

ROGERIO AMARAL TUPINAMBÁ

**Avaliação da osteointegração em implantes da liga de Ti7,5Mo com
tratamento de superfície por anodização**

Rogério Amaral Tupinambá

**Avaliação da osteointegração em implantes da liga de Ti7,5Mo com
tratamento de superfície por anodização**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia do
Campus de Guaratinguetá, Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do Título de
Doutor em Engenharia Mecânica na área de
Materiais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini
Alves Claro

Coorientadora: Dr^a. Ana Lúcia do Amaral
Escada

T928a Tupinambá, Rogerio Amaral
Avaliação da osteointegração em implantes da liga de Ti7,5Mo com
tratamento de superfície por anodização / Rogerio Amaral Tupinambá –
Guaratinguetá, 2019.
91 f : il.
Bibliografia: f. 81-89
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Engenharia de Guaratinguetá, 2019.
Orientador: Prof^ª Dr^ª. Ana Paula Rosifini Alves Claro
Coorientador: Prof^ª Dr^ª. Ana Lúcia do Amaral Escada
1. Ligas de titânio 2. Implantes dentários. 3. Metais - Oxidação anódica
I. Título.
CDU 669.295(043)

ROGERIO AMARAL TUPINAMBÁ

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA”


PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
CURSO: DOUTORADO

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

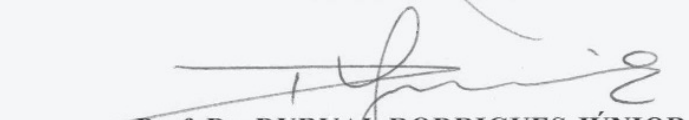


Prof. Dr.ª Ivonete Ávila
Coordenadora

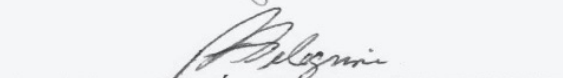
BANCA EXAMINADORA:



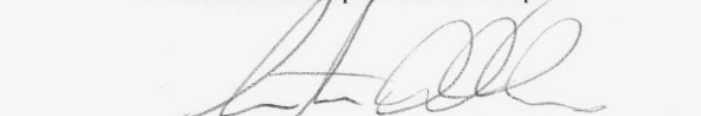
Prof. Dr.ª ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientadora / UNESP-FEG



Prof. Dr. DURVAL RODRIGUES JÚNIOR
EEL/USP



Prof. Dr. ANDRÉ ANTONIO PELEGRINE
Universidade São Leopoldo Mandic/Campinas



Prof. Dr.ª CRISTIANE APARECIDA ASSIS CLARO
UNICAMP



Prof. Dr. RONALDO SPEZIA NUNES
UNESP-FEG

Novembro de 2019

DADOS CURRICULARES

ROGERIO AMARAL TUPINAMBÁ

NASCIMENTO	02.10.1975 – Caçapava / SP
FILIAÇÃO	Norival Miranda Tupinambá Lais Amaral Tupinambá
1993/1996	Graduação em Odontologia Universidade de Taubaté - UNITAU
2007/2009	Curso de Especialização em Ortodontia Universidade de Taubaté - UNITAU
2012/2014	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de Mestrado, na Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista/ UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a todos os bravos homens e mulheres que dedicaram seu sangue, suor e lágrimas para pavimentar o caminho que percorri, sei que poderia ter sido ainda mais tortuoso sem o esforço de todos que me precederam.

Dedico este trabalho ao seu beneficiário final, o paciente que um dia poderá sorrir ou repor um membro perdido e ter uma vida mais digna e confortável.

Dedico este trabalho aos que virão depois de mim, que possam usar este conhecimento para o bem e para o desenvolvimento e conforto de outrem.

Dedico a minha família que soube compreender os momentos de ausência e isolamento, que meu esforço possa servir de inspiração para os desafios diários e, que saibam onde, quando e porquê seguir em frente é sempre a melhor opção.

Dedico este trabalho aos meus amigos e colegas que nos bastidores, sempre acreditaram em meu potencial e entenderam minhas decisões.

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca deixaram de me ensinar quão valiosa era a educação e como transmitir conhecimento era, mais que um dever, um privilégio.

Dedico a meus alunos que são parte fundamental do processo de crescimento pessoal que experimento, que este crescimento possa ser de algum modo compartilhado e que mesmo a menor transformação possa acontecer. Viver no outro através do conhecimento transmitido é se tornar, de certo modo, imortal.

Ao bondoso Deus que me concede a honra de vivenciar as experiências que vivo e vivi, que Sua graça possa me presentear com sabedoria e discernimento.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, pelo dom da vida e por todas as experiências maravilhosas que Ele tem me proporcionado.

A minha esposa Adriana por toda compreensão e apoio, especialmente nos momentos de ausência e aos meus filhos, Cassiano e Murilo, que juntos são meu porto seguro e razão de viver.

Aos meus pais, Norival e Lais (in memorium), que sempre foram um exemplo de companheirismo e que nunca mediram esforços para me proporcionarem os meios para que eu me tornasse a pessoa que hoje sou.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro, pela atenção e confiança a mim dedicados e, por ter acreditado em meu potencial.

A minha co-orientadora, professora e amiga Ana Lucia do Amaral Escada, pelo auxílio no preparo das amostras e no desenvolvimento dos materiais utilizados para o processo de anodização.

A amiga e professora Dr^a. Cristiane Aparecida de Assis Claro que sempre me introduziu a vida acadêmica e por sua contribuição para o tratamento estatístico dos dados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Paulo Machado pela disposição e solicitude na realização das análises de caracterização de superfície nos Laboratórios do INPE de São José dos Campos.

Ao Sr. Sidival Dias proprietário da empresa Titanium Fix e a Dra. Ana Paula Nocentini Semesanto pela disponibilização dos implantes e usinagem de nossas amostras.

A Universidade São Leopoldo Mandic, e especial ao Prof. André Pelegrine no auxílio com os experimentos *in vivo* e a Médica Veterinária Mariana Franco de Oliveira pelo cuidado e preparação dos animais do biotério.

A todos os professores do Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG/UNESP, pela atenção e dedicação, dos quais tive a honra de ser aluno.

Aos funcionários de Seção de Pós-Graduação da FEG/UNESP, Sydney Eustáquio Ramos Rabelo, Maria Cristina Silva de Oliva e Renata Pereira da Rocha Barbosa pela atenção no atendimento.

À secretária do Departamento de Materiais e Tecnologia Maria Aparecida R. Vasconcelos, pela gentileza no atendimento.

Aos amigos, Marisa de Sousa, Reginaldo Toshihiro Konatu, João Corobolante e Adelman Pereira Junior pelo apoio, atenção e companheirismo.

Para meus amigos e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, o meu mais sincero obrigado!

A dedicação, o esforço e o amor que imprimimos naquilo que fazemos refletem, exatamente, quem nós somos.

Tiago Curralo

RESUMO

O objetivo deste estudo *in vivo* foi avaliar as propriedades de resposta óssea da liga de Ti7,5Mo usinada em minimplantes com tratamento de superfície por anodização e compará-la, com sua versão não tratada e com a liga de Ti-CP em sua apresentação comercial, tratada por jateamento e ataque ácido, em relação às suas propriedades de osteointegração. Os minimplantes do Grupo tratado de Ti7,5Mo foram anodizados em eletrólito de NH₄F por 24h e em seguida calcinados a 450°C por 1h. As amostras foram divididas em três Grupos, Ti-CP com tratamento de superfície por jateamento seguido de ataque ácido (n=5), Ti7,5Mo usinadas (n=5) e Ti7,5Mo anodizado para crescimento de nanotubos de TiO₂ (n=6). Para caracterização das amostras foram realizados a espectroscopia Raman, difração de raios X, perfilometria ótica e microscopia eletrônica de varredura. As análises histomorfométricas para determinação do BIC (bone to implant contact) e do BAFO (bone area fraction occupancy) foram realizadas após implantação das amostras de cada Grupo na tíbia de ratos Wistar sacrificados após 4 semanas. A análise estatística por meio do teste de ANOVA de 1 fator demonstrou haver diferença estatística significativa apenas entre os Grupos para o BIC; o teste Tukey para avaliação do BIC demonstrou haver diferença estatística significativa somente entre o Grupo Ti7,5Mo anodizado em relação ao Grupo Ti-CP em apresentação comercial; não foram detectadas diferenças estatísticas significantes para o BAFO entre os Grupos. O teste Pearson não detectou correlação direta entre os valores de BIC e BAFO. As amostras de Ti7,5Mo com superfície anodizada para crescimento de nanotubos de TiO₂ apresentaram melhor resposta biológica para o BIC em relação ao Grupo de apresentação comercial. No entanto, não houve diferenças entre os Grupos para os valores de BAFO.

PALAVRAS-CHAVE: Ligas de titânio. Implantes dentários. Anodização. Osteointegração.

ABSTRACT

The objective of this *in vivo* study was to evaluate the bone response of the Ti7,5Mo alloy machined in minimplants with surface treatment by anodization and compare it, with its untreated version and with the Ti-CP alloy in its commercial presentation, gritblasted and acid-etched. The Ti7,5Mo minimplants of the treated group were anodized in a NH_4F electrolyte for 24h and then calcinated at 450°C for 1h. The samples were divided into three groups, Ti-CP with surface treatment by blasting followed by acid-etched (n=5), Ti7, 5Mo machined (n=5) and Ti7, 5Mo anodized for growth of TiO_2 nanotubes (n=6). To characterize the samples, Raman spectroscopy, X-ray diffraction, optical profilometry and scanning electron microscopy (SEM) were performed. The Histomorphometric analysis for determination of the BIC (bone to implant contact) and BAFO (bone area fraction occupancy) were performed after the tibia implantation of the samples of each group in Wistar rats sacrificed after 4 weeks. The statistical analysis using the 1-factor ANOVA test showed statistically significant difference only for BIC amongst groups, Turkey test showed statistically significant difference for the evaluation of BIC only between the group Ti7, 5Mo anodized in relation to the Ti-CP group in commercial presentation, Turkey test did not detect significant statistical difference for BAFO among the groups. Pearson test did not detect direct correlation between BIC and BAFO values. The Ti7,5Mo samples with anodized surface for growth of TiO_2 nanotubes presented better biological response to BIC compared to the commercial presentation group, however, there were no differences among the groups for BAFO values.

KEYWORDS: Titanium alloys. Dental implants. Anodization. Osteointegration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrando o crescimento de nanotubos por anodização.....	17
Figura 2 – Variação do módulo de elasticidade da liga de Ti-xNb-yTa-5Zr pela incorporação do tântalo.....	21
Figura 3 – Diferentes formas alotrópicas observadas nos óxidos de titânio.....	25
Figura 4 – Características da reação de crescimento da camada de óxido conforme o tipo de solução eletrólito.....	27
Figura 5 – Possível esquematização do crescimento e organização dos nanotubos durante o processo de anodização.....	30
Figura 6 – Esquema da metodologia a ser utilizada neste trabalho.....	42
Figura 7 – Implante confeccionado visto nos diferentes planos do espaço e com suas dimensões.....	43
Figura 8 – Implantes posicionados no anodo.....	45
Figura 9 - Célula eletrolítica com amostras sendo anodizadas.....	46
Figura 10 - Forno utilizado para o processo de calcinação.....	47
Figura 11 - MEV FEG Tescan do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE.....	48
Figura 12 - Difratorômetro Panalytical X'Pert com radiação Cu-K α do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE.....	49
Figura 13 - Especômetro Horiba Scientific T64000 do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE.....	50
Figura 14 - Perfilômetro Óptico Veeco, modelo NT1100 do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais –INPE.....	51
Figura 15 - Sequência dos procedimentos cirúrgicos realizados nos espécimes, A e B: incisão, C e D: retalho rebatido, E: perfuração, F e G: inserção do implante, H: sutura.....	53
Figura 16 - Imagem evidenciando os diferentes estruturas em contato com a superfície do implante (A) e, na região entre as espiras: (B) osso maturado, (C) osteoide, (D) fibras musculares, (E) fibras colágenas.....	56
Figura 17 - Linha amarela demarcada sobre a superfície total entre o implante e o tecido adjacente para o cálculo do BIC. Do comprimento total foi calculada a porcentagem de tecido ósseo (em vermelho) que efetivamente mantinha contato com o implante (em preto).....	57

Figura 18 - Linha amarela demarcada sobre a área total entre o implante e o tecido adjacente entre as espiras para o cálculo do BAFO (A), da área total foi removida o tecido não mineralizado (coloração azul ou negra) e calculada a porcentagem de tecido ósseo (em vermelho) presente entre as espiras do implante (em preto).....	58
Figura 19: Amostra do Grupo 1 observada em diferentes ampliações no MEV, em A(50x): superfície da amostra; B(2500x), C(5000x), D(10000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando o tratamento de superfície por jateamento e ataque ácido nos diferentes aumentos.....	60
Figura 20: Amostra do Grupo 2 após tratamento em diferentes ampliações no MEV, em A(50x): superfície da amostra; B(2500x), C(5000x), D(10000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando a ausência de qualquer tratamento de superfície nos diferentes aumentos.....	61
Figura 21: Amostra do Grupo 3 após tratamento em diferentes ampliações no MEV, em A(200x): superfície da amostra; B(12500x), C(25000x), D(50000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando o tratamento de superfície por anodização com crescimento de nanotubos nos diferentes aumentos.....	63
Figura 22a: Mensuração diâmetro dos nanotubos (A, B e C) em amostras do Grupo 3.....	64
Figura 22b: Mensuração do comprimento dos nanotubos nas amostras do Grupo 3 (D, E e F) em D tem-se a camada de nanotubos que foi desprendida pelo entalhe.....	65
Figura 23: Difratoograma apresentando pico característico da fase anatase apresentada na amostra do Grupo 3	67
Figura 24: Gráfico da amostra do Grupo 3 com a presença das bandas das diferentes fases com predominância da fase anatase (A).....	68
Figura 25: Amostras dos Grupos 1 e 2 sem bandas características das fases anatase ou rutilo.....	68
Figura 26: Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 1.....	69
Figura 27: Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 2.....	70
Figura 28: Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 3.....	70
Figura 29: Amostras caracterizando os valores médios obtidos para o BIC em cada um dos Grupos.....	72

Figura 30: Amostras caracterizando os valores médios obtidos para o BAFO em cada um dos Grupos.....	73
Figura 31: Distribuição das medidas e a diferença estatisticamente significativa entre os Grupos para os valores de BIC (\otimes média e \oplus mediana).....	74
Figura 32: Distribuição das medidas e a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os Grupos para os valores de BAFO (\otimes média e \oplus mediana).....	75
Quadro 1 – Variação das propriedades mecânicas conforme porcentagem de incorporação de molibdênio na liga.....	22
Quadro 2 – Diferentes métodos de modificação de superfície e seus objetivos	23
Quadro 3 – Diferentes parâmetros das variações alotrópicas da liga de TiO ₂	25
Quadro 4 – Variações alotrópicas obtidas conforme a variação da temperatura de calcinação	31
Quadro 5 – Divisão dos Grupos conforme suas características distintas.....	44
Tabela 1 – Valores médios dos diâmetros dos nanotubos obtidos pelos autores.....	66
Tabela 2 - Valores referentes às rugosidades médias de cada Grupo.....	71
Tabela 3 - Valores da estatística descritiva referentes aos valores do BIC dos diferentes Grupos.....	72
Tabela 4 - Valores da estatística descritiva referentes aos valores do BAFO dos diferentes Grupos.....	73
Tabela 5 - Comparação dos valores referentes ao BIC entre os Grupos (teste Tukey).....	74
Tabela 6 - Valores referentes a correlação entre BIC e BAFO nos Grupos (teste Pearson).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
BIC	Bone to Implant Contact
BAFO	Bone Area Fraccion Occupancy
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
TNT	Titanium Nano Tubes
OC	Camada Óxido Compacta
OP	Camada Óxido Porosa
HA	Hidroxiapatita
SLActive.	Sand Blasted Long Grit Acid-etched Active
BMP	Bone Morphogenic Protein
TGF	Transformation Growth Factor
DMT	Departamento de Engenharia de Materiais
C.P.	Apresentação Comercial
PBS	Tampão Fosfato Salino
MEV FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Campo de Emissão
V	Volts
kV	Kilo Volts
mA	Mili Amperagem
ANOVA	Analisis of Variance

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.2	OBJETIVOS	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	TITÂNIO	19
2.2	LIGAS DE TITÂNIO – ASSOCIAÇÕES	20
2.2.1	Ligas TiMo – Ti7,5Mo	20
2.3	TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE	22
2.3.1	Anodização	26
2.4	IMPLANTODONTIA	32
2.4.1	Histórico	32
2.4.2	Tratamentos de superfície na implantodontia	35
2.4.2.1	Superfícies usinadas “lisas”	34
2.4.2.2	Superfícies texturizadas	35
2.4.2.2.1	<i>Plasma spray</i>	36
2.4.2.2.2	<i>Plasma spray de hidroxiapatita</i>	36
2.4.2.2.3	<i>Plasma spray de titânio</i>	36
2.4.2.2.4	<i>Modificação por feixe laser</i>	37
2.4.2.2.4	<i>Jateamento de partículas</i>	37
2.4.2.2.5	<i>Jateamento seguido de ataque ácido</i>	37
2.4.2.2.6	<i>Ataque ácido</i>	38
2.4.2.2.7	<i>Superfícies nanotexturizadas por anodização</i>	38
2.4.2.3	Superfícies biomiméticas	38
2.4.3	Osteointegração	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	PROCESSAMENTO DA LIGA	42
3.2	CONFECÇÃO DOS IMPLANTES	43
3.3	DIVISÃO DOS GRUPOS	44
3.4	ANODIZAÇÃO	44
3.4.1	Solução para processo de anodização para crescimento de nanotubos de TiO₂	45
3.4.2	Condições de anodização	45
3.4.3	Tratamento térmico	46

3.5	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	47
3.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	47
3.5.2	Difração de raios X	48
3.5.3	Espectroscopia Raman	49
3.5.4	Perfilometria óptica	49
3.6	CÁLCULO AMOSTRAL	51
3.7	TESTE <i>IN VIVO</i>	52
3.8	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	54
3.8.1	Processamento das amostras	54
3.8.1	BIC e BAFO	55
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	59
4.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	67
4.3	ESPECTROSCOPIA RAMAN	68
4.4	PERFILOMETRIA ÓPTICA	69
4.5	TESTES IN VIVO.....	71
5	CONCLUSÕES	79
5.1	SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A	90
	ANEXO A	91

1 INTRODUÇÃO

O uso de ligas a base de titânio para substituição de tecidos duros se tornou, nos últimos anos, o padrão áureo na escolha do tipo de material a ser empregado, especialmente em Odontologia para confecção de implantes que substituirão elementos dentários perdidos (BRUNETTE et al., 2012).

Os primeiros implantes dentários tinham como característica o uso de materiais que não tinham propriedades mecânicas e biocompatibilidade adequadas, o que resultava na grande maioria das vezes na perda do elemento implantado e conseqüente desconfiança da classe odontológica no emprego deste tipo de recurso (ALBREKTSSON et al., 1986).

Na década de 1950, Brånemark realizou um experimento em que usou uma câmara de implante de titânio para estudar o fluxo sanguíneo no osso de coelho. Na conclusão do experimento, durante a remoção das câmaras de titânio dos ossos, este observou que o osso havia se integrado completamente ao implante impossibilitando a remoção da câmara. À esta íntima integração Brånemark deu o nome de "osteointegração" e assim vislumbrou a possibilidade do uso desta descoberta em humanos (ALBREKTSSON et al., 1983).

Aplicando o termo “osteointegração” à implantodontia, refere-se ao contato direto entre tecido ósseo vivo e a superfície de um implante que suporta carga direta em nível histológico, de modo que o contato direto do osso e da superfície do implante possa ser verificado microscopicamente (BRÅNEMARK et al., 1983).

Dos diversos materiais utilizados para confecção de implantes e biomateriais, algumas ligas têm se destacado, dentre elas as ligas de Ti7,5Mo, que apresenta notória biocompatibilidade e características biomecânicas adequadas, como baixo módulo de elasticidade (55GPa) (OH et al., 2005).

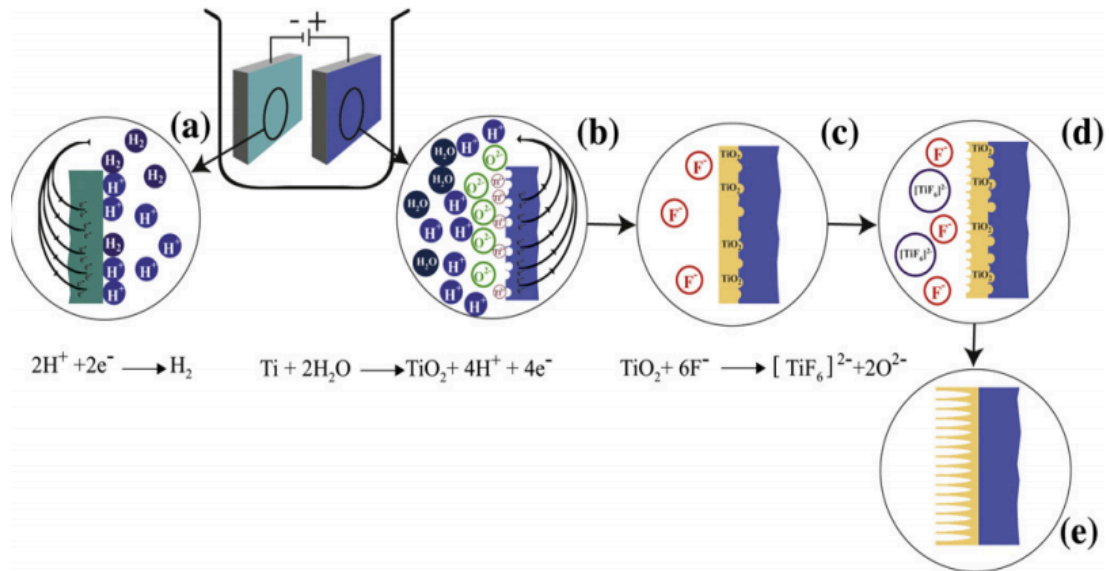
Estudos anteriores avaliando a osteointegração da liga Ti7,5Mo mostraram que, a partir da análise histológica de implantes cilíndricos implantados em fêmur de coelhos, a formação de tecido ósseo ao redor dos implantes de Ti7,5Mo foi duas vezes superior à que ocorre para a liga Ti-6Al-4V. A ótima biocompatibilidade das ligas de Ti7,5Mo indica sua aplicação para a confecção de implantes dentários (HO et al., 1999).

Também tem sido reportada a possibilidade de se preparar óxidos metálicos nanoestruturados baseados no processo eletroquímico de auto-organização. Basicamente, o crescimento do filme anódico é determinado por um balanço entre a taxa de formação e taxa de dissolução do filme de óxido dada pela natureza do eletrólito, que está intimamente ligada a

outros parâmetros de processamento como por exemplo, concentração do eletrólito, potencial aplicado, densidade da corrente e pH (ESCADA et al., 2012).

A partir da otimização destes parâmetros a produção de superfícies contendo nanotubos se torna possível, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema ilustrando o crescimento de nanotubos por anodização



Fonte: Minagar et al. (2012)

A modificação de superfície dessas ligas, empregando a anodização, com a formação de uma superfície nanoestruturada, proporciona melhor resposta biológica celular, que foi verificada a partir da realização de estudos *in vitro* (ESCADA et al., 2017). No entanto, a resposta biológica óssea em estudo *in vivo* com a Liga Ti7,5Mo com superfície nanoestruturada ainda não foi determinada.

Estudos mais recentes têm demonstrado que as células do corpo humano estão predispostas a interagir com superfícies nanoestruturadas, tais como superfícies nanorugosas ou contendo nanopartículas, e que materiais em nanoescala interagem com algumas proteínas de forma mais eficaz do que os materiais convencionais. (ESCADA et al., 2017; BRAMMER et al., 2011).

Conforme exposto, o emprego da anodização como técnica de modificação de superfícies em ligas de titânio pode oferecer uma alternativa viável no desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas, especialmente na área da implantodontia, com materiais que terão características biológicas, mecânicas e de superfície ainda melhores e mais confiáveis.

1.2 OBJETIVOS

Esse estudo *in vivo* tem como objetivo principal avaliar a osteointegração da liga Ti7,5Mo após tratamento de superfície empregando anodização em eletrólito composto de glicerol e fluoreto de amônio a 0,25%, para formação de nanotubos auto-organizados de dióxido de titânio (TNT), em diferentes protocolos e com sua opção sem tratamento de superfície.

