considerada hidrofílica, porém, se o valor for superior a 90°, o material será considerado hidrofóbico<sup>58</sup>. A utilização da água é considerada fundamental quando materiais utilizados como dispositivos de implantes são avaliados, uma vez que 70% do corpo humano é constituído por água. Ao ser implantado o biomaterial entra em contato com o sangue, porém para ser um bom biomaterial é necessário que além de apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos, estimulando uma resposta

adequada, seja hemocompatível, ou seja tenha boa compatibilidade com o plasma sanguíneo que em sua maioria (93%) é formado por água<sup>18</sup>.

No presente estudo, as superfícies de titânio anodizadas apresentaram redução nos valores de ângulos de contato após a realização da anodização (Tabela 4). Em água destilada, as amostras de Ti cp apresentaram ângulo de contato inicial igual a 70,2° e após o tratamento por anodização o ângulo de contato foi reduzido para 31,6°. Com este mesmo líquido, as amostras de TNZT apresentaram valores iguais a 68,6° e 38,0°, respectivamente antes e após a anodização. Zhu et al.<sup>89</sup> (2004) observaram diminuição nos valores de ângulos de contato em amostras de Ti cp anodizadas com íons cálcio e fósforo, no qual amostras controle sem tratamento apresentavam ângulos de 75,0° e após tratamento passaram para 45,0°. Diminuição nos valores de ângulo de contato também foram observados por Kim et al.<sup>40</sup> (2013) em amostras de Ti cp. Antes do tratamento por anodização, suas amostras exibiam ângulo de contato de 87,2°, e após a incorporação de íons cálcio e fósforo este valor diminuiu para 65,7°. Já Huan et al.<sup>31</sup> (2014) utilizando um eletrólito diferente com ácido fluorídrico observaram que os valores de ângulo de contato para liga NiTi, inicialmente iguais a 70° diminuíram para 15°.

Diferentes valores de ângulo de contato, bem como diferentes reduções desta propriedade após anodização podem ocorrer em consequência à variação nos parâmetros utilizados na anodização (voltagem, tempo de anodização, composição do eletrólito, etc). Ao estudar diferentes voltagens para anodização (140V, 200V, 260V e 300V), Zhu et al.<sup>89</sup> (2004) verificaram relação inversamente proporcional entre a voltagem e o ângulo de

contato em amostras de Ti cp após incorporação dos íons cálcio e fósforo, sendo que com o aumento da voltagem ocorria diminuição nos valores de ângulo de contato. Neste mesmo trabalho, os autores ainda destacaram que a diminuição dos valores de ângulo de contato também se associa ao aumento na rugosidade superficial das amostras, uma vez que com o aumento da voltagem aplicada mais rugosa se tornou a superfície, e maior número de poros e camadas formadas podem ter facilitado a dissipação do líquido, diminuindo, portanto os valores de ângulos de contato.

Medidas de ângulo de contato fornecem apenas uma idéia sobre hidrofiliidade/hidrofobicidade de uma superfície em relação a apenas um líquido (a água). Porém estas medidas são bastante importante quando utilizadas principalmente em testes para definição da energia livre de superfície de amostras que é um parâmetro que melhor caracteriza a superfície de sólidos por utilizar diferentes tipos de substâncias líquidas com diferentes polaridades<sup>58</sup>. Apesar de não poder serem divididas em duas categorias distintas: moléculas polares e apolares pela simples razão de que a polaridade é uma grandeza que pode variar continuamente de zero até um valor máximo (que corresponde a uma substância totalmente iônica), pode-se utilizar substâncias com valores de polaridade definidos como por exemplo, a água (polaridade igual a 52,0), o etilenoglicol (polaridade igual a 19,0), o polietilenoglicol (polaridade igual a 13,0), e o diiodometano (polaridade igual a 2,0) necessários para se estabelecer o gráfico de energia livre de superfície<sup>18</sup>. O valor da energia de superfície total das amostras anodizadas demonstrou comportamento contrário ao ângulo de contato, ou seja, maior valor de energia

livre de superfície em amostras anodizadas, resultados correspondentes aos descritos por Huan et al.<sup>31</sup> (2014), e Takebe et al.<sup>79</sup> (2012).

Em seu estudo Takebe et al.<sup>79</sup> (2012) avaliaram a energia livre de superfície em amostras de Ti cp anodizadas com íons cálcio e fósforo e obtiveram aumento na energia livre de superfície destas amostras. As amostras sem tratamento apresentavam ELS inicial de  $35,7\text{mJ/m}^2$  e após anodização aumentaram para  $62,8\text{ mJ/m}^2$ . Em outro estudo também em relação à energia livre de superfície Huan et al.<sup>31</sup> (2014) relataram aumento da energia de superfície total em amostras de NiTi após anodização com íons flúor, passando de  $40,0\text{mN/m}$  para  $80,0\text{ mN/m}$ .

Segundo Sul et al.<sup>76</sup> (2005) a redução nos valores de ângulo de contato associada ao aumento da energia livre de superfície em amostras anodizadas pode ser atribuída às alterações na rugosidade de superfície devido à formação da camada de microporos. A camada multiporosa das superfícies anodizadas pode permitir que o líquido dispensado sobre a superfície se dissipe em direção ao interior dos poros, diminuindo desta forma os valores de ângulo de contato<sup>8</sup>. A anodização com íons cálcio e fosfato promove a diminuição dos valores de ângulos de contato, o que por sua vez aumenta a hidrofiliabilidade da superfície de titânio, contribuindo para maior adsorção de proteínas e por consequência aumento da atividade celular<sup>34,39</sup>.

Dentre as propriedades de superfície, além da molhabilidade e energia livre de superfície, variações na rugosidade média das superfícies de implantes também vêm sendo diretamente associadas a efeitos nos processos de osteocondução<sup>17</sup>.

Segundo Albrektsson, Wennerberg<sup>2</sup> (2004), a rugosidade média da maioria dos implantes comercializados pode ser dividida em quatro categorias, (1) superfícies lisas com valores de  $Ra < 0,5 \mu\text{m}$ , (2) superfícies minimamente rugosas com  $Ra$  entre  $0,5$  e  $1 \mu\text{m}$ , (3) superfícies moderadamente rugosas com  $Ra$  entre  $1$  e  $2 \mu\text{m}$ , e (4) superfícies rugosas com valores de rugosidade média superiores a  $2 \mu\text{m}$ . Desta forma amostras de Ti cp e TNZT, que no presente estudo podem ser classificadas como minimamente rugosas e lisas, respectivamente, passaram a ser classificadas como superfícies moderadamente rugosa e minimamente rugosas. O aumento nos valores de  $Ra$  após anodização está de acordo com outros autores<sup>46, 69, 73, 88, 89</sup>, que obtiveram aumento da rugosidade na ordem de 10 vezes em amostras de Ti-6Al-4V (passando de  $0,27\mu\text{m}$  e  $2,8\mu\text{m}$ , respectivamente antes e após anodização). Da mesma forma Tao et al.<sup>78</sup> (2009), também observaram aumento de rugosidade na liga Ti-24Nb-4Zr-7,9Sn, de  $0,08\mu\text{m}$  para  $0,30\mu\text{m}$ . O aumento da rugosidade média das superfícies após a anodização com cálcio e fósforo se deve a formação da camada multiporosa, ou seja, a presença de poros em diferentes camadas torna a superfície mais irregular, aumentando a rugosidade média das mesmas<sup>89</sup>. Estudos como de Le Guéhennec et al.<sup>44</sup> (2007), observaram que superfícies de titânio com maior rugosidade são requeridas para manter a estabilidade mecânica da deposição do revestimento de cálcio e fósforo. Além disso, Albrektsson, Wennerberg<sup>2</sup> (2004) concluíram que superfícies de implantes mais rugosas aumentam o contato osso-implante. Isto demonstra a importância desta propriedade de superfície para se obter uma forte relação de osseointegração. O aumento da rugosidade de superfícies



anodizadas pode ser benéfico melhorando a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas<sup>17,69</sup>, em virtude da maior área de superfície para a adsorção de proteínas que são potentes indutoras de adesão celular<sup>17</sup>.

