

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 23/03/2020



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Fernanda Florian**

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de  
titânio-molibdênio**

**Araraquara**

**2018**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**



**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**

**Fernanda Florian**

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de  
titânio-molibdênio**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Periodontia, na área de Odontologia.

**Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**

**Araraquara**

**2018**

Florian, Fernanda

Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de titânio-molibdênio. / Fernanda Florian. – Araraquara: [s.n.], 2018

78 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Titânio 2. Teste de Materiais 3. Osteogênese I. Título

**Fernanda Florian**

**Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de  
titânio-molibdênio**

**COMISSÃO JULGADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º examinador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

3º examinador: Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz

4º examinador: Prof. Dr. Rogério Margonar

5º examinador: Prof. Dr. Walter Martins Junior

Araraquara, 23 de Março de 2018.

## **DADOS CURRICULARES**

### **FERNANDA FLORIAN**

|             |                                                                                                                                                                                       |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NASCIMENTO  | 18 de Agosto de 1983 - São Paulo / SP.                                                                                                                                                |
| FILIAÇÃO    | Carlos Antônio Florian<br><br>Neiva de Camargo Florian                                                                                                                                |
| 2005 – 2008 | Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.                                            |
| 2009 – 2011 | Curso de Aprimoramento em Cirurgia e Traumatologia Bucodentofacial pela Fundação do Desenvolvimento Administrativo – FUNDAP.                                                          |
| 2012 – 2014 | Curso de Especialização em Implantodontia pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD.                                                                                    |
| 2012 – 2014 | Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. |
| 2014 – 2018 | Curso Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.   |

À **Deus**, criador do Universo que nos concede a cada dia uma nova oportunidade, iluminando os pensamentos e guiando meus passos. Agradeço por todas as pessoas envolvidas em minha vida que tornaram possível a conquista de novos objetivos, nos dão fé e esperança com suas palavras e sorrisos.

Aos meus pais **Carlos Antonio Florian** e **Neiva de Camargo Florian (in memorian)** que com muito amor, dedicação e humildade foram os responsáveis diretos por minha educação e valores. Por todo apoio em minhas escolhas e, com amor e confiança, por estarem presentes ao meu lado durante toda vida.

À minha irmã **Fabiana Florian**, pelo estímulo e participação na minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de profissional dedicada que procuro seguir, pelo carinho, incentivo e eterna amizade.

Ao meu marido **André da Motta Gonçalves**, quem eu amo, agradeço pelo companheirismo e compreensão nas horas dedicadas a elaboração da tese. Pela confiança em meu trabalho e exemplo de profissional na qual procuro seguir os passos, ao seu lado.

*Minha eterna gratidão por todos vocês fazerem parte da minha vida.*

## ***Agradecimentos Especiais***

Ao Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, pela orientação na elaboração dessa tese, pela confiança e respeito. Por acreditar em meu potencial profissional e participar dessa etapa da minha carreira acadêmica. Pelo exemplo de pessoa e profissional.

À amiga Ms. **Mariana Aline Cominotte** por todo apoio e dedicação no desenvolvimento desse trabalho. É exemplo de profissional que com toda paciência e compreensão me ajudou nessa etapa da carreira acadêmica. Meus sinceros agradecimentos pela convivência e votos de sucesso.

À amiga Dr. **Luana Carla Pires** que me ajudou a trilhar os primeiros passos em pesquisas laboratoriais na área de Biomaterias. Sua dedicação, competência e seriedade no trabalho acadêmico ficam de exemplo que pretendo seguir. Meus sinceros agradecimentos pela convivência e votos de sucesso.

Aos colegas Dr. Diego Pedreira da Silva, Dr. Fernando Guastaldi e Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi por seu apoio na elaboração e confecção dos discos de Ti com os tratamentos químicos utilizados.

## ***Agradecimentos***

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e do Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelência no ensino e pesquisa, dedicação e apoio aos alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, que colaborou financeiramente na pesquisa (nº 0571/2017).

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof.Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Silvana Regina Perez Orrico**, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Daniela Leal Zandim-Barcelos** e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Morgana R. Guimarães Stabili** que colaboraram com muita competência minha formação acadêmica na Periodontia.

Aos Docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial: **Prof. Dr. Valfrido A. Pereira Filho**, **Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira**, **Profa. Dra. Marisa A. Cabrini Gabrielli**, **Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro**, **Prof. Dr. José Scarso Filho** e **Prof. Dr. Mário Francisco R. Gabrielli** que tiveram fundamental importância em minha formação profissional desde a iniciação científica até os dias de hoje.