Objetivos específicos:

- Caracterizar as superfícies das amostras dos três Grupos por meio de MEV, difração de raios X, espectroscopia Raman e perfilometria óptica;
- Analisar o filme de dióxido de titânio formado na superfície anodizada para determinar sua morfologia, composição química, rugosidade superficial e estrutura cristalina;
- Analisar a bioatividade da superfície do material quanto às variáveis de contato entre osso e implante (BIC) e fração da área ocupada por osso (BAFO), presentes ao redor das amostras após o período de 30 dias.

Esse estudo tem como meta principal a utilização da técnica de anodização utilizada no experimento na fabricação de implantes dentários da liga Ti7,5Mo para fins comerciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TITÂNIO

As primeiras tentativas de uso do titânio como material para fabricação de implantes datam do final da década de 1930 (RODRIGUES, 2013). Verificou-se que o titânio era tolerado, assim como os aços inoxidáveis e as ligas de cobalto-cromo. Isso se deve às excelentes propriedades do titânio, como densidade tão baixa quanto a do osso, alta resistência mecânica, resistência à fadiga, baixo módulo de elasticidade, boa resistência ao desgaste e alta biocompatibilidade.

O titânio como biomaterial metálico apresenta comprovada osteointegração. Além disso, apresenta comportamento bioinerte pela formação da camada de óxido em sua superfície e, pode se tornar bioativo por meio da modificação de sua superfície com incorporação de cálcio e fosfato (LI et al., 1994)

A estabilidade química conferida ao titânio, pela formação de uma camada passiva de TiO_2 quando inserido no corpo humano e suas excelentes propriedades mecânicas, tornaram o titânio o biomaterial de eleição para aplicações biomédicas (ELIAS et al., 2008). Dentre suas diversas aplicações, a fabricação de implantes dentários é uma das mais utilizadas. O filme amorfo de TiO_2 que se forma naturalmente sobre o substrato de titânio, apresenta resistência à corrosão, baixo nível de condutibilidade elétrica, elevada resistência à corrosão e uma fase termodinamicamente estável em meio fisiológico (SPRIANO et al., 2005).

O meio bucal apresenta fatores como variações de temperatura e pH, presença de biofilme microbiano e propriedades físicas e químicas dos alimentos que podem ser agressivos aos metais, provocando a sua corrosão. Além disso, grande parte dos implantes trabalha sob a ação de cargas mecânicas que geram atrito, deslizamento e, conseqüentemente, a possível liberação de partículas metálicas (SMITH e HASHEMI et al., 2013; MANIVASAGAM et al., 2010). Como resultado destes mecanismos de desgaste e corrosão, a integridade mecânica e estrutural do implante pode ser comprometida levando à sua falha prematura ou à fratura.

2.2 LIGAS DE TITÂNIO – ASSOCIAÇÕES

Com o intuito de buscar por características que poderiam conferir o titânio melhores propriedades mecânicas e torná-lo ainda mais reativo como biomaterial, as associações de outros metais à liga foram amplamente utilizadas.

Dentre os elementos de liga que são adicionados ao titânio Comercialmente Puro (C. P.) alguns se mostraram tóxicos ou com possíveis efeitos deletérios a longo prazo, como o vanádio e o alumínio. Os produtos da degradação de implantes fabricados com estes metais têm sido associados a complicações como osteólise, inflamações, reações alérgicas e vasculites, podendo ainda ocasionar o acúmulo de íons metálicos em órgãos, teratogenicidade e câncer (HANAWA, 2004; OKAZAKI e GOTOH 2005; SUMITA et al., 2004).

Além disso estas ligas também apresentavam características mecânicas inadequadas, como baixa resistência ao desgaste e elevado módulo de elasticidade (EISENBARTH et al., 2004; KOIKE et al., 2005).

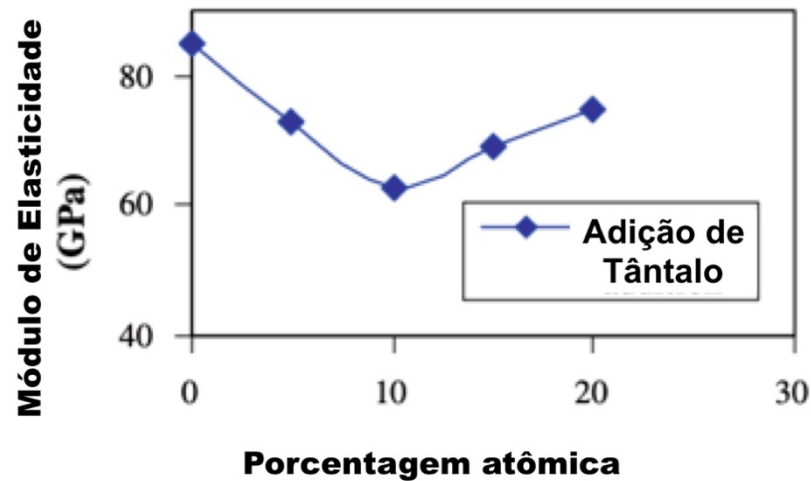
2.2.1 Ligas TiMo – Ti7,5Mo

Visando melhores características às ligas destinadas à fins protéticos, outras ligas agora produzidas com materiais que não produzam riscos por sua utilização, chamadas de ligas de segunda geração, como as ligas Ti-13Nb-13Zr (ASTM F1713), Ti-12Mo-6Zr (ASTM F1813), Ti-35Nb-7Zr-5Ta dentre outras, foram testadas como materiais para implantes.

Como as ligas de zircônio de titânio com 13% a 17% de zircônio (TiZr1317), que têm melhores atributos mecânicos, como aumento do alongamento e resistência à fadiga, do que o titânio puro. O crescimento de osteoblastos, essenciais para a osteointegração, não é impedido pelo titânio e pelo zircônio. O Roxolid desenvolvido pela Straumann (Straumann AG, Basel, Suíça) atende aos requisitos dos mecânicos dos implantes dentários e é 50% mais forte que o titânio puro, suas propriedades mecânicas superiores possibilitam sua utilização como implantes finos e componentes de implantes que podem ser submetidos a altas deformações e, além disso o material apresenta boa biocompatibilidade semelhante ao titânio puro (SAINI et al., 2015).

A incorporação de diferentes elementos químicos possibilita maior variação nas propriedades mecânicas e também de suas características de biocompatibilidade. A Figura 2 demonstra a variação do módulo de elasticidade da liga de Ti-xNb-yTa-5Zr quando o tântalo é incorporado (GEETHA et al., 2009).

Figura 2 - Variação do módulo de elasticidade da liga de Ti-xNb-yTa-5Zr pela incorporação do tântalo



Fonte: Geetha et al. (2009)

Tendo como características o baixo módulo de elasticidade e elevada relação resistência/módulo, além de excelentes características de formação óssea em sua superfície, Lin et al. (2005 e 2007) desenvolveram a liga binária de Ti7,5Mo. Quando Ho e colaboradores (1999) avaliaram as características das diferentes porcentagens de associação do molibdênio ao titânio, num espectro de variação de 6 a 20% (m/m) onde foram observadas as diferentes fases presentes, a estrutura cristalina em função da porcentagem de molibdênio e também algumas propriedades mecânicas como dureza, módulo de elasticidade e resistência à flexão, a condição que melhor se adequou aos critérios observados foi a de 7,5%, com módulo de elasticidade de 55GPa e excelente resistência a corrosão quando comparada ao titânio C.P.. O Quadro 1 apresenta as diferentes propriedades das ligas em com suas variações de proporção.

Quadro 1 - Variação das propriedades mecânicas conforme porcentagem de incorporação de molibdênio na liga.

<i>Liga (%p Mo)</i>	<i>Propriedades Mecânicas</i>		
	<i>Dureza (HV 200g)</i>	<i>Mód. Elast. (GPa)</i>	<i>Resistência (MPa)</i>
Ti-6Mo	270	70	1480
Ti-7,5Mo	265	55	1400
Ti-9Mo	320	78	1485
Ti-10Mo	347	97	1780
Ti-12,5Mo	348	84	1420
Ti-15Mo	310	70	1380
Ti-17Mo	310	78	1650
Ti-20Mo	305	86	1620

Fonte: Adaptado de Ho et al. (1999)

2.3 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE

A classificação mais empregada dos possíveis tratamentos utilizados para modificar a superfície dos materiais é apresentada no Quadro 2, de acordo com o emprego de recursos mecânicos, físicos e químicos (SOBIESZCZYK et al., 2010).

Quadro 2 – Diferentes métodos de modificação de superfície e seus objetivos.

MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	OBJETIVOS
Métodos Mecânicos	Aumento da adesão a partir de topografia de superfície específica
Usinagem	
Lixamento	
Polimento	
Jateamento	
Métodos Químicos	Aumento da biocompatibilidade, bioreatividade e condutividade óssea Aumento da resistência a corrosão Remoção de contaminação
Tratamento ácido	
Tratamento alcalino	
Tratamento com peróxido de hidrogênio	
Tratamento sol-gel	
Anodização	
Deposição química de vapor (CVD)	
Métodos bioquímicos	
Métodos físicos	Aumento da resistência ao desgaste, corrosão e biocompatibilidade
Plasma spray, aspersão térmica	
Deposição física de vapor (PVD)	
Implantação iônica	
Plasma	

Fonte: Adaptado de Sobieszczyk et al. (2010)

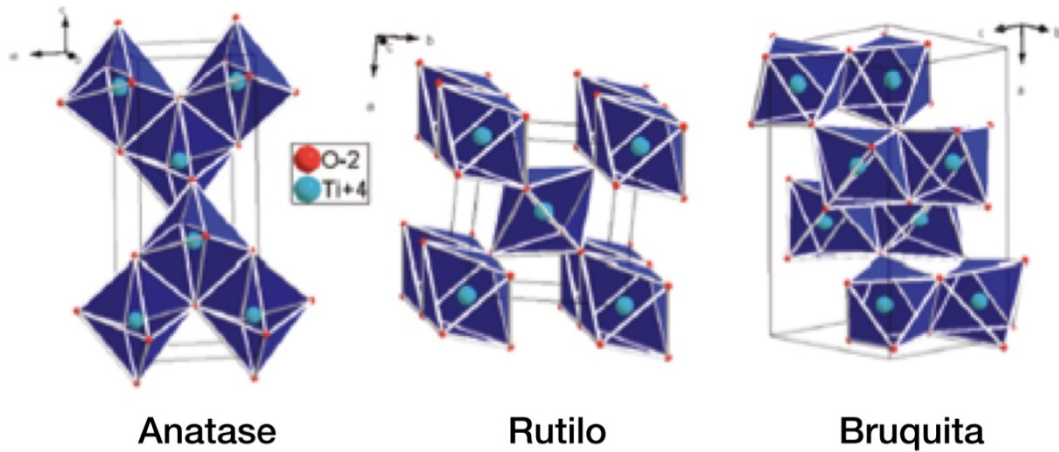
Para que um processo de modificação de superfície possa ser considerado físico, este deve envolver as energias térmica, cinética e elétrica e não reações químicas. Na maioria dos processos físicos ocorre a deposição de um filme a partir da condensação na superfície do substrato com o vapor adjacente, que fornece o material para o revestimento na forma de

átomos, íons ou moléculas geradas por um alvo. Também se incluem nesta categoria a implantação iônica e a descarga por plasma (DUAN e WANG, 2006).

Já nas modificações químicas de superfície, como a deposição por vapor químico, processo biomimético, deposição pelo método sol-gel, deposição por eletroforese e anodização, o que ocorre é a formação de uma camada homogênea regular de óxido com espessura variável sobre a sua superfície (LIU et al., 2004). Entre eles, foram introduzidas uma superfície micro-rugosa, granulada e atacada com ácido (SLA, Straumann AG, Basel, Suíça) e sua contraparte quimicamente modificada (SLActive), utilizada para reduzir o período de osteointegração. Com relação às superfícies do SLA, estudos de longo prazo relataram que os implantes de SLA podem ser carregados com segurança entre 6 e 8 semanas, com altas taxas de sobrevivência atingindo 99%. Em relação aos implantes SLActive, alguns ensaios clínicos relataram que estes podem ser carregados em oclusão total em apenas 3 semanas após a colocação (WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2010).

Desde os anos 1970, a chamada “chimie douce” introduziu métodos sintéticos que produzem novos materiais com características únicas, incluindo a síntese de materiais híbridos ou a síntese a baixa temperatura de óxidos (LIVAGE, 2001). O processo de precipitação em soluções aquosas é um dos métodos sintéticos desenvolvidos através do “chimie douce”. Esse processo tem sido usado para produção de compostos de óxido de titânio (TiO_2) com fácil controle do tamanho/morfologia, bem como do arranjo estrutural (JOLIVET et al., 2008). Esta última característica é a mais relevante, pois o dióxido de titânio tem várias formas alotrópicas com diferentes estruturas: O óxido de titânio (TiO_2) presente na superfície do titânio e de suas ligas é termodinamicamente estável e apresenta-se em três formas alotrópicas: rutilo, anatase e bruquita, as duas primeiras apresentam estrutura cristalina tetragonal, enquanto que a bruquita apresenta-se ortorrômbica (DAMBOURNET et al., 2009). Embora a estrutura anatase consista em octaedros de TiO_6 de compartilhamento de borda, as estruturas de rutilo e de bruquita exibem configurações de canto e arestas (Figura 3). Essas fases podem ser preparadas em meio aquoso, por meio de precipitação.

Figura 3 – diferentes formas alotrópicas observadas nos óxidos de titânio.



Fonte: Dambournet et al. (2009)

Das três formas alotrópicas o rutilo é a mais estável (TANG et al.,1994), quanto as características de molhabilidade a superfície formada apenas por rutilo é hidrofóbica, enquanto a superfície coberta por uma mistura de rutilo e anatase é hidrofílica (LIM et al., 2001).

No Quadro 3 é possível observar os parâmetros das diferentes formas alotrópicas do TiO_2 .

Quadro 3 – Diferentes parâmetros das variações alotrópicas do TiO_2

Propriedades físicas	Rutilo	Bruquita	Anatásio
Célula unitária	Tetragonal	Ortorrômbica	Tetragonal
Parâmetros de rede (Å)	$a_0 = 4,58$ $c_0 = 2,98$	$a_0 = 9,17$ $b_0 = 5,43$ $c_0 = 5,13$	$a_0 = 3,78$ $c_0 = 9,50$
Densidade (g/cm^3)	4,245	4,119	3,893
Volume molar (cm^3/mol)	18,817	19,393	20,519
Energia de formação (kJ/mol)	945	942	939
Constante dielétrica (ϵ)	110	78	48

Fonte: Velten et al.(2002)

2.3.1 Anodização

Por meio da anodização em eletrólitos aquosos e não aquosos é possível o crescimento de estruturas de óxidos organizados de TiO_2 nanotubulares de espessura considerável (100 nm). Pela similaridade das nanofibras formadas à estrutura da matriz extracelular, o crescimento celular, o aumento da adesão de osteoblastos, a proliferação e o crescimento ósseo, se tornam viáveis possibilitando assim o seu estudo (CHANG et al. 2012).

O processo eletroquímico de anodização ocorre a partir da aplicação de um campo elétrico, no qual a ligação de oxigênio na matriz metálica possibilita a formação de um filme de óxido sobre a superfície do substrato (BRUNETTE et al., 2001).

Para que ocorra a anodização, uma célula eletroquímica composta por dois eletrodos, um anodo de titânio e um catodo de platina, sofre a passagem de uma corrente elétrica ou potencial constante. A camada de óxido na superfície do anodo se forma por reações de oxidação e redução, em combinação com a difusão de íons no eletrólito. Quando é aplicada uma corrente constante, o controle da reação de oxidação do anodo se dá por modo galvanostático, já quando ocorre a aplicação de uma tensão constante, por modo potenciostático (ASOH et al., 2001).

A anodização para formar camadas de nanotubo é realizada aplicando-se uma etapa potencial (ou rampa) a uma voltagem constante entre 1 a 30 V em eletrólito aquoso ou 5 a 150 V em eletrólitos não aquosos contendo aproximadamente 0,05 -0,5 M (mol L^{-1}) de íons de flúor (ROY et al., 2011).

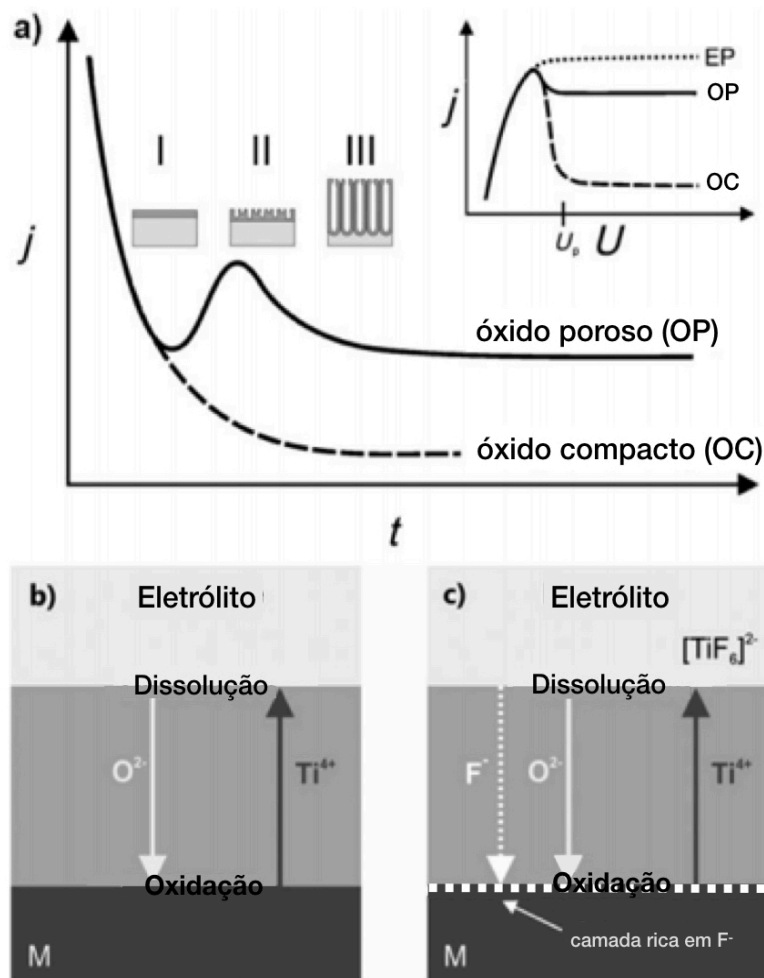
O TNT pode ser produzido por anodização usando diferentes eletrólitos contendo flúor como NH_4F / CH_3COOH , H_2SO_4 / HF , Na_2HPO_4 / NaF , etc. O diâmetro do nanotubo é notavelmente afetado pelo tipo de eletrólito usado (YANG et al. 2008). Geralmente, dois tipos diferentes de eletrólitos, eletrólitos orgânicos (ou neutros) e aquosos, são usados para a síntese de TNT. Quando a anodização ocorre em uma condição ácida, em outras palavras, com alto teor de água este é chamado de eletrólito aquoso. Um eletrólito orgânico (ou neutro) tem uma pequena quantidade de oxigênio em relação ao teor de água em comparação a um eletrólito aquoso.

Nos eletrólitos orgânicos como $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ / NH_4F e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / NH_4F , são obtidos nanotubos em camadas de TNT mais auto-organizadas e com maior comprimento (KANECO et al., 2007; TSUCHIYA et al., 2007). Yang et al. (2008) relataram que, para obter TNT longo, eletrólitos contendo flúor devem ser usados no lugar de eletrólitos com tampões contendo espécies de eletrólitos altamente viscosos (orgânicos). Curvas suaves de corrente foram obtidas em todas as tensões nos eletrólitos de glicerol (orgânico), enquanto flutuações de corrente foram observadas em eletrólito aquoso, que é devido à alta taxa de dissolução química e à oxidação do Ti (GONG et al., 2001).

A investigação por microscopia de força atômica realizada por Indira et al. (2015) mostra que a camada porosa se forma sob uma competição de formação de titânia e dissolução de óxido até uma espessura limite de ~ 75 e 100 nm, respectivamente, para eletrólitos aquosos e orgânicos.

O crescimento do óxido pode ser monitorado registrando a relação característica de relação corrente/tempo, como observado na Figura 4.

Figura 4 - Características da reação de crescimento da camada de óxido conforme o tipo de solução do eletrólito, (a) comportamento da corrente-tempo, (b) transporte apoiado por íons que se movem através das camadas de óxido na ausência e (c) presença de íons de flúor.



Fonte: Adaptado de Roy et al. (2011)

Baseando-se na Figura 4 temos:

a) Comportamento típico de corrente-tempo ($j-t$) após um pico de tensão na ausência (---) e presença (___) de íons de flúor no eletrólito. Tanto o óxido compacto (livre de flúor) quanto

a formação de óxido metálico poroso / tubular (contendo flúor) se formam em diferentes estágios morfológicos (I – III):

I) Eletro polimento (químico);

II) Formação de camada de óxido compacta (OC), não solúvel no eletrólito;

III) Com a variação das condições eletroquímicas, uma competição entre a dissolução e a formação do óxido ocorrerá, levando à formação de uma camada de óxido porosa. Sob condições experimentais mais específicas ocorrerá a auto-organização dos poros durante o crescimento;

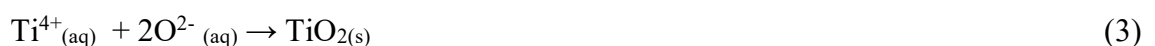
Em b e c, observa-se o desenho esquemático mostrando transporte apoiado por íons que se movem através das camadas de óxido na ausência e presença de íons de flúor: migração rápida de flúor leva à acumulação na interface metal-óxido.

Uma maneira esquemática de explicar o processo da formação do óxido durante a anodização, consiste na divisão das camadas de anodização em camada anódica externa e hidratada, exposta ao eletrólito e, camada anidra, mais interna (TAVEIRA et al., 2005). Por possuir íons hidroxila em excesso quando comparada à camada interna, a camada externa é considerada $Ti(OH)_4$, enquanto a camada anódica interna, é representada por TiO_2 . As etapas abaixo representam as reações que ocorrem no anodo, conforme as seguintes etapas:

I) Oxidação do metal e produção de íons Ti^{4+} e elétrons de acordo com a equação (1):



II) Os íons Ti^{4+} liberados combinam-se com OH^- formando a camada anódica hidratada (equação (2)) e O^{2-} formando a camada de óxido (equação (3)) presentes na água. Finalizando o processo enquanto a camada hidratada formada libera água o óxido é produzido (equação (4)).



No catodo, os elétrons liberados durante a oxidação do Ti (equação (1)), reagem com íons hidrogênio (equação (5)):

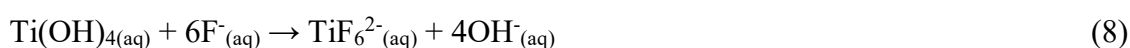
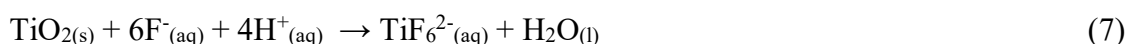


Somando-se as equações de (1) a (5), o processo de formação do óxido é dado por:



Quando eletrólitos ácidos são utilizados para anodização do titânio, sua capacidade de formação de óxidos se torna superior à de soluções convencionais (sais neutros e soluções alcalinas) ou soluções de hidróxido. Quando são utilizados íons fluoreto a camada de óxido não é compacta, como na obtida com soluções convencionais ou de hidróxido. (BERGER et al., 2007).