Neste estudo também foram verificadas diferenças significantes entre os diferentes metais testados, no qual a liga experimental (TNZT) apresentou rugosidade média inferior a do Ti cp em ambas as situações, antes e após a realização de tratamento de superfície. Tal ocorrência pode ser atribuída à sua composição. Mesmo após o ataque ácido com solução de Kroll, a liga que parecia ter os grãos menos evidenciados, já apresentava maior lisura inicial. Após anodização, a liga TNZT apresenta um aumento dos valores de Ra, porém mantém a característica de apresentar rugosidade média inferior ao Ti cp. A menor rugosidade da liga TNZT possivelmente resultou na formação de menor número de camadas de poros, e poros menos regulares em relação ao Ti cp.

Cabe ressaltar que o sucesso dos implantes dentais depende não somente em propiciar o processo de osseointegração como também impedir a colonização bacteriana a estes dispositivos. As superfícies de implantes de titânio instaladas na cavidade bucal estão sujeitas a colonização por bactérias e formação do biofilme, e esta colonização pode causar destruição dos tecidos moles ao redor do implante como também destruição do tecido ósseo, levando a falha dos mesmos<sup>26</sup>. Assim, este estudo também avaliou a adesão bacteriana aos metais, rejeitando-se a segunda hipótese nula, visto que a anodização com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio alterou a adesão de *S. mutans* na superfície da liga TNZT.

Dentre as várias bactérias presentes na cavidade bucal o *S. mutans* é tido como principal cepa microbiana causadora da placa dental<sup>4</sup>. A avaliação de adesão deste patógeno no presente estudo se deve por este ser conhecido como uma estirpe de bactérias primárias que preparam o ambiente para a adesão e acúmulo das bactérias secundárias presentes no local da implantação, em particular ao redor dos implantes dentais<sup>84</sup>. Dessa forma o *S. mutans* age como colonizador primário facilitando a colonização secundária por bactérias periodontopatógenas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, e *Streptococcus sanguinis*.

Com o objetivo de diminuir ou impedir a colonização bacteriana, alguns métodos de tratamento de superfícies de implantes vêm sendo desenvolvidos atualmente<sup>51,82</sup>. Dentre estes métodos, a modificação de superfície por meio da anodização além de aumentar a espessura das camadas de óxido do titânio, propicia também a formação de uma camada mista de óxidos com a presença não apenas de rutilo, mas também de anatase na superfície do metal<sup>11</sup>. Segundo Scarano et al.<sup>72</sup> (2010), nanopartículas de anatase presentes na superfície podem atribuir características antimicrobianas ao titânio devido ao seu poder de oxidação, que promove a liberação de radicais livres tais como hidroxila, radical superóxido, e peróxido de hidrogênio que por sua vez resultam na lise das bactérias.

Glantz<sup>29</sup>, em 1969, foi o primeiro pesquisador a reconhecer a existência de uma correlação positiva entre ELS e quantidade de acúmulo de placa/biofilme, em um estudo in vivo, ao avaliar superfícies de esmalte, dentina e materiais restauradores com diferentes ELS em relação à quantidade de

biofilme formado em períodos de 1, 3 e 7 dias. Quirynen et al.<sup>61</sup> (1993) avaliaram a influência da energia livre de superfície na maturação do biofilme supra e subgingival ao redor de implantes. Foram acompanhados pilares de implantes com alta (titânio) e baixa (recobrimento com teflon) energia livre de superfície, durante o período de 3 meses. Os resultados demonstraram que os substratos com baixa ELS apresentaram menor quantidade de biofilme maduro tanto supra quanto subgingival (com maior proporção de cocos, e menor proporção de organismos móveis e espiroquetas). Dessa forma a diminuição na formação de biofilme em superfícies com menor ELS pode ser parcialmente explicada devido a baixa resistência de ligação entre as bactérias e substrato, provavelmente por causa de uma falha coesiva na camada tratada<sup>13</sup>. Por outro lado, Quirynen et al.<sup>60</sup> (1990), ao avaliarem diferentes superfícies com mesma rugosidade e diferentes ELS, verificaram ausência de diferença na quantidade de placa aderida às superfícies, sugerindo não haver influência da ELS sobre o biofilme aderido em superfícies de mesma rugosidade.

A adesão e a retenção dos microrganismos ocorrem em quatro fases: (1) transporte de nutrientes dos microrganismos para o substrato; (2) adesão inicial; (3) adesão por meio de interações específicas e (4) colonização das superfícies<sup>9,63</sup>. A adesão inicial de um microrganismo a um substrato se deve a interações entre forças atrativas de Van der Waals e forças eletrostáticas repulsivas. Após esta fase, ocorre o segundo estágio de adesão por meio de ligações iônicas, covalentes, ou pontes de hidrogênio. Esta segunda fase de adesão é considerada irreversível, e ocorre, preferencialmente, em superfícies rugosas, onde os microrganismos estarão protegidos contra forças de remoção<sup>62,64</sup>. Por este motivo, a rugosidade de

superfície tem demonstrado ser uma variável importante na formação de placa  
30,62 .

Com o aumento da rugosidade, aumenta-se também a área de superfície (em cerca de duas a três vezes) que pode facilitar a maior adesão bacteriana<sup>61</sup>. Segundo Bollen et al.<sup>9</sup> (1996) e Quirynen et al.<sup>61</sup> (1993) reduzir a rugosidade abaixo do padrão de 0,2µm não influenciam na quantidade de biofilme formado sobre as superfícies de implantes. Desta forma, com relação ao Ti cp, uma possível explicação para não haver diferença estatística significativa entre superfície sem tratamento e anodizada em relação à adesão de *S. mutans*, ou seja, não haver aumento na adesão de *S. mutans* após anodização, se encontra nos valores de rugosidade média superficial. As superfícies de Ti cp sem tratamento apresentavam rugosidade de 0,97µm, e após a anodização a rugosidade aumentou para 1,2 µm, aumento de 0,2µm, pode não ter sido suficiente para alterar e promover aumento da adesão de *S. mutans* à superfície do Ti cp.

Assim, pode-se dizer que o aumento da adesão de *S. mutans* na superfície anodizada da liga TNZT parece estar mais associado à quantidade de aumento nos valores de Ra do que ao aumento da energia livre de superfície, uma vez que o Ti cp anodizado apresentou valores de ELS muito próximos aos mensurados na liga experimental anodizada.

