

**LIDIANE SARTINI DE OLIVEIRA**

**QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE  
OSTEOGÊNESE EM IMPLANTES DENTÁRIOS**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

2010



**LIDIANE SARTINI DE OLIVEIRA**

**QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO DA OSTEOGÊNESE EM  
IMPLANTES DENTÁRIOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA**.

Área de Concentração: Mecânica dos Sólidos e Vibrações.

Orientador: Prof. Dr. Cleudmar Amaral de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Domingues das Neves

UBERLÂNDIA-MG

2010







# **LIDIANE SARTINI DE OLIVEIRA**

## **QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO DA OSTEOGÊNESE EM IMPLANTES DENTÁRIOS**

Tese APROVADA pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Mecânica dos Sólidos e Vibrações.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr Cleudmar Amaral de Araújo – FEMEC/UFU – Orientador

---

Prof. Dr. Flávio Domingues das Neves – FOUFU/UFU – Co-Orientador

---

Prof. Dr. Geninho Thomé – ILAPEO/NEODENT

---

Prof. Dr. Gustavo Mendonça – UCB/DF

---

Prof. Dr. Márcio Bacci da Silva – FEMEC/UFU

---

Prof. Dr. Ricardo Fortes de Miranda – FEMEC/UFU

**Uberlândia, 20 de Agosto de 2010.**



Dedico este trabalho aos meus Pais, Luiz Sartini e Linda,  
que não mediram esforços pela educação dos filhos,  
aos meus irmãos Lílian e Luiz Júnior,  
ao meu sobrinho Marcelo e sobrinhas Ana Luiza e Letícia,  
ao meu orientador Cleudmar A. Araújo,  
e a todos que contribuíram para a finalização deste.





## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia e à Faculdade de Engenharia Mecânica pela oportunidade de realizar este Curso.

Agradeço a Deus que me deu mais essa oportunidade de viver, adquirir conhecimentos e que eu possa transmiti-los com muita competência da maneira que os recebi.

Ao Professor Dr. Cleudmar A. Araújo, pelo incentivo e inestimáveis orientações, sustentadora de várias idéias, durante a realização deste trabalho. Obrigada por estar sempre ao meu lado apoiando e ensinando. Jamais irei esquecer o que aprendi com você.

Ao meu co-orientador Prof. Flávio D. das Neves por também confiar em mim e me apoiar ao longo desse doutorado, por todo seu empenho em contribuir para o desenvolvimento da interação Engenharia/Odontologia.

À Empresa Neodent Implantes Osteointegráveis Ltda pela parceria neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lyndon Cooper da Universidade da Carolina do Norte pela doação das células HFob para o desenvolvimento dos ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Ao Prof. Dr. Gustavo Mendonça pelos ensinamentos, pelo auxílio que mesmo longe, não media esforços para me atender e esclarecer as dúvidas sobre os ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

À Profa. Maria Aparecida e ao Prof. Cláudio pelos ensinamentos da área da Biologia Celular para a realização dos ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Ao meu eterno amor que sempre me apoiou, sempre me amparou, sempre esteve ao meu lado, sempre me entendeu, sempre teve idéias ótimas e me ajudou. Sem você não seria possível desenvolver este trabalho. A você, meu eterno agradecimento. Sempre te amarei!!!

À todos os meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram durante este período de estudo não deixando eu desistir desse grande sonho.

À todos os colegas do Laboratório de Projetos Mecânicos Prof. Henner A. Gomide, pela paciência, carinho e amizade durante todo esse tempo. À amiga Gina Lizette, Delma, Ana Paula, Carla Ricardi que sempre estavam juntos no LPM para me apoiarem.

Aos amigos Fernando Lourenço e Luciana pela amizade e carinho durante todos estes anos.

À todos os colegas do Laboratório de Biologia Celular (BIOMOL) pela paciência, carinho e ajuda durante todo o tempo dos ensaios “*in vitro*”.

À Camilla pela sua amizade e ensinamentos de ensaios de “cultura de células”.

À Ângela, técnica do Laboratório de Tribologia e Materiais (LTM/FEMEC/UFU) pela companhia e ensinamentos durante os ensaios de caracterização das superfícies.

A todos os meus familiares pelo incentivo e compreensão.

À minha amiga de anos Denize V. Novais, por sua amizade, paciência e carinho comigo principalmente por ter paciência em ouvir os meus desabaços quando estava triste.

Aos técnicos Valdico de Faria e Lazinho, pela amizade e carinho comigo.

Às secretárias da Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Kelly e Lucimara por todo seu apoio e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigada pela grande amizade construída durante esses anos. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.



OLIVEIRA, L. S. **Quantificação do Processo de Osteogênese em Implantes Dentários.** 2010. 205f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

## Resumo

A implantodontia surgiu como uma alternativa para substituir um elemento dental perdido. Os primeiros implantes odontológicos baseavam-se no empirismo e fracassaram devido à falta de estudos clínicos e científicos controlados. Na década de 60, Brånemark e colaboradores, fundamentados em pesquisas clínicas, desenvolveram um novo sistema de implantes baseado em uma ancoragem direta no tecido ósseo, sem a interposição de tecido mole, denominada osseointegração. O processo de osseointegração envolve aspectos biomecânicos e ainda não foi completamente esclarecido. Em vários estudos tem-se verificado que o tratamento da superfície do implante, por exemplo, superfícies tratadas com jateamento e condicionadas com ataque ácido, vem sendo um dos principais fatores que influenciam na osteogênese e, conseqüentemente, na osseointegração. Tais superfícies apresentariam condições apropriadas para uma aposição óssea de forma mais rápida possibilitando uma aplicação de carga em um menor período de tempo. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o fenômeno da osteogênese em implantes dentários, considerando diferentes superfícies obtidas por diferentes condições de jateamento e ataque ácido. A avaliação foi feita utilizando ensaios “*in vitro*” de cultura de células osteoblásticas, sendo definido um índice para medir a intensidade da osteogênese baseado nas medidas da proliferação e viabilidade celular, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização. Os ensaios foram conduzidos, de tal forma que, a sensibilidade das variáveis medidas fosse analisada e através de métodos de similitude em engenharia definiu-se uma equação de predição para o fenômeno. A vantagem deste procedimento é a possibilidade de previsão do nível da osteogênese, sem utilizar ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” que em geral são demorados e de alto custo, permitindo avaliar um produto, quanto às condições da superfície, antes de ser lançado no mercado, servindo como uma “ferramenta” do controle de qualidade.