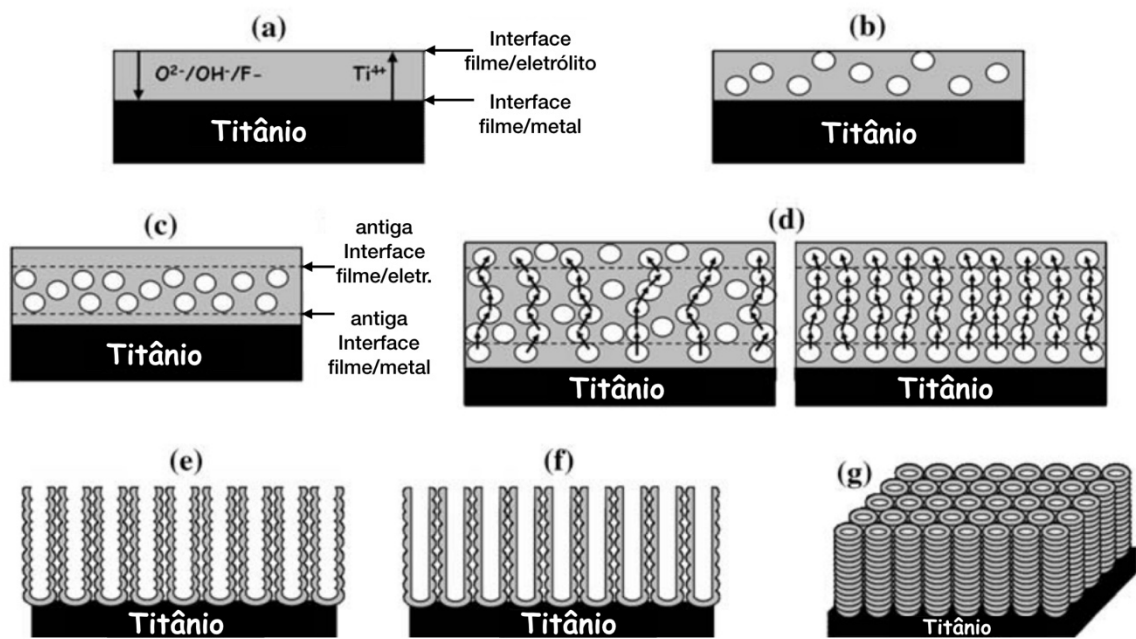
Os íons de fluoreto têm como característica a formação de complexos de TiF_6^{2-} solúveis em água. Estes íons atacam a camada de óxido e a camada hidratada, como descrito nas equações (7) e (8), ou reagem com os íons Ti^{4+} , de acordo com a equação (9) (TAVEIRA et al., 2005).



A estrutura do óxido de titânio produzido é determinada pela competição entre a formação do óxido e sua dissolução, conforme observado nas equações (TAVEIRA et al., 2005).

Na Figura 5 observa-se que a presença de íons fluoreto, sob a ação do campo elétrico, gera cavidades (b) enquanto o óxido evolui e se torna mais espesso (c). A formação de vários nanotubos perpendiculares (d) à superfície ocorre pela associação das cavidades que tendem a se orientar verticalmente à superfície do metal (e). Em perspectiva tridimensional os nanotubos se agrupam em pilhas de anéis alongados (g).

Figura 5 - Possível esquematização do crescimento e organização dos nanotubos durante o processo de anodização



Fonte: Adaptado de Jaroenworarluck et al. (2007)

Variando-se as concentrações de fluoreto de amônio entre 0,010 mol/L e 0,2 mol/L são produzidos nanotubos de titânia abertos na parte superior e fechados na parte inferior, enquanto que o diâmetro externo se manteve constante em todo seu comprimento. Já o diâmetro interno diminuiu em direção ao substrato (XIE e BLACKWOOD, 2010).

Variações nos parâmetros de processamento como, por exemplo, composição do eletrólito, potencial aplicado, densidade da corrente, pH e temperatura, resultarão em filmes de óxido com diferentes rugosidades superficiais, morfologias e composições químicas. Assim, baixas tensões (abaixo de 20V) produzirão estrutura amorfas do óxido de Ti, enquanto tensões maiores estruturas cristalinas (SUL et al., 2001). Podendo assim ser observada na superfície diferentes estruturas cristalinas, anatase, uma mistura de anatase e rutilo, ou apenas rutilo (BERGER et al., 2008). Além disso o modo como estarão ordenados também pode variar de compacta, porosa desordenada, porosa ordenada ou nanotubular altamente ordenada (GHICOV e SCHMUKI, 2009)

As características da camada de nanotubos formada, tem relação direta com os parâmetros utilizados durante o processo de anodização. Potencial e tempo de anodização determinarão a geometria dos nanotubos. O comprimento dos nanotubos é determinado pelo tempo de anodização, enquanto que o diâmetro dos nanotubos é depende da tensão aplicada. (BAUER et al., 2006; MACAK et al., 2008; LEE et al., 2006; MACAK et al., 2007; GHICOV & SCHMUKI, 2009; LEE et al., 2008)

A obtenção de nanotubos de TiO_2 com características volumétricas adequadas tanto em altura quanto diâmetro, foi obtida nos experimentos de Escada (2012) na superfície de discos e com Nogueira (2017) em discos e implantes, com anodizações realizadas em tensões de 20V e 30V por 24h em eletrólito de glicerol e NH_4F 0,25%.

Após a anodização, a camada de nanotubos possuirá estrutura amorfa, somente após sua calcinação é que apresentará estrutura cristalina definida. A temperatura utilizada neste processo tem relação direta com o tipo de estrutura cristalina final. O Quadro 4 descreve as várias formas cristalinas obtidas por diferentes autores conforme a temperatura de calcinação utilizada.

Quadro 4 - Variações alotrópicas obtidas conforme a variação da temperatura de calcinação

Autor	Temperatura de Calcinação (°C)	Fases encontradas
Varghenese et al.,(2003)	230-280	Anatase
	430-480	Anatase + rutilo
	580-620	Rutilo + fase α'
	680-880	Rutilo
Yang et al.,(2008)	400	Anatase + fase α'
Li et al.,(2009)	300-500	Anatase
	600	Rutilo
	700	Anatase + rutilo
Yu & Wang (2010)	300-500	Anatase + fase α'
	600	Rutilo
	600-700	Anatase + rutilo
	800	Rutilo
Regonini et al.,(2010)	300-400	Anatase
	500	Anatase + rutilo
	600	Rutilo
Fang et al.,(2011)	450	Anatase
	800	Rutilo
Rangel et al.,(2018)	400-450	Anatase
	500	Anatase + rutilo
	600-800	Rutilo

Fonte: Adaptado de Velten et al. (2012)

A uniformização da camada de óxido dos nanotubos em arranjo cristalino de anatase apresentará propriedades físicas e características de superfície superiores, como grande área de superfície, pequeno tamanho de cristal e locais mais ativos para a catálise mesoporosa,

resultando em reatividade com tecidos vivos superior à superfícies de titânio puro não tratadas numa ordem de 300 a 400% maiores (OH et al., 2006).

Além das melhores características físicas, uma das mais desejáveis no aspecto biológico é a alteração da molhabilidade superficial resultante da anodização. Diferentes hidrofílicidades podem ser obtidas por meio da variação dos parâmetros de anodização, conforme observado por Escada et al. (2017) ao realizar este tipo de tratamento na liga de Ti7,5Mo, obtendo variação no ângulo de contato entre 37,7° e 9,8°. A molhabilidade afeta a adsorção de proteínas, adesão/ativação plaquetária, coagulação sanguínea e adesão celular e bacteriana (CHOEE et al., 2004).

A superfície anodizada das ligas de titânio também podem ter outras propriedades quando associadas a incorporação de medicamentos. A utilização das ligas de Ti7,5Mo com superfície anodizada com crescimento de nanotubos de TiO₂ e incorporação de clorexidina por imersão, obteve resultados bactericidas e antifúngicos bastante eficientes (CAROBOLANTE et al., 2016; OLIVEIRA, L L., 2016).

2.4 IMPLANTODONTIA

2.4.1 Histórico

Registros arqueológicos citam os primeiros implantes feitos de pedra e marfim na China e no Egito antes da Idade Contemporânea. Outros materiais como ouro e marfim foram utilizados nos séculos XVI e XVII. Dispositivos de implantes metálicos feitos de ouro, ligas de irídio, tântalo, aço inoxidável e ligas de cobalto foram também desenvolvidos no início do século XX. (MISCH, 2004)

No Antigo Egito de 2500 aC dentes periodontalmente comprometidos eram estabilizados com o uso de fios de ligadura de ouro. Dentes de animais implantados esculpidos em marfim citados em escritos egípcios antigos são os exemplos mais antigos da implantodontia primitiva. (RING, 1985). Conchas do mar foram usadas em vez de dentes em 600 dC, evidências do que foi encontrado em Honduras e restaurações dentárias feitas de jade e turquesa foram encontradas em crânios maias. Uma das primeiras utilizações de implantes documentadas ocorreu na França com Albucasis de Condue (936-1013) que usou o osso de boi para substituir os dentes perdidos;

Em 1700, John Hunter sugeriu a possibilidade de transplantar os dentes de um humano para outro. No século XVIII, Pierre Fauchard e John Hunter documentaram o transplante

dentário com as condições para o seu sucesso. Eles afirmaram que o sucesso foi maior com dentes anteriores ou substituição de pré-molares e em jovens com dentes saudáveis (ANUSAVICE, 2012)

Em 1791, William Gregor desenvolveu o Titânio na Inglaterra e Martin Heinrich Klaproth o batizou em homenagem aos Titãs da mitologia grega em 1795. O Titânio não puro foi preparado por Nilson e Pettersson em 1887. Em 1809, Maggiolo confeccionou raízes feitas de ouro que foram fixadas aos dentes por uma mola. Estes implantes de ouro do tamanho de um dente foram colocados sem uma coroa para cicatrizar passivamente no alvéolo dentário logo após a extração, logo acima da gengiva (não eram posicionados no interior no osso). A coroa era confeccionada após a cicatrização. A inserção das raízes de ouro com êxito era seguida de intensa dor e inflamação gengival (GOSAVI et al., 2013).

Harris em 1887 utilizava como implantes pinos de platina recobertos com chumbo. O pino tinha formato de raiz dentária e o chumbo era asperizado para maior retenção. Bonwell, em 1895, usou tubos de ouro e irídio implantados no osso para substituição de um elemento dentário e para suportar próteses totais. Payne, em 1898, implantou uma cápsula de prata como base para uma coroa de porcelana que foi cimentada várias semanas depois. Scholl em 1905 demonstrou um implante de raiz de porcelana corrugado. O implante foi bem-sucedido por dois anos e ancorado a dentes adjacentes e obturações usando-se pinos. (ANUSAVICE, 2012)

O titânio comercialmente puro (99,9%) foi preparado pela primeira vez em 1910 por Matthew A. Hunter por aquecimento de $TiCl_4$ com sódio em uma bomba de aço a 700-800°C no processo Hunter. Em 1932, William Justin Kroll produziu titânio, reduzindo o tetracloreto de titânio ($TiCl_4$) com cálcio. Oito anos depois, ele refinou esse processo usando magnésio e na mesma proporção do sódio, no que ficou conhecido como o processo Kroll (AFFAIRS, ADA COUNCIL ON SCIENTIFIC, 2003).

Greenfields, em 1913, introduziu e patenteou um implante oco em “cesta” feito de uma malha de 24 fios da liga platina/irídio soldada com ouro de 24 quilates, sendo utilizado como implante unitário e próteses fixas de até oito elementos (ANUSAVICE, 2012).

Depois de 1925, a era moderna começou com o avanço dos biomateriais de implantes, Venable et al. (1937) analisaram as interações da liga de cobalto e outros metais e ligas disponíveis com o osso, concluindo que certos metais produziam reação galvânica que levava à corrosão quando em contato com os fluidos teciduais. Strock, em 1939, descreveu um método para instalação de um parafuso da liga fundida de cobalto, cromo e molibdênio, a qual denominou de Vitallium, para fornecer uma ancoragem para a colocação de um elemento dentário perdido. A liga foi considerada relativamente inerte, compatível com tecidos vivos e

resistente a reações adversas com fluidos corporais. As primeiras avaliações documentaram taxas de sobrevivência do implante de 10 anos ou mais anos. O Vitallium também foi utilizado em várias outras formas de dispositivos cirúrgicos, tais como implantes ortopédicos, placas subperiosteais, parafusos, ancoras e nas articulações (ANUSAVICE, 2012).

Em 1947, Formiggni desenvolveu um implante helicoidal espiral de hélice única, feito de tântalo e aço inoxidável. Ao mesmo tempo, Raphael Chercheve projetou um implante de espiral dupla feito de uma liga de cromo-cobalto. Em 1948, Goldberg & Gershkoff relataram a inserção do primeiro implante subperiosteal viável.

Em 1952, Branemark desenvolveu um projeto de implante com rosca feito de titânio puro que aumentou a popularidade dos implantes para novos níveis. Branemark estudou todos os aspectos do desenho do implante, incluindo fenômenos biológicos, mecânicos, fisiológicos e funcionais em relação ao sucesso do implante endosteal. Um aspecto muito importante dessa evolução, que inclui biomateriais, desenhos e aplicações clínicas, foi a pesquisa clínica realizada por P I Branemark na Suécia. Seus estudos usaram titânio puro, em formato de raiz e condições altamente controladas para cirurgia, restauração e manutenção. Em 1963, Linkow projetou e introduziu o design da cesta oca com furos de ventilação e roscas de parafuso (ANUSAVICE, 2012).

Existem quatro tipos de desenhos de implantes que evoluíram ao longo de séculos de desenvolvimento. Abaixo são listados os quatro tipos: (AFFAIRS, ADA COUNCIL ON SCIENTIFIC, 2003)

- Endosteal: colocados no osso basal alveolar maxilar ou mandibular com transecção de apenas uma única lâmina cortical. O implante endosteal mais popular é o implante que mimetiza o formato das raízes dos dentes para a distribuição de carga direcional e posicionamento adequado no interior do osso;
- Subperiosteal: é composto por uma subestrutura e uma superestrutura de implante em que a moldura de corpo customizado é colocado diretamente abaixo do periosteio sobre o córtex ósseo subjacente. Foi desenvolvido por Dhal (1940) e melhorado por Berman (1951), que utilizou uma técnica de impressão óssea direta;
- Transosteal: combina os tipos subperiosteal e endosteal. Este penetra nas duas lâminas corticais e atravessa toda a espessura do osso alveolar. O conceito de implantes transosteal foram concebidos pela primeira vez na Alemanha em 1930. Small (1968) desenvolveu o implante agulhado mandibular, que foi alterado por Bosker (1982) com implante transmandibular feito de liga de ouro;

- Epitelial: que é inserido diretamente na mucosa bucal.

Independentemente do tipo de implante, podem ocorrer falhas devido a fatores locais e sistêmicos durante a substituição de dentes perdidos no procedimento cirúrgicos de colocação de implantes.

Os implantes atuais tem formas e tamanhos variados para se ajustarem aos dentes que substituirão e aos diferentes requisitos protéticos demandados. Estes implantes utilizam como materiais titânio ou ligas de titânio com graduação específica para favorecer sua reatividade superficial.

2.4.2 Tratamentos de superfície na implantodontia

Para melhorar o processo de osteointegração as superfícies dos implantes têm sido aprimoradas através de diferentes tratamentos de superfície, visando inicialmente, o aumento da superfície de contato entre o implante e o tecido ósseo. Um dos fatores principais do processo de interação física e química entre células e implantes é a topografia de sua superfície.

As superfícies dos implantes de titânio podem ser classificadas em três Grupos principais: usinadas (lisas), texturizadas e biomiméticas.

2.4.2.1 Superfícies usinadas “lisas”

O implante usinado tem rugosidade de superfície entre 0,5 μm e 1 μm , que são resultantes do processo de corte (usinagem), não recebendo tratamento químico ou mecânico, apresentando apenas a macromorfologia de usinagem. Esses implantes tem pequenas ranhuras que permitem o processo de mineralização do osso em direção ao implante, sem apresentar superfície indutora. Forma-se uma superfície anisotrópica, a qual é responsável por promover o processo de adesão celular e a produção da matriz proteica. (THAKRAL et al., 2014).

2.4.2.2 Superfícies texturizadas

2.4.2.2.1 Plasma spray

O plasma spray, antes da introdução do jateamento seguido de ataque ácido, era o tipo de tratamento mais comum, feito com a chama ionizada de um gás aquecido entre 10.000 °C e 30.000 °C, e as partículas são lançadas em grandes velocidades contra o corpo do implante.

Após o contato, essas partículas resfriam e se solidificam. O spray de plasma é utilizado para aplicar e incorporar o Ti (titânio) e a HA (hidroxiapatita) na superfície do implante. (GALLI et al. 2013).

2.4.2.2.2 Plasma spray de hidroxiapatita

O tratamento para recobrimento com nucleação de apatita ocorre por meio de três etapas: tratamento alcalino, tratamento térmico e imersão em solução sintética equivalente ao plasma sanguíneo. Essa camada é formada pela pulverização do spray de plasma de hidroxiapatita sobre o implante. A rugosidade depende do tamanho das partículas, da aderência dessas, da velocidade e distância em que essas foram lançadas contra o implante. (NAVES et al., 2015)

2.4.2.2.3 Plasma spray de titânio

O plasma de spray de titânio é formado pelo recobrimento do implante com gases ionizados por aspersão térmica com spray de plasma de titânio. Nesse método, a chama ionizada de um gás é lançada contra a parede do implante com uma temperatura elevada entre 10.000 °C e 30.000 °C. Com essa alteração, ocorre a aceleração de absorção do sangue devido ao efeito de molhabilidade, aumentando a área de contato superficial e promovendo, assim, a osteointegração. A partícula de titânio é fundida na superfície, formando uma camada de 50 µm de espessura. E o revestimento resultante fica entre 10 µm e 40 µm, aumentando a superfície do implante. Porém, superfícies entre 0,5 µm e 2 µm já têm uma resposta positiva para osteointegração. Sendo assim, os implantes de superfície tratada com spray de plasma de titânio têm sido pouco utilizados, pois aumentam a possibilidade de contaminação bacteriana, especialmente em implantes realizados imediatamente após às extrações (COLOMBO et al. 2012).

2.4.2.2.4 Modificação por feixe de laser

O implante tem a sua superfície modificada por irradiação por meio de feixes de laser produzindo erosões e uma superfície rugosa. É um tratamento considerado limpo por não interagir com nenhum material externo durante o processo de modificação da superfície, em

que o feixe de laser age como meio físico no tratamento dessa superfície. É um método que produz alto grau de pureza e rugosidade suficiente para uma boa osteointegração. A grande vantagem em relação aos outros tipos de tratamentos de superfície é o controle total no tipo de rugosidade criada, como micro retenções orientadas e regulares em pontos definidos na superfície, o tamanho das rugosidades é controlado pela intensidade do pulso da fonte emissora. Essa técnica não envolve elementos químicos, evitando a contaminação da camada de óxido do titânio (BERARDI et al. 2011).

2.4.2.2.5 Jateamento de partículas

Neste tratamento a superfície do implante é bombardeada com partículas de óxido de alumínio ou de titânio, criando depressões irregulares no corpo do implante. Não há adesão de partículas ao implante, essas servem apenas para criar irregularidades. A rugosidade é dependente do tamanho das partículas, do tempo e da pressão do disparador. Análises em MEV (microscópio eletrônico de varredura) em implantes submetidos ao jateamento de alumínio (Al_2O_3) demonstram resíduos, provenientes do processo de fabricação, que podem contaminar a superfície do implante, o que seria prejudicial à osteointegração, pois competiriam com o cálcio para a formação de osso. O uso de óxido de titânio no lugar da alumina tornou-se uma forma de evitar esses efeitos indesejáveis na superfície do implante (LE GUÉHENNEC, 2007).

2.4.2.2.6 Jateamento seguido de ataque ácido

Os implantes que são tratados com jateamento de areia seguido de ataque ácido, sendo processados sob atmosfera de nitrogênio e armazenados em NaCl (cloreto de sódio) isotônico, são denominados SLActive (Sand blasted Long grit Acid-etched active). As superfícies SLA são tratadas com jatos de areia de granulação grossa (250-500 μm), produzindo macro rugosidades no implante, seguidos por ataque ácido (HCl/H_2SO_4), que é responsável por sua micro rugosidade. Esses implantes têm uma estabilidade secundária mais ativa que os demais implantes, sendo que essa ocorre em duas semanas após a instalação do implante no osso (KLEIN et al., 2013). Nessa nova técnica, a superfície é hidroxilada, e essa mudança química melhora as estruturas superficiais, que são ideais para a adsorção de proteínas e para promover a intenção imediata do implante no tecido ósseo. A superfície SLActive foi desenvolvida para otimizar a estabilidade do implante em menor tempo e diminuir os riscos do tratamento nas fases iniciais da reabilitação (RUPP et al. 2014).

2.4.2.2.7 Ataque ácido

O implante por ataque ácido é imerso em uma substância ácida, a qual provoca erosões nesse corpo. A concentração de ácido, o tempo e a temperatura são fatores determinantes da microestrutura da superfície. Sobre a superfície lisa, o processo mais utilizado é o duplo ataque ácido, realizado com o ácido sulfúrico e o hidrocloreídrico (SCHLEE et al., 2015).

2.4.2.2.8 Superfícies nanotexturizadas por anodização

No caso de superfícies nanotexturizadas, todos os implantes já vêm com uma camada de óxido na sua superfície, os tratados com anodização, recebem uma camada adicional óxida, obtidas onde o implante é usado como um ânodo, ativando íons, quando um potencial elétrico é aplicado a esse implante, gera reações de transferência de cargas e íons. Sob controle, o campo elétrico guiará o processo de oxidação que ocorrerá no implante e resultará no aumento da espessura da camada de óxido de titânio (TiO_2). Com o aumento dessa camada de óxido de titânio e a adição de outros elementos, como fosfato (PO_4), potencializa-se a osteointegração (THAKRAL et al., 2014). A resistência à corrosão e a biocompatibilidade estão relacionadas à presença de uma camada de óxido não reativo, o que impede a formação de tecido fibroso em volta do implante e cria um contato direto com o tecido ósseo (COLOMBO. et al., 2012). Os implantes com esse tratamento de superfície são menos dependentes de composição química, pois o processo resultante se define por um aumento complementar do contato osso-implante (MEIRELLES et al., 2008).

2.4.2.3 Superfícies biomiméticas

Este método permite recobrir a superfície do implante com uma camada uniforme de hidroxiapatita similar à camada biológica, com até 15 μm de espessura, por meio da precipitação heterogênea de fosfato de cálcio sob condições fisiológicas de temperatura e pH sobre o implante dentário, através da utilização de solução de íons semelhantes ao plasma sanguíneo com vistas à deposição de camada de apatita (ABE et al., 1990). A osteocondutividade é aumentada pela liberação gradual das moléculas que estão integradas à estrutura do material. O fosfato de cálcio, hoje, apresenta-se como um dos principais biomateriais para reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresenta como características:

semelhança com a fase mineral de tecido ósseo, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (KURTZ et al., 2014). Outra vantagem desse tratamento de superfície é que as moléculas biologicamente ativas, como agentes osteogênicos, podem ser precipitadas como componentes inorgânicos para formar uma matriz com propriedades tanto osteoindutora (fatores de crescimento) como osteocondutora (camada de fosfato de cálcio). Também foi observado um contato maior entre osso e implante em superfícies com coberturas biomiméticas com fosfato de cálcio do que em superfícies não tratadas (RUPP et al., 2014).

2.4.3 Osteointegração

Os primeiros implantes dentários utilizados apresentavam inadequada resistência a longo prazo dos tecidos peri-implantares à traumas mecânicos, químicos e microbianos (WEISS et al., 1973). O principal motivo para este insucesso era a existência de uma cápsula de tecido conjuntivo que circundava o implante e o isolava do osso adjacente, como um "pseudo-periodonto" (LINKOW et al., 1973; BABBUSH, 1972). A presença desta membrana entre o material implantado e a superfície óssea, impedia o contato íntimo entre esta e osso adjacente, assim não havia osteointegração.

A osteointegração foi observada pela primeira vez - embora não explicitamente declarada - por Bothe, Beaton e Davenport em 1940 (RUDY et al., 2008). Bothe et al. (1940) foram os primeiros pesquisadores a realizar estudos *in vivo* com implantes de titânio e observaram como estes tendiam a se fundir com o osso, relataram também que, pelas características inerentes ao titânio, sua resistência e dureza, haveria potencial para que fosse utilizado como futuro material de próteses.

Em outros experimentos *in vivo*, ao serem removidas as amostras de titânio dos espécimes, seus fêmures se fraturavam, apesar de apresentarem trabeculado ósseo íntegro nas imagens radiográficas, tamanha era a união das amostras ao osso. (LEVENTHAL, 1951). Mais tarde ao observar o mesmo fenômeno ao estudar o fluxo sanguíneo ósseo em coelhos Per-Ingvar Brånemark cunhou o termo "osteointegração". (BRÅNEMARK, 1983)

A osteointegração pode ser definida como a formação de uma interface direta entre um implante e osso, sem tecido mole interveniente (MILLER, 1997), implante osseointegrado é um tipo de implante definido como endosteal contendo poros nos quais osteoblastos e tecido conjuntivo de suporte podem migrar (ANDERSON et al. 1998).

A osteointegração é um processo dinâmico em que as características do implante, como sua geometria e propriedades da superfície modulam o comportamento molecular e celular. Embora a osteointegração tenha sido observada usando diferentes materiais, ela é mais frequentemente usada para descrever a reação dos tecidos ósseos ao titânio, ou materiais revestidos com titânio com derivados de fosfato de cálcio. Pensava-se anteriormente, que os implantes de titânio eram retidos no osso por estabilização mecânica ou ligação interfacial e que os implantes revestidos com fosfato de cálcio eram estabilizados através de ligações químicas (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001). Hoje sabe-se que ambos são quimicamente ligados ao osso, seja por contato direto entre os átomos de cálcio e titânio, ou pela ligação a uma camada similar ao cimento na interface implante/osso. (DAVIES, 2003; KARLSSON et al., 2014).