Embora tenha sido bem conduzido, o presente estudo apresenta limitações. Avaliou-se a adesão bacteriana em superfícies anodizadas incorporando íons cálcio e fósforo, como próximo passo os resultados deste estudo deveriam ser transferidos para um modelo microbiológico utilizando microrganismos anaeróbios específicos relacionados

a doença perimplantar para averiguar a resposta das superfícies anodizadas em relação a adesão. Em estudos futuros com a estratégia de utilizar técnicas de modificação de superfície por anodização pode-se incorporar diferentes íons como a prata e o magnésio para testar seus potenciais antimicrobianos.

## 7 Conclusão

Pode-se concluir que:

- A anodização com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio alterou as propriedades de superfície, composição química, topografia, rugosidade média e energia livre de superfície da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta e do Ti cp.

- A anodização com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e acetato de cálcio aumentou a adesão de *Streptococcus mutans* apenas na superfície da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

- O aumento da rugosidade de superfície e energia livre de superfície facilitaram maior formação de biofilme em superfícies de Ti-35Nb-7Zr-5Ta anodizadas.

## 8 Referências\*

1. Afonso CRM, Ferrandini PL, Ramirez AJ, Caram R. High resolution transmission electron microscopy study of the hardening mechanism through phase separation in a  $\beta$ -Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy for implant applications. *Acta Biomater.* 2010; 6 (4): 1625-9.
2. Albrektsson T, Wenneberg A. Oral implant surfaces: Part 1 – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17 (5):536-46.
3. Al-Radha ASD, Dymock D, Younes C, O`Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J. Dent.* 2012; 40 (2): 146-53.
4. Baca P, Castillo AM, Baca AP, Liébana MJ, Junco P, Liébana J. Genotypes of *Streptococcus mutans* in saliva versus dental plaque. *Arch Oral Biol.* 2008, 53 (8): 751-4.
5. Barbour ME, O'Sullivan DJ, Jenkinson HF, Jagger DC. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonization of titanium abutments. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18 (7): 1439-47.
6. Barrere F, Snel MME, Van Blitterswijk CA, De Groot K, Layrolle P. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. *Biomaterials.* 2004; 25 (14): 2901–10.

---

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

7. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Cer Soc.* 2008; 28 (7): 1319-27.
8. Bico J, Thiele U, Quere D. Wetting of textured surfaces. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects.* 2002; 206: 41-6.
9. Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7 (3): 201-11.
10. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. *Titanium in medicine.* Berlin: Springer; 2001.
11. Busquim TP, Kuri SE, Elias CN, Lima JHC, Muller CA. Characterization of titanium oxide into different dental implant surface treatments. *Implant News.* 201; 9 (2): 207-14.
12. Busscher HJ, Van Pelt WJ, De Boea P, de Jong MP, Arends J. The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids Surf.* 1984, 9 (4): 319-31.
13. Busscher HJ, Bos R, Van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *EEMS Microbiol Letters.* 1995, 128 (3): 229-34.
14. Cai Z, Shafer T, Watanabe I, Nunn ME, Okabe T. Electrochemical characterization of cast titanium alloys. *Biomaterials.* 2003; 24 (2): 213-8.
15. Caous JS, Lövenklev M, Fäldt J, Langton M. Adhesion of *Streptococcus mitis* and *Actinomyces oris* in co-culture to machined and anodized titanium surfaces as affected by atmosphere and pH. *BMC Oral Health.* 2013; 13: 4.



16. Chen JZ, Shi YL, Wang L, Yan FY, Zhang FQ. Preparation and properties of hydroxyapatite-containing titania coating by micro-arc oxidation. *Mater Lett.* 2006, 60 (20): 2538.
17. Conserva E, Lanuti A, Menini M. Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2010, 25 (6):1099-107.
18. Cruz NC, Rangel EC, Wang J, Trasferettib BC, Davanzob CU, Castro SGC, Moraes MAB. Properties of titanium oxide films obtained by PECVD. *Surf Coat Tech.* 2000; 126 (2-3): 123-30.
19. Cydzik EK, Kowalski K., Glazowska I. Electrochemical formation of bioactive surface layer on titanium. *J Achiev Mater Manufact Eng.* 2006; 18 (1-2): 147-50.
20. Duarte PM, Reis AF, de Freitas PM, Ota-Tsuzuki C. Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. *J Periodontol.* 2009; 80 (11): 1824-32.
21. Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials.* 1996; 17 (14): 1399-403.
22. Elias LM. Avaliação microestrutural e mecânica das ligas Ti-41,1Nb-7,1Zr e Ti-35,3Nb-7,1Zr-5,1Ta para aplicação biomédica. [dissertação de mestrado]. Lorena: Faculdade de Engenharia da USP; 2006.
23. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Mater.* 2008; 1 (3): 234-42.

24. Ergun C, Liu H, Halloran JW, Webster TJ. Increased osteoblast adhesion on nanograined hydroxyapatite and tricalcium phosphate containing calcium titanate. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 80 (4): 990–97.
25. Fais LMG, Carmello JC, Spolidorio DMP, Adabo GL. Streptococcus mutans adhesion to titanium after brushing with fluoride and fluoride-free toothpaste simulating 10 years of use. *Int J Oral Maxillofac Impl*, 2013; 28 (2): 463-9.
26. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010; 89 (1): 8-18.
27. Frojd V, Franke-Stenport V, Meirelles L, Wennerberg A. Increased bone contact to a calcium-incorporated oxidized commercially pure titanium implant: an in-vivo study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; 37 (6): 561–6.
28. Frojd V, Chávez de Paz L, Andersson M, Wennerberg A., Davies JR, Svensater G. In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. *Molec. Oral Microbiol*. 2011; 26 (4): 241-52.
29. Glantz PO. On wettability and adhesiveness: a study of enamel, dentine, some restorative dental materials, and dental plaque. *Odontol Revy*. 1969, 20: 1-132.
30. Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, et al. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12 (6): 543-51.
31. Huan Z, Fratila-Apachitei LE, Apachitei I, Duszczyk J. Synthesis and characterization of hybrid micro/nano-structured NiTi surfaces by a combination of etching and anodizing. *Nanotechnology*. 2014, 25 (5): 1-9.

32. Ishizawa H, Ogino M. Characterization of hydroxiapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res* 1995; 29 (9): 1071-9.
33. Ishizawa H, Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res* 1995; 29 (1): 65-72.
34. Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. Organic- inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res.* 2008, 25 (10): 2357-69.
35. Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *J Oral Implantol.* 2003; 12 (2): 175-81.
36. Keshmiri M, Troczynski T. Apatite formation on TiO<sub>2</sub> anatase microspheres. *J Non Cryst Solids.* 2003; 324 (3): 289-94.
37. Kim HS, Kim WY, Lim SH. Microstructure and elastic modulus of Ti-Nb-Zr ternary alloys for biomedical applications. *Scr Mater.* 2006; 54: 887-91.
38. Kim SE, Lim JH, Lee SC. Anodically nanostructured titanium oxides for implant applications. *Electrochim Acta.* 2008; 53 (14): 4846-51.
39. Kim MH, Lee S-Y, Kim M-J, Kim S-K, Heo S-J, Koak J-Y. Effect of biomimetic deposition on anodized titanium surfaces. *J Dent Res.* 2011, 90 (6): 711-6.
40. Kim K, Lee B-A, Piao X-H, Chung H-J, Kim Y-J. Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. *Periodontal Implant Sci.* 2013; 43 (4): 198-205.