Em especial, a **Profa. Dra. Eleny Balducci Roslindo** que com muita paciência me ensinou os primeiros passos acadêmicos na iniciação científica da Disciplina de Histologia e Embriologia Humana, meus sinceros sentimentos de gratidão

Aos amigos de turma do Doutorado (2014-2018): pelo companheirismo e oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, novas amizades que com certeza se preservarão por muito tempo.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia e Cirurgia: **Isabela Cristine Manzolli Rodrigues, Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda, Suleima Ferreira, Priscila Gabriela Gentile, Thelma Aparecida Gomes e Antonio Medeiros Filho** pela atenção reservada a todos os alunos, sempre com carinho e dedicação, tornando possível a realização desta jornada acadêmica.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier** pela gentileza que sempre nos receberam na Seção de Pós Graduação, resolvendo nossas dúvidas com paciência e competência.

Aos funcionários da Biblioteca: **Maria Inês Carlos, Maria Aparecida Capella Carvalho, Ana Cristina Jorge e Laudicélia Martins Arantes** da Seção Técnica de Referência, Atendimento ao Usuário e Documentação; também **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli e Denise Floriano da Silva** da Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação e **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas**, Diretora Técnica de Serviço, pela disposição em ajudar aos alunos com eficiência, gentileza e agilidade.

Florian F. Avaliação física, química e biológica em diferentes superfícies de uma liga de titânio-molibdênio [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **RESUMO**

Com o alto índice de sucesso dos implantes, o desenvolvimento de novas ligas e tratamentos de superfície tem sido o grande enfoque das pesquisas da área. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a liga binária composta de Ti-15Mo que recebeu um tratamento químico a base de ácido fosfórico, seguido ou não por tratamento de hidróxido de sódio e também tratamento de laser com deposição de apatita para em seguida avaliar a resposta in vitro de osteoblastos de ratos. A metodologia aplicada avaliou a liga através dos testes de microscopia eletrônica de varredura associada à espectroscopia por energia dispersiva de raios X, medidas de rugosidade e área efetiva com microscópio confocal a laser e ângulo de contato. Os ensaios biológicos verificaram a resposta dos osteoblastos a essas superfícies observando a morfologia, adesão e proliferação celular, além da quantificação de nódulos de mineralização, níveis de atividade de fosfatase alcalina e expressão gênica de marcadores da osteogênese. Os resultados demonstram que os tratamentos de superfície realizados atingiram os objetivos de modificar as características físico-químicas do Ti-cp e Ti-15Mo, de forma que os eventos intermediários observados na RBMSC sugerem favorecer a osseointegração. As células osteoblásticas se comportaram de forma semelhante entre as superfícies tratadas, sem diferenças significativas, sugerindo que a liga Ti-15Mo é uma alternativa para o uso na Implantodontia pelas vantagens de sua propriedade mecânica. Espera-se com esses resultados, determinar benefícios para possíveis aplicações biológicas dessa liga, bem como dos tratamentos de superfície propostos, na Implantodontia.

**Palavras chave:** Titânio. Teste de materiais. Osteogênese.

Florian F. Physical, chemical and biological evaluation on different surfaces of a titanium-molybdenum alloy [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **ABSTRACT**

With the high success rate of implants, the development of new alloys and surface treatments has been the major focus of research in the area. The aim of this study was to characterize the binary composite alloy of Ti-15Mo that received a chemical treatment based on phosphoric acid, followed or not by sodium hydroxide and also laser treatment with deposition of apatite to next evaluate the in vitro response of rat osteoblasts. The applied methodology evaluated the alloy through scanning electron microscopy associated to X-ray dispersive energy spectroscopy, roughness measurements and effective area with laser confocal microscope and contact angle. The biological tests verified the response of osteoblasts to these surfaces by observing cell morphology, adhesion and proliferation, as well as the quantification of mineralization nodules, levels of alkaline phosphatase activity and gene expression of osteogenesis markers. The results demonstrate that the surface treatments performed reached the goals of modifying the physicochemical characteristics of the Ti-cp and Ti-15Mo alloy, so that the intermediate events observed in the RBMSC suggest that they favor osseointegration. The osteoblastic cells behaved similarly in both alloys and surface treatments, without significant differences, suggesting that the Ti-15Mo alloy is an alternative for the use in the Implantology for the advantages of mechanical property. These results are expected to determine benefits for possible biological applications of this alloy, as well as proposed surface treatments, in Implantology.