A osteointegração ocorre através dos mesmos mecanismos que a consolidação da fratura óssea, diferenciando-se em alguns pontos como na ausência de progenitores condrogênicos (COLNOT et al., 2007). Mais recentemente a osteointegração foi definida como "anquilose funcional", onde novo osso é depositado diretamente na superfície do implante que apresenta estabilidade mecânica ou estabilidade primária, isto é, resistência à desestabilização por agitação mecânica ou forças de cisalhamento (SCHROEDER et al., 1981).

Osteointegração não é um fenômeno isolado, mas sim depende de osteoindução prévia e osteocondução. Cabe aqui a definição destes termos (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001):

- Osteoindução: é o processo pelo qual a osteogênese é induzida por meio de mobilização de células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes, no qual estas são estimuladas a evoluir para uma linhagem celular formadora de osso.
- Osteocondução: é o crescimento ósseo sobre uma superfície. Uma superfície osteocondutora é aquela que permite o crescimento ósseo em sua superfície ou em seus poros, canais ou tubos. Wilson-Hench (1987), sugeriu que a osteocondução é o processo pelo qual o osso é direcionado de modo manter-se em conformidade com a superfície de um material.

Pesquisas mais recentes sobre a osteoindução remontam ao experimento de Urist (1965) em meados da década de 1960, onde osso desmineralizado foi utilizado como agente osteoindutor. Mais tarde, uma glicoproteína solúvel denominada BMP (bone morphogenic protein) foi isolada como agente indutivo (URIST et al., 1979).

A BMP pertence à família do fator de crescimento transformador (TGF) - β dos fatores de crescimento. Existem pelo menos 15 BMP diferentes (SOLHEIM, 1998), dos quais BMP-2 e BMP-7 parecem ser as mais ativas. BMP são naturalmente liberadas em resposta ao trauma ou na remodelação óssea e são os únicos agentes indutores conhecidos (LIND, 1996).

No entanto, estímulos físicos, como estresse ou tipos de sinais elétricos aplicados de outra forma, têm sido considerados, direta ou indiretamente, influenciadores da indução óssea (BASSET, 1967; WILSON-HENCH, 1987).

A osteoindução é um mecanismo biológico básico que ocorre regularmente na consolidação de fraturas e na incorporação de implantes. Mesmo que os osteoblastos pré-existentes antes do trauma, auxiliem a formar novo osso, tais células contribuem apenas com uma pequena porção do novo osso formado na consolidação da fratura.

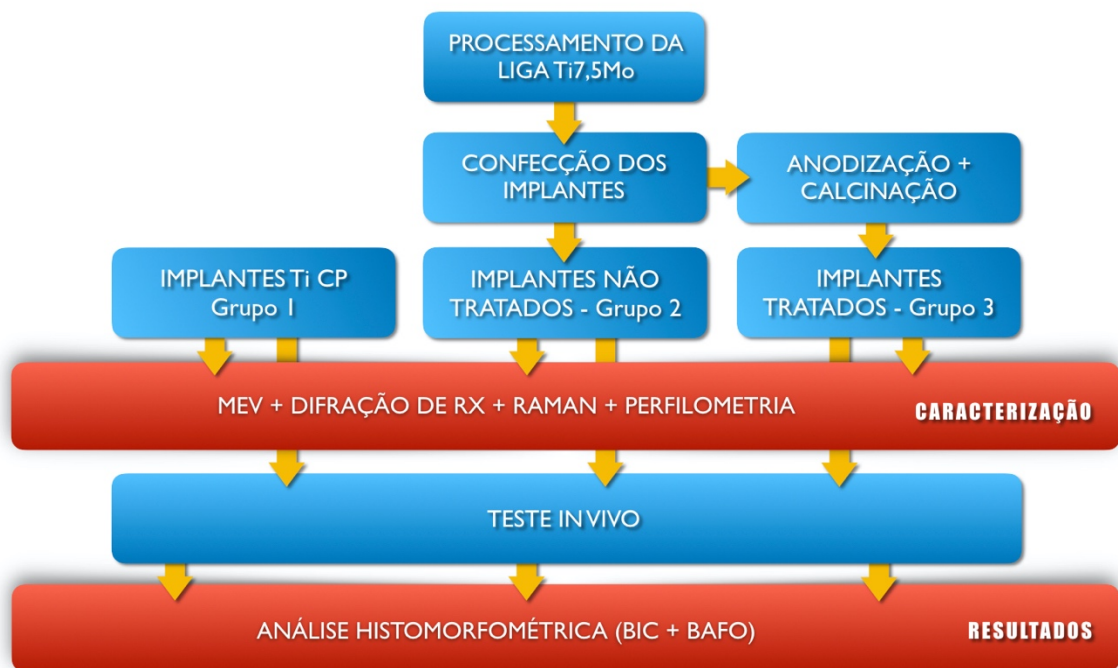
De acordo com Frost (1989), todo o tecido lesionado pela fratura desencadeia o reparo por meio da sensibilização de diferentes tipos de células sobreviventes. Ao mesmo tempo, a lesão libera mensageiros locais, bioquímicos e biofísicos que orientam as células a responderem da maneira adequada. Alguns desses mensageiros guiam a diferenciação e organização das células, enquanto outros induzem mitoses.

Esta parte inicial da resposta de reparação inclui, portanto, a osteoindução, que se inicia imediatamente após a lesão e é muito ativo durante a primeira semana, embora a ação dos pré-osteoblastos recém-recrutados não seja óbvia até várias semanas depois, no estágio de calo ósseo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 6 é possível observar o fluxograma da metodologia empregada para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 6 - Esquema da metodologia utilizada neste trabalho.



Fonte: Autor

3.1 PROCESSAMENTO DA LIGA

A liga de Ti7,5Mo foi produzida na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista (UNESP), no Departamento de Engenharia de Materiais (DMT). Os lingotes da liga de Ti7,5Mo foram obtidos a partir da fusão de titânio comercialmente puro e molibdênio, em forno a arco voltaico, com atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado a água (FAPESP 2009/00059-7). De acordo com estudos estabelecidos previamente (ESCADA, 2012) cada lingote foi refundido pelo menos 10 vezes para garantir homogeneidade da composição da liga.

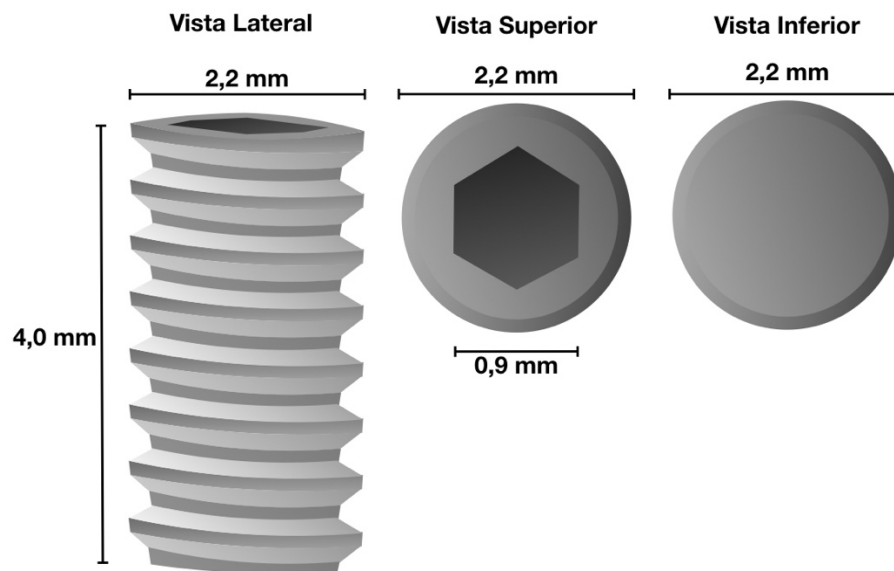
O tratamento de homogeneização foi realizado em forno tubular a uma temperatura de 1000°C durante um período de 24 horas, seguido do tratamento de solubilização (750°C por 2

horas com resfriamento em água). Posteriormente foi realizado o forjamento a frio em prensa rotativa, de acordo com os parâmetros determinados em estudos anteriores para obtenção das barras. Os passes foram graduais com diversos martelos até que o diâmetro de 6 mm fosse obtido, no laboratório de forja da escola de Engenharia de Lorena – USP. As barras foram submetidas, novamente, a tratamento térmico de solubilização nos laboratórios de fundição da FEG-UNESP. (ESCADA, 2012).

3.2 CONFECÇÃO DOS IMPLANTES

As barras forjadas da liga de Ti7,5Mo foram submetidas à usinagem de modo a serem obtidos implantes cilíndricos de 2,2 x 4 mm (Fig. 7) na empresa Titanium Fix (São José dos Campos - SP). As amostras de titânio C.P. também foram confeccionadas na mesma empresa, da mesma maneira e com as mesmas dimensões.

Figura 7 - Implante confeccionado visto nos diferentes planos do espaço e com suas dimensões.



Fonte: Autor

Após a usinagem nenhum outro tipo de tratamento ou preparo da superfície foi realizado nas amostras de Ti7,5Mo antes do processo de anodização. As amostras de titânio C.P. foram jateadas e passaram também por condicionamento ácido de superfície, como são costumeiramente preparadas para uso comercial.

As superfícies das amostras a serem anodizadas, foram submetidas a sucessivas lavagens para condicionamento. O processo consistiu em 3 lavagens de 3 horas em solução de NaCl 1,5 mol/L, NaCl 0,15 mol/L e tampão fosfato-salino (PBS), entre cada solução as amostras foram lavadas por 10 minutos em ultrassom imersos em água deionizada.

3.3 DIVISÃO DOS GRUPOS

Os Grupos foram divididos em número de 3 com as amostras separadas conforme o tipo de liga e tratamento de superfície realizados, conforme o Quadro 5.

Quadro 5 - Divisão dos Grupos conforme suas características distintas

Grupo	Tipo de Liga	Tratamento de superfície	n
Grupo 1 (controle)	Ti C. P.	Jateamento e Ataque ácido	5
Grupo 2	Ti7,5Mo	Nenhum	5
Grupo 3	Ti7,5Mo	Anodização e Tratamento Térmico	6

Fonte: Autor

Cada um dos Grupos teve suas amostras caracterizadas para avaliação adequada de suas composições químicas (espectroscopia Raman), avaliação das fases presentes na superfície (difração de RX), rugosidade e espessura (perfilometria) e morfologia dos nanotubos formados (MEV) no Grupo 3.

Após implantação em tíbias de ratos Wistar (estudo *in vivo*) as amostras foram analisadas para avaliação das características histomorfométricas relativas ao contato osso/implante (BIC) e formação óssea entre as espiras do implante (BAFO).

3.4 ANODIZAÇÃO

Todos os procedimentos de anodização foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP).

O protocolo de anodização foi realizado com o intuito de crescimento de nanotubos de óxido de titânio (TiO₂) na superfície das amostras confeccionadas em Ti7,5Mo.

3.4.1 Solução para processo de anodização para crescimento de nanotubos de TiO₂

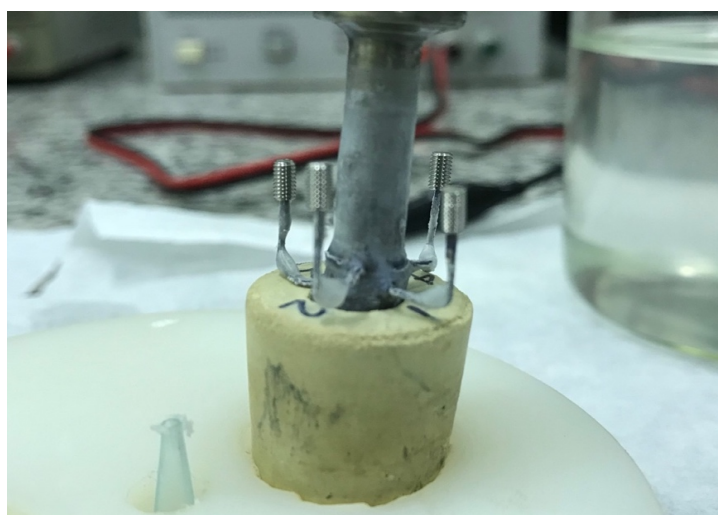
A solução utilizada para o processo de anodização foi composta de um eletrólito contendo glicerol e NH₄F 0,25%. Os elementos que compuseram a solução foram devidamente pesados em balança digital de precisão e dissolvidos de modo a formarem uma solução que serviu de meio para a anodização.

3.4.2 Condições de anodização

A geração de corrente elétrica contínua, que possibilitou a anodização das amostras, foi obtida através de uma fonte de corrente contínua (Agilent – E3617A), com corrente gerada com ampliação inicial de voltagem realizada em incrementos de 2V por minuto, até que a voltagem preconizada fosse atingida. Quando a voltagem estabelecida de 20V foi atingida, esta foi mantida por 24 h conforme o protocolo preconizado por ESCADA et al., 2017).

As amostras foram posicionadas em número de 4, devidamente presas ao anodo por um suporte em formato de pontas individuais especificamente preparado para acomodar cada uma das amostras de modo a permitir a passagem de corrente para a anodização das mesmas. O catodo foi composto por uma malha cilíndrica de platina que envolveu o conjunto das amostras (Figura 8).

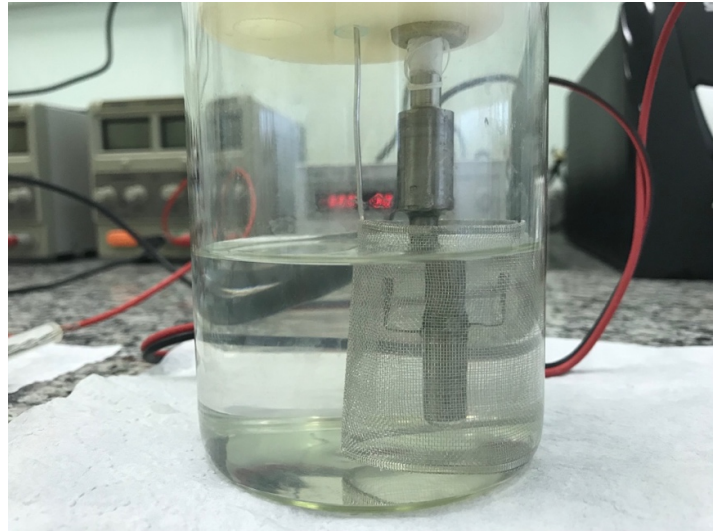
Figura 8 - Implantes posicionados no anodo



Fonte: Autor

O conjunto compôs a célula eletroquímica e permaneceu imerso na solução eletrolítica pelo período de 24h para que a anodização fosse realizada (Figura 9).

Figura 9 - Célula eletrolítica com amostras sendo anodizadas



Fonte: Autor

3.4.3 Tratamento térmico

Para a estabilização da fase de organização dos nanotubos em anatase, as amostras anodizadas foram lavadas com água deionizada, secas, e tratadas termicamente por calcinação a 450°C em um forno mufla EDG, com uma taxa de aquecimento de 5°C por minuto, permanência de 1h, e resfriadas no interior do forno, como pode ser visto na Figura 10, conforme proposto por Li et al. (2009).

Figura 10 - Forno mufla utilizado para o processo de calcinação



Fonte: Autor

Após todo o processo as amostras foram acondicionadas em envelopes autoclaváveis individuais e submetidas à esterilização por raios Gama na empresa Titanium Fix – São José dos Campos.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar a morfologia da superfície das amostras foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Marca Philips, Modelo XL 30 FEG, com filamento *field emission gun* (FEG), do Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Para avaliação do comprimento e diâmetro dos nanotubos formados na superfície das amostras foi utilizado o microscópio MEV FEG Tescan do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP (Figura 11).

Figura 11 - MEV FEG Tescan do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE



Fonte: Autor

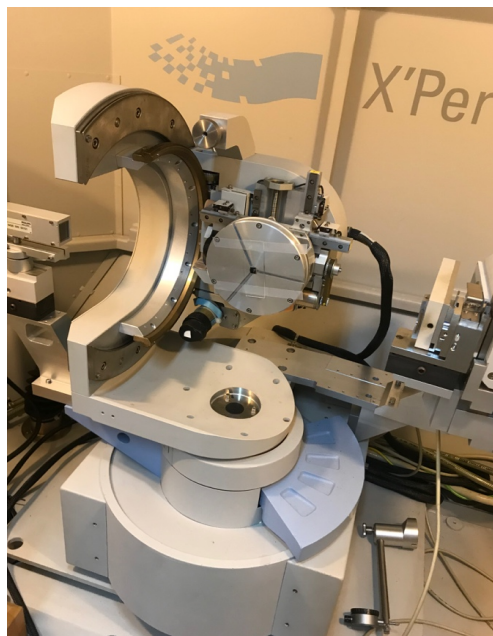
3.5.2 Difração de raios X

Este método faz uso dos raios X de comprimentos de onda conhecidos para determinar os espaçamentos dos planos cristalinos desconhecidos. Os raios X são ondas eletromagnéticas de alta energia e pequeno comprimento de onda. Quando o feixe de raios X atinge os átomos do material a ser analisado, seus elétrons são acelerados e passam a reemitir radiação com a mesma energia (mesmo comprimento de onda), porém em todas as direções. Se os átomos estiverem num arranjo periódico, as ondas sofrerão interferência, ou seja, ocorre uma reflexão apenas em certos ângulos de incidência e reflexão.

Para determinação das fases presentes na liga Ti7,5Mo foi feita a difratometria de raios X no modo rasante com ângulo $\hat{\Omega}$ igual a 2 graus. Foi utilizado um tubo de raios X com alvo de cobre. O equipamento utilizado é da marca Philips e modelo MRD, Panalytical X'Pert com radiação Cu-K α e um detector X'Celerator, instalado no LABAS-INPE, em São José dos Campos – SP (Figura 12).

Esta técnica permite que o feixe de raios X interaja com finas camadas de material que podem ser de alguns nanômetros a poucos micrometros. As amostras foram analisadas em 2θ na faixa de 20-80°, com tamanho do passo de 0,02° e tempo total de contagem de 19h e 10min., com potência de 45kV e 40mA.

Figura 12 - Difratorômetro Panalytical X'Pert com radiação Cu-K α do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE



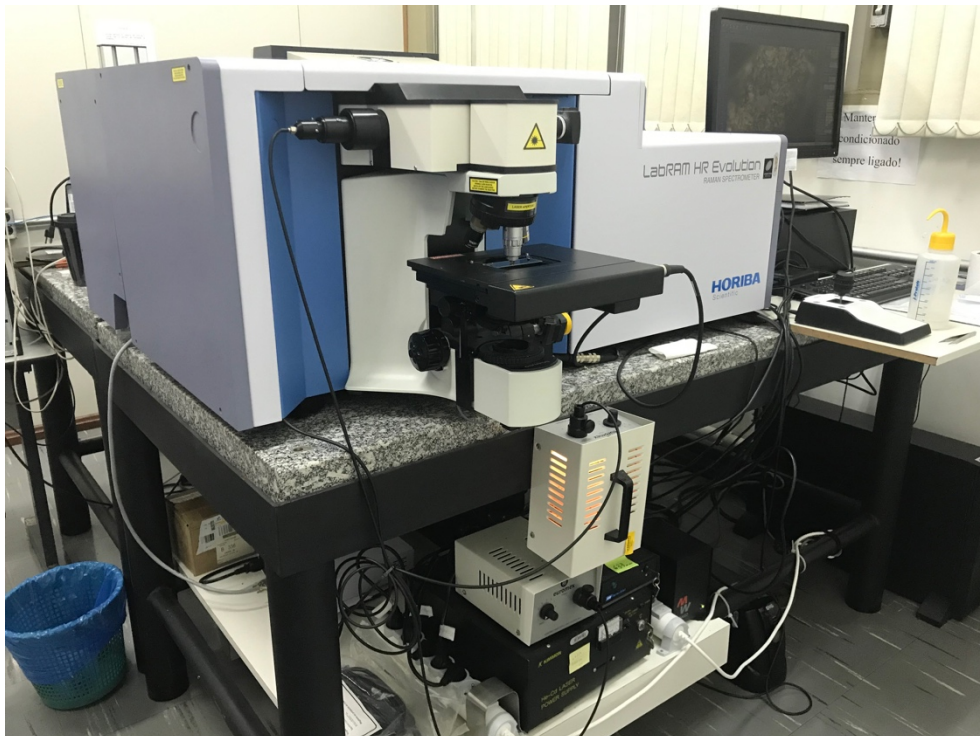
Fonte: Autor

3.5.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica, a qual permite a identificação de materiais orgânicos e inorgânicos em poucos segundos, fornecendo a informação química e estrutural do material. No caso do presente estudo, a espectroscopia Raman foi utilizada para a caracterização da composição da superfície dos implantes após o procedimento descrito.

As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP, sob temperatura ambiente, em um espectrômetro da marca Horiba Scientific T64000 utilizando como fonte de excitação um laser de argônio com comprimento de onda de 514 nm (Figura 13).

Figura 13 - Espectrômetro Horiba Scientific T64000 do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE



Fonte: Autor

3.5.4 Perfilometria óptica

A perfilometria óptica foi realizada a fim de visualizar a superfície das amostras bidimensional e tridimensionalmente e medir a rugosidade média apresentada, onde tem-se:

- R_a (S_a para 3D) é o desvio médio aritmético de um perfil (R_a) ou de uma superfície (S).
- R_q (S_q para 3D) é a raiz média da raiz quadrada do desvio do perfil (R_q) ou superfície (S_q). R_q dá quase a mesma informação que R_a , mas é ligeiramente mais sensível aos picos elevados e aos baixos vales.
- R_t (S_t para 3D) é o valor máximo do pico até o vale do perfil (R_t) ou a superfície (S_t), um parâmetro extremo que varia facilmente em diferentes áreas.

As medidas foram realizadas no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP, pelo equipamento Perfilômetro Óptico Veeco, modelo NT1100 (Figura 14).

Por se tratar de um parafuso, a medição da rugosidade foi realizada na lateral deste, buscando-se pontos comuns entre as amostras pela dificuldade de mensuração resultante da rugosidade natural da rosca.

Figura 14 - Perfilômetro Óptico Veeco, modelo NT1100 do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE



Fonte: Autor

3.6 CÁLCULO AMOSTRAL

Para determina o número de animais a serem utilizados por Grupo experimental o cálculo utilizado foi feito adotando-se:

- Valor crítico para grau de confiança de 95% (1,96);
- Desvio máximo 0,2236 (22,36%) (s), baseado no estudo anterior da literatura (MELLO e OLIVEIRA et al., 2014) e experimentos preliminares; erro padrão mínimo que se deseja encontrar de $\pm 5\%$ da média (50%) (d); e
- Nível de significância de $p < 0,05$.

Na qual C é dependente dos valores escolhidos para a força ou poder do teste ($1-\beta$; chance de encontrar uma diferença existente) e nível de significância (α ; a chance de considerar dois Grupos diferentes quando eles não o são). Para considerar $p < 0,05$ o valor de α é 0,05. s é o desvio padrão aceitável de acordo com a projeção do pesquisador e d é a diferença esperada entre os Grupos.

Para calcular o C, deve-se aplicar a fórmula: $C = (z_{\alpha} + z_{\beta})^2$, onde z corresponde a valores encontrados em livros de estatística. É importante lembrar que para determinar o valor de z_{α} deve-se dividir o valor do intervalo de confiança por 2, por exemplo, para um intervalo de 0,95 o valor α se procurar na tabela é 0,475 e a soma dos valores da linha com o topo da coluna (0,06) lhe fornecem um valor de $z = 1,96$. Em experimentos na área de saúde, o poder do teste é comumente 90% para o qual o valor de z_{β} é 1,282. Logo, se em um determinado modelo experimental, um pesquisador deseja trabalhar com um poder para o teste de 90% e nível de significância 0,05, o valor de C será de $(1,96 + 1,282)^2 = 10,51$.