41. Kobayashi E, Doi H, Yoneyama T, Hamanaka H, Gibson IR, Best SM, et al. Influence of aging heat treatment on mechanical properties of biomedical Ti-Zr based ternary alloys containing niobium. *J Mater Sci Mater Med*. 1998; 9 (11): 625-30.
42. Lee CM, Ju CP, Chern Lin JH. Structure-property relationship of cast Ti-Nb alloys. *J Oral Rehabil*. 2002; 29 (4): 314-22.
43. Lee J, Hurson S, Tadros H, Schu"pbach P, Susin C, Wikesjo" UME. Crestal remodelling and osseointegration at surfacemodified commercially pure titanium and titanium alloy implants in a canine model. *J Clin Periodontol*. 2012; 39 (8): 781-8.
44. Le Gu"henec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007; 23 (7): 844-54.
45. Li H, Khor KA, Cheang P. Titanium dioxide reinforced hydroxyapatite coatings deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray. *Biomaterials*. 2002, 23 (1): 85-91.
46. Li L-H, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*. 2004, 25 (14): 2867-75.
47. Liang B, Fujibayashi S, Neo M, Tamura J, Kim HM,, Uchida M, et al. Histological and mechanical investigation of the bone-bonding ability of anodically oxidized titanium in rabbits. *Biomaterials*. 2003; 24 (27): 4959-66.

48. Liu XY, Chu PK, Ding CX. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng Rep.* 2004, 47 (3-4): 49–121.
49. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface nano-functionalization of biomaterials. *Mater Sci Eng R.* 2010; 70 (3-6): 275-302.
50. Maluf PSZ, Marotti J, Komatsu C, Arcangeli P. Advantages of treatment laser surface osseointegrated dental implants. *Implant News* 2007; 4: 643-6.
51. Marciano FR, Lima-Oliveira DA, da Silva NS, Diniz AV, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC films containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2009, 340 (1): 87–92.
52. Morais LS, Serra GG, Muller CA, Palermo EFA, Andrade LR, Meyers MA. In vivo metal ion release from Ti-6Al-4V orthodontic mini-implants. *Matéria.* 2007; 12 (2): 290-7.
53. Moretti LAC. Microtopografia de implantes de titânio com diferentes tratamentos de superfície à microscopia eletrônica de varredura e de força atômica. [dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2012.
54. Multigner M, Frutos E, Mera CL, Chao J, Gonzalez-Carrasco JL. Interrogations on the sub-surface strain hardening of grit blasted Ti-6Al-4V alloy. *Surf Coat Tech.* 2009; 203 (14): 2036-40.
55. Newman MG, Flemming. Periodontal considerations of implants and implant associated microflora. *J Dent Educ.* 1988, 52 (12): 737-44.

56. Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 2005; 26 (24): 4938–43.
57. Omar O, Svensson S, Zoric N. In vivo gene expression in response to anodically oxidized versus machined titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92 (4): 1552–66.
58. Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci*. 1969, 13 (8): 1741-7.
59. Pan J, Leygraf C, Thierry D, Ektessabi AM. Corrosion resistance for biomaterial applications of TiO<sub>2</sub> films deposited on titanium and stainless steel by ion-beam-assisted sputtering. *J Biomed Mater Res*. 1997; 35 (3): 309- 18.
60. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990, 17 (3): 138-44.
61. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993; 72 (9): 1304-9.
62. Quirynen M, Van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants R*. 1993, 4 (3): 158–61.

63. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22 (1): 1-14.
64. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van EJ, Van SD. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11 (2): 169-78.
65. Rangel EC, Gadioli GZ, Cruz NC. Investigations on the stability of plasma modified silicone surfaces. *Plasm Polym.* 2004; 9 (1): 35-48.
66. Rosenberg ES, Sang-Choon C, Elian N, Jalbout ZN, Froum S, Evian CI. Characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2004, 19: 873-9.
67. Saldana L, Barranco V, García-Alonso MC, Vallés G, Escudero ML, Munuera L. Concentration-dependent effects of titanium and aluminium ions released from thermally oxidized Ti6Al4V alloy on human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 77 (2): 220-9.
68. Sakaguchi N, Niinomib M, Akahorib T, Takedab J, Todab H. Effect of Ta content on mechanical properties of Ti-30Nb-XTa-5Zr. *Mater Sci Eng.* 2005; 25 (3): 370 – 6.
69. Santander S, Alcaine C, Lyahyai J, Pérez MA, Rodellar C, Doblare M, Ochoa I. In vitro osteoinduction of human mesenchymal stem cells in biomimetic surface modified titanium alloy implants. *Dent Mater J.* 2012; 31(5): 843–50.

70. Santos MCLG, Line SRP. Loss of osteointegrated implant: host related factors. *Periodontia*. 2004; 14: 32-7.
71. Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiol Res*. 2011; 166 (1): 63-7.
72. Scarano A, Piatelli A, Polimeni A, Di Iorio D, Carinci F. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and anatase- coated titanium healing screws: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2010, 81 (10):1466-71.
73. Suh JY, Jang BC, Zhu X, Ong JL, Kim K. Effect of hydrothermally treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation. *Biomaterials*. 2003; 24 (2): 347-55.
74. Sul Y-T, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002, 23 (2): 491–501.
75. Sul YT, Byon ES, Jeong Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2004; 6 (2): 101–10.
76. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005, 20 (3): 349-59.



77. Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent.* 2002; 30 (1): 47-51.
78. Tao XJ, Li SJ, Zheng CY, Fu J, Guo Z, Hao YL, et al. Synthesis of a porous oxide layer on a multifunctional biomedical titanium by micro-arc oxidation. *Mater Sci Eng C.* 2009, 29 (6): 1923-34.
79. Takebe J, Ito S, Miura S, Miyata K, Ishibashi K. Physicochemical state of the nanotopographic surface of commercially pure titanium following anodization-hydrothermal treatment reveals significantly improved hydrophilicity and surface energy profiles. *Mater Sci Eng C.* 2012, 32 (1): 55–60.
80. Teughels W, Assche NV, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Imp Res.* 2006, 17 (2): 68-81.
81. Tran PA, Webster TJ. Understanding the wetting properties of nanostructured selenium coatings: the role of nanostructured surface roughness and air-pocket formation. *Int J Nanomedic.* 2013; 8: 2001–9.
82. Visai L, Rimondini L, Giordano C, Del Curto B, Sbarra MS, Franchini R, et al. Electrochemical surface modification of titanium for implant abutments can affect oral bacteria contamination. *Appl. Biomater Biomech.* 2008, 6 (3): 170–7.
83. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int.* 1996; 27 (6): 401-8.
84. Xu J, Ding G, Li J, Yang S, Fang B, Sun H. Zinc-ion implanted and deposited titanium surfaces adhesion of *Streptococcus mutans*. *Appl Surface Sci.* 2010; 256: 7540-4.