---

**Palavras-chave:** Implantes dentários, Osseointegração, Osteogênese, Similitude, Superfícies de Titânio.



OLIVEIRA, L. S. **Quantification of the Osteogenesis Process in Dental Implants.** 2010. 205f. Doctorate Thesis, Federal University of Uberlândia.

## **Abstract**

Dental implants appeared as an alternative for replacing missing teeth. The first dental implants were based on empiricism and were unsuccessful because of the lack of controlled clinical trials and scientific studies. In the 1960's Brånemark and colleagues, based on clinical research developed a new implant system using a direct anchorage in the bone structure, without an interposed having soft tissue, called osseointegration. The osseointegration process involves biomechanical aspects and it is not yet completely understood. In various studies it has been verified that the implant surface treatment, for example, surfaces treated with sandblasting and acid etching, has shown itself to be one of the principal factors influencing osteogenesis and consequently osseointegration. Such surfaces offer conditions appropriate for a quicker bone apposition, thus making load application possible in a shorter period of time. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the osteogenesis phenomenon in dental implants, taking into consideration the different surfaces obtained through differing sandblasting and acid etching conditions. An evaluation was carried out using "*in vitro*" experiments of osteoblastic cell culture. An osseointegration index was defined to measure the intensity of the osteogenesis based on calculations of cell viability and proliferation, alkaline phosphatase activity and mineralized nodules formation. The experiments were conducted in such a way that the sensitivity of the various measures would be analyzed and, by means of similar methods in engineering, a predictable equation was defined for the phenomenon. The advantage of this procedure is the possibility of foreseeing the osteogenesis level, without resorting to experiments "*in vivo*" and "*in vitro*" which, in general are time consuming and costly, making it possible to evaluate a product, with respect to its surface conditions before putting it on the market, thus serving as a quality control "tool".

---

**Key Words:** dental implants, osseointegration, osteogenesis, similitud, titanium surfaces.



## Lista de Símbolos

<b>Símbolos</b>	<b>Significado</b>
$\bar{\eta}_i$	Medidas normalizadas das variáveis de influência da osteogênese
$\pi_1$	Grau da osteogênese
$\eta_i$	Medida das variáveis de influência da osteogênese
$\Psi_i$	Nível de osteogênese
$\rho_i$	Pesos relativos de cada variável de influência
$\pi_i$	Variáveis de influência
$\gamma_{SL}$	Tensão superficial entre o sólido e o líquido utilizado na Eq. De Young
$\gamma_{LV}$	Tensão superficial entre o líquido e o vapor utilizado na Eq. De Young
$\gamma_{SV}$	Tensão superficial entre o sólido e o vapor utilizado na Eq. De Young
$\alpha, \beta$ e $\theta$	Ângulo de contato entre a interfaces das 3 fases (líquida, sólida e gasosa)
$\theta_A$	Ângulo de avanço no método dinâmico da gota Sésil
$\theta_R$	Ângulo de retrocesso no método dinâmico da gota Sésil
$\gamma_{ij}$	Energia superficial entre duas fases indicadas na Eq. de Dupre-Young
$\theta^*$	Ângulo de contato aparente utilizado na Eq. de Dupre-Young
$\gamma_{i,SV}$	Tensão superficial sólido/vapor da Eq. de Cassie-Baxter
$\gamma_{i,SL}$	Tensão superficial sólido/líquido da Eq. de Cassie-Baxter
$\gamma$	Tensão superficial Cassie-Baxter entre líquido e vapor
$\sigma_L$	Tensão superficial total utilizada na teoria de Owens/Wendt e Fowkes
$\sigma_L^D$ e $\sigma_S^D$	Componentes dispersivas para o líquido e o sólido da teoria de Owens/Wendt e Fowkes
$\sigma_L^P$ e $\sigma_S^P$	Componentes polares para o líquido e o sólido da teoria de Owens/Wendt e Fowkes



## Lista de Abreviaturas

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
$\alpha$ -MEM	Componente do meio de cultura ( $\alpha$ Minimum Essential Médium)
A <sub>i</sub>	Variações de ataque ácido utilizados no trabalho
Al	Alumínio
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido de Alumínio (ou Alumina)
ALP	Atividade de Fosfatase Alcalina
ATCC	American Type Culture Collection
BIOMOL	Laboratório de Biologia Molecular
BSE	Backscattering Electrons
C	Carbono
C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub> S	Alizarin Red S
Ca	Cálcio
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Misture F-12 Ham
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
F1, F2 e F3	Tipos de ácidos utilizados no trabalho
FAR	Fenômeno de aceleração regional
Fe	Ferro
FEMEC	Faculdade de Engenharia Mecânica (UFU)
FHA	Fluorhidroxiapatita
GII	Titânio Grau II
H	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio (Água Oxigenada)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido Clorídrico
HEPM 1486	Linhagem de células fibroblásticas humanas
HF	Ácido Fluorídrico
HFob 1.19	Linhagem de células osteoblásticas humanas
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico

HR-FHA	Superfícies revestidas por FHA com alta rugosidade
$J_i$	Variações de jateamento utilizados no trabalho
KCl	Cloreto de potássio
$KH_2PO_4$	Fosfato Monopotássico
LPM	Laboratório de Projetos Mecânicos Prof. Henner A. Gomide
LR-FHA	Superfícies revestidas por FHA com baixa rugosidade
LTM	Laboratório de Tribologia e Materiais - FEMEC/UFU
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MG63	Células osteoblásticas originadas de osteosarcoma
MTS	Meio Total Suplementado
MTT	Método que quantifica a proliferação e viabilidade celular
N	Nitrogênio
$N_2$	Gás nitrogênio
Na	Sódio
$Na_2HPO_4$	Fosfato Dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O	Oxigênio
OPN	Ostopontina
P	Fósforo
PBS	Solução Salina Tampão
p-NPP	p-mitrophenol phosphate em tampão 2-amino-2-methyl-1-propanol
PS	Plasma Spray
PTFE	Polytetrafluoretileno
PTH	Marcador celular tumoral (paratormônio)
$R_a$	Rugosidade Média
$R_p$	Altura máxima do pico do perfil
$R_q$	Rugosidade Média Quadrática
$R_t$	Rugosidade Total
$R_v$	Profundidade máxima do vale do perfil
$R_y$	Rugosidade máxima
SBF	Soro fetal bovino
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
Si	Silício
SiC	Carboneto de silício