Assim temos:

$$n = 1 + [2C \times (s/d)^2]$$

$$n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2]$$

$$n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2]$$

$$n = 1 + [21,02 \times 0,2]$$

$$n = 1 + 4,204$$

$$n = 5,204$$

Assim sendo adotou-se um valor mínimo de $n=5$ para cada um dos Grupos. Deste modo foram utilizados 12 animais no total com índice de perda, que receberam aleatoriamente um

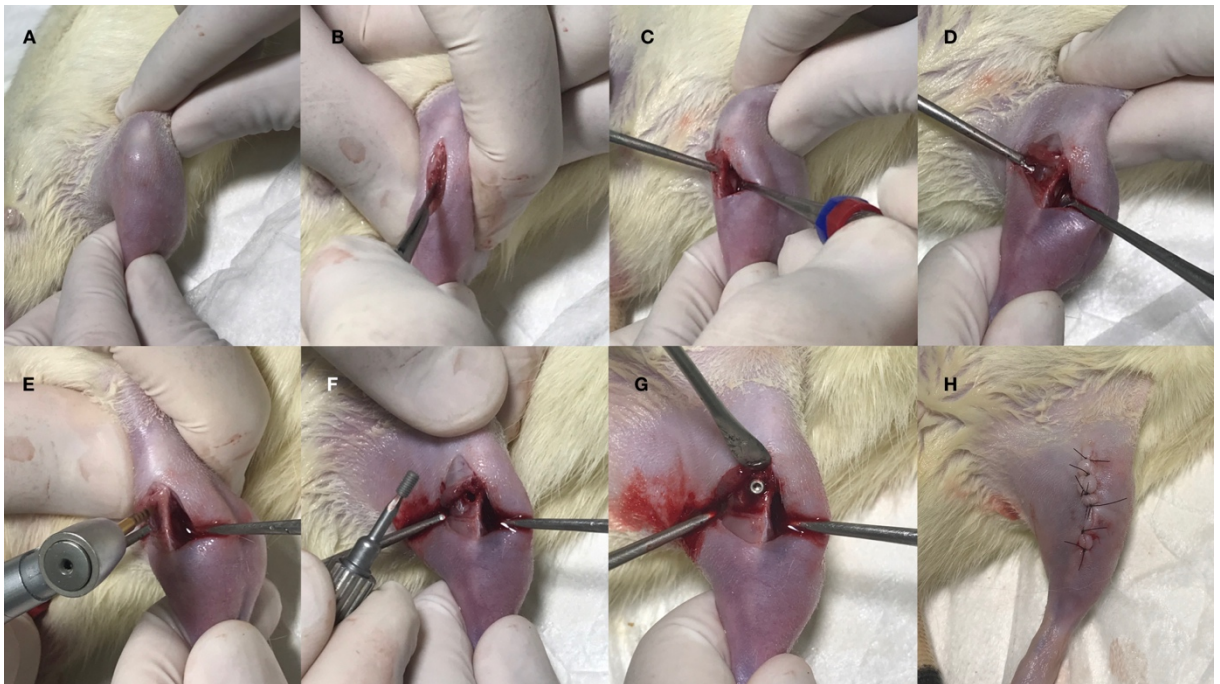
implante em cada tíbia, com total de 24 implantes, de modo a serem implantados sempre dois implantes de Grupos diferentes num mesmo animal.

3.7 TESTE *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* foram realizados com ratos isogênicos Wistar do biotério de animais da Faculdade São Leopoldo Mandic – Campus Campinas sobre orientação do Professor Dr. André Antonio Pelegrine, após terem sido devidamente aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA SLMANDIC) da referida instituição (Processo nº 2018/042). Os procedimentos foram realizados no laboratório de Implantodontia da referida instituição.

Doze ratos machos, pesando entre 300 e 400g, receberam, de modo aleatório, um implante (2,2 x 4,0mm) dos diferentes Grupos que compunham o trabalho, em cada uma de suas tíbias, de modo que cada animal recebesse dois tipos diferentes de implantes cada. Após tricotomia na região das patas inferiores direita e esquerda, foi efetuada antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Figura 15 - Sequência dos procedimentos cirúrgicos realizados nos espécimes, A e B: incisão, C e D: retalho rebatido, E: perfuração, F e G: inserção do implante, H: sutura.



Fonte: Autor

Foi efetuada uma incisão retilínea de 1cm em cada pata (A e B) e um retalho de espessura total foi rebatido (C e D). Com broca tipo lança de 1,1mm de diâmetro girando em 1000 rpm, acoplada em contra ângulo redutor 20:1 em motor elétrico e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (E), foi produzida uma pequena perfuração na região da epífise medial da tíbia para se possibilitar a inserção dos implantes. Posteriormente ao preparo do leito, os implantes de Ti7,5Mo foram fixados nas tíbias com auxílio de chaves específicas (0,9mm) de titânio (F). Após o posicionamento dos implantes (G), foi efetuada sutura da pele por meio de pontos simples (H).

Após a cirurgia, os animais foram posicionados em gaiolas individuais e receberam dose única de Benzetacil 600,000 IU. Eles foram mantidos em ciclos de 12 horas de claro/escuro, temperatura controlada em 21° C e dieta *ad libitum*.

Dos doze animais utilizados para o experimento *in vivo*, oito sobreviveram. Estes foram sacrificados 30 dias após a cirurgia com sobredose anestésica, por meio de uma injeção endovenosa de Quetamina (2 ml) e xilazina (1 ml). As tíbias foram removidas por meio do uso de discos diamantados e imediatamente levadas ao laboratório para processamento.

3.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Após a eutanásia dos animais, suas tíbias foram removidas e processadas para que as análises histomorfométricas de cada uma das amostras de cada Grupo fossem realizadas. Foram mensuradas as variáveis de contato entre osso e implante (bone-to-implant contact - BIC) e, a área de osso ocupada entre as espiras dos implantes (bone area fraction occupancy - BAFO).

3.8.1 Processamento das amostras

O processo de preparo das peças ósseas contendo as amostras para posterior análise englobou os seguintes passos:

- Fixação: em formol 10% por 5 dias;
- Desidratação: as peças ósseas passaram pelo processo de desidratação sendo imersas em álcool em diferentes concentrações e tempos:
 - 70% por 24hs;
 - 95% por 24hs;
 - 100% por 24hs (I);
 - 100% por 48hs (II);
 - 100% por 56hs (III).

A desidratação adequada promove melhor penetração da resina.

- Diafanização: dois ciclos de imersão em xilol foram realizados:
 - Imersão por 24hs (I);
 - Imersão por 48hs (II).
- Inclusão da peça em resina:

A inclusão foi realizada mergulhando a peça óssea em um frasco de vidro de aproximadamente 20ml com tampa que impede a passagem de ar, de modo que a peça óssea não mantivesse contato direto com o fundo do frasco. Este serviu somente como molde para a resina, que depois de polimerizada foi removida do molde de vidro fraturando-o.

- Preparo e penetração da resina:

A solução de resina (solução A) foi composta de 15% de Dibutilftalato e 85% de Metilmetacrilato. As peças foram mantidas nesta solução em ambiente refrigerado na seguinte sequência:

- 3 a 5 dias em solução A;
- 3 a 5 dias em solução A + 1% de peróxido de benzoila;
- 3 a 5 dias em solução A + 3% de peróxido de benzoila,

A fase final de inclusão foi realizada em temperatura ambiente por 2 a 4 dias.

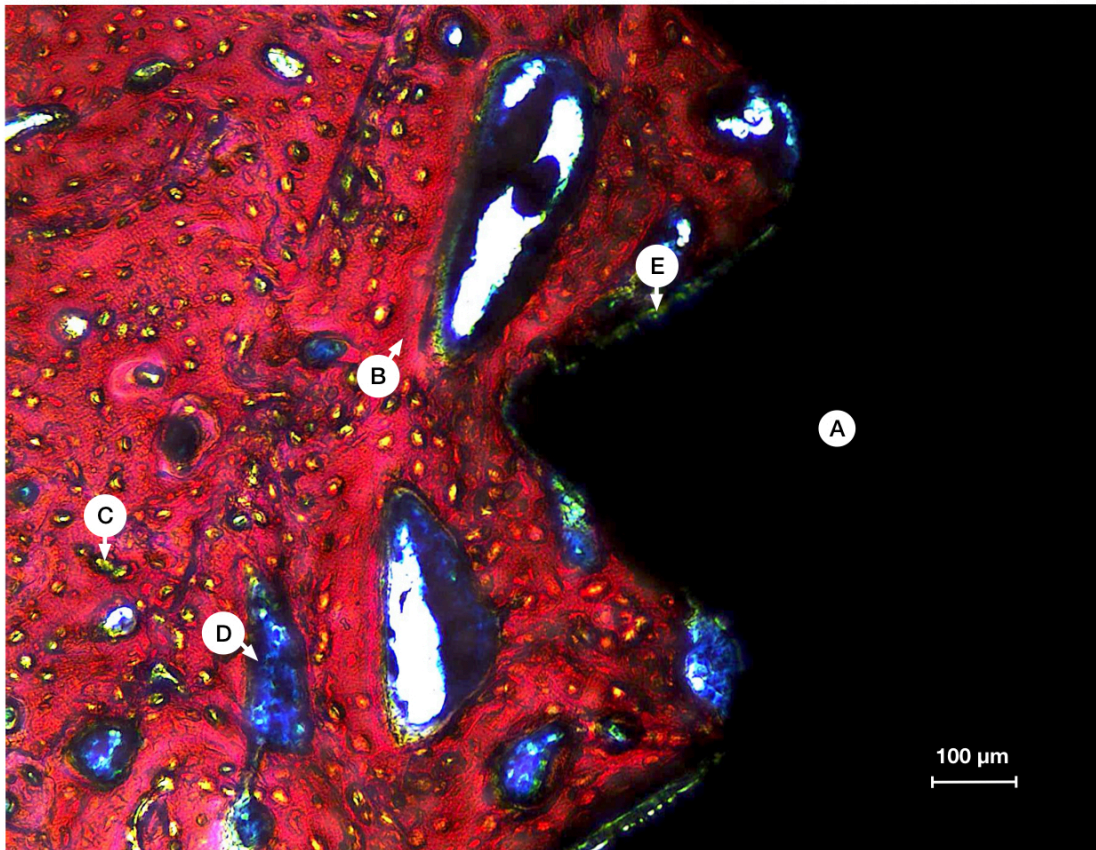
- Preparação do bloco de resina polimerizada: após quebrar-se o frasco de vidro a resina é então serrada de modo a ficar em formato retangular para ser realizada a microtomia.
- Microtomia: realizada em micrótopo de precisão (Exakt®,. Apparatebeau, Alemanha) de modo longitudinal ao implante produzindo duas lâminas de cada uma das amostras com espessura de 7 µm e polidos com sistema de polimento (Exakt®).

3.8.2 BIC e BAFO

A análise de BIC e BAFO foram realizados no laboratório de histopatologia da Escola de Odontologia da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas, SP, Brasil). Toda a área de osso da peça ao redor do implante na tíbia foi definida como região de interesse e avaliada histomorfometricamente.

Antes da análise os fragmentos foram corados com coloração de azul de Stevenel, que permite, em ampliações maiores, a avaliação do núcleo, citoplasma e componentes extracelulares. Tecidos mineralizados não são corados. Como contra-corado se utilizou picro-fucsina de Van Gieson que cora fibras colágenas de verde/verde azulado, osso de alaranjado ou roxo; osteóide de amarelo esverdeado e fibras musculares de azul/azul esverdeado. A Alizarina vermelha cora especificamente cálcio, corando assim de laranja até roxo os tecidos mineralizados enquanto que os demais tecidos permanecem em azul (Fig.16)

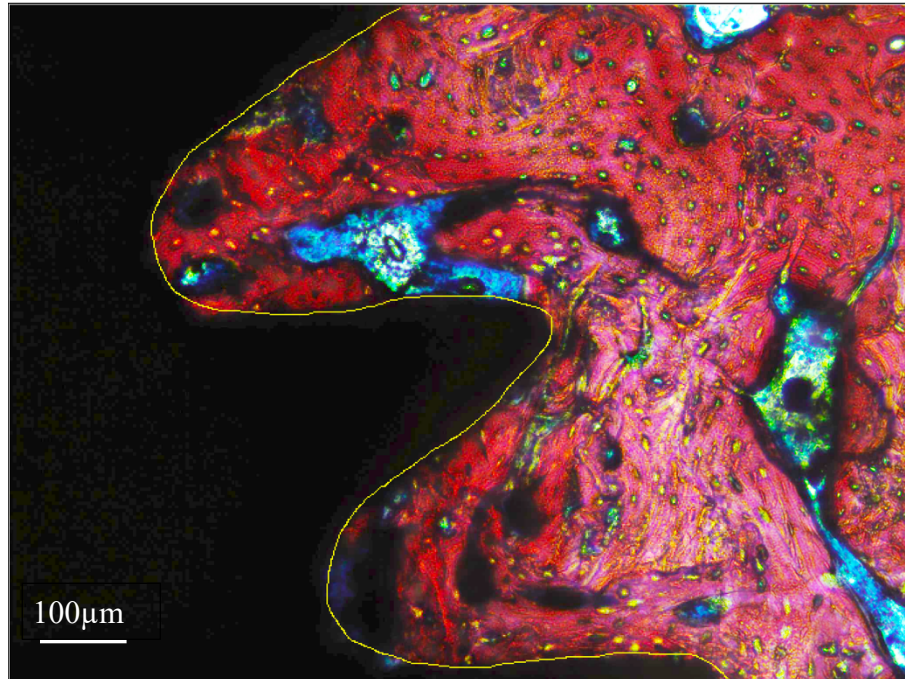
Figura 16 - Imagem evidenciando os diferentes estruturas em contato com a superfície do implante (A) e, na região entre as espiras: (B) osso maturado, (C) osteoide, (D) fibras musculares, (E) fibras colágenas.



Fonte: Autor

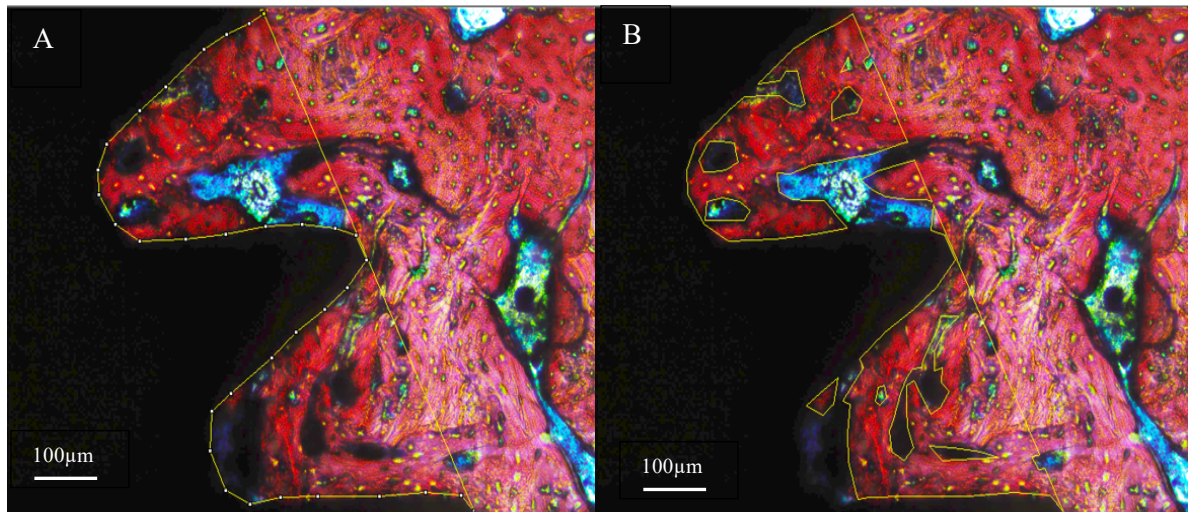
Para cada amostra foram analisadas duas lâminas estas, de quatro a oito imagens de áreas distintas de cada fragmento foram avaliadas, desde que mantivessem contato ou estivessem próximas ao tecido ósseo adjacente para que as médias de BIC e BAFO fossem calculadas. As imagens digitais foram capturadas utilizando um microscópio Nikon Eclipse modelo H550S (Nikon, Japão), com ampliação de 100x acoplado a uma câmera Infinity 1 (Lumenera Corporation, EUA) conectada a um computador para a aquisição das imagens. O examinador avaliou cegamente as imagens e rastreou a variação da formação óssea em todas as imagens usando o software ImageJ 1.52k para MAC (National Institute of Health, NIH, EUA), em dois momentos distintos com intervalo de uma semana. Todos os resultados foram anotados em micrômetros lineares para o cálculo do BIC (Fig. 17) e em micrômetros quadrados para o cálculo do BAFO (Fig. 18) e, posteriormente, declarados como uma porcentagem linear e da área total respectivamente.

Figura 17 - Linha amarela demarcada sobre a superfície total entre o implante e o tecido adjacente para o cálculo do BIC. Do comprimento total foi calculada a porcentagem de tecido ósseo (em vermelho) que efetivamente mantinha contato com o implante (em preto).



Fonte: Autor

Figura 18 - Linha amarela demarcada sobre a área total entre o implante e o tecido adjacente entre as espiras para o cálculo do BAFO (A). Da área total foi removido o tecido não mineralizado (coloração azul ou negra) e calculada a porcentagem de tecido mineralizado (em vermelho) presente entre as espiras do implante (em preto).



Fonte: Autor

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa utilizado para a análise estatística foi o Minitab 17 (Pensilvânia, EUA). Os resultados obtidos referentes aos valores ao BIC e BAFO foram analisados por meio do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para distribuições normais, utilizou-se a análise ANOVA de 1 fator, complementada com o teste Tukey para comparação múltipla, considerando-se valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Também foi utilizado o teste de correlação de Pearson para avaliação de correlação entre os parâmetros avaliados no mesmo Grupo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações aqui apresentadas foram divididas em resultados das análises de caracterização estrutural e resultados dos experimentos *in vivo*.

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A seguir são apresentadas as imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura e, por meio da observação das imagens, é possível avaliar cada uma das diferentes superfícies dos mini-implantes de cada um dos Grupos.

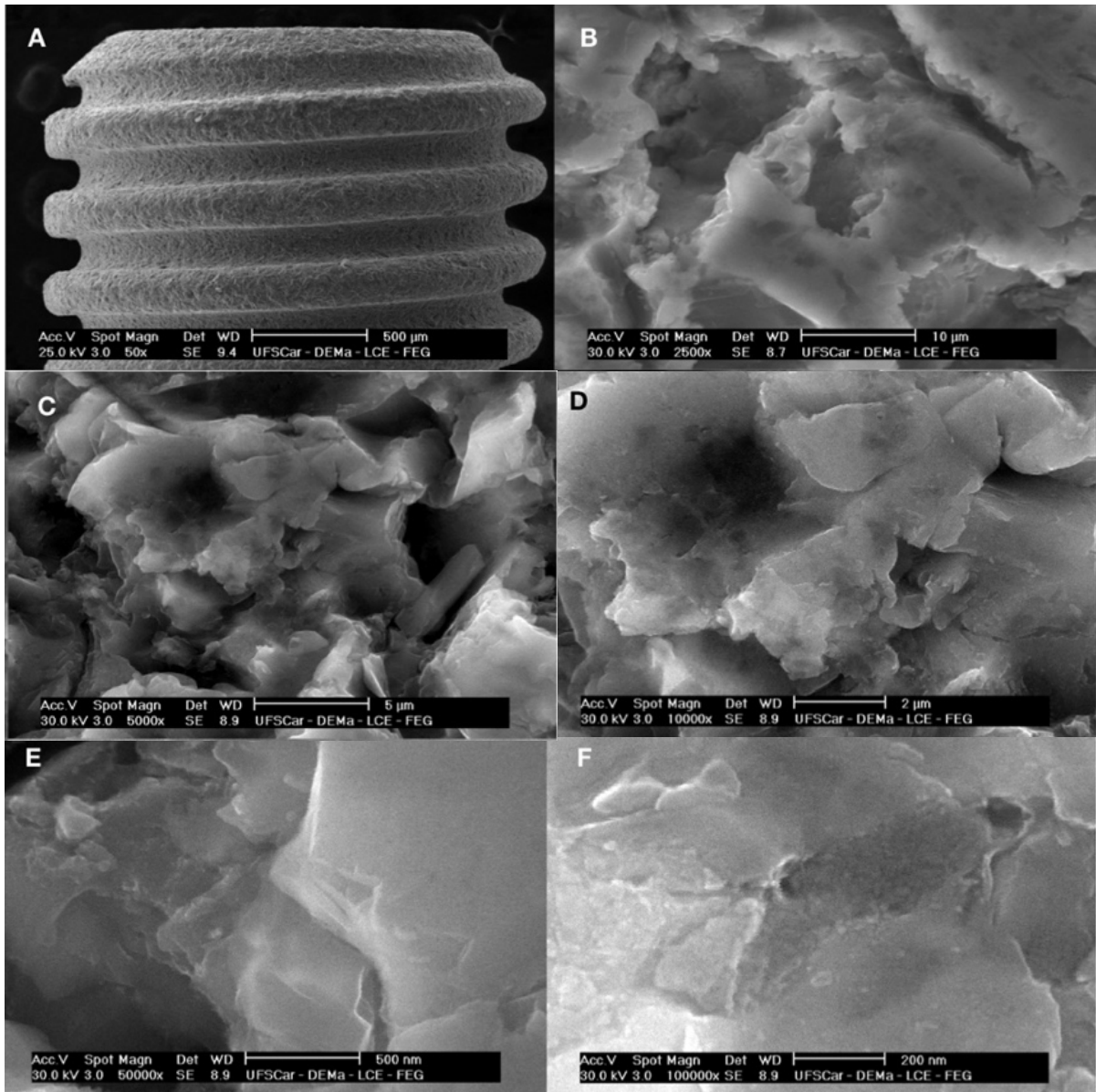
Na Figura 19 são observadas as imagens do Grupo 1, com superfícies jateadas por óxido de alumínio e atacadas por ácido (HCl/H₂SO₄).

Observa-se um padrão bastante irregular na superfície, típico dos materiais que passam pelo tratamento com jateamento, e posteriormente o ataque ácido da superfície, para obtenção de microabrasão.

Este tratamento é um dos mais comumente utilizados pela indústria por possibilitar um aumento significativo da superfície de contato, especialmente quando comparada à amostra apenas usinada, aumentando conseqüentemente a estabilidade inicial e adsorção de proteínas, reduzindo o tempo de osteointegração (RUPP et al., 2014). O inconveniente da técnica é a possibilidade de agregação das partículas utilizadas no processo de jateamento à superfície do implante.

Quando a alumina (Al₂O₃) é utilizada como agente abrasivo no jateamento, sua insolubilidade a meios ácidos torna comum sua incorporação à superfície do material. Sua posterior liberação às áreas adjacentes ao implante, pode ter influência negativa no processo de osteointegração. Além disso a característica heterogênea desta superfície pode reduzir a típica excelente resistência à corrosão em ambientes fisiológicos das ligas de titânio (APARICIO et al., 2003).