85. Yu S, Yu Z, Wang G. Biocompatibility and osteoconduction of active porous calcium-phosphate films on a novel Ti-3Zr-2Sn-3Mo-25Nb biomedical alloy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;85 (2):103-15.
86. Zhao C, Zhang X, Cao P. Mechanical and electrochemical characterization of Ti-12Mo-5Zr alloy for biomedical application. *J Alloy Compd*. 2011; 509 (32): 8235– 8.
87. Zhu X, Kim K-H, Jeong Y. Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. *Biomaterials*. 2001; 22 (16): 2199-206.
88. Zhu X, Ong JL, Kim S, Kim K. Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material. *J Biomed Mater Res*. 2002; 60 (2): 333-8.
89. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004; 25 (18): 4087-103.
90. Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004; 25 (14): 2695– 711.

## Anexos

Tabela A1 – Estatística descritiva referente ao ângulo de contato dos subgrupos experimentais mensurado em água destilada. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZA <sup>-</sup>	TNZA <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	12	12	12	12
Mínimo	55,60	21,40	57,40	29,20
Máximo	106,90	44,80	86,60	47,60
Amplitude Total	51,30	23,40	29,20	18,40
Mediana	70,20	31,60	68,60	38,00
Primeiro Quartil (25%)	67,45	29,03	64,58	34,30
Terceiro Quartil (75%)	72,43	35,83	84,30	46,13
Desvio Interquartilico	4,98	6,80	19,73	11,83
Média Aritmética	73,67	32,63	72,18	38,91
Variância	217,02	51,57	118,29	40,77
Desvio Padrão	14,73	7,18	10,88	6,39
Erro Padrão	4,25	2,07	3,14	1,84
Coeficiente de Variação	0,20	0,22	0,15	0,16
Assimetria (g1)	1,55	0,32	0,23	0,25
Curtose (g2)	1,99	-0,41	-1,68	-1,38
Média Harmônica	71,45	31,18	70,70	37,96
N (média harmônica)	12	12	12	12
Média Geométrica	72,49	31,90	71,43	38,43
N (média geométrica)	12	12	12	12
Variância (geométrica)	1,01	1,02	1,01	1,01
Desvio Padrão (geométrico)	1,20	1,25	1,16	1,18

Tabela A2 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de ângulo de contato mensurados em água destilada. Araraquara, 2013.

H	36,5145
Graus de liberdade	3
(p) Kruskal-Wallis	< 0,0001
Ti cp A <sup>-</sup>	443
Ti cp A <sup>+</sup>	112
TNZA <sup>-</sup>	433
TNZA <sup>+</sup>	188
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	36,9167
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	9,3333
TNZA <sup>-</sup> (posto médio)	36,0833
TNZA <sup>+</sup> (posto médio)	15,6667

Tabela A3 – Comparações dos valores de ângulo de contato mensurado em água destilada obtidas por meio do teste de Dunn. Araraquara, 2013.

Comparações	Dif. Postos	z calculado	z crítico	P
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e Ti cp A <sup>+</sup>	27,5833	4,8261	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>-</sup>	0,8333	0,1458	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	21,25	3,718	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>-</sup>	26,75	4,6803	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>+</sup>	6,3333	1,1081	2,635	ns
Postos médios TNZA <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	20,4167	3,5722	2,635	< 0,05

ns = não significativa

Tabela A4 – Estatística descritiva referente ao ângulo de contato dos subgrupos experimentais mensurado em etilenoglicol. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZA <sup>-</sup>	TNZA <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	12	12	12	12
Mínimo	26,10	15,00	38,50	19,10
Máximo	43,40	27,10	68,90	36,50
Amplitude Total	17,30	12,10	30,40	17,40
Mediana	32,30	21,65	56,35	25,40
Primeiro Quartil (25%)	28,53	18,30	45,60	23,68
Terceiro Quartil (75%)	36,63	22,85	63,38	26,85
Desvio Interquartilico	8,10	4,55	17,78	3,18
Média Aritmética	32,85	21,15	54,59	25,70
Variância	26,85	12,43	118,46	20,02
Desvio Padrão	5,18	3,53	10,88	4,47
Erro Padrão	1,50	1,02	3,14	1,29
Coefficiente de Variação	0,16	0,17	0,20	0,17
Assimetria (g1)	0,63	0,07	-0,13	1,02
Curtose (g2)	-0,27	-0,38	-1,81	2,52
Média Harmônica	32,14	20,60	52,53	25,04
N (média harmônica)	12	12	12	12
Média Geométrica	32,49	20,88	53,56	25,36
N (média geométrica)	12	12	12	12
Variância (geométrica)	1,01	1,01	1,02	1,01
Desvio Padrão (geométrico)	1,17	1,19	1,23	1,18

Tabela A5 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de ângulo de contato mensurados em etilenoglicol. Araraquara, 2013.

H	38,5859
Graus de liberdade	3
(p) Kruskal-Wallis	< 0,0001
Ti cp A <sup>-</sup>	350,5
Ti cp A <sup>+</sup>	108
TNZA <sup>-</sup>	508
TNZA <sup>+</sup>	209,5
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	29,2083
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	9
TNZA <sup>-</sup> (posto médio)	42,3333
TNZA <sup>+</sup> (posto médio)	17,4583

Tabela A6 – Comparações dos valores de ângulo de contato mensurado em etilenoglicol obtidas por meio do teste de Dunn. Araraquara, 2013.

<b>Comparações</b>	<b>Dif. Postos</b>	<b>z calculado</b>	<b>z crítico</b>	<b>p</b>
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e Ti cp A <sup>+</sup>	20,208	3,536	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>-</sup>	13,125	2,296	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	11,750	2,056	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>-</sup>	33,333	5,832	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>+</sup>	8,458	1,480	2,635	ns
Postos médios TNZA <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	24,875	4,352	2,635	< 0,05

ns = não significante

Tabela A7 – Estatística descritiva referente aos valores de ângulo de contato dos subgrupos experimentais mensurados em polietilenoglicol. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZA <sup>-</sup>	TNZA <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	12	12	12	12
Mínimo	20,10	15,00	22,40	13,10
Máximo	36,90	24,10	42,10	26,50
Amplitude Total	16,80	9,10	19,70	13,40
Mediana	25,70	19,60	32,90	20,75
Primeiro Quartil (25%)	24,48	17,38	26,08	17,08
Terceiro Quartil (75%)	27,05	21,65	38,95	23,70
Desvio Interquartilico	2,58	4,28	12,88	6,63
Média Aritmética	25,97	19,61	32,60	20,24
Variância	18,65	8,67	52,05	18,69
Desvio Padrão	4,32	2,94	7,21	4,32
Erro Padrão	1,25	0,85	2,08	1,25
Coefficiente de Variação	0,17	0,15	0,22	0,21
Assimetria (g1)	1,26	0,05	-0,10	-0,26
Curtose (g2)	3,52	-1,08	-1,85	-1,25
Média Harmônica	25,38	19,20	31,08	19,32
N (média harmônica)	12	12	12	12
Média Geométrica	25,66	19,40	31,84	19,79
N (média geométrica)	12	12	12	12
Variância (geométrica)	1,01	1,01	1,02	1,02
Desvio Padrão (geométrico)	1,17	1,16	1,26	1,25

Tabela A8 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de ângulo de contato mensurados em polietilenoglicol. Araraquara, 2013.