SLA	Superfícies tratadas com jateamento e condicionadas com ataque ácido ou (Sandblasted, large grit, acid-etched)
SBF	Simulated Body Fluid
Ti	Titânio
Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V	Liga composta de Titânio, Alumínio e Vanádio
TiCp	Titânio Comercialmente Puro
TiO	Monóxido de Titânio
TiO <sub>2</sub>	Óxido de titânio
TPS	Superfícies tratadas com jateamento e revestida com plasma de titânio (ou Titanium plasma spray)
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
USA	Estados Unidos da América
VERO	Linhagem de células fibroblásticas



# Sumário

CAPÍTULO I – Introdução	1
CAPÍTULO II – Revisão da Literatura	7
2.1 – Tratamentos de Superfícies de Implantes de Titânio	7
2.2 – Ensaios “ <i>in vitro</i> ” de Cultura de Células	15
2.3 – Ensaios de Torque de Remoção	22
2.4 – Ensaios da Energia Superficial	24
2.5 – Modelos Matemáticos Computacionais	26
CAPÍTULO III – Implantes Osseointegrados	29
3.1 – Superfícies de Implantes	30
3.2 – O Fenômeno da Osseointegração	33
3.3 – O Processo da Osteogênese	43
CAPÍTULO IV – Ensaio “ <i>in vitro</i> ” de Cultura de Células	49
4.1 – Preparação dos Reagentes	49
4.2 – Aquisição das Células	53
4.3 – Preparação das Amostras	56
4.4 – Parâmetros Osteogênicos Analisados	59
4.4.1 – Medida da Proliferação e Viabilidade Celular	59
4.4.2 – Medida da Atividade de Fosfatase Alcalina	66
4.4.3 – Medida dos Nódulos de Mineralização	67
CAPÍTULO V – Modelo Matemático	71
5.1 – Introdução	71
5.2 – Medida da Intensidade da Osteogênese	72
5.3 – Equação de Predição	75
CAPÍTULO VI – Caracterização das Superfícies	81
6.1 – Rugosidade	81
6.1.1 – Rugosidade Média ( $R_a$ )	83
6.1.2 – Rugosidade Média Quadrática ( $R_q$ )	83
6.1.3 – Profundidade Máxima do Vale ( $R_v$ )	83
6.1.4 – Altura Máxima do Pico ( $R_p$ )	83
6.1.5 – Altura Máxima do Perfil ( $R_t$ )	84
6.2 – Medida da Energia Superficial	89

6.2.1 – Energia Superficial de um Líquido	90
6.2.2 – Energia Superficial de um Sólido	91
6.2.3 – O Conceito de Molhamento	92
6.2.4 – Ângulo de Contato	97
6.2.4.1 – Métodos de Medição de Ângulos de Contato	98
6.2.5 – A Técnica da Gota Sésil	99
6.2.5.1 – Estimativa da Energia Superficial	100
6.2.5.2 – Estimativa Proposta da Energia Superficial	104
CAPÍTULO VII – Resultados	109
7.1 – Caracterização das Superfícies	109
7.1.1 – Medida da Rugosidade	109
7.1.2 – Medida da Energia Superficial	114
7.2 – Medida ou Intensificação da Osteogênese	116
7.3 – Determinação da Equação Preditiva	123
7.4 – Análise de uma Nova Superfície de Titânio baseada na Equação Preditiva	128
CAPÍTULO VIII – Discussão dos Resultados	133
CAPÍTULO IX – Conclusões	137
CAPÍTULO X – Referências Bibliográficas	139
APÊNDICE I	157
APÊNDICE II	165
APÊNDICE III	169

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

Atualmente a bioengenharia tecidual representa uma promissora interface na indústria de implantes médicos e odontológicos. Esta indústria tem desenvolvido uma nova geração de implantes fundamentada nos avanços das pesquisas em biologia celular e molecular. Enquanto no passado a maioria dos implantes eram inertes e essencialmente estruturais, produtos atuais e futuros buscam implantes mais biológicos em sua natureza, os quais poderão favorecer o processo de reparo inerente ao organismo, além de aumentar a sobrevida desses implantes. A variedade de dispositivos utilizados na implantologia tem sido explorada pela bioengenharia tecidual a fim de acelerar a velocidade de reparo ósseo, a qualidade e a quantidade de osso neoformado, além de diminuir osteólise periprostética e afrouxamento de implantes que tornem necessárias novas cirurgias (PUELO e NANJI, 1999; DAVIES, 2003; SCHMIDT et al., 2003).

O sucesso da terapia com implante é confirmada através da obtenção de contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo neo-formado a nível de microscópio óptico. Esse fenômeno, denominado osseointegração, ocorre após uma inflamação inicial durante a instalação do implante, seguida por alterações no micro-ambiente peri-implantar que conduzem à neo-formação óssea na superfície do implante. Clinicamente, o fenômeno de osseointegração é caracterizado pela imobilidade do implante e ausência de sintomatologia durante a função mastigatória.

O termo “osseointegração” foi definido como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. A osseointegração foi observada em estudos realizados utilizando microscopia que consistia em uma leve inserção de uma câmara de titânio contendo um sistema óptico na fíbula de um coelho. As câmaras ópticas não podiam ser retiradas do osso ao redor após um período de tempo já que a retirada resultava em osso aderido às câmaras (BRÅNEMARK, 1985). Este fenômeno é o “pilare” da implantodontia atual e representou um

grande avanço da Odontologia. A busca por um substituto o mais próximo possível do elemento dental perdido, fez com que diferentes sistemas de implantes utilizando diversos materiais fossem utilizados. Na década de 60, Brånemark e colaboradores, desenvolveram um novo sistema de implantes baseado numa ancoragem direta no tecido ósseo intacto, sem a interposição de tecido mole, denominada osseointegração (AMARANTE e LIMA, 2001; SIMON e WASTON, 2002; FRANCHI et al., 2005). Em estudos usando microscopia eletrônica de varredura, observou-se a existência de uma camada de lipoproteínas entre o implante e o tecido ósseo. A definição aceita atualmente é a de Zarb e Albrektsson "Osseointegração é o processo pelo qual a fixação rígida e assintomática de um material aloplástico no osso é obtida e mantida durante a função" (HOBKIRK e WASTON, 1996).