**Key-words:** Titanium. Materials testing. Osteogenesis.

## SUMÁRIO

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                             | <b>13</b> |
| <b>1.1 Liga Ti-15Mo .....</b>                                                         | <b>14</b> |
| <b>1.2 Modificações de superfície visando a osseointegração .....</b>                 | <b>14</b> |
| <b>1.3 Modificação de superfícies com o uso de laser.....</b>                         | <b>15</b> |
| <b>1.4 Modificação de superfícies por deposição de apatitas.....</b>                  | <b>16</b> |
| <b>1.5 Modificação química de superfícies .....</b>                                   | <b>17</b> |
| <b>1.6 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas.....</b> | <b>18</b> |
| <b>1.7 Estudos biológicos.....</b>                                                    | <b>19</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                             | <b>21</b> |
| <b>3 PUBLICAÇÕES .....</b>                                                            | <b>22</b> |
| <b>3.1 Publicação 1 .....</b>                                                         | <b>22</b> |
| <b>3.2 Publicação 2 .....</b>                                                         | <b>50</b> |
| <b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                    | <b>71</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                              | <b>72</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>                                                                   | <b>78</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Desde as primeiras décadas do surgimento dos implantes dentários osseointegráveis, pesquisadores tentam compreender os mecanismos envolvidos no processo de formação óssea ao redor dos implantes. Atualmente, com o alto sucesso dos biomateriais e o avanço tecnológico na área, as pesquisas têm focado no entendimento dos mecanismos de interação da superfície do implante com os tecidos ósseos, na busca de implantes com características diferenciadas, que favoreçam o processo de osseointegração<sup>1,2</sup>.

Existem vários fatores que influenciam a osseointegração e consequentemente o sucesso clínico dos implantes: o material de fabricação utilizado (titânio comercialmente puro ou ligas), a forma do implante (macroestrutura), o tipo de superfície (microestrutura) e, atualmente em destaque, a existência de modificações nanoestruturais<sup>3</sup>. O aperfeiçoamento do material utilizado visa melhorar a resistência mecânica, resistência à corrosão e desgaste, associado a uma adequada distribuição de forças no leito ósseo e resistir a cargas mastigatórias por um longo período<sup>4</sup>.

Os metais mais utilizados nos implantes comercializados atualmente são o titânio comercialmente puro (Ticp), a liga Ti-6Al-4V (titânio-6alumínio-4vanádio) e liga Ti-13Nb-13Zr (titânio-nióbio-zircônio)<sup>3,5</sup>. O titânio comercialmente puro exibe características desejáveis como alta relação resistência/densidade, boa resistência à corrosão e biocompatibilidade. A adição de outros elementos, como alumínio, vanádio, molibdênio, é realizada com intuito de conferir uma melhora nas propriedades mecânica e química, suportar cargas mastigatórias e interagir adequadamente com o osso ao seu redor<sup>4,6</sup>.

As propriedades mecânicas desejadas nas ligas de titânio vão depender da relação quantitativa e qualitativa das fases  $\alpha$  e  $\beta$  do metal. O titânio  $\alpha$  é muito suscetível à formação de mesclas de deformação e ao superaquecimento, o que produz uma estrutura distorcida<sup>7</sup>. Pesquisas que estudam o aperfeiçoamento das ligas de Ti para Implantodontia visam as ligas do tipo  $\beta$ , que possui características como baixo módulo de elasticidade, assemelhando-se mais ao módulo de elasticidade óssea, maior resistência mecânica e à corrosão e melhor resposta tecidual quando comparadas com ligas tipo  $\alpha+\beta$ <sup>4,8,9</sup>.

## 1.1 Liga Ti-15Mo

O molibdênio (Mo) é um dos elementos capaz de estabilizar a fase  $\beta$  do titânio<sup>8</sup> e as ligas de titânio-molibdênio (Ti-Mo) têm sido objeto de diferentes estudos microestruturais e eletroquímicos<sup>4,6,8</sup>. A fase  $\alpha$  é observada quase que exclusivamente quando a concentração de Mo adicionada ao Ticp atinge 6%. Uma retenção significativa da fase  $\beta$  é observada para a liga contendo 10% de Mo, enquanto que para concentrações mais elevadas de Mo (15 a 20%) é observada somente a retenção da fase  $\beta$ <sup>4</sup>. Em estudos eletroquímicos, a liga Ti-Mo apresentou-se com alta resistência à corrosão<sup>6,8</sup> conferindo para a liga Ti-15Mo uma possível indicação para utilização em Implantodontia.

Em um estudo in vivo que avaliou a resposta biológica tecidual a esta liga<sup>10</sup>, no qual cilindros de Ti-15Mo foram inseridos em tíbias de coelhos após dois tipos de tratamentos de superfícies: usinada e modificada por irradiação a laser, foi observado um alto torque de remoção para as superfícies de Ti-15Mo modificadas por laser e uma boa resposta biológica de ambas as superfícies.