H	27,51
Graus de liberdade	3,00
(p) Kruskal-Wallis	< 0,0001
Ti cp A <sup>-</sup>	370,50
Ti cp A <sup>+</sup>	157,00
TNZA <sup>-</sup>	462,50
TNZA <sup>+</sup>	186,00
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	30,88
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	13,08
TNZA <sup>-</sup> (posto médio)	38,54
TNZA <sup>+</sup> (posto médio)	15,50

Tabela A9 – Comparações dos valores de ângulo de contato mensurado em polietilenoglicol obtidas por meio do teste de Dunn. Araraquara, 2013.

Comparações	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e Ti cp A <sup>+</sup>	17,792	3,113	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>-</sup>	7,667	1,341	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	15,375	2,690	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>-</sup>	25,458	4,454	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>+</sup>	2,417	0,423	2,635	ns
Postos médios TNZA <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	23,042	4,032	2,635	< 0,05

ns = não significante



Tabela A10 – Estatística descritiva referente ao ângulo de contato dos subgrupos experimentais mensurado em diiodometano. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>-</sup>	TNZA <sup>-</sup>	TNZA <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	12	12	12	12
Mínimo	14,50	23,60	22,90	17,40
Máximo	30,20	32,60	37,80	26,60
Amplitude Total	15,70	9,00	14,90	9,20
Mediana	24,30	28,55	31,45	25,20
Primeiro Quartil (25%)	22,40	26,90	28,30	23,45
Terceiro Quartil (75%)	25,98	29,48	32,80	25,83
Desvio Interquartilico	3,58	2,58	4,50	2,38
Média Aritmética	23,88	28,29	31,00	24,28
Variância	17,92	5,78	18,62	6,16
Desvio Padrão	4,23	2,41	4,32	2,48
Erro Padrão	1,22	0,69	1,25	0,72
Coefficiente de Variação	0,18	0,09	0,14	0,10
Assimetria (g1)	-0,79	-0,19	-0,02	-2,13
Curtose (g2)	1,15	0,44	-0,10	5,51
Média Harmônica	23,05	28,10	30,43	23,99
N (média harmônica)	12	12	12	12
Média Geométrica	23,49	28,20	30,72	24,14
N (média geométrica)	12	12	12	12
Variância (geométrica)	1,02	1,00	1,01	1,01
Desvio Padrão (geométrico)	1,22	1,09	1,15	1,12

Tabela A11 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de ângulo de contato mensurados em diiodometano. Araraquara, 2013.

H	22,759
Graus de liberdade	3,000
(p) Kruskal-Wallis	< 0,0001
Ti cp A <sup>-</sup>	181,500
Ti cp A <sup>+</sup>	374,000
TNZA <sup>-</sup>	440,500
TNZA <sup>+</sup>	180,000
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	15,125
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	31,167
TNZA <sup>-</sup> (posto médio)	36,708
TNZA <sup>+</sup> (posto médio)	15,000

Tabela A12 – Comparações dos valores de ângulo de contato mensurado em diiodometano obtidas por meio do teste de Dunn. Araraquara, 2013.

Comparações	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e Ti cp A <sup>+</sup>	16,042	2,807	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>-</sup>	21,583	3,776	2,635	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	0,125	0,022	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>-</sup>	5,542	0,970	2,635	ns
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZA <sup>+</sup>	16,167	2,829	2,635	< 0,05
Postos médios TNZA <sup>-</sup> e TNZA <sup>+</sup>	21,708	3,798	2,635	< 0,05

ns = não significante

Gráfico A1- Gráfico de Energia Livre de superfície gerado pelo software SCA 20 para a amostra de Ti cp A. Araraquara, 2013.

SE - Plot

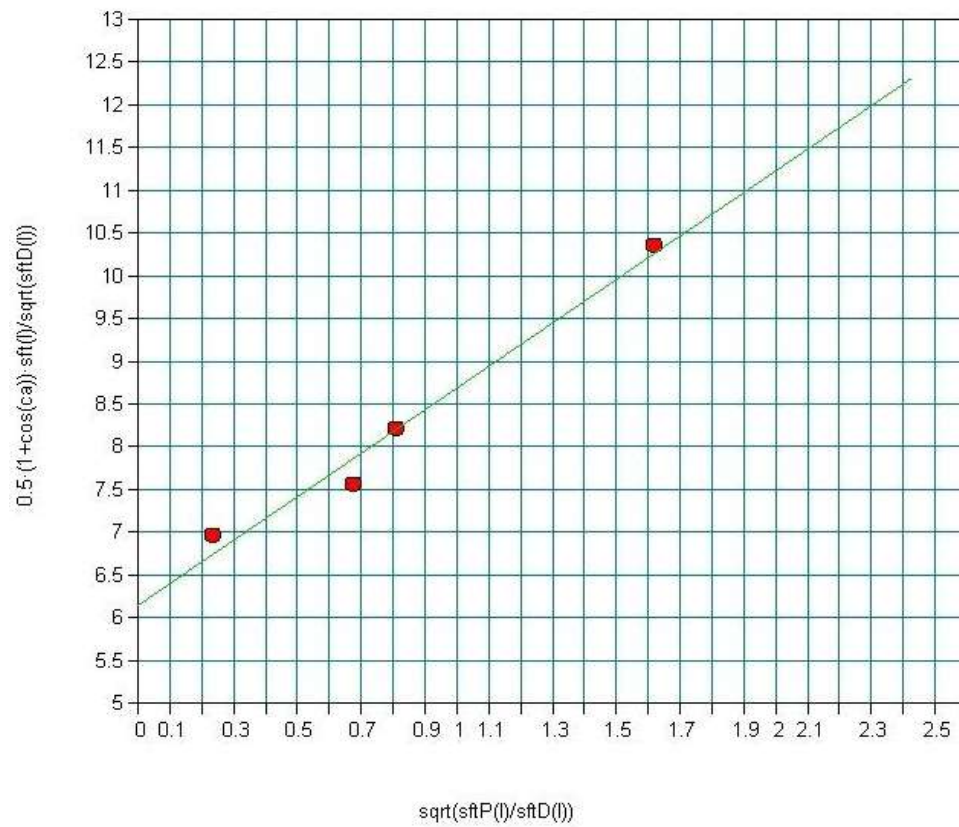


Gráfico A2- Gráfico de Energia Livre de superfície gerado pelo software SCA 20 para a amostra de Ti cp A<sup>+</sup>.  
Araraquara, 2013.