Os principais mecanismos relacionados ao processo de osseointegração dos implantes são similares aos que ocorrem durante o reparo de uma fratura óssea, e envolvem uma série de eventos celulares e moleculares (DAVIES, 2003; FRANCHI et al., 2005). Sabe-se que no osso é possível encontrar células mesenquimais indiferenciadas, capazes de se diferenciarem (osteoblastos, osteócitos, e de revestimento), que são denominadas células osteoprogenitoras. Além destas existem ainda os osteoclastos. Os osteoblastos são os responsáveis pela síntese e secreção dos compostos orgânicos e inorgânicos da matriz extracelular do osso novo (osteóide) e, quando ficam presos entre o osteóide mineralizado, passam a chamar-se osteócitos. Os osteoblastos que não ficam presos no osso pela ação osteogênica, assumem uma morfologia similar e se convertem em células de revestimento (BÁDENAS, 2004). Existem evidências crescentes de que algumas ações como crescimento e diferenciação dependem do estágio de diferenciação das células (WATZEK, 2004). Os mecanismos moleculares ligados a esses efeitos são pouco conhecidos, mas a localização e o nível de expressão de receptores e ligantes de citocinas em subgrupos específicos de células osteogênicas, podem ajudar a entender os caminhos que levam ao desenvolvimento e regulação da osteogênese (DAVIES, 2000; YAMADA et al., 2000).

No entanto, os aspectos clínicos relacionados a osseointegração são conseqüências de um padrão de secreção de proteínas extracelulares e moléculas de adesão permitindo que a superfície do implante seja povoada por osteoblastos, os quais vão produzir nova matriz óssea, inicialmente não mineralizada, a qual em função do tempo e estímulos bioquímicos irá sofrer mineralização. Esses fenômenos iniciais, que levam à osseointegração não podem ser avaliados clinicamente, sendo necessários estudos "*in vitro*", utilizando modelos experimentais, para avaliar o comportamento celular na superfície do implante, quando exposta a diferentes estímulos. Variações na topografia de superfície do implante podem influenciar na adesão, proliferação celular, secreção de proteínas e

mineralização da matriz extracelular, acelerando o reparo ósseo. Os osteoblastos, células responsáveis pela produção da matriz óssea, respondem a variações na rugosidade superficial dos implantes, o que pode ser utilizado pela bioengenharia para favorecer a osseointegração.

Portanto, apesar do êxito nas aplicações que envolvem o fenômeno da osseointegração ao longo destes últimos 20 anos ainda existem diversas investigações que buscam obter melhores respostas a curto e a longo prazo. Por isso é necessário um amplo conhecimento das propriedades físico-químicas e topográficas da superfície do material, permitindo o desenvolvimento de novas geometrias com a otimização da resposta tecidual (BÁDENAS, 2004).

Atualmente, a descoberta dos eventos celulares e moleculares que conduzem à formação óssea ao redor dos implantes, juntamente com o desenvolvimento de biomateriais que favoreçam esse processo, tem sido o foco da implantologia. Esse tipo de estudo geralmente é realizado "*in vitro*" utilizando cultura de tecidos, mas as respostas são muito variáveis em função da origem das células utilizadas na cultura como osteoblastos de roedores, diferenciados de células da medula óssea, ou culturas imortalizadas.

O titânio vêm sendo o material mais utilizado na implantodontia dentária atual. Normas internacionais determinam quatro graus de Ti para aplicação médica, que se classificam em função da quantidade de elementos intersticiais das ligas de titânio. O aumento destes elementos influenciam a resistência mecânica, modificando a ductilidade e a resistência à corrosão. A melhora das respostas teciduais são conseguidas com tratamentos superficiais que influenciam significativamente o efeito de cicatrização óssea. Os tratamentos mais significativos são o polimento e a limpeza com dissolventes, o jateamento, o ataque ácido, a projeção por plasma de titânio, ataque alcalinos e projeção por plasma de fosfato de cálcio (BÁDENAS, 2004).

Estudos longitudinais demonstraram altas taxas de sucesso com os implantes de titânio desde que adequadamente utilizados (ADELLE et al., 1981; DAVIES, 2003). Novos sistemas de implantes foram desenvolvidos, baseados no protocolo original de Brånemark e colaboradores, com variações na geometria do parafuso, composição química do titânio, topografia e tratamento de superfície (AMARANTE e LIMA, 2001; BRUNETTE e CHEHROUDI, 1999; DAVIES, 2003; Llet et al., 2004; XIE et al., 2005).

Os implantes odontológicos podem ser inseridos no osso maxilar ou mandibular, podendo ser recobertos ou não com materiais bioativos. Existe no mercado um grande número, que continua crescendo, de sistemas de implantes. Esses implantes podem ter a forma de cilindros, lâminas, parafusos, cones, ou até mesmo imitar a geometria da raiz de um dente. Quanto ao acabamento superficial, os implantes podem ser de titânio puro ou

recobertos. Quanto à fixação ao osso, os implantes odontológicos podem ser classificados em quatro categorias principais: implantes do tipo 1, que são aqueles feitos de material inerte e que não fazem nenhuma ligação com o osso; implantes do tipo 2 são os implantes porosos, onde o osso cresce por entre as reentrâncias, promovendo uma fixação mecânica. Os implantes do tipo 3 são bioativos e formam ligação com o osso através de reações químicas na interface. Implantes do tipo 4 que são reabsorvíveis, ou seja, que após algum tempo de inserção, são substituídos pelo osso.