## 1.2 Modificações de superfície visando a osseointegração

A utilização de materiais adequados e tratamentos de superfícies apropriados podem tornar os materiais metálicos bioativos e, com isso, acelerar o processo de osseointegração, culminando em um período de reparo reduzido ao paciente. Frente a esse desafio, o desenvolvimento de superfícies que aceleram o processo de osseointegração dos biomateriais intra-ósseos é um desafio atual em vários campos de pesquisa, tais como, ciência dos materiais, Engenharia, Odontologia, Medicina, Física, Química e Biologia.

As características da superfície dos implantes foram mencionadas por Albrektsson et al.<sup>11</sup> (1981), como sendo um dos seis fatores determinantes para incorporação do osso aos implantes. Como este é um fator essencial para o sucesso e sobrevivência dos mesmos, muitos são os estudos sobre os tipos de superfícies existentes, o desenvolvimento de novas superfícies e as respostas celulares in vitro e em modelos in vivo<sup>2,12</sup>.

As modificações na superfície do implante visam acelerar a osseointegração. Essas modificações podem ser feitas por processos de subtração ou de adição<sup>2</sup>. Dentre os processos de tratamento/modificação por subtração tem-se: o eletropolimento, o polimento mecânico, o jateamento, o condicionamento ácido e a oxidação anódica. Já como processos de adição, podemos citar: os recobrimentos por hidroxiapatitas (HA) e outros compostos a base de Cálcio e Fosfato (apatitas); as superfícies de plasma-spray de titânio e a deposição iônica<sup>2,13,14</sup>. Esses tratamentos empregados para alteração das superfícies se caracterizam microscopicamente como microalterações ou nanoalterações<sup>2, 15</sup>.

Estudos têm demonstrado que a topografia da superfície do implante claramente interfere nas respostas celulares tanto nos modelos *in vitro* como *in vivo*<sup>16</sup>. Observou-se que o aumento da rugosidade na superfície do implante de Ti-cp promove integração óssea, aumentando a quantidade de osso formado na interface por meio de osteocondução e osteogênese<sup>17,18</sup>. A topografia da superfície influencia a resposta óssea em nível micrométrico e as alterações em nível nanométrico levam a uma melhor resposta celular, principalmente nos estágios iniciais de interação com o organismo.

### **1.3 Modificação de superfícies com o uso de laser**

A irradiação da superfície do implante por feixe de laser leva a uma superfície microestruturada, com formação de uma camada de óxido de Ti, além de ser um método controlado, altamente reprodutível e sem a presença de contaminantes na superfície<sup>18-21</sup>. O laser de alta potência vem sendo sugerido como opção para obtenção de uma conformação tridimensional da superfície, além de modificar a composição química por meio do aumento da camada de óxido de Ti, favorecendo a resposta celular<sup>10,19,20</sup>.

Durante a irradiação, a interação feixe de laser/titânio produz efeitos térmicos durante a sequência de pulsos, o que leva a superfície a se fundir e até vaporizar, criando assim um estado de plasma, denominado fenômeno de ablação. Os resultados do processo de fusão e solidificação rápida provocam a difusão de átomos para o titânio na área irradiada, especialmente oxigênio e nitrogênio presentes na atmosfera ambiente, levando ao aumento da camada de óxido de Ti. O óxido de Ti, por sua vez, leva a uma resposta biológica favorável, pois melhora na superfície propriedades importantes tais

como a composição química, a molhabilidade e a energia livre de superfície, além de proteger a estrutura cristalina subjacente contra os efeitos corrosivos do ambiente biológico<sup>22</sup>.

Khosroshahi et al.<sup>23</sup>, publicaram um estudo, em 2009, em que avaliaram a topografia da superfície de Ti-6Al-4V irradiadas com laser, bem como a resposta in vitro e in vivo da mesma. Observaram que a irradiação da amostra levou a uma melhora nas características topográficas e químicas da superfície e que estas alterações produziram respostas positivas nos modelos in vivo e in vitro comparadas ao controle. Faeda et al.<sup>24</sup> em 2009, avaliaram o efeito in vivo da utilização de implantes de Ti-cp modificados com irradiação a laser em tíbia de coelhos e observou que a interação osso-implante foi maior nos implantes tratados a laser quando comparada ao implante usinado.

Em recente revisão, Hindy et al.<sup>25</sup> (2017) verificaram que o tratamento com laser em superfícies de implantes dentários produziu uma porosidade de revestimento uniforme entre as espiras, que diminuiu o tempo de reparo, porém concluíram que o tipo de laser e os parâmetros utilizados nas aplicações podem afetar a biocompatibilidade do implante dentário.