Figura 19 - Amostra do Grupo 1 observada em diferentes ampliações no MEV, em A(50x): superfície da amostra; B(2500x), C(5000x), D(10000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando o tratamento de superfície por jateamento e ataque ácido nos diferentes aumentos

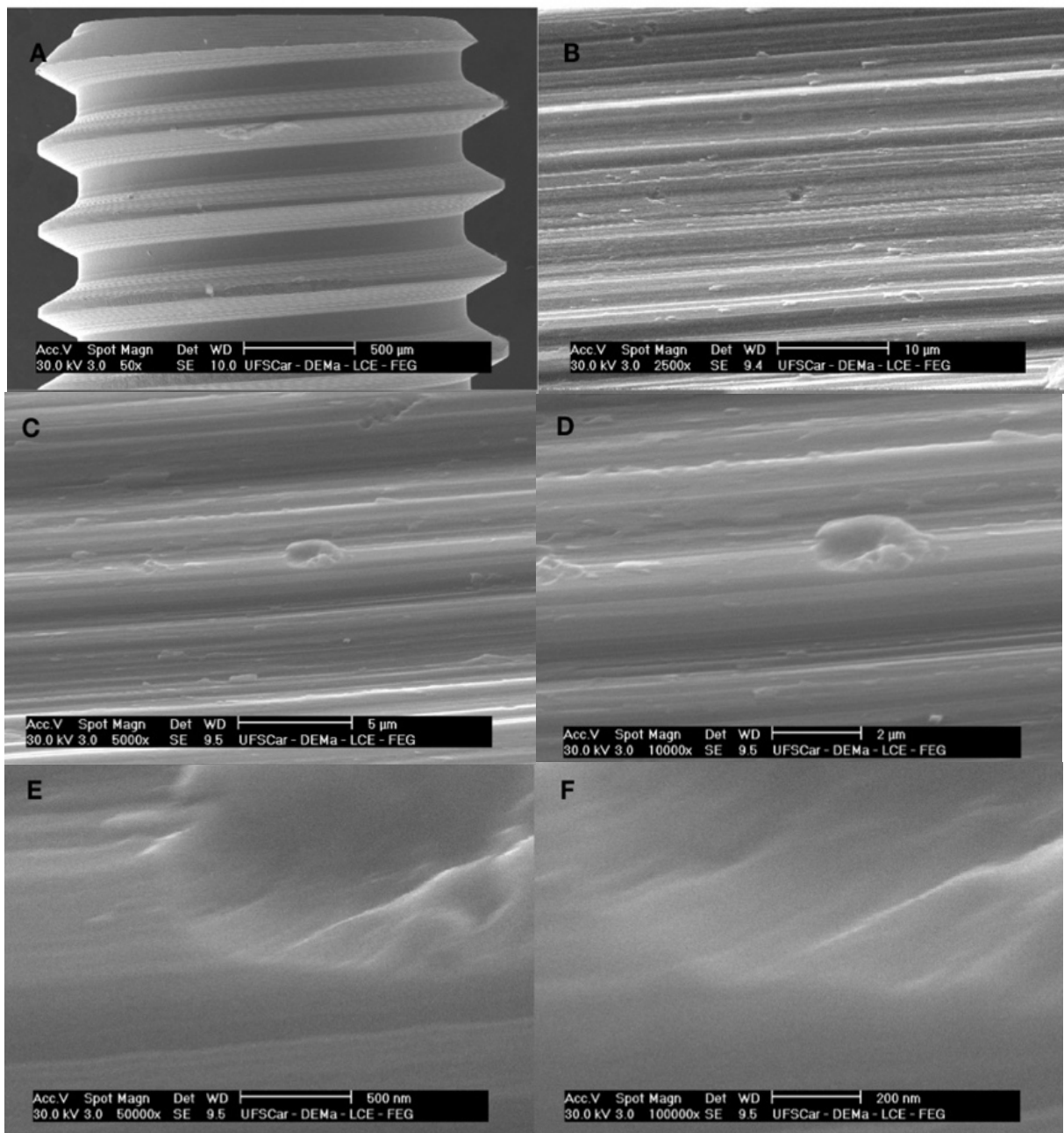


Fonte: Autor

Por outro lado, verificou-se que esta superfície melhora o processo osteocondutor através da fixação de células osteogênicas e de fibrina, resultando na formação óssea diretamente na superfície do implante. Na área perimplantar, o tecido ósseo com trabéculas finas se projeta diretamente sobre o implante (TRISI et al., 2003).

Na Figura 20 são observadas as imagens do Grupo 2, com superfícies somente usinadas, sem tratamento de superfície que tem como característica a presença de pequenas ranhuras que permitem o processo de mineralização do osso em direção ao implante (THAKRAL et al., 2014).

Figura 20 - Amostra do Grupo 2 após tratamento em diferentes ampliações no MEV, em A(50x); B(2500x), C(5000x), D(10000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando a ausência de qualquer tratamento de superfície nos diferentes aumentos



Fonte: Autor

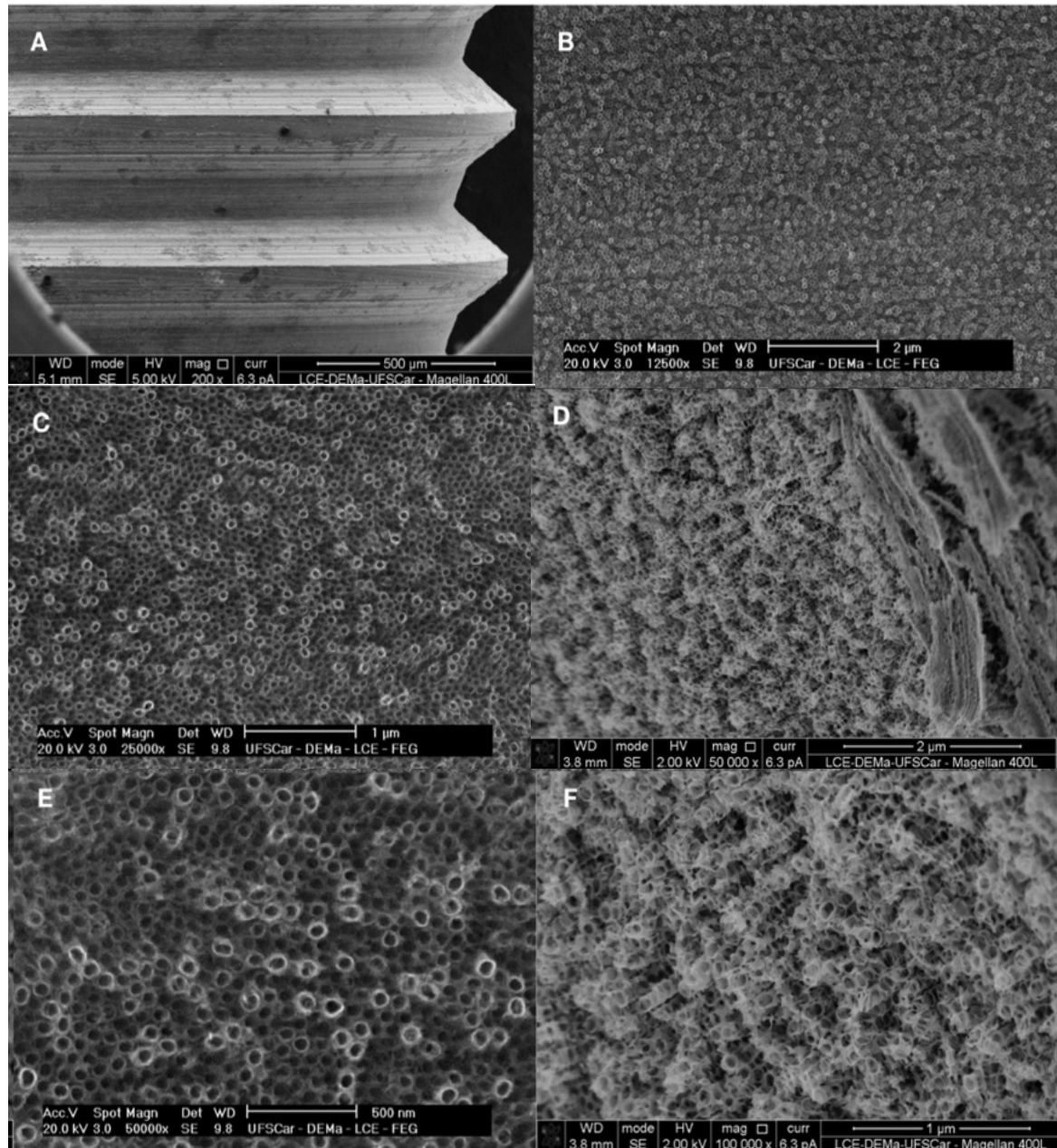
A superfície apresentou-se com característica de polimento com estrias, típica de superfície metálica usinada, evidenciando, quando comparada às demais amostras, uma superfície mais regular e, portanto, com menor área de contato, não apresentando superfície indutora. Forma-se uma superfície anisotrópica, que é capaz de promover o processo de adesão celular e a produção da matriz proteica, típicas da interação inicial do tecido ósseo ao implante, enquanto que as superfícies rugosas apresentam taxa elevada de diferenciação celular e maturação de osteoblastos, propiciando uma aceleração nos fenômenos da osteointegração (THAKRAL et al., 2014).

Na Figura 21 são observadas as imagens do Grupo 3, com superfícies que receberam tratamento por anodização.

Nas amostras do Grupo 3 pode-se observar o crescimento efetivo e regular dos nanotubos de TiO_2 por toda a superfície da amostra. O mesmo tipo de padrão foi observado nos demais experimentos desenvolvidos com este material no Laboratório de Materiais da FEG tanto nos trabalhos de Escada (2012), quanto de Oliveira (2016) e Nogueira (2017), que utilizaram os mesmos valores de tensão (20V), tempo de anodização (24h) e eletrólito (glicerol e NH_4F), seguido de calcinação à 450°C .

O experimento desenvolvido por Escada (2012) demonstrou que este tipo de padrão poderia ser observado tanto nas tensões de 20V quanto de 30V, mas optou-se pelo menor potencial para que fossem obtidos nanotubos com menor diâmetro que comprovadamente possuem maior reatividade superficial (ESCADA, 2017).

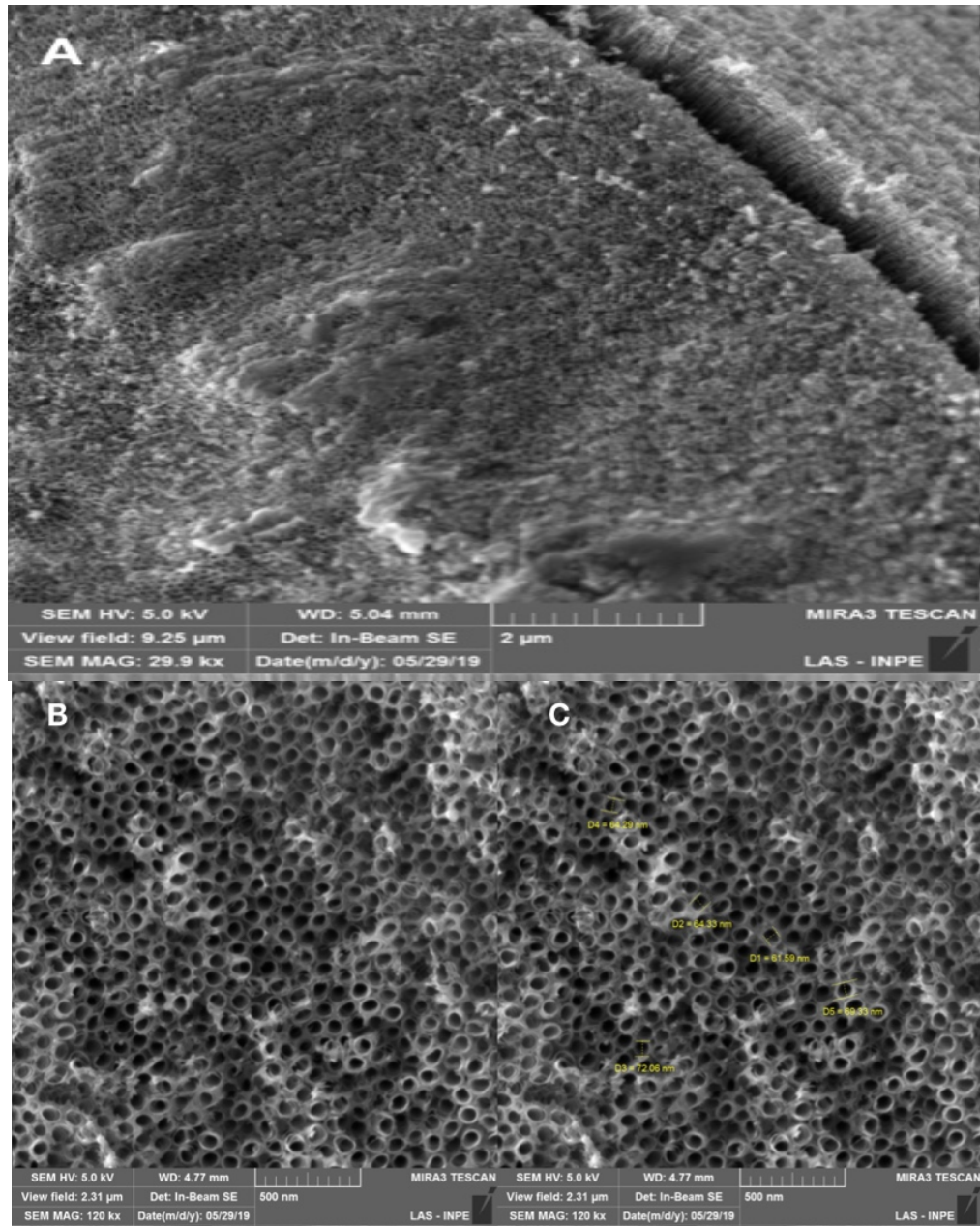
Figura 21 - Amostra do Grupo 3 após tratamento em diferentes ampliações no MEV, em A(200x): superfície da amostra; B(12500x), C(25000x), D(50000x), E(50000x) e F(100000x): evidenciando o tratamento de superfície por anodização com crescimento de nanotubos nos diferentes aumentos



Fonte: Autor

Na figura 22 a e b, as amostras do Grupo 3 foram novamente avaliadas para mensuração do comprimento e diâmetro dos nanotubos. Como toda a superfície da amostra estava recoberta por nanotubos, foi necessário realizar um pequeno entalhe na amostra para que a camada superficial de nanotubos se despregasse da superfície e assim fosse possível a realização da mensuração do comprimento efetivo da camada superficial.

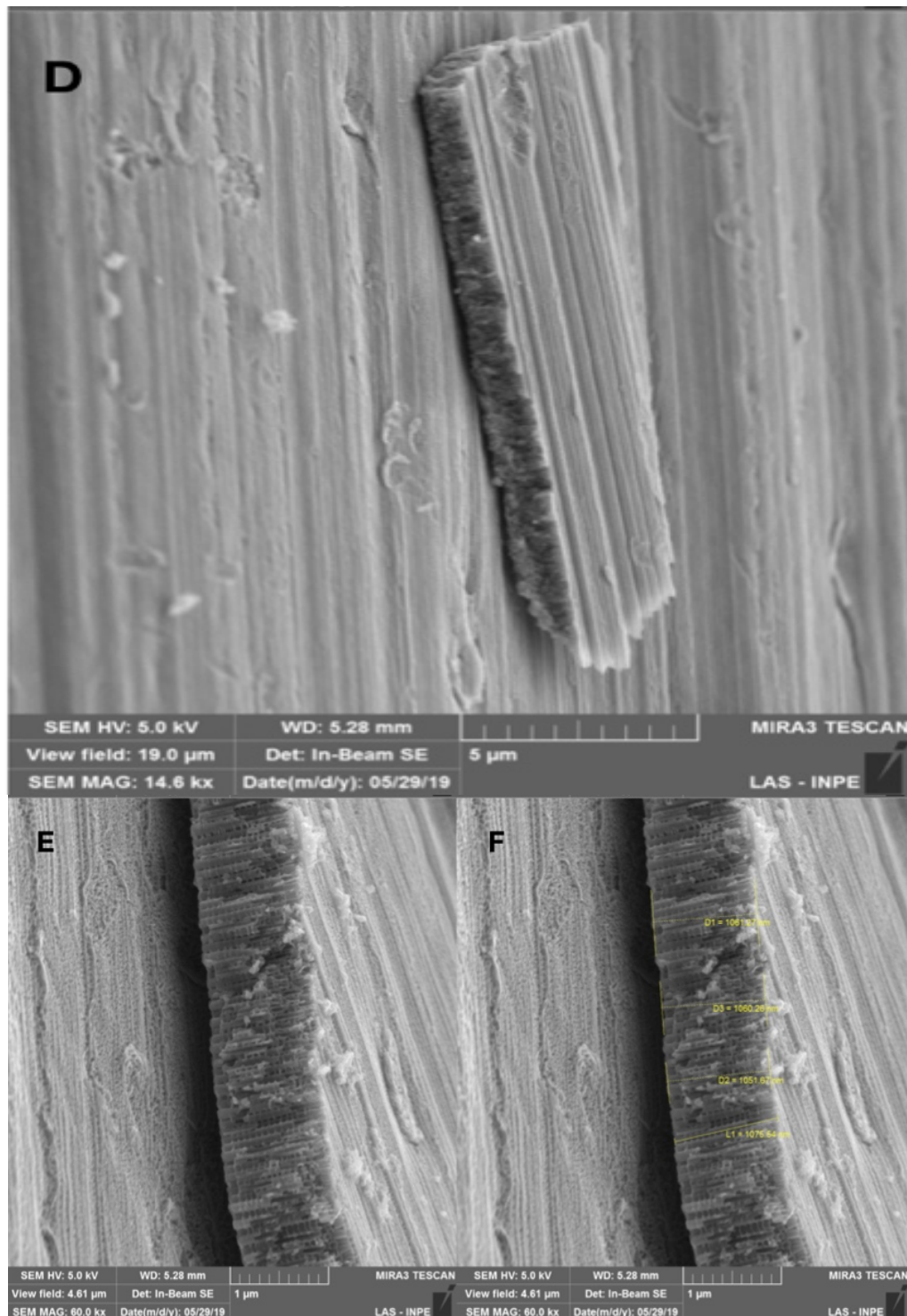
Figura 22a - Mensuração diâmetro dos nanotubos (A, B e C) em amostras do Grupo 3



Fonte: Autor

Pelas imagens visualizadas no MEV da superfície tratada das amostras do Grupo 3, foi possível medir o diâmetro médio dos nanotubos. Observou-se diâmetro médio de 73nm dos nanotubos em sua camada superficial e comprimento de aproximadamente 1,06μ (hum micrometro) no filamento de nanotubos da camada desprendida pelo entalhe.

Figura 22b - Mensuração do comprimento dos nanotubos nas amostras do Grupo 3 (D, E e F) em D tem-se a camada de nanotubos que foi desprendida pelo entalhe



Fonte: Autor

Estudos realizados por autores do Grupo de Pesquisas da FEG – UNESP com o crescimento de nanotubos em ligas de Ti7,5Mo em diferentes apresentações, discos polidos ou

miniimplantes, podem ser observados na Tabela 1, demonstrando os diferentes diâmetros obtidos.

Quadro 6 - Valores médios dos diâmetros dos nanotubos obtidos pelos autores

Autor	Potencial (V)	Material	Diâmetro
Escada (2012)	20 / 30V	Discos polidos	80nm
Oliveira (2016)	10 / 20V	Discos polidos	55nm
Nogueira (2017)	20V	Minimplantes	97nm
Tupinambá (2019) (presente estudo)	20V	Minimplantes	73nm

Fonte: Autor

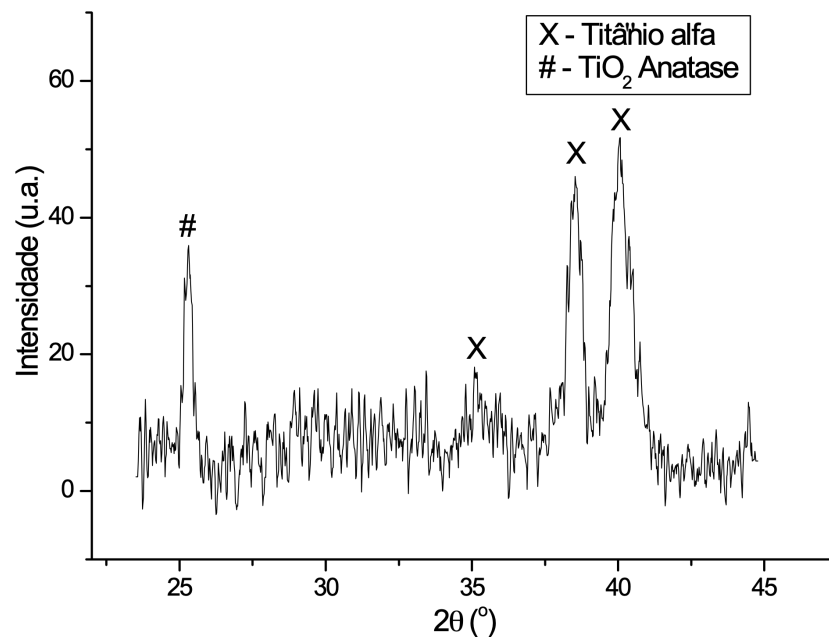
Os valores médios obtidos no presente trabalho referentes ao diâmetro dos nanotubos são equivalentes aos observados por Escada (2012) e Nogueira (2017) e, um pouco superiores aos obtidos por Oliveira (2016). Ambos autores utilizaram o mesmo eletrólito, potencial, tempo de anodização e tratamento térmico do presente estudo. Pelas medidas observadas, os valores obtidos são considerados bastante adequados para a interação efetiva com o tecido ósseo, conforme observado por Brammer et al. (2004), onde nanotubos com diâmetros próximos a 70-100nm proporcionaram maior formação óssea por induzir a formação de células alongadas com alta capacidade de regulação da atividade de produção de fosfatase alcalina, que é capaz de induzir a tensão do citoesqueleto e a diferenciação seletiva de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos. Os mesmos resultados foram observados por Ding et al. (2015) ao compararem superfícies anodizadas de implantes com diferentes padrões de diâmetros dos nanotubos, com melhores respostas de formação óssea em nanotubos com diâmetros superiores a 50nm.

Quanto ao comprimento dos nanotubos, o valor obtido foi bastante próximo aos 700nm observados por Yang et al. (2008) para o mesmo eletrólito e potencial, que concluíram que esta condição foi a mais eficiente nas taxas de conversão e na formação da camada de nanotubos mais espessa.

4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A difratometria e raios X demonstrou a presença da fase alfa” e predominância de anatase somente na superfície da amostra do Grupo 3 (Figura 23), apresentando pico intenso característico desta fase próxima a 26° (2 θ). Tais variações não foram observadas nos demais Grupos por estes não terem sofrido nenhum tratamento de superfície que promovesse a formação de camada de óxido como o Grupo 3.

Figura 23 - Difratoograma apresentando pico característico da fase anatase apresentada na amostra do Grupo 3



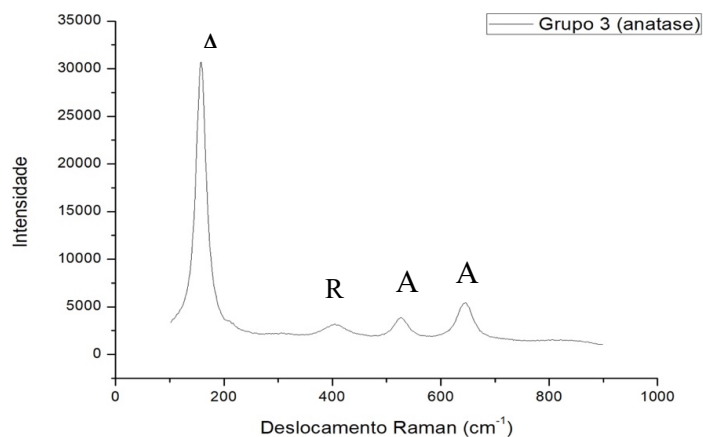
Fonte: Autor

Os valores observados e características do gráfico são compatíveis com os obtidos por diferentes autores para a mesma liga e tratamento de superfície (ESCADA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016).

4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

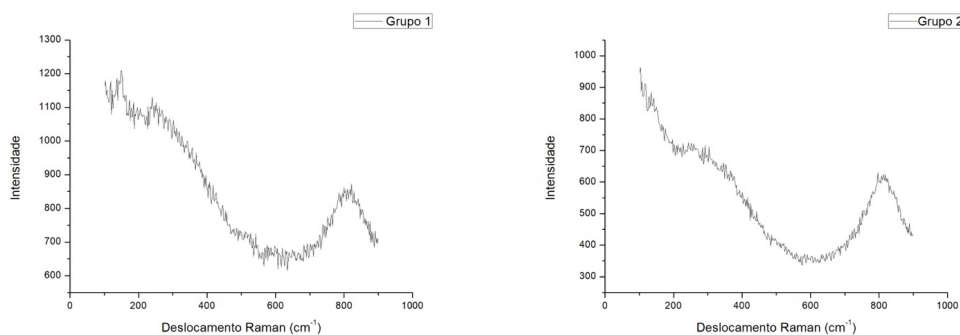
Assim como observado na difratometria de raios X, a espectroscopia Raman da amostra do Grupo 3 demonstrou a presença da banda típica da fase anatase (A) e uma pequena banda da fase rutilo (R) (Figura 24). As amostras dos demais Grupos não apresentaram qualquer tipo de característica destas fases (Figura 25)

Figura 24 - Gráfico da amostra do Grupo 3 com a presença das bandas das diferentes fases com predominância da fase anatase (A)



Fonte: Autor

Figura 25 - Amostras dos Grupos 1 e 2 sem bandas características das fases anatase ou rutilo



Fonte: Autor

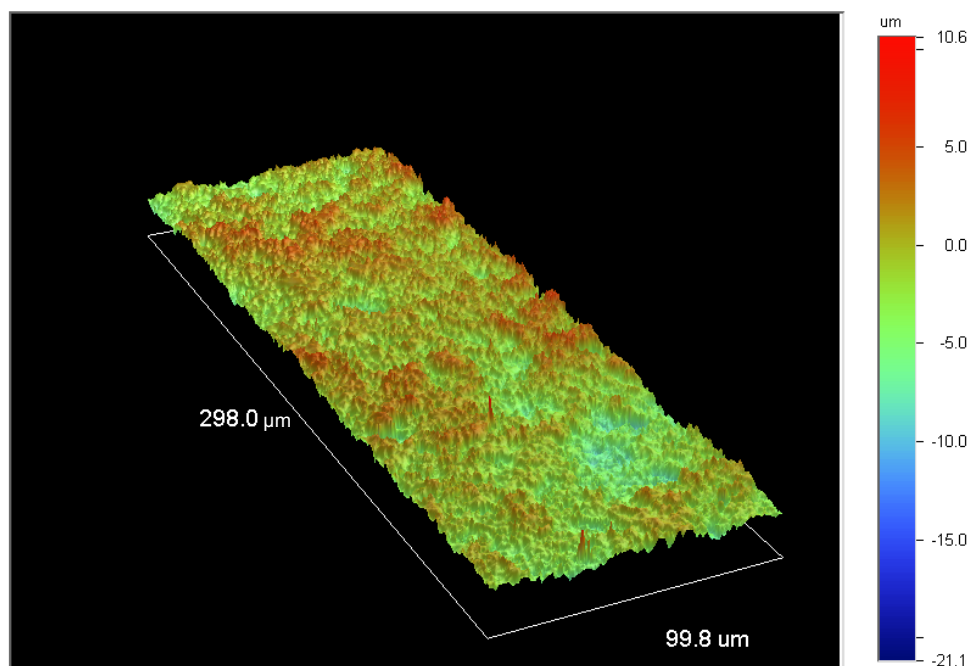
Conforme observado por Lim et al. (2001), a estrutura de superfície mais adequada às interações com tecidos ósseos é a anatase por apresentar características bastante hidrofílicas. Além disso Oh et al. (2006) observaram que esta configuração apresentava propriedades físicas

e características de superfície superiores, que promoviam locais mais ativos para a catálise mesoporosa, resultando em reatividade com tecidos vivos superior às superfícies de titânio puro não tratadas. O presente trabalho obteve resultados das distribuições das fases compatíveis aos observados por diferentes autores para a mesma liga e tratamento de superfície (ESCADA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016). A variação nos parâmetros de anodização e calcinação da liga de Ti7,5Mo produz superfícies com estruturas cristalinas variáveis, com maiores ou menores quantidades de anatase e rutilo que tem influência direta no grau de molhabilidade superficial. Maiores concentrações de rutilo produzem maior hidrofobicidade, com ângulo de contato de $9,8^\circ$ quando calcinadas a 600°C (ESCADA et al., 2017).