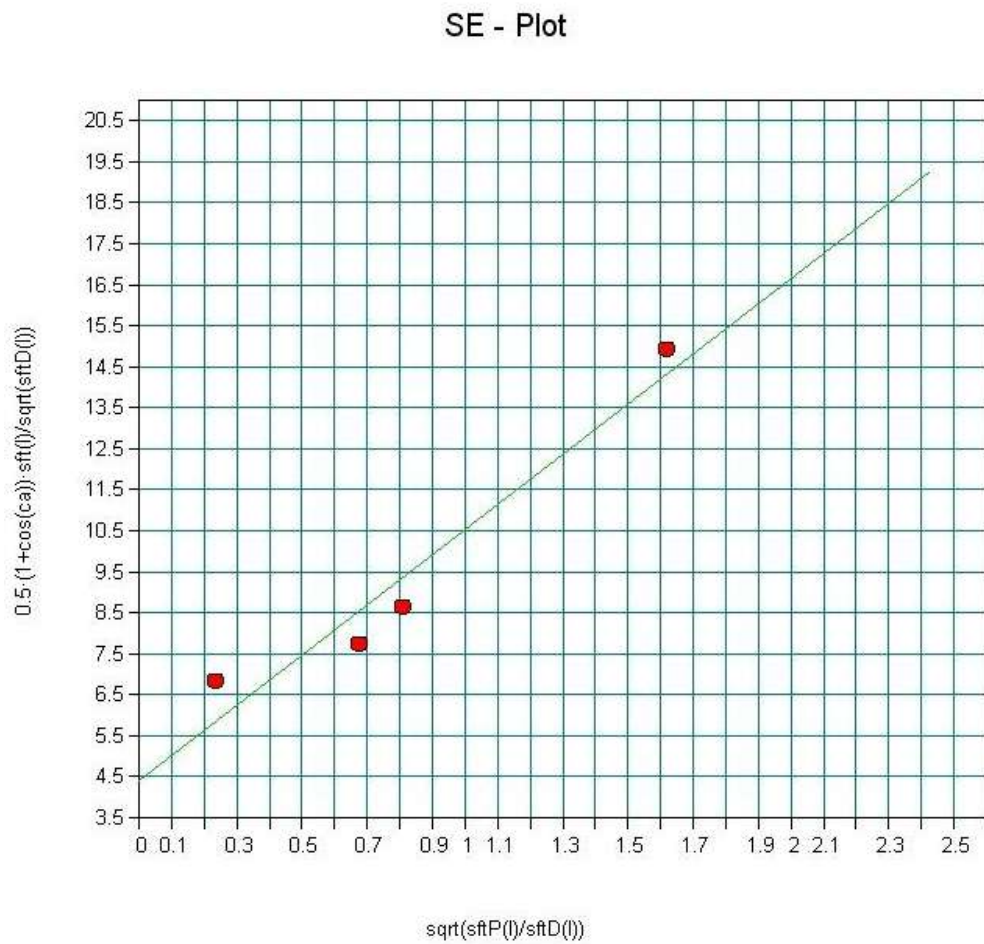


Gráfico A3 - Gráfico de Energia Livre de superfície gerado pelo software SCA 20 para a amostra de TNZT A. Araraquara, 2013.

SE - Plot

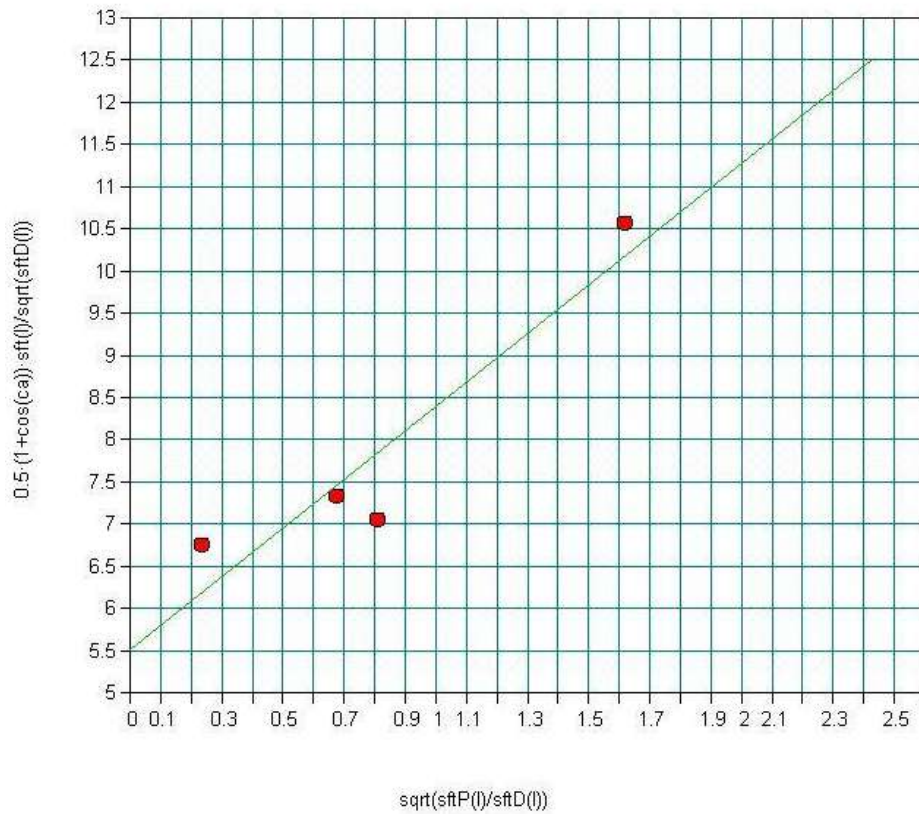


Gráfico A4 - Gráfico de Energia Livre de superfície gerado pelo software SCA 20 para a amostra de TNZT A<sup>+</sup>.  
Araraquara, 2013.