#### **1.4 Modificação de superfícies por deposição de apatitas**

As apatitas são compostos minerais a base de cálcio e fosfato, presentes nos tecidos minerais do corpo. A hidroxiapatita (HA) é o principal componente mineral dos ossos, por isso é hoje o composto a base de cálcio e fosfato (CaP) mais estudado como biocerâmica. Além disso, tem sido amplamente utilizada como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo. Além da HA, outros fosfatos de cálcio também estão presentes em calcificações normais e patológicas<sup>13</sup>.

Nos implantes dentários a HA é utilizada para recobrimento das superfícies, sendo este realizado mais comumente por meio do método plasma-spray e da deposição biomimética<sup>13,26</sup>. O método biomimético consiste em colocar o substrato a ser recoberto em uma solução sintética, denominada SBF - *Simulated Body Fluid*, de composição iônica e pH semelhantes ao plasma sanguíneo a 37°C. Este método permite recobrir o

substrato com uma camada uniforme de apatitas, semelhante à apatita biológica encontrada no tecido ósseo humano<sup>26</sup>.

Estudos têm demonstrado que os recobrimentos com CaP conferem ao implante uma superfície com potencial osteocondutor<sup>27</sup>. Após a implantação, a dissolução do recobrimento leva a liberação dos íons Ca e P na região peri-implantar aumentando a energia iônica e a saturação sanguínea, levando a precipitação de cristais de apatitas biológicas sobre a superfície do implante<sup>28,29</sup>. A camada de apatita biológica então incorpora proteínas e promove a adesão de células osteoprogenitoras que produzirão a matriz extracelular óssea<sup>30</sup>.

Observa-se que implantes recobertos com apatitas induzem a uma rápida integração por estimularem os osteoblastos precocemente e, conseqüentemente, levarem a um aumento na formação óssea comparados a implantes não recobertos, especialmente em condições em que exista baixa qualidade e/ou quantidade óssea<sup>13,30</sup>. Além disso, esse recobrimento potencializa a osteocondução por meio da adsorção e retenção de proteínas estruturais nos estágios iniciais do reparo<sup>28</sup>.

### **1.5 Modificação química de superfícies**

A literatura tem demonstrado que as superfícies de materiais que contêm características na escala nanométrica, nanotopográfica ou de nanotexturas, favorecem respostas celulares e melhoram a osseointegração, fato que pode ser observado em estudos biológicos com ratos, cães, coelhos e humanos<sup>31-36</sup>.

Ataques ácidos da superfície de implantes a base de titânio têm sido amplamente aplicados para alterar a rugosidade, composição da superfície e a molhabilidade/energia superficial<sup>37</sup>. São de particular interesse os ácidos: clorídrico, sulfúrico, fluorídrico e fosfórico também as misturas destes, por favorecerem consideravelmente a osseointegração sem adição de material à superfície do implante, por exemplo, de hidroxiapatitas ou de partículas do jateamento<sup>38</sup>.

Alguns métodos de ataques químicos têm sido avaliados quanto ao comportamento frente às células, em ensaios in vitro, na busca de compreender os fatores que regulam os processos de adesão, espreadimento, proliferação e diferenciação

de células pluripotentes mesenquimais em osteoblastos e avaliar a expressão gênica destas em diferentes superfícies, ambas envolvidas no processo de osteogênese<sup>32,39-41</sup>.

Alguns pesquisadores avaliaram as superfícies de implantes dentários de titânio usinado e com ataque ácido, na qual ocorreu a formação de uma topografia micrométrica provocada pela desoxidação e reoxidação da superfície do implante atacado, e ao contrário do que era esperado, não houve a ocorrência de topografia na escala nanométrica. Na análise histológica, a eficiência da modificação de superfície foi comprovada por meio da porcentagem de contato implante/osso, que demonstrou promover maior osteogênese na superfície dos implantes inseridos nas mandíbulas de cães, fato que sugere um aumento de bioatividade durante a remodelação óssea<sup>42</sup>.

Oliveira et al.<sup>32</sup> (2004) realizaram a imersão de implantes por 2 horas em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ , na qual foram observadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) porções do citoplasma de algumas células com aparência reticulada e células que prolongam-se sobre os metais.

O tratamento alcalino também imprime alterações de composição química, rugosidade e topografia sobre a superfície tratada<sup>43</sup>. Este tratamento desperta interesse por meio da formação de uma camada de titanato de sódio sobre a qual a precipitação de hidroxiapatita é estimulada. O que se sabe, portanto, é que esse tipo de tratamento estimula a formação de hidroxiapatitas sobre as superfícies dos materiais, no entanto, ainda é escassa a literatura que reporte respostas biológicas em relação às superfícies de materiais tratados alcalinamente sem acondicionamento prévio em SBF.