4.4 PERFILOMETRIA ÓPTICA

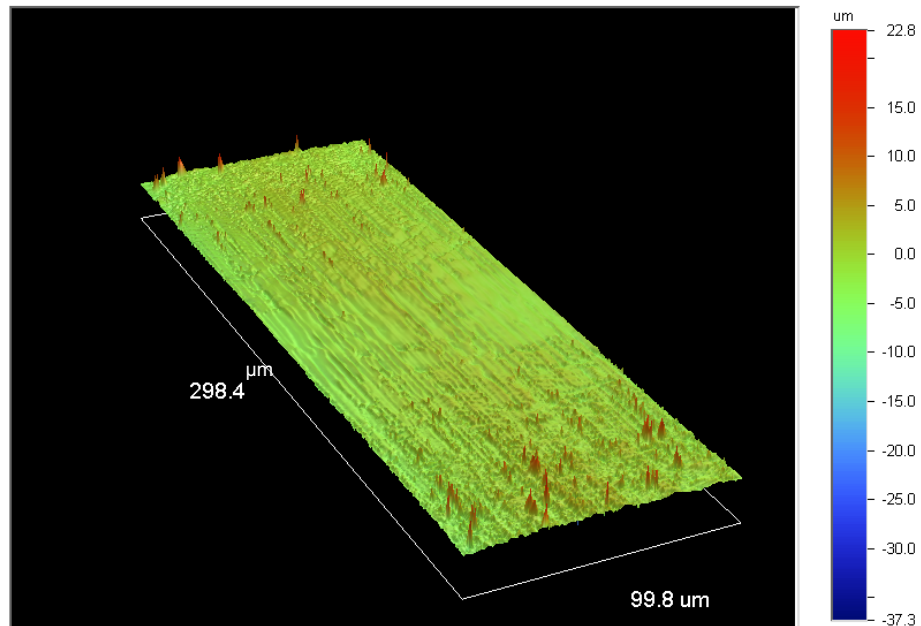
A análise das superfícies das amostras para avaliação de suas rugosidades superficiais pode ser observada nas figuras 26 a 28 apresentadas a seguir.

Figura 26 - Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 1



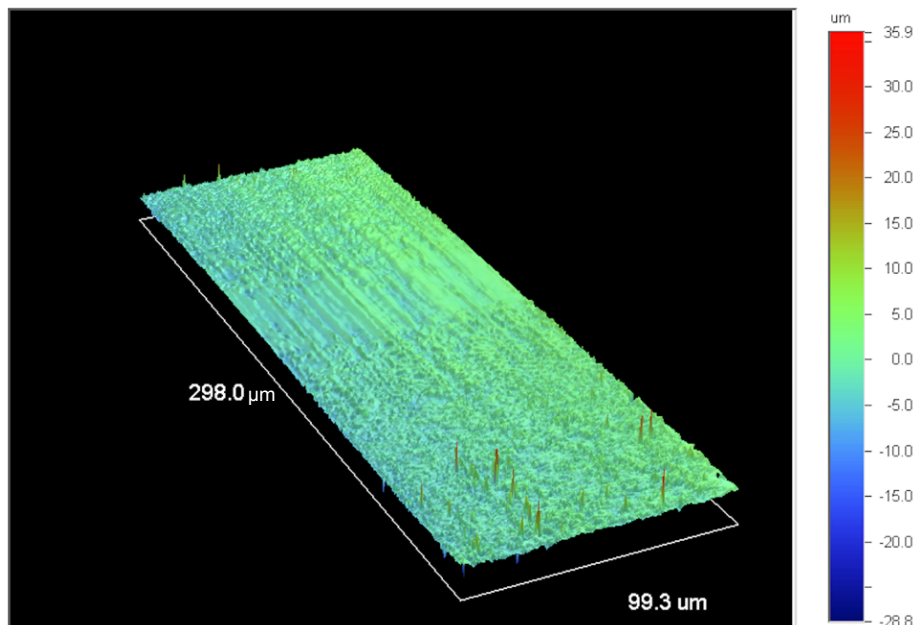
Fonte: Autor

Figura 27 - Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 2



Fonte: Autor

Figura 28 - Perfilometria da superfície da amostra do Grupo 3



Fonte: Autor

Entre as amostras analisadas a superfície mais rugosa foi observada no Grupo 1. Este padrão de rugosidade é típico do tratamento da superfície por jateamento e ataque ácido, produzindo superfícies não homogêneas e microporosas e com conseqüente menor variação entre picos e fundos de vale (R_t). Este tipo de topografia pode promover a diferenciação osteoblástica, mas ao mesmo tempo pode inibir sua proliferação (DING et al., 2015). As

amostras do Grupo 3 foram as segundas mais rugosas e, as que apresentaram maior variação entre o pico e o fundo do vale (R_t). As superfícies menos rugosas foram observadas nas amostras do Grupo 2, por somente ter sofrido usinagem e nenhum outro tipo de tratamento de superfície.

A mensuração da rugosidade média das amostras dos diferentes Grupos é apresentada na Tabela 2:

Tabela 2 - Valores referentes às rugosidades médias de cada Grupo

Amostra	R_a (μm)	R_q (μm)	R_t (μm)
Grupo 1	2,01	2,53	31,43
Grupo 2	1,08	1,49	60,04
Grupo 3	1,72	2,13	64,71

Fonte: Autor

Como observado por Wennerberg e Albrektsson (2009), em sua revisão sistemática, superfícies tratadas que apresentavam rugosidade entre 1-2 μm apresentaram a melhor resposta biológica óssea, exatamente na faixa de variação observada na rugosidade das amostras do presente estudo. Houve um pequeno aumento na rugosidade média observado no presente trabalho quando comparado aos resultados de Escada et al. (2017). Diversos autores demonstraram que tanto a fixação precoce quanto a estabilidade mecânica a longo prazo do implante podem ser melhoradas por um perfil de rugosidade elevado em relação às superfícies lisas, pois a rugosidade elevada promove melhor travamento mecânico entre a superfície do implante e do osso adjacente em formação (BUSER et al., 1991; GOTFREDSEN et al., 1995). Entretanto, o risco principal da rugosidade superficial elevada é o aumento do risco de peri-implantite, assim como um aumento na liberação iônica (BECKER et al., 2000). A rugosidade moderada entre 1 a 2 μm pode mitigar estas duas ocorrências (ALBREKTSSON et al., 2005).

4.5 TESTES *IN VIVO*

A opção pela utilização dos parâmetros de BIC e BAFO como referência para avaliação da osteointegração, reside no fato de que há um consenso na literatura científica atual que determina a qualidade da osteointegração é dependente do percentual de contato direto entre osso e implante, assim como na densidade de osso ao redor do implante. Especialmente para avaliação da qualidade óssea em tecidos ósseos de baixa densidade (WENG et al., 2003). Além

disso, outros tipos de teste como torque de remoção e análise de frequência de ressonância (ISQ), que avaliam a força necessárias para remoção do implante e a estabilidade do implante, respectivamente, estavam inviabilizados pelas características do desenho e do tamanho diminuto do implante, bem como do animal utilizados.

Após os experimentos *in vivo* cada uma das amostras foi avaliada por meio de estudos histomorfométricos de BIC e BAFO, obtendo-se os resultados em porcentagem relativa, apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente:

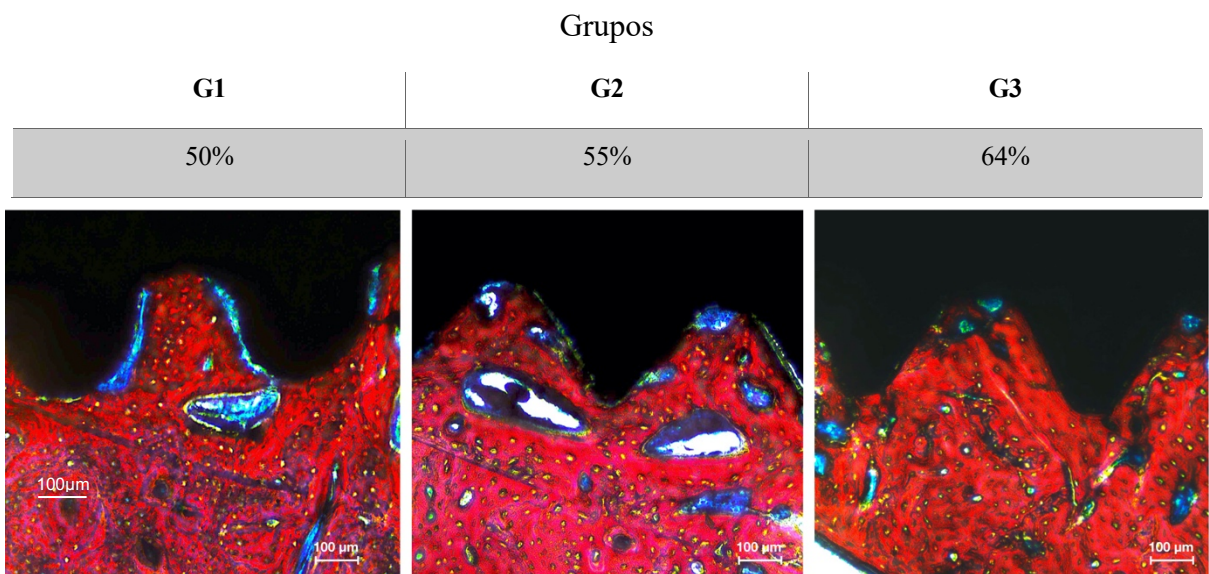
Tabela 3 - Valores da estatística descritiva referentes aos valores do BIC dos diferentes

Grupo	n	Média%	Desvio Padrão	Grupos				
				Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Primeiro Quartil	Terceiro Quartil
1	5	50,85	5,81	56,22	41,53	51,51	47,82	55,38
2	5	55,20	8,10	65,78	43,16	54,80	51,83	59,56
3	6	64,06	7,72	72,99	53,04	65,47	56,95	70,44

Fonte: Autor

Na figura 29 observa-se uma amostra de cada um dos Grupos com características de BIC compatíveis com os valores médios obtidos.

Figura 29 - Amostras caracterizando os valores médios obtidos para o BIC em cada um dos



Fonte: Autor

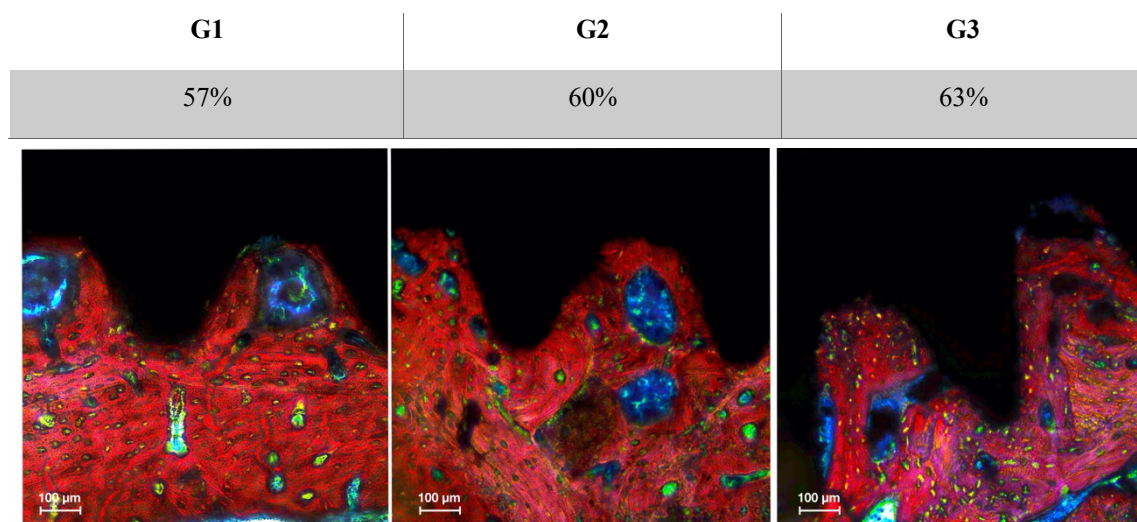
Tabela 4 - Valores da estatística descritiva referentes aos valores do BAFO dos diferentes Grupos

Grupo	n	Média%	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo	Mediana	Primeiro Quartil	Terceiro Quartil
1	5	57,53	12,41	74,32	41,41	59,69	48,14	64,97
2	5	59,91	6,63	67,71	50,86	61,49	54,58	64,69
3	6	62,74	12,15	82,76	50,82	59,22	53,16	71,26

Fonte: Autor

Na Figura 30 observa-se uma microfotografia de uma amostra de cada Grupo com características de BAFO compatíveis com os valores médios aferidos.

Figura 30 - Amostras caracterizando os valores médios obtidos para o BAFO em cada um dos Grupos



Fonte: Autor

O teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov demonstrou que houve normalidade de distribuição dos dados referentes aos valores de BIC e BAFO. Para avaliar se houve diferença entre os Grupos o teste de ANOVA de 1 fator foi realizado para avaliação dos valores referentes ao BIC e ao BAFO.

Na comparação entre os Grupos em relação aos valores referentes ao BIC, apresentando distribuição normal ($p=0,275$), adotando-se um poder de teste de $\alpha=0,05$ e com $p<0,05$ para

determinar diferença estatísticas significante, foi aplicado a ANOVA de fator único, determinando que as diferenças nos valores médios entre os Grupos de tratamento são maiores do que seria esperado ao acaso, portanto há diferença estatisticamente significante ($p = 0,008$).

Pela comparação entre os Grupos por meio do teste Tukey, foi observado que houve diferença estatística significante somente entre os Grupos 1 e 3 ($p = 0,006$) (Figura 31). Sendo que o Grupo 3, com superfície anodizada, apresentou valores percentuais médios de BIC 21% maiores que os do Grupo 1, com apresentação comercial do implante com superfície tratada por jateamento e ataque ácido, conforme apresentado na Tabela 5.

Figura 31 - Distribuição das medidas e a diferença estatisticamente significante entre os Grupos para os valores de BIC (\otimes média e \oplus mediana)

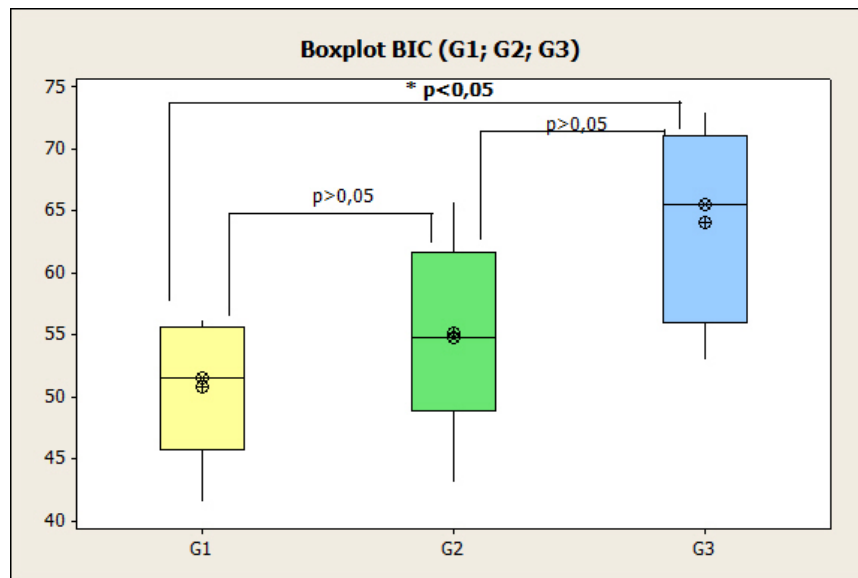


Tabela 5 - Comparação dos valores referentes ao BIC entre os Grupos (teste Tukey)

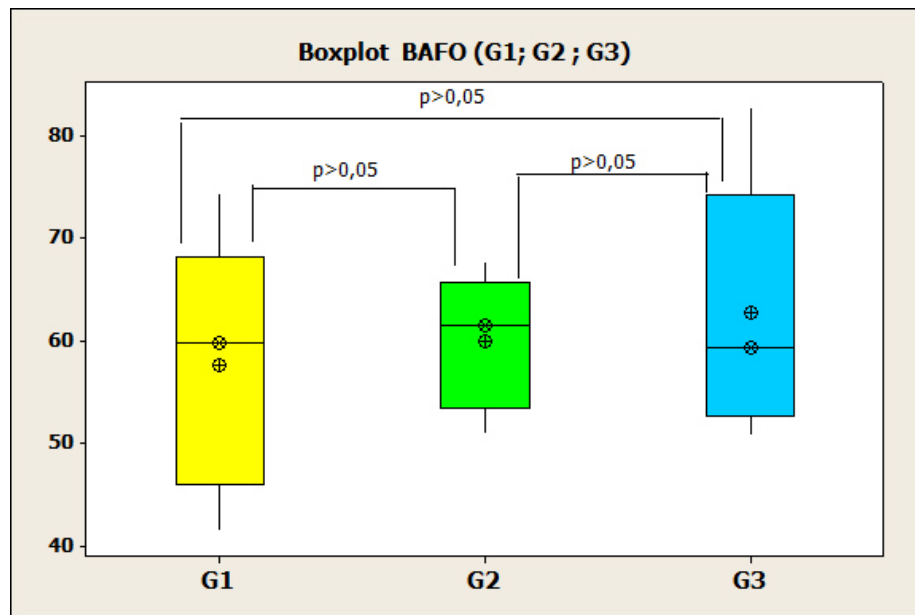
Grupos	P ($p < 0,05$)	Significância
G1xG2	0.307	negativa
G1xG3	0.006	positiva
G2xG3	0.116	negativa

Fonte: Autor

Na comparação dos valores percentuais relativos ao BAFO entre os Grupos, quando analisados pelo teste de ANOVA de 1 fator, as diferenças observadas não foram

suficientemente grandes para excluir a possibilidade de que a diferença seja devido à variabilidade amostral aleatória. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos ($p = 0,194$) (Figura 32).

Figura 32 - Gráfico demonstrando a distribuição das medidas e a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os Grupos para os valores de BAFO (\otimes média e \oplus mediana)



Fonte: Autor

O teste de correlação de Pearson demonstrou não haver correlação significativa entre os valores de BIC e BAFO entre qualquer par de variáveis na tabela de correlação, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Valores referentes à correlação entre BIC e BAFO nos Grupos (teste Pearson)

Grupos	p ($p < 0,05$)	Significância
G1 BICxBAFO	0,220	não
G2 BICxBAFO	0,118	não
G3 BICxBAFO	0,088	não

Fonte: Autor

O valor médio de BIC do Grupo 1 de $50,8 \pm 5,81\%$, observados no presente estudo para um período de 4 semanas, quando comparado com os disponíveis na literatura, nomeados pelos

diferentes autores como SLA (sand blasted-acid etched large grid surface), apresentou resultados ligeiramente superiores aos demais autores para o mesmo tipo de material, que obtiveram $41,3 \pm 15,2\%$ para 2 semanas e $46,77\% \pm 11,54$ para 6 semanas (PELEGRINE et al., 2019), $46,53\%$ para 4 semanas (HERRERO-CLIMENT et al., 2018) e $46,77\% \pm 11,54$ em duas semanas e $41,04\% \pm 3,75$ em seis semanas (FREITAS, 2014).

Quanto à comparação do BAFO do Grupo 1 de $57,53 \pm 12,4\%$, com a literatura disponível, também foram observados valores ligeiramente superiores aos $50,75 \pm 2,56\%$ para duas semanas e $55,39 \pm 14,98\%$ para seis semanas observados por Freitas (2014), mas bastante superiores aos $28,7 \pm 13,7\%$ para duas semanas e $36,4 \pm 10,3\%$ para 6 semanas observados por Pelegrine et al. (2019) e os $36,26\%$ para 4 semanas de Herrero-Climent et al. (2018).

Caso os resultados obtidos para o BAFO no presente estudo para o Grupo 1 fossem mais compatíveis aos observados na literatura, ou seja, menores, possivelmente teriam-se observado diferenças significantes entre os Grupos, assim como foram observadas diferenças para os valores obtidos na comparação do BIC entre os Grupos.

Na atual literatura não foram encontrados estudos *in vivo* com implantes de Ti7,5Mo usinados que utilizassem os parâmetros de BIC e BAFO como referência para a resposta óssea. Assim foi utilizado como método de comparação para o Grupo 2, implantes de Ti-CP que passaram por usinagem e não receberam nenhum tipo de tratamento de superfície. No presente estudo para o Grupo 2 foram obtidos valores médios de BIC de $55,2 \pm 8,10\%$, superiores aos $41,97 \pm 9,93\%$ para duas semanas e os $30,41 \pm 5,44\%$ para seis semanas obtidos por Freitas (2014) assim como os $27,9\%$ para três semanas e os $14,7\%$ para oito semanas obtidos por Tavares et al. (2007). Deste modo pode-se constatar que a liga de Ti7,5Mo obteve resultados bastante superiores aos encontrados na literatura para materiais não tratados e conforme observado neste estudo, sem diferença estatística significativa para o material em sua apresentação comercial tratada (Grupo 1).

Na avaliação do BAFO, o Grupo 2 apresentou média de $59,91 \pm 6,63\%$, semelhantes aos valores médios percentuais obtidos por Tavares et al. (2007), de $58,1 \pm 13,2\%$ para 3 semanas, e superiores aos $47,7 \pm 6,5\%$ para 8 semanas.

A mesma dificuldade de comparação foi encontrada em relação ao Grupo 3. Por este motivo utilizaram-se trabalhos que realizaram tratamento de superfície dos implantes de titânio com crescimento de nanotubos de TiO₂ por anodização. Para os valores médios de BIC o presente estudo obteve $64,06\% \pm 7,72\%$, compatíveis com Pelegrine et al. (2019) que obtiveram resultados de $63,1 \pm 8,7\%$ para duas semanas e $64,8 \pm 7,4\%$ para seis semanas. Já Ding et al.

(2015) obtiveram valores médios bastante inferiores, de $32,1 \pm 0,010\%$ para o mesmo período de tempo e em nanotubos de diâmetros similares aos do presente estudo.

Quanto à avaliação do BAFO no Grupo 3, este também seguiu o mesmo método de comparação do realizado no BIC. Pelegrine et al. (2019) obtiveram $54,8 \pm 7,5\%$ para duas semanas e $57,9 \pm 9,3\%$ para seis semanas. Ding et al. (2015) obteve $45,1 \pm 0,036\%$ em seu experimento, ou seja, ambos inferiores aos $60,17 \pm 11,56\%$ observados neste estudo.