As estratégias mais utilizadas para melhorar a resposta tecidual consistem no aumento da rugosidade ou na aplicação de recobrimentos bioativos (BÁDENAS, 2004). Os tratamentos de superfícies buscam o estabelecimento de uma ligação química e mecânica do osso ao material do implante. Atualmente, uma infinidade de tratamentos de superfícies têm sido aplicados aos implantes de titânio. Esses tratamentos envolvem desde tratamentos puramente mecânicos que visam o aumento da rugosidade superficial até tratamentos químicos que envolvem mudanças estruturais na camada de óxido. Os tratamentos de superfície que envolvem altas temperaturas têm a vantagem de aumentar a espessura da camada de óxido, bem como de estabilizar a mesma. A cristalinidade e a microestrutura do óxido de titânio também influenciam a indução de precipitação de apatita. O aumento da rugosidade das superfícies é feito com o jateamento utilizando partículas duras de óxido. Os óxidos mais usados são óxidos de Ti, Al ou Si. Após o jateamento, é recomendado um tratamento com ácido para retirar possíveis incrustações de partículas de óxido e também para uniformizar a rugosidade criada pelo processo de jateamento.

Embora não exista consenso quanto ao padrão ideal de rugosidade (SADERet al., 2005), sabe-se que as superfícies rugosas apresentam melhores resultados que as lisas, com efeitos positivos na resposta celular e diferenciação (LINCKS et al., 1998; BOYAN et al., 2003; ROSA e BELOTI, 2003; SAMMONS et al., 2005; NAGEM FILHO et al., 2007).

Uma das condições indispensáveis ao sucesso da osseointegração é a presença de tecido ósseo viável. É, portanto necessária a presença das células medulares que pertencem ao sistema hematopoiético que tomam parte nesse processo, osteoclastos e células indiferenciadas precursoras dos osteoblastos. As células osteoblásticas que são células de origem mesenquimal, serão estimuladas a induzir formação de tecido ósseo (osteogênese). Uma das possibilidades de avaliar a viabilidade de formação óssea é através de ensaios “*in vitro*”.

As modificações relacionadas à topografia e superfície têm sido avaliadas tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, buscando determinar parâmetros como adesão, proliferação e viabilidade celulares, assim como determinação dos níveis de proteína total, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização (ROSA e BELOTI, 2003; XAVIER et al., 2003).



Os principais testes “*in vitro*” são os testes em líquido corporal simulado (SBF) e os testes de cultura de células. Os testes de cultura de células podem avaliar o efeito do material sobre as células no que se refere à multiplicação, função, toxicidade e adesão. Há uma variedade de métodos de avaliação de toxicidade. No entanto, os materiais não tóxicos não são necessariamente biocompatíveis, o que torna necessária a realização de outros testes. Nos testes de cultura de células, é observado como células mantidas em cultura interagem com as superfícies. Esses testes têm a vantagem de indicarem não somente a bioatividade, mas também a toxicidade das superfícies analisadas.

Vários estudos têm avaliado as mudanças nos padrões osteogênicos, “adesão, proliferação, viabilidade, presença de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada”, em função do tipo de tratamento de superfície. Jateamentos na superfície do titânio, seguidos ou não, de ataque ácido, assim como tratamentos eletrolíticos, possibilitaram o desenvolvimento de superfícies do tipo SLA (Sandblasted, large grit, acid-etched) e TPS (Titanium plasma spray) (ROSA e BELOTI, 2003; XAVIER et al., 2003; SAMMONS et al., 2005; NAGEM FILHO et al., 2007). Essas superfícies encontram-se comercialmente disponíveis e têm sido amplamente estudadas.

Recentemente, a indústria de implantes odontológicos vem sofrendo uma grande revolução através dos contínuos avanços na área da biologia celular. Pesquisas nesta área têm possibilitado o surgimento de novas gerações de implantes médicos e terapias relacionadas. Neste aspecto a biomecânica representa uma importante interface de auxílio na avaliação de fenômenos físicos relacionados aos implantes dentários.

O objetivo deste trabalho é analisar o fenômeno da osteogênese utilizando ensaios “*in vitro*” de cultura de células e através destes resultados formular matematicamente a intensidade da osteogênese em diferentes superfícies de titânio que poderiam ser utilizadas em implantes dentários. A equação de predição foi obtida utilizando métodos de similitude em Engenharia. Utilizando o modelo matemático, determinou-se as variáveis ótimas para os níveis de rugosidade e energia superficial, considerando as diferentes condições de jateamento e ataque ácido analisadas.

O trabalho foi proposto visando fornecer ao clínico e as empresas do setor maiores conhecimentos sobre o fenômeno, facilitando a seleção e análise de eventuais produtos, quanto às variáveis analisadas influenciadas pelas diferentes condições de superfície. Neste caso, buscou-se introduzir uma nova forma de abordagem de um problema complexo (processo de osteogênese), possibilitando uma análise preliminar de uma nova superfície, evitando uma análise experimental que, em geral, é demorada, de difícil execução e de custo relativamente alto.

A maior motivação deste estudo é avaliar o fenômeno da osteogênese “*in vitro*”, que é um dos processos básicos da osseointegração em diferentes condições de superfície, utilizados em implantes dentários. A avaliação será programada de forma a obter uma equação de predição que possa avaliar a intensidade da osteogênese, considerando discos de titânio nas diferentes condições superficiais, sem ter que realizar um novo ensaio “*in vitro*”, que além de ser de alto custo, é trabalhoso e difícil de ser executado e analisado. Busca-se avaliar o processo e obter variáveis que possam realizar uma osteogênese mais rápida, ou seja, que poderiam acelerar o processo de osseointegração visando diminuir o tempo de espera para a colocação de carga sobre os implantes.

Em muitos estudos analisando o torque de remoção do implante ou mesmo através de estudos “*in vitro*” foi observado que tratamentos de superfícies (duplo ataque ácido, jateamento seguida de ataque ácido, revestimentos com hidroxiapatita, entre outros) influenciam no processo da osteogênese, aumentando o contato ósseo com o implante. Diante desses fatos, nos últimos anos, procura-se uma rugosidade ótima para os implantes utilizando tratamentos superficiais mais adequados para promoverem uma melhor osteogênese.