## **1.6 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas**

Alguns fatores relacionados às superfícies dos materiais regulam as características da interface implante/osso, tais como energia de superfície, rugosidade, topografia e sua composição. Estes fatores são importantes e interligados, pois exercem influência sobre o comportamento das células de linhagem osteoblástica durante os processos biológicos que antecedem a osseointegração de um implante.

A **energia livre da superfície** pode ser modificada por meio da alteração da área específica da superfície ou da molhabilidade, sendo que as superfícies hidrofílicas

aparentam ter maior adesão de proteínas comparadas às superfícies hidrofóbicas<sup>41,44,45</sup>. Segundo Spriano et al.<sup>46</sup> (2005) um baixo ângulo de contato (30°) já indica boa propriedade hidrofílica, promissora ao sucesso da osseointegração.

É importante observar que níveis de **rugosidade** interferem na adesão e espreadimento celulares e que há um intervalo de valores de rugosidade em que as respostas biológicas são melhores<sup>47</sup>. Segundo estudos prévios, o procedimento de ataque ácido produz picos na superfície de titânio com tamanhos que variam de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro<sup>48,49</sup> sendo que o aumento de rugosidade provoca aumento da adesão, de proliferação e de atividade da fosfatase alcalina, apesar desta última não ter sido considerada estatisticamente significativa<sup>50</sup>.

A **topografia e composição** da superfície podem alterar fatores como adesão e proliferação celulares<sup>51-53</sup>. O processo de diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos pode ser avaliado pela medida da atividade específica de fosfatase alcalina (ALP), ou seja, durante essa alteração fenotípica há um aumento de fosfatase alcalina no meio da cultura in vitro ou o aumento na produção de osteocalcina ou na expressão gênica referente à produção destas proteínas<sup>54-56</sup>. Em estudos de Oh S et al.<sup>57</sup> (2006), a superfície recoberta de nanotubos apresentou melhores respostas de adesão e espreadimento celulares, além de maior atividade de ALP.

## 1.7 Estudos biológicos

Nos estudos dos biomateriais, os testes in vitro caracterizam a resposta celular frente ao substrato estudado. A utilização do modelo in vitro, além de poder apresentar uma rápida resposta, avalia fatores como a biocompatibilidade, citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular. No caso dos estudos sobre as modificações de superfície, esse modelo ainda fornece a resposta da célula quanto à formação óssea, podendo identificar se a superfície exerce influência positiva ou negativa na osteogênese<sup>58</sup>. Entre as vantagens do modelo in vitro, comparado ao in vivo, pode-se incluir: a reprodutibilidade, rapidez de resultados, alta sensibilidade, custo reduzido e bom controle das variáveis<sup>58</sup>.

Há uma vasta literatura que relata o comportamento de osteoblastos em superfícies de Ti com diversos tratamentos de superfície, sugerindo que tais células apresentaram morfologia poligonal e que pequenas diferenças na proliferação se devam às diferenças dessas células em cada superfície testada<sup>59,60</sup>. Além disso, estudos de expressão gênica e de mineralização das células nas superfícies de Ti nos fornecem informações sobre a resposta celular frente ao biomaterial, no qual autores demonstraram que a quantidade de formação de nódulos de mineralização está diretamente relacionada com a rugosidade de superfície do Ti<sup>61,62</sup>. Os genes *BGLAP*, *RUNX2*, *SP7*, *Col1A1*, *ALPL* participam dos eventos do processo de formação óssea<sup>63-67</sup>.

Nesta tese, o objetivo consiste em avaliar alguns métodos de modificação de superfície de baixo custo tendo em vista o cenário brasileiro de recursos escassos para aplicação em Saúde. Com este propósito foram realizadas modificações de superfície com tratamentos a laser e químicos que podem provocar alterações das propriedades da superfície, mais especificamente de topografia, rugosidade, ângulo de contato, para em seguida avaliar os efeitos destas propriedades sobre as respostas biológicas, em especial do comportamento de osteoblastos sobre amostras de Ti-cp e Ti-15Mo.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, um dos desafios da Implantodontia é acelerar o crescimento de tecido ósseo ao redor do implante. Assim, uma maneira de reduzir o tempo e aumentar a qualidade da osseointegração é modificando as propriedades da superfície dos implantes. Frente a este desafio, o desenvolvimento de superfícies que acelerem o processo de osseointegração dos biomateriais intraósseos é um paradigma atual em vários campos de pesquisa.