O Grupo 3 apesar de não apresentar diferença estatística significativa em relação ao BIC para o Grupo 2, pode ser considerado bastante promissor, pois o Grupo 2 apresentou os maiores valores relativos quando comparado aos demais materiais usinados disponíveis na literatura em relação ao BIC. O mesmo ocorreu em relação ao BAFO: o Grupo 3 não apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais Grupos do presente estudo, mas apresentou valores superiores aos materiais anodizados com crescimento de nanotubos de TiO_2 avaliados na literatura.

Apesar dos demais estudos analisados demonstrarem diferenças estatísticas significantes tanto para os valores de BIC quanto os de BAFO na comparação entre materiais com superfície jateada seguida de ataque ácido (SLA) versus superfície anodizada com crescimento de nanotubos de TiO_2 (TNT) (PELEGRINE et al., 2019; HERRERO-CLIMENT et al., 2018), o presente estudo não apresentou diferença estatística significativa entre estes Grupos ($p > 0,05$) para os valores de BAFO.

Outra discordância está no fato de que materiais com superfícies nanotexturizadas tendem a promover tanto a diferenciação celular quanto a sua proliferação, o que resultaria também em taxas de BIC e BAFO, i. e. osteointegração, com maiores chances de correlação, fato não observado no presente estudo através do teste Pearson de correlação intra-grupo. ($p > 0,05$). A literatura (DING et al., 2015; LARRAZA et al., 1999) demonstra que superfícies microestruturadas (SLA) promovem diferenciação dos osteoblastos mas inibem sua proliferação. Portanto, mesmo que as microsuperfícies resultem em um melhor nível de osteointegração quando comparadas com superfícies lisas (usinadas), a falta de proliferação de osteoblastos resultaria em um menor acúmulo de massa óssea (BAFO) em comparação com o produzido por uma superfície lisa. Portanto seria esperado que a ausência de correlação entre o BIC e o BAFO fosse observada entre os Grupos 1 e 2 e não no Grupo 3.

Uma possível explicação para a ausência de diferença estatística significativa entre os Grupos para o BAFO, pode ser o período de tempo utilizado para o experimento. Pelegrine et al. (2019) ao comparar o BIC e BAFO de implantes SLA com implantes SLA com tratamento de superfície com crescimento de nanotubos de TiO_2 (TNT), obteve valores estatisticamente

mais significantes tanto para BIC quanto para o BAFO em duas semanas (T1) do que em seis semanas (T2). Segundo o autor isto ocorreu pelo fato de que em duas semanas a osteoindução e osteocondução do Grupo tratado (TNT) já havia promovido uma boa osteointegração inicial, com taxas de BIC e BAFO aumentadas. Após 6 semanas o Grupo não tratado teve mais tempo para produção óssea, reduzindo a diferença de quase 50% entre as amostras observado em T1 para 36% em T2. Estudos comprovam a completa formação óssea no modelo animal utilizado em quatro semanas (MURAI et al., 1999).

Além disso, os valores obtidos tanto para o BIC quanto para o BAFO no Grupo 1 isoladamente, foram maiores quando comparados aos valores observados na literatura para os mesmos parâmetros neste tipo de material (PELEGRINE et al., 2019; HERRERO-CLIMENT et al., 2018; FREITAS, 2014).

Superfícies anodizadas promoveram aumento da resposta óssea com valores mais elevados para os testes histomorfométricos em comparação com as superfícies usinadas e tratadas tradicionalmente com jateamento e ataque ácido (SLA). Dois mecanismos são propostos para explicar esta osteointegração: o travamento mecânico através do crescimento ósseo nos poros dos nanotubos e a ligação bioquímica, especialmente pelas características de rugosidade superficial e molhabilidade, típicas das superfícies anodizadas (SUL et al., 2005).

Ao aliar as características mecânicas apropriadas com o tratamento de superfície que promove respostas biológicas de qualidade, as ligas de Ti7,5Mo abrem uma nova e promissora perspectiva aos novos materiais para utilização em implantodontia e demais áreas médicas reabilitadoras.

5 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

- O método utilizado na anodização para modificação da superfície da liga de Ti7,5Mo, usinada em minimplantes foi efetivo para que fossem atingidos os efeitos biológicos desejados, produzindo superfícies com rugosidades adequadas, fases cristalinas predominantes em anatase, nanotubos com diâmetros e comprimentos adequados, reproduzindo as propriedades e características compatíveis aos encontrados em nosso grupo de pesquisas, em estudos anteriores e nos experimentos já realizados previamente na liga em formato de pastilhas polidas;
- O Grupo 3, composto por amostras da liga de Ti7,5Mo com tratamento de superfície por anodização, produziram percentuais de contato direto do osso formado com a superfície do implante (BIC), superiores aos Grupo 1 (controle);
- Não houve diferenças estatísticas significantes entre os Grupos nos percentuais relativos às quantidades de tecido ósseo formado entre as espiras dos implantes (BAFO);
- Não foi detectada correlação direta entre os valores obtidos para o BIC e o BAFO nas avaliações intra-grupos;
- Os resultados apontam para a eficiência do uso do tratamento de superfície por anodização como um método coadjuvante para acelerar o processo de osteointegração, pela ativação da proliferação do tecido ósseo sobre a superfície tratada, não produzindo nessa pesquisa, nenhum sinal deletério celular. Isso corrobora com outras pesquisas que utilizaram este método para modificação de superfície de implantes para a mesma finalidade.

5.1 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos propõem-se para continuidade da pesquisa, os seguintes estudos:

- Análise da molhabilidade superficial por método de imersão para comparação da liga usinada e tratada em formato de implantes com o material em formato de pastilhas, já disponível na literatura;
- Variação no tempo e nos parâmetros de anodização seguido de calcinação em diferentes temperaturas para obtenção de fases distintas e;

- Experimentos in vivo com diferentes períodos de tempo e condições de ativação dos implantes.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of materials science**. Materials in medicine, London, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1990.
- AFFAIRS, ADA COUNCIL ON SCIENTIFIC. Titanium applications in dentistry. **The Journal of the American Dental Association**, v. 134, n. 3, p. 347-349, 2003.
- ALBREKTSSON, T. *et al.* The interface zone of inorganic implants *in vivo*: Titanium implants in bone. **Annals of biomedical engineering**, v. 11, n. 1, p. 1-27, 1983.
- ALBREKTSSON, T. *et al.* The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 1, n. 1, p. 11-25, 1986.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.
- ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. State of the art in oral implants. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 474-481, 1991.
- ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. The impact of oral implants-past and future, 1966-2042. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 71, n. 5, p. 327, 2005.
- ANDERSON, K.; ANDERSON, L. E.; GLANZE, W. D. **Mosby's medical, nursing, & allied health dictionary**. St. Louis, Missouri: CV Mosby, 1998. cap. 1, p. 157-158.
- ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. (Ed.). **Phillips' science of dental materials** St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Health Sciences, 2012. cap. 7, p. 111-148.
- APARICIO, C. *et al.* Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 2, p. 263-273, 2003.
- ASOH, H. *et al.* Conditions for fabrication of ideally ordered anodic porous alumina using pretextured Al. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 148, n. 4, p. B152-B156, 2001.
- BABBUSH, C. A. Endosseous blade-vent implants: a research review. **Journal of Oral Surgery (American Dental Association: 1965)**, v. 30, n. 3, p. 168, 1972.
- BASSETT, C. A. L. Biologic significance of piezoelectricity. **Calcified Tissue Research**, v. 1, n. 1, p. 252-272, 1967.
- BAUER, S.; KLEBER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: tailoring the geometry in H₃PO₄/HF electrolytes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 8, p. 1321-1325, 2006.

- BECKER, W. *et al.* A prospective multicenter clinical trial comparing one-and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 2, n. 3, p. 159-165, 2000.
- BERARDI, D. *et al.* New laser-treated implant surfaces: a histologic and histomorphometric pilot study in rabbits. **Clinical & Investigative Medicine**, v. 34, n. 4, p. 202-210, 2011.
- BERGER, S.; TSUCHIYA, H.; SCHMUKI, P. Transition from nanopores to nanotubes: self-ordered anodic oxide structures on titanium–aluminides. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 10, p. 3245-3247, 2008.
- BOTHE, R. T. Reaction of bone to multiple metallic implants. **Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 71, p. 598-602, 1940.
- BRAMMER, K. S. *et al.* Biomaterials and biotechnology schemes utilizing TiO₂ nanotube arrays. In: **Biomaterials Science and Engineering**. IntechOpen, 2011.
- BRÅNEMARK, P.-I. Osseointegration and its experimental background. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 50, p. 399-410, 1983.
- BRUNETTE, D. M. *et al.* (Ed.). **Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications**. Springer Science & Business Media, 2012. cap. 1, p. 13-24.
- BRUNETTE, D. M. **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications**. Springer Science & Business Media, 2001. cap. 3, p. 231-266.
- BUSER, D. *et al.* Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 25, n. 7, p. 889-902, 1991.
- CAROBOLANTE, J. P. A. *et al.* Incorporação de clorexidina à superfície da liga Ti7, 5Mo após modificação de superfície com crescimento de nanotubos de TiO₂ associado a eletrofiação. **Archives of Health Investigation**, v. 5, n. 6, 2016. Disponível em: <http://archhealthinvestigation.emnuvens.com.br/ArcHI/article/view/1792>. Acesso: 12 de junho de 2018.
- CHANG, C. *et al.* A novel rotating electrochemically anodizing process to fabricate titanium oxide surface nanostructures enhancing the bioactivity of osteoblastic cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 7, p. 1687-1695, 2012.
- CHOEE, J. H. *et al.* Proliferation rate of fibroblast cells on polyethylene surfaces with wettability gradient. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 92, n. 1, p. 599-606, 2004.
- COLNOT, C. *et al.* Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 9, p. 862-867, 2007.

- COLOMBO, J. S. *et al.* In vivo monitoring of the bone healing process around different titanium alloy implant surfaces placed into fresh extraction sockets. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 4, p. 338-346, 2012.
- DAMBOURNET, D.; BELHAROUAK, I.; AMINE, K. Tailored preparation methods of TiO₂ anatase, rutile, brookite: mechanism of formation and electrochemical properties. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 3, p. 1173-1179, 2009.
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.
- DUAN, K.; WANG, R. Surface modifications of bone implants through wet chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 2309-2321, 2006.
- EISENBARTH, E. *et al.* Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5705-5713, 2004.
- ELIAS, C. N. *et al.* Biomedical applications of titanium and its alloys. **JOM-The Member Journal of The Minerals, Metals & Materials Society**, v. 60, n. 3, p. 46-49, 2008.
- ESCADA, A. L. A. *et al.* Human dermal fibroblast adhesion on Ti-7.5Mo after TiO₂ nanotubes growth. **Materials Science Forum**, v. 899, p. 195-200, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.899.195>. Acesso: 12 de junho 2018.
- ESCADA, A. L. do A. **Crescimento de nanotubos de TiO₂ na superfície da liga Ti-7, 5Mo empregando anodização**. 2012. 110f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica - Materiais) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2012.
- ESCADA, A. L.; NAKAZATO, R. Z.; CLARO, A. P. R. A. Influence of anodization parameters in the TiO₂ nanotubes formation on Ti-7.5 Mo alloy surface for biomedical application. **Materials Research**, v. 20, n. 5, p. 1282-1290, 2017.
- FREITAS, G. P. **Avaliação da resposta do tecido ósseo tipo IV a implantes osseointegráveis de titânio com diferentes tratamentos de superfície**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Cirurgia Buco Maxilo Facial) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- FROST, H. M. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 248, p. 294-309, 1989.
- GALLI, S. *et al.* Surface characterization and clinical review of two commercially available implants. **Implant Dentistry**, v. 22, n. 5, p. 507-518, 2013.
- GEETHA, M. *et al.* Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397-425, 2009.
- GHICOV, A.; SCHMUKI, P. Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and other self-aligned MO x structures. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2791-2808, 2009.

GONG, D. *et al.* Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. **Journal of Materials Research**, v. 16, n. 12, p. 3331-3334, 2001.

GOSAVI, S.; GOSAVI, S.; ALLA, R.. Titanium: a miracle metal in dentistry. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 27, n. 1, 2013.

GOTFREDSON, K. *et al.* Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, n. 10, p. 1223-1231, 1995.

HANAWA, T. Metal ion release from metal implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 6-8, p. 745-752, 2004.

HERRERO-CLIMENT, M. *et al.* Effectiveness of a new dental implant bioactive surface: histological and histomorphometric comparative study in minipigs. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 3, p. 1423-1432, 2018.

HO, W. F.; JU, C. P.; LIN, J. H. C. Structure and properties of cast binary Ti–Mo alloys. **Biomaterials**, v. 20, n. 22, p. 2115-2122, 1999.

INDIRA, K. *et al.* A review on TiO₂ nanotubes: influence of anodization parameters, formation mechanism, properties, corrosion behavior, and biomedical applications. **Journal of Bio-and Tribo-corrosion**, v. 1, n. 4, p. 28, 2015.

JAROENWORALUCK, A. *et al.* Macro, micro and nanostructure of TiO₂ anodised films prepared in a fluorine-containing electrolyte. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 16, p. 6729-6734, 2007.

JOLIVET, J. *et al.* Design of oxide nanoparticles by aqueous chemistry. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 299-305, 2008.

KANECO, S. *et al.* Fabrication of uniform size titanium oxide nanotubes: Impact of current density and solution conditions. **Scripta Materialia**, v. 56, n. 5, p. 373-376, 2007.

KARLSSON, J. *et al.* Atomically resolved tissue integration. **Nano Letters**, v. 14, n. 8, p. 4220-4223, 2014.

KLEIN, M. O. *et al.* Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 15, n. 2, p. 166-175, 2013.

KOIKE, M. *et al.* Corrosion behavior of cast Ti-6Al-4V alloyed with Cu. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 73, n. 2, p. 368-374, 2005.

- KURTZ, S. M. *et al.* Advances in zirconia toughened alumina biomaterials for total joint replacement. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 31, p. 107-116, 2014.
- LE GUÉHENNEC, L. *et al.* Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, n. 7, p. 844-854, 2007.
- LEE, B. *et al.* Effect of surface structure on biomechanical properties and osseointegration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1448-1461, 2008.
- LEE, S. *et al.* Hydroxyapatite-TiO₂ hybrid coating on Ti implants. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, n. 3, p. 195-208, 2006.
- LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. **Journal of Bone Joint and Surgery of America**, v. 33, n. 2, p. 473-474, 1951.
- LI, G. *et al.* Effect of calcination temperature on the morphology and surface properties of TiO₂ nanotube arrays. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 16, p. 7323-7328, 2009.
- LI, P. *et al.* Bonelike hydroxyapatite induction by a gel-derived titania on a titanium substrate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 77, n. 5, p. 1307-1312, 1994.
- LIM, Y. J. *et al.* Surface characterizations of variously treated titanium materials. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16, n. 3, 2001.
- LIN, C; JU, C; LIN, J C. A comparison of the fatigue behavior of cast Ti-7.5 Mo with cp titanium, Ti-6Al-4V and Ti-13Nb-13Zr alloys. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 2899-2907, 2005.
- LIN, D. *et al.* Bone formation at the surface of low modulus Ti-7.5 Mo implants in rabbit femur. **Biomaterials**, v. 28, n. 16, p. 2582-2589, 2007.
- LIND, M. Growth factors: possible new clinical tools: A review. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 67, n. 4, p. 407-417, 1996.
- LINKOW, L. I.; GLASSMAN, P. E.; ASNIS, S. T. Macroscopic and microscopic studies of endosteal bladevent implants (six month dog study). **Oral implantology**, v. 3, n. 4, p. 281-309, 1973.
- LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.
- LIVAGE, J. Chimie douce: from shake-and-bake processing to wet chemistry. **New Journal of Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 1-1, 2001.
- MACAK, J. M. *et al.* Mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO₂ nanotubes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 2, p. 254-266, 2008.

MACAK, J. M. *et al.* TiO₂ nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 11, n. 1-2, p. 3-18, 2007.

MANIVASAGAM, G; DHINASEKARAN, D.; RAJAMANICKAM, A. Biomedical implants: corrosion and its prevention-a review. **Recent Patents on Corrosion Science**, v. 2, p. 40-54, 2010. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/84c0/a7dcb2a9f567e67ec847801410a6f097c2d2.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2019.

MEIRELLES, L. *et al.* The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 23, n. 4, 2008.

OLIVEIRA, R. M. *et al.* Xenograft impregnated with bone marrow mononuclear fraction for appositional bone regeneration in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 29, n. 4, 2014.

MILLER, B. F.; KEANE, C. B. **Encyclopedia and dictionary of medicine, nursing, and allied health**. Philadelphia, PA: Saunders, 1997. cap. 3, p. 363-364.

MINAGAR, S. *et al.* A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 2875-2888, 2012.

MISCH, C. E. **Dental Implant Prosthetics-E-Book**. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2004. cap. 1, p. 3-4.

MURAI, K. *et al.* Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 523-533, 1996.

NAVES, M. M. *et al.* Effect of macrogeometry on the surface topography of dental implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 30, n. 4, 2015.

NOGUEIRA, R. G. C. **Processamento de implantes dentários com modificação da superfície da liga Ti-7,5Mo a partir da formação de nanotubos**. 2017. 49 f. Trabalho de Graduação (Graduação em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2017.

OH, S. *et al.* Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 4938-4943, 2005.

OH, S. *et al.* Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 78, n. 1, p. 97-103, 2006.

- OKAZAKI, Y.; GOTOH, E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials *in vitro*. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 11-21, 2005.
- OLIVEIRA, L. L. **Incorporação de Clorexidina na Superfície da liga Ti-7, 5Mo após o crescimento de Nanotubos de TiO₂**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica – Materiais) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.
- PELEGRINE, A. A. *et al.* Development of a Novel Nanotextured Titanium Implant. An Experimental Study in Rats. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 954, 2019.
- RING, M. E. **Dentistry: an illustrated history**. Abradale Press/Harry N. Abrams, 1985. cap. 1, p 15-36.
- RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013.
- ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: synthesis and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904-2939, 2011.
- RUDY, R. J. *et al.* Intraosseous anchorage of dental prostheses: an early 20th century contribution. **Compendium**, v. 29, n. 4, p. 220, 2008.
- RUPP, F. *et al.* A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 7, p. 2894-2906, 2014.
- SAINI, M. *et al.* Implant biomaterials: a comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 3, n. 1, p. 52, 2015.
- SCHLEE, M. *et al.* Prospective, multicenter evaluation of trabecular metal-enhanced titanium dental implants placed in routine dental practices: 1-year interim report from the development period (2010 to 2011). **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n. 6, p. 1141-1153, 2015.
- SCHROEDER, A. *et al.* The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. **Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 9, p.15-25, 1981.
- SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: AMGH Editora, 2013. cap. 17, p. 649-650.
- SOBIESZCZYK, S. Surface modifications of Ti and its alloys. **Advances in Materials Sciences**, v. 10, n. 1, p. 29-42, 2010.
- SOLHEIM, E. Growth factors in bone. **International Orthopaedics**, v. 22, n. 6, p. 410-416, 1998.
- SPRIANO, S. *et al.* Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. **Biomaterials**, v. 26, n. 11, p. 1219-1229, 2005.

SUL, Y. *et al.* The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering & Physics**, v. 23, n. 5, p. 329-346, 2001.

SUL, Y. *et al.* Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 3, 2005.

SUMITA, M.; HANAWA, T.; TEOH, S. H. Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 6-8, p. 753-760, 2004.

TANG, H. *et al.* Electrical and optical properties of TiO₂ anatase thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 75, n. 4, p. 2042-2047, 1994.

TAVARES, M. G. *et al.* Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 4, p. 452-458, 2007.

TAVEIRA, L. V. *et al.* Initiation and growth of self-organized TiO₂ nanotubes anodically formed in NH₄F/(NH₄)₂SO₄ electrolytes. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 152, n. 10, p. B405-B410, 2005.

THAKRAL, G. K. *et al.* Nanosurface—the future of implants. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 8, n. 5, p. ZE07, 2014.

TRISI, P. *et al.* Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 7, p. 945-956, 2003.

TSUCHIYA, H. *et al.* Characterization of electronic properties of TiO₂ nanotube films. **Corrosion Science**, v. 49, n. 1, p. 203-210, 2007.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

URIST, M. R.; MIKULSKI, A.; LIETZE, A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1828-1832, 1979.

VELTEN, D. *et al.* Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 59, n. 1, p. 18-28, 2002.

WEISS, C. M.; JUDY, K. W.; CHIARENZA, A. R. Precompacted, coined titanium endosteal blade implants. **Oral Implantology**, v. 3, n. 4, p. 237, 1973.

WENG, D. *et al.* Osseotite® vs. machined surface in poor bone quality: a study in dogs. **Clinical oral implants research**, v. 14, n. 6, p. 703-708, 2003.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, p. 172-184, 2009.

WILSON-HENCH, J. Osteoinduction. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, p. 29, 1987.

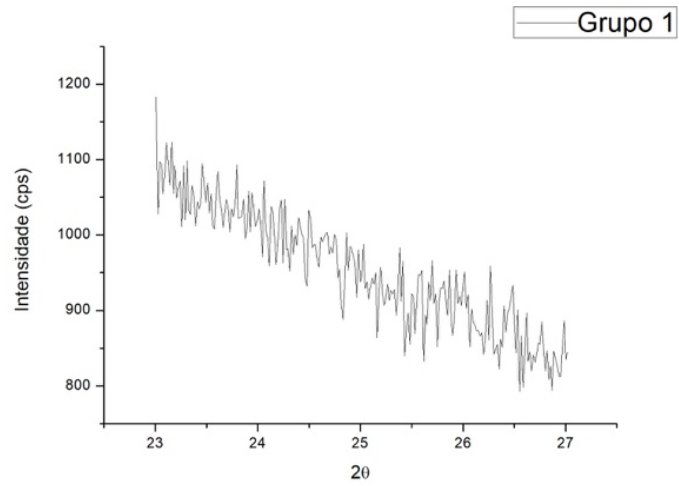
XIE, Z. B.; BLACKWOOD, D. J. Effects of anodization parameters on the formation of titania nanotubes in ethylene glycol. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 905-912, 2010.

YANG, D. J. *et al.* Thickness-conversion ratio from titanium to TiO₂ nanotube fabricated by anodization method. **Materials Letters**, v. 62, n. 4-5, p. 775-779, 2008.

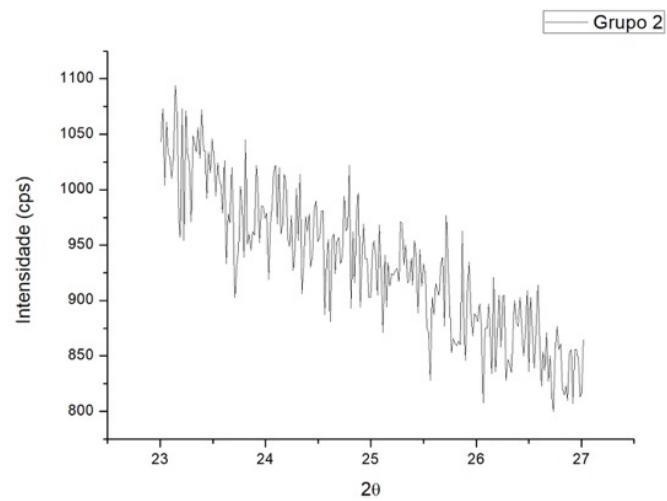
YANG, Y.; WANG, X.; LI, L. Synthesis and growth mechanism of graded TiO₂ nanotube arrays by two-step anodization. **Materials Science and Engineering: B**, v. 149, n. 1, p. 58-62, 2008.

APÊNDICE A

Gráficos resultantes da análise dos Grupos 1 e 2 por difratometria de raios X que não apresentaram características típicas da presença da fase anatase em suas superfícies.



Fonte: Autor



Fonte: Autor

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética para liberação do uso dos ratos para os testes *in vivo*.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA SLMandic

Campinas, 20 de dezembro de 2018.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da osseointegração em implantes da liga de T17,5MO com tratamento de superfície**", registrada com o nº **2018/042**, sob a responsabilidade de **André Antônio Pelegrine** e executor **Rogério Amaral Tupinambá** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FACULDADE SÃO LEOPOLDO MANDIC (CEUA SLMandic), em reunião de: 20/12/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/2019 a 09/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> - Wistar
N. de Animais	12
Peso/Idade	250 g/3 meses
Sexo	Machos
Origem	ANILAB- Animais de laboratório, criação e comércio LTDA

Cordialmente,

Médica Veterinária Mariana Franco de Oliveira
Vice Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA SLMandic

SLM.CEA.F8-00