Este trabalho foi organizado de tal forma que a análise do problema fosse feita de forma sequencial até a apresentação e discussão dos resultados. Neste caso, no Capítulo I foi feita uma introdução ao assunto estudado indicando o principal problema, vantagens e desvantagens e os objetivos a serem alcançados. O Capítulo II apresenta uma revisão bibliográfica referente ao tema estudado especificando o estado da arte. No Capítulo III foi mostrado como os implantes osteointegrados estão intimamente relacionados com os fenômenos da osseointegração e processos de osteogênese. Neste capítulo os processos celulares são discutidos e comentados. No Capítulo IV fez-se uma explanação do ensaio “*in vitro*” de cultura de células, ou seja, da preparação dos reagentes, das amostras e dos parâmetros osteogênicos. Descreve também o método utilizado para realizar a caracterização das superfícies utilizadas no trabalho. O Capítulo V aborda o modelo matemático proposto para avaliar a intensidade da osteogênese utilizando métodos de similitude em Engenharia. O Capítulo VI apresenta os procedimentos experimentais deste trabalho para a caracterização da superfície. O Capítulo VII apresenta resultados de toda a caracterização da superfície bem como, a intensificação do nível de osteogênese com a formulação da equação de predição em função os resultados do ensaio “*in vitro*”. O Capítulo VIII apresenta uma discussão dos resultados. O Capítulo IX apresenta as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

# CAPÍTULO II

## REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Tratamentos de Superfícies de Implantes de Titânio

Hahn e Palich (1970) desenvolveram um experimento em que os revestimentos porosos foram aplicados em implantes de titânio visando uma avaliação prévia das superfícies obtidas após os revestimentos porosos. Os implantes foram colocados no fêmur de ovelhas por um período de 14 a 26 semanas. Os autores observaram que o torque de remoção nas amostras com revestimento poroso foram aproximadamente 20 vezes maiores do que os torques no grupo controle sem revestimento.

Meffert; Block; Kent (1987) analisaram três tipos de implantes sem rosca: comercialmente puro; comercialmente puro com superfíciejateada com areia degranulometria de 25 a 30  $\mu\text{m}$  e comercialmente puro com superfície recoberta de hidroxiapatita de 75  $\mu\text{m}$  de espessura. Utilizaram um total de 101 implantes distribuídos em 10 cães. Os implantes foram removidos com 1, 4 e 10 meses após a implantação e observaram que 96 implantes tiveram uma cicatrização sem infecção e os outros 5 restantes não tiveram uma cicatrização favorecida. Na análise das três superfícies relataram que, na primeira, os implantes foram de fácil remoção por apresentar fibras paralelas ao longo do eixo. Na segunda foi apresentado um encapsulamento delgado que com o passar do tempo, foi diminuindo. E por último, na terceira superfície obtiveram uma melhor resposta quanto aosseointegração, apresentando uma camada de osso lamelar na maior parte da superfície podendo dizer que os implantes estavam histologicamentebiointegrados.

Spector (1987) realizou uma revisão sobre implantes poroso-revestidos utilizados em cirurgias ortopédicas. Nesta revisão, em meados dos anos 70, vários grupos prosseguiram

com o desenvolvimento de sistemas porosos. E ainda observou que os mecanismos protéticos poroso-revestidos oferecem uma alternativa viável para o tratamento de implantes. Este estudo serviu de direcionamento para modificações em projetos futuros de implantes.

Visando solucionar um problema de desaperto de implantes ortopédicos no osso, um estudo feito por Pilliar (1987) com revestimentos porosos para superfícies de implantes visava evitar a ocorrência de vários problemas de perda das propriedades mecânicas dos metais. Ele observou que os fabricantes conheciam os efeitos desses processos sobre as propriedades mecânicas.

Com a finalidade de avaliar o remodelamento ósseo ao redor de três diferentes tipos de implantes, Pilliaret al. (1991) utilizaram: i) implantes de Ti comercialmente puro rosqueados; ii) implantes cônicos de liga de Ti com poros superficiais e iii) implantes cônicos de liga de Ti com poros em  $\frac{2}{3}$  apicais. Estes implantes foram inseridos em mandíbulas de cães e mantidos em função por 23 semanas para o grupo (ii) e 73 a 77 semanas para os grupos (i) e (iii). Durante todo o tempo de aplicação de força, os implantes foram acompanhados por análises radiográficas. Observaram que para o grupo (i), houve um crescimento ósseo ao redor de todo o implante, para o grupo (ii) o crescimento ósseo ocorreu com 4 semanas e para o grupo (iii) pequena quantidade de osso se formou próximo a superfície. No entanto, no primeiro ano, ocorreu uma ligeira perda óssea para os grupos (i) e (iii). Para evitar esta perda, os autores sugeriram recobrir coronalmente o implante com material poroso.

Buser e colaboradores (1991) estudaram a influência das características de diferentes superfícies na integração dos implantes de titânio com o osso. Os implantes foram inseridos em tíbia e fêmur de seis porcos e retirados depois de 3 e 6 semanas para a análise. Os autores observaram que superfícies eletropolidas, jateadas com granulometria média e com tratamento de ataque ácido (HF, HNO<sub>3</sub>) tiveram uma porcentagem baixíssima de contato osso/implante com valores de 20 a 30%. Superfícies jateadas com granulometria grossas e tratadas com plasma de titânio mostraram valores entre 30 a 40%. Já as superfícies jateadas com granulometria grossa e tratadas com ataque ácido (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mostraram valores médios entre 50 e 60%. E, finalmente, as superfícies com revestimento de hidroxiapatita (HA) mostraram valores de 60 a 70% de contato ósseo. Concluíram que o aumento da interface osso/implante está correlacionado com o aumento da rugosidade da superfície do implante.

Em 1995, Martin e colaboradores analisaram discos de titânio de grau II com várias superfícies: (PT) superfícies pré-tratadas com ácido fluorídrico (HF), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e lavadas; (EP) superfícies eletro polidas; (FA) superfícies com jateamento de granulação fina

e ataque ácido: ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); (CA) superfícies com jateamento de granulação grossa e ataque ácido: HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (TPS) superfícies com jateamento de granulação grossa e revestida com plasma de hidreto de titânio. Estas superfícies foram classificadas na ordem da mais lisa para a mais rugosa (EP, PT, FA, CA e TPS). Os autores analisaram os parâmetros osteogênicos nas superfícies dos discos de titânio e em suas análises, observaram que quando comparadas com culturas de células sobre o controle de plástico, o número de células foi reduzido nas superfícies TPS e aumentado sobre as superfícies EP, enquanto que o número de células sobre as outras superfícies foi equivalente com o observado sobre controle de plástico. Quanto à atividade de fosfatase alcalina em particular foram encontradas células isoladas que tendem a diminuir com o aumento das superfícies rugosas. Vale ressaltar que a densidade de recobrimento foi de 9300 células/cm<sup>2</sup> e o tempo de cultura foi de 24 ou 48 horas.