O estudo de materiais para criação de superfícies de implantes dentários tem se tornado um tema desafiador, impulsionado por desafios clínicos e em busca de um maior índice de sucesso. Nesse aspecto, o desenvolvimento de superfícies é um ponto crítico, de modo que as propriedades físicas e químicas da superfície de um implante influenciam o tipo e a intensidade de interação com proteínas e células osteogênicas, determinando a interface implante-osso.

Diversos métodos estão sendo desenvolvidos ou aprimorados para alcançar os objetivos esperados, considerando um menor tempo de osseointegração e aumentando a taxa de sucesso de reabilitações orais. As modificações de superfícies tanto com a utilização de laser, a deposição de apatitas ou tratamentos químicos apresentam uma vasta literatura na biologia óssea, com resultados promissores quanto a melhora das respostas celulares.

O presente trabalho propôs a caracterização superficial da liga Ti-15Mo por meio de avaliações físicas, químicas e biológicas, para investigação das respostas celulares frente às diferentes superfícies, que podem promover influência positiva ou negativa na osteogênese. Diante das observações até o momento, os tratamentos de superfície realizados atingiram os objetivos de modificar as características físico-químicas das ligas Ti-cp e Ti-15Mo, de forma que os eventos intermediários observados na RBMSC sugerem favorecer a osseointegração.

Estudos futuros sugerem observar as vantagens dessas modificações em modelos in vivo para estabelecer e provar a eficácia da osseointegração, bem como para criar novas perspectivas em Implantologia.

## REFERÊNCIAS\*

1. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67(8): 932-49.
2. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20 Suppl 4: 172-84.
3. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J.* 2003; 53(6 Suppl 2): 409-43.
4. Oliveira NTC, Aleixo G, Caram R, Guastaldi AC. Development of Ti–Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. *Mater Sci Eng A Struct Mater.* 2007; 452-453:727-31.
5. Bello SA, de Jesus-Maldonado I, Rosim-Fachini E, Sundaram PA, Difffoot-Carlo N. In vitro evaluation of human osteoblast adhesion to a thermally oxidized gamma-TiAl intermetallic alloy of composition Ti-48Al-2Cr-2Nb (at.%). *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(5): 1739-50.
6. Oliveira NTC, Guastaldi AC. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2009; 5:399-405.
7. Fazano CATV. A prática metalográfica. São Paulo: Hemus; 1980.
8. Kumar S, Narayanan TS. Corrosion behaviour of Ti-15Mo alloy for dental implant applications. *J Dent.* 2008; 36(7): 500-7.
9. Martins Junior JRS, Matos AA, Oliveira RC, Buzalaf MAR, Costa I, Rocha LA, Grandini CR. Preparation and characterization of alloys of the Ti–15Mo–Nb system for biomedical applications. *J Biomed Mater Res Part B* 2018; 106B:639–48.
10. Oliveira NTC, Guastaldi FPS, Perrotti V, Hochuli-Vieira E, Guastaldi AC, Piattelli A, et al. Biomedical Ti–Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. *Clin Impl Dent Relat Res.* 2013; 15(3): 427-37.
11. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52(2):155-70.
12. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 25(1):63-74.
13. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20 Suppl 4:185-206.

\*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.  
Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

14. Lusquinos F, De Carlos A, Pou J, Arias JL, Boutinguiza M, Leon B, et al. Calcium phosphate coatings obtained by Nd:YAG laser cladding: physicochemical and biologic properties. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(4): 630-7.
15. Zhu X, Eibl O, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J. Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(1): 114–27.
16. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone*. 1997; 21(6):507-14.
17. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr. et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*. 1995; 29(3):389-401.
18. Gotz HE, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*. 2004; 25(18):4057-64.
19. Tavangar A, Tan B, Venkatakrishnan K. Synthesis of bio-functionalized three-dimensional titania nanofibrous structures using femtosecond laser ablation. *Acta Biomater*. 2011; 7(6):2726-32.
20. Deppe H, Warmuth S, Heinrich A, Korner T. Laser-assisted three-dimensional surface modifications of titanium implants: preliminary data. *Lasers Med Sci*. 2005; 19(4): 229-33.
21. Singh R, Kurella A, Dahotre NB. Laser surface modification of Ti-6Al-4V: wear and corrosion characterization in simulated biofluid. *J Biomater Appl*. 2006; 21(1): 49-73.
22. Hallgren C, Reimers H, Chakarov D, Gold J, Wennerberg A. An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*. 2003; 24(5): 701-10.
23. Khosroshahi ME, Mahmoodi M, Saeedinasab H. In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium: yttrium-aluminium-garnet laser and silicon carbide paper. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(6): 925-39.
24. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(8): 1706-15.
25. Hindy A, Farahmand F, Tabatabaei FS. In vitro biological outcome of laser application for modification or processing of titanium dental implants. *Lasers Med Sci*. 2017; 32(5): 1197-206.