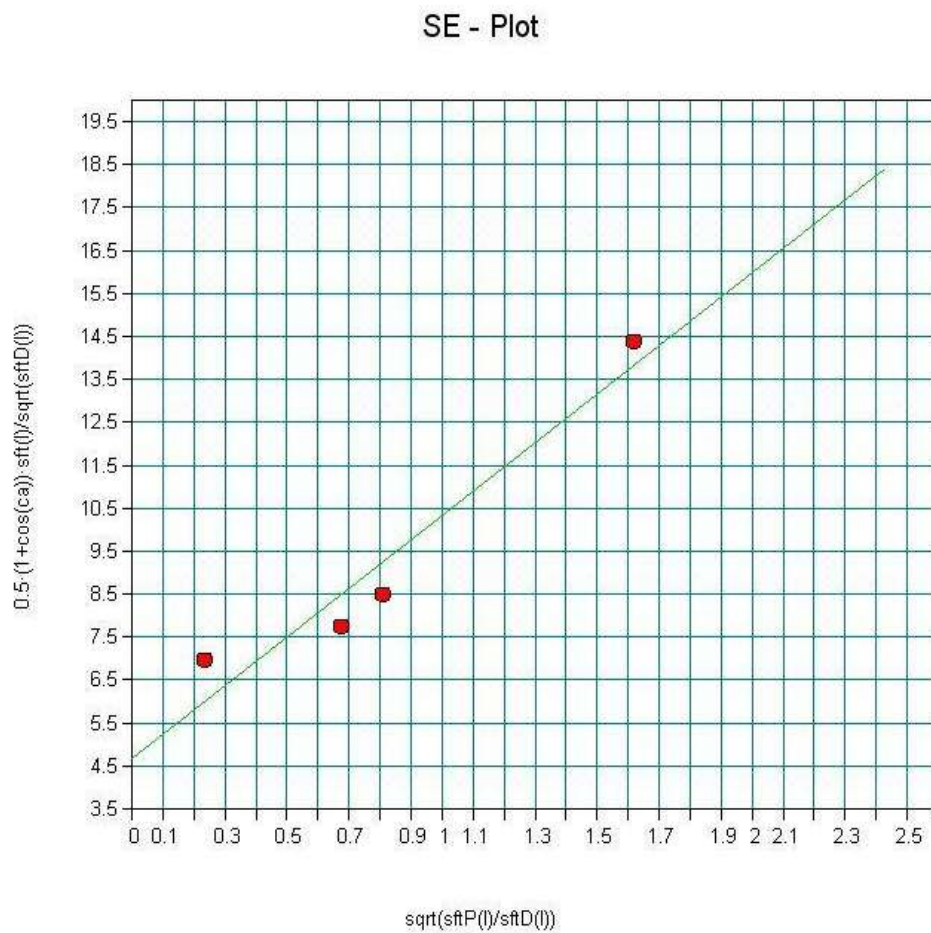


Tabela A13 – Estatística descritiva referente à rugosidade média dos subgrupos experimentais. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZA <sup>-</sup>	TNZA <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Mínimo	0,815	0,89	0,168	0,49
Máximo	1,318	1,38	0,21	0,595
Amplitude Total	0,503	0,49	0,042	0,105
Mediana	0,975	1,21	0,175	0,5313
Primeiro Quartil (25%)	0,8763	1,098	0,173	0,5081
Terceiro Quartil (75%)	1,158	1,355	0,1773	0,5538
Desvio Interquartilico	0,2818	0,257	0,0043	0,0456
Média Aritmética	1,0207	1,2004	0,1787	0,532
Variância	0,0336	0,0281	0,0002	0,0012
Desvio Padrão	0,1832	0,1677	0,0125	0,0347
Erro Padrão	0,0579	0,053	0,0039	0,011
Coeficiente de Variação	17,95%	13,97%	6,99%	6,53%
Assimetria (g1)	0,6343	-0,5423	2,1169	0,5088
Curtose (g2)	-1,1121	-0,7745	4,6063	-0,5425
Média Harmônica	0,9932	1,1775	0,178	0,53
N (média harmônica)	10	10	10	10
Média Geométrica	1,0066	1,1893	0,1783	0,531
N (média geométrica)	10	10	10	10
Variância (geométrica)	1,0133	1,0093	1,0019	1,0018
Desvio Padrão (geométrico)	1,1906	1,1574	1,0685	1,0667

Tabela A14 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de rugosidade média entre os subgrupos de Ti cp. Araraquara, 2013.

H	4,9766
Graus de liberdade	1
(p) Kruskal-Wallis	0,0257
Ti cp A <sup>-</sup>	75,5
Ti cp A <sup>+</sup>	134,5
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	7,55
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	13,45

Tabela A15 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de rugosidade média entre os subgrupos de TNZT. Araraquara, 2013.

H	14,3613
Graus de liberdade	1
(p) Kruskal-Wallis	0,0002
TNZT A <sup>-</sup>	55
TNZT A <sup>+</sup>	155
TNZT (posto médio)	5,5
TNZT (posto médio)	15,5



Tabela A16 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de rugosidade média entre as amostras não anodizadas. Araraquara, 2013.

H	14,3613
Graus de liberdade	1
(p) Kruskal-Wallis	0,0002
Ti cp A <sup>-</sup>	55
TNZT A <sup>-</sup>	155
Ti cp A <sup>-</sup> (posto médio)	5,5
TNZT A <sup>-</sup> (posto médio)	15,5

Tabela A17 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis referente à comparação dos valores de rugosidade média entre as amostras anodizadas. Araraquara, 2013

H	14,3613
Graus de liberdade	1
(p) Kruskal-Wallis	0,0002
Ti cp A <sup>+</sup>	55
TNZT A <sup>+</sup>	155
Ti cp A <sup>+</sup> (posto médio)	5,5
TNZT A <sup>+</sup> (posto médio)	15,5

Tabela A18 – Resultado do teste de Dunn referente à comparação dos valores de rugosidade média entre os subgrupos experimentais. Araraquara, 2013.

<b>Comparações</b>	<b>Dif. Postos</b>	<b>z calculado</b>	<b>z crítico</b>	<b>p</b>
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e Ti cp A <sup>+</sup>	5,9	2,23	1,96	< 0,05
Postos médios TNZT A <sup>-</sup> e TNZT A <sup>+</sup>	10	3,7796	1,96	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>-</sup> e TNZT A <sup>-</sup>	10	3,7796	1,96	< 0,05
Postos médios Ti cp A <sup>+</sup> e TNZT A <sup>+</sup>	10	3,7796	1,96	< 0,05

Tabela A19 – Estatística descritiva referente à adesão de *S. mutans* segundo os subgrupos experimentais. Araraquara, 2013.

	Ti cp A <sup>-</sup>	Ti cp A <sup>+</sup>	TNZT A <sup>-</sup>	TNZT A <sup>+</sup>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Mínimo	6,991	6,892	5,748	6,763
Máximo	7,462	7,505	6,491	7,362
Amplitude Total	0,471	0,613	0,743	0,598
Mediana	7,234	7,060	6,097	7,079
Primeiro Quartil (25%)	7,051	6,965	5,903	6,798
Terceiro Quartil (75%)	7,404	7,262	6,293	7,217
Desvio Interquartilico	0,353	0,297	0,390	0,419
Média Aritmética	7,229	7,122	6,106	7,034
Variância	0,035	0,044	0,068	0,051
Desvio Padrão	0,188	0,210	0,260	0,226
Erro Padrão	0,059	0,067	0,082	0,071
Coeficiente de Variação	0,026	0,030	0,043	0,032
Assimetria (g1)	0,062	0,908	0,165	-0,031
Curtose (g2)	-1,996	-0,594	-1,234	-1,778
Média Harmônica	7,224	7,117	6,096	7,028
N (média harmônica)	10	10	10	10
Média Geométrica	7,226	7,119	6,101	7,031
N (média geométrica)	10	10	10	10
Variância (geométrica)	1,000	1,000	1,001	1,000
Desvio Padrão (geométrico)	1,026	1,030	1,044	1,033

Tabela A20 – Resultado da análise de variância *one-way* ANOVA referente à comparação dos valores de unidades formadoras de colônia. Araraquara, 2013.

Fontes de variação	GI	SQ	QM	F	p
Subgrupos	3	8.025	2.675	54.0204	< 0.0001
Erro	36	1.783	0.05		

Tabela A21 – Resultados do teste de Tukey referentes à comparação dos valores de unidades formadoras de colônia entre os subgrupos experimentais. Araraquara, 2013.

Comparações	Diferença	Q	p
Ti cp A <sup>-</sup> vs. Ti cp A <sup>+</sup>	0,1063	1,5112	ns
Ti cp A <sup>-</sup> vs. TNZT A <sup>-</sup>	1,1223	15,949	< 0,01
Ti cp A <sup>-</sup> vs. TNZT <sup>-+</sup>	0,1942	2,7593	ns
Ti cp A <sup>+</sup> vs. TNZT A <sup>-</sup>	1,016	14,4378	< 0,01
Ti cp A <sup>+</sup> vs. TNZT A <sup>+</sup>	0,0878	1,2481	ns
TNZT A <sup>-</sup> vs. TNZT <sup>-+</sup>	0,9281	13,1897	< 0,01

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 19 de março de 2014

Haline de Lima Carneiro