Com o objetivo de analisar microscopicamente a interface osso/implante, Piattelli; Corigliano; Scarano (1996) avaliaram a resposta óssea em dois tipos de implantes tratados superficialmente com plasma de titânio quando carregados e em dois tipos de implantes após a inserção na região pré-molar direita de dois pacientes com 18 e 34 anos. Os autores observaram uma variação significativa na análise morfométrica do contato osso/implante para os dois pacientes. Além disso, utilizando o método de Von Kossa eles observaram que o osso na interface com o implante estava altamente mineralizado e nenhum tecido conectivo e células inflamatórias foram encontradas na interface.

Em 1997, Vidigal Júnior e Groisman fizeram uma análise crítica da osseointegração versus biointegração. Observaram que a utilização de implantes cobertos por hidroxiapatita (HA) deve ser considerada como uma das escolhas quando a qualidade óssea não é boa. Concluíram também que os implantes dentários não devem ser reesterilizados, pois perdem seu alto grau de biocompatibilidade podendo assim influenciar na formação da interface osso-implante.

Wennerberget al. (1998) fizeram uma avaliação histomorfométrica de implantes na forma de parafusos com duas superfícies rugosas utilizando um total de 40 implantes divididos em 4 grupos. Ao final de 12 semanas todos os implantes foram avaliados e observaram que nas superfícies jateadas foram encontradas partículas de 75 µm de tamanho e, além disso, houve um contato ósseo mais acentuado que nas superfícies usadas.

A maioria das modificações nas condições superficiais tem sido propostas visando uma maior interação óssea entre a interface osso/implante. É o que apresenta o trabalho de Cochran et al. (1998) onde foi feita uma investigação que indicou que um implante de titânio com superfície SLA obteve um maior contato ósseo que os implantes com superfície TPS

sob diferentes condições de carregamento e descarregamento. Os autores fizeram um estudo histométrico em mandíbulas de 6 cães para a inserção de 69 implantes. Após todo o tempo de análise os autores observaram que as superfícies SLA obtiveram um maior contato ósseo quando comparadas com as superfícies TPS, o que leva a concluir que as superfícies SLA promovem um maior contato ósseo em relação as superfícies TPS.

De acordo com os estudos de Linckset al. (1998), o número de células em superfícies de titânio puro de grau II com rugosidade variando de 0,22  $\mu\text{m}$  a 4,24  $\mu\text{m}$  foi reduzido quando comparados com o número de células sobre o plástico, enquanto foi equivalente às superfícies de liga de titânio. Além disso, foi utilizada também uma densidade de recobrimento de 9300 células/cm<sup>2</sup> com um tempo de cultura de 24 horas. A atividade de fosfatase alcalina teve uma significância maior sobre as superfícies mais rugosas. A produção de osteocalcina aumentou somente sobre a superfície mais rugosa ( $R_a = 4,24 \mu\text{m}$ ). O mesmo acontece com a produção de colágeno. Portanto, os autores sugeriram que a rugosidade e a composição da superfície podem desempenhar um papel mais importante e que o melhor projeto para um implante é uma superfície de titânio puro com uma micro topografia áspera.

Uma análise em macacos das reações dos tecidos peri-implantes com implantes de titânio tratados com plasma, carregados imediatamente, foi feita utilizando 48 implantes distribuídos uniformemente entre maxila e mandíbula. Após 3 dias da inserção dos implantes, foi cimentada uma superestrutura de metal sobre 24 implantes, os implantes testes, abrangendo 12 implantes da maxila e 12 da mandíbula. Os outros 24 implantes, os implantes de controle, foram deixados sem carga. Nas análises microscópicas todos os implantes estavam cobertos por osso e as análises histomorfométrica demonstraram que nos implantes teste a porcentagem de contato ósseo foi significativamente maior que nos implantes de controle e nenhum tecido fibroso conectivo foi apresentado na interface (PIATTELLI et al., 1998).

Em 1999, Rigo e colaboradores fizeram uma análise crítica dos processos de recobrimento com hidroxiapatita (HA) sobre substratos metálicos apresentando as vantagens, desvantagens e perspectivas de cada processo. Após as análises, os autores observaram que o único processo que possui uma importância industrial e comercial, apesar de algumas desvantagens evidenciadas em seu desempenho biológico a longo prazo é o de plasma spray (PS) podendo-se esperar que a cristalinidade e composição sejam semelhantes à da HA biológica para que tenha o melhor desempenho em termos de bioatividade.

Wennerberg e Albrektsson (2000) fizeram uma análise de vários métodos bi-dimensionais e tri-dimensionais de medidas das ondulações, rugosidade superficial e

análise topográfica visando sugerir padrões para a avaliação de superfícies de implantes. Após as análises os autores sugerem que em projetos de implantes dentários é aceitável a análise da superfície através do interferômetro e profilômetroconfocal a laser utilizando as áreas como medidas. Sugeriram que a escolha dos filtros pode ser feita através dos valores de ondulação e rugosidade, realizando medidas de  $R_a$  e  $R_q$  para análises bi-dimensionais e  $S_a$  e  $S_q$  para análises tri-dimensionais.

Em estudo feito por Gadelmawla et al. (2002) onde utilizou as equações matemáticas dos parâmetros que medem a rugosidade de uma superfície. Foram determinados 59 parâmetros de rugosidade. Estas medidas foram utilizadas para fazer a caracterização de uma superfície juntamente com um pacote computacional desenvolvido pelos autores.

Berglund et al. (2003) investigaram as diferentes fases da cicatrização envolvidas no processo que resulta em osseointegração. Os autores utilizaram um total de 160 implantes ITI® com superfície SLA e 10 mm de comprimento inserido em mandíbulas de 20 cães labradores sendo que, cada animal recebeu 8 implantes, 4 do lado direito e 4 do lado esquerdo da mandíbula. Em tempos determinados pelos autores, 4, 7, 15, 28, 45, 60 e 75 dias os animais eram sacrificados para a retirada de material tanto para a análise histológica como para a biópsia. Após fazer as análises em todos estes tempos descritos acima, os autores concluíram que a rugosidade da superfície SLA aumenta a osteocondução, conseqüentemente, melhora a osseointegração dos implantes quando comparadas com superfícies usinadas (lisas).

Ponzoni, em 2004, avaliou o tecido ósseo frente à superfície de implantes tratadas com jateamento de óxido de alumínio implantadas nas áreas mandibulares com ótima qualidade e quantidade óssea com ausência de infecção, utilizando apenas cinco roscas apicais e o fundo do implante para análise do percentual de osseointegração. Foi observado um contato ósseo significativo de aproximadamente 76% quando comparado aos demais estudos.

Conterno e pesquisadores (2004) estudaram a influência do ataque ácido com diferentes concentrações em dois tipos de superfície de titânio comercialmente puro grau 2, uma superfície desbastada com granulometria de 600 e superfícies tratadas inicialmente com o jateamento. Utilizaram oito lâminas de titânio para cada superfície, uma temperatura para o ataque ácido de 60°C durante 30 minutos e um volume de solução de 6 ml. Analisaram a topografia da superfície, a rugosidade e a perda de pesos das amostras. Obtiveram como resultados que as topografias das superfícies sofreram modificações em todos os casos, as rugosidades nas superfícies tratadas inicialmente com o jateamento foram maiores que as observadas nas superfícies desbastadas e na análise da perda de peso das amostras logo após o ataque ácido apresentaram comportamentos diferentes,

sendo que, com o ácido sulfúrico houve resultados diferentes enquanto que com o ácido clorídrico a perda de peso aumentou à medida que as soluções aumentavam as concentrações.

Diniz et al. (2005) fizeram um estudo onde o objetivo era caracterizar superfícies de titânio submetidas a um tratamento superficial de jateamento com partículas de  $Al_2O_3$  e ataque ácido com HF e  $H_2O_2$  para análise e processamento digital de imagens. Após o processamento digital das imagens, os autores conseguiram obter uma caracterização precisa da presença de alumina que permitiu avaliar indiretamente o processo de fabricação do material e futuros efeitos no comportamento biológico de cultura de células osteoblásticas.

Sabe-se que é de extrema importância efetuar uma caracterização da superfície quanto aos elementos químicos presentes na camada de óxido e sua espessura, uma vez que, estas características influenciam no processo da osteogênese. Diante disso, Januário et al. (2005) avaliaram a espessura e contaminantes da camada de óxido em 5 marcas de implantes osseointegráveis, NOBEL BIOCARE, 3I, CONEXÃO, AS TECHNOLOGY e NAPIO. Em todas as análises com espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X foram utilizados 11 implantes rosqueados lisos de 3,75 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento. Após as análises os autores encontraram uma espessura da camada de óxido de  $15 \pm 3$ ;  $6,3 \pm 0,5$ ;  $6,0 \pm 0,2$ ;  $6,3 \pm 0,4$  e  $11 \pm 3$  nm para os implantes das marcas NOBEL BIOCARE, 3I, CONEXÃO, AS TECHNOLOGY e NAPIO, respectivamente. Em relação à análise dos contaminantes, os autores observaram uma mínima presença de carbono na primeira marca enquanto que nas demais foi observado a presença de carbono e também de contaminantes inorgânicos.

Da Silva (2006) tinha como objetivo em sua dissertação de mestrado caracterizar o revestimento de pó de titânio sobre liga de titânio, obtido através de aspersão térmica por plasma spray, e comparar com outros dois tipos de acabamento superficial, utilizado na confecção de implantes, a superfície usinada, e a superfície usinada e jateada por partículas abrasivas. Em sua metodologia considerou a análise da superfície através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em que se observou as alterações topográficas, e possíveis modificações químicas superficiais, com o auxílio de espectrometria por energia de dispersão(EDS). Ao final de seu trabalho concluiu que os procedimentos para obter superfícies com perfil de rugosidade e morfologia típicas para osseointegração mostraram um aumento na área de contato superficial proporcionando maior potencial de contato ósseo, além de favorecer a adsorção do sangue pela ação do efeito da molhabilidade das partículas arredondadas, garantindo com isso o início eficaz do processo de osseointegração. Observou também que o perfil de rugosidade da superfície formada



apresentou uma morfologia que deve favorecer o contato e a fixação de células ósseas que necessitam de pontos de ancoragem para sua estabilização e formação de tecido ósseo. Em comparação com os implantes concluiu que os implantes preparados na pesquisa obtiveram rugosidade superior aos comerciais e que a morfologia superficial apresentou-se mais favorável para que o fluxo sanguíneo permaneça por efeito de molhamento que facilitaria de forma mais rápida a osseointegração.

Paredes; Vaz; Silva (2006) apresentaram um estudo onde avaliaram a influência de três tipos de superfícies no fenômeno da osseointegração, tais como, a superfície usinada, a jateada com óxido de alumínio e esferas de vidro e por último, superfície revestida com titânio pelo processo de plasma-spray. Perante isso, utilizaram amostras de titânio comercialmente puro grau I com tratamentos. As amostras foram analisadas no MEV observando a morfologia da superfície. A rugosidade da superfície foi medida através de um rugosímetro com apalpador esférico com ponta de diamante de 2  $\mu\text{m}$  de raio e amplitude de ação de 1 mm. Para obter os valores de  $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_y$  e  $S_m$  foi utilizado um percurso de análise de 15 mm. Os autores concluíram o estudo observando que o jateamento mostrou-se adequado para obter superfícies com rugosidades e morfologia que podem influenciar de maneira significativa no processo da osseointegração. No tratamento de revestimento os autores concluíram que o processo de plasma-spray aumentou a área de contato superficial, favorecendo também uma melhor adsorção sanguínea que influenciou a osseointegração, apesar de terem observado a presença de contaminantes na superfície. E finalmente, consideraram que as rugosidades obtidas