26. Aparecida AH, Fook MV, Guastaldi AC. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20(6): 1215-22
27. Morris HF, Ochi S, Spray JR, Olson JW. Periodontal-type measurements associated with hydroxyapatite-coated and non-HA-coated implants: uncovering to 36 months. *Ann Periodontol*. 2000; 5(1): 56-67.
28. Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and dental implants. *Int J Biomater*. 2010; 2010: 915327.
29. Chang YL, Stanford CM, Wefel JS, Keller JC. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite-coated implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(2): 239-47.
30. Torensma R, ter Brugge PJ, Jansen JA, Figdor CG. Ceramic hydroxyapatite coating on titanium implants drives selective bone marrow stromal cell adhesion. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(5): 569-77.
31. Sela, J. Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD et al. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(4): 423-36.
32. de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004; 25(3): 403–13.
33. Richert L, Vetrone F, Yi JH, Zalzal FF, Wuest JD, Rosei F et al. Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv Mater*. 2008; 20(8): 1488–92.
34. Bagherzadeh R, Latifi M, Najar SS, Tehran MA, Kong L. Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101(3): 765–74.
35. Mendonça G; Mendonça DBS, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008; 29(28): 3822–35.
36. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano today*. 2009; 4(1): 66–80.
37. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007; 23(7): 844-54.
38. Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(9): 935–49.
39. Yi JH, Bernard C, Variola F, Zalzal FF, Wuest JD, Rosei F et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surf Sci*. 2006; 600(19): 4613–21.

40. Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci.* 2002; 500 (1-3): 656–77.
41. Oliveira DP, Palmieri A, Carinci F, Bolfarini C. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(6): 1816–22.
42. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18( 4): 452–8.
43. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. Bioactive metals : preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(2): 99–107.
44. Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J.* 2010; 21(6): 471–81.
45. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J et al. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 544–57.
46. Spriano S, Bosetti M, Bronzoni M, Vernè E, Maina G, Bergo V et al. Surface properties and cell response of low metal ion release Ti–6Al–7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. *Biomaterials* 2005; 26(11): 1219–29.
47. Boyan BD et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1  $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39(1): 77-85.
48. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007; 23(7): 844-54.
49. Massaro C, Rotolo F, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface of commercial titanium dental implants. Part 1: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13:535–48.
50. Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials.* 2001; 22(11): 1241–51.
51. Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater.* 2005; 1: 211–22.
52. Anselme K, Bigerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17(5): 471–9.
53. Variola F, Yi JH, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials.* 2008; 29(10): 1285–98.

54. Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008; 4(3): 535-43.
55. Ravichandran R, Liao S, Ng CCh, Chan CK, Raghunath M, Ramakrishna S. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J Stem Cells.* 2009; 1(1): 55–66.
56. Ramires P, Cosentino F, Milella E, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(8): 797–801.
57. Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 78(1): 97-103.
58. Hacking SA, Harvey E, Roughley P, Tanzer M, Bobyn J. The response of mineralizing culture systems to microtextured and polished titanium surfaces. *J Orthop Res.* 2008; 26(10): 1347-54.
59. Uggeri J, Guizzardi S, Scandroglio R, Gatti R. Adhesion of human osteoblasts to titanium: a morpho-functional analysis with confocal microscopy. *Micron.* 2010; 41(3): 210-9.
60. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012; 12(9): 12347-60.
61. Ward BC, Webster TJ. The effect of nanotopography on calcium and phosphorus deposition on metallic materials in vitro. *Biomaterials.* 2006; 27(16): 3064-74.
62. Choi CR, Yu HS, Kim CH, Lee JH, Oh CH, Kim HW, et al. Bone cell responses of titanium blasted with bioactive glass particles. *J Biomater Appl.* 2010; 25(2): 99-117.
63. Tillotson N, Logan N, Brett P. Osteogenic stem cell selection for repair and regeneration. *Bone Rep.* 2016; 28(5): 22–32.
64. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(1): 27-38.
65. Mendonca DBS, Miguez PA, Mendonca G, Yamauchi M, Aragao FJL, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone.* 2011; 49(3): 463-72.
66. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: Of bone and stretch. *Int J Biochem Cell B.* 2008; 40: 1659–63.
67. Kim MJ, Kim CW, Lim YJ, Heo SJ. Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 79(4): 1023-32.

68. Takashi M, Tsubaki S, Tsuzuki T, Duarte WR, Yamauchi M, Sato H. Differential gene expression of collagen-binding small leucine-rich proteoglycans and lysyl hydroxylases, during mineralization by MC3T3-E1 cells cultured on titanium implant material. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(3):225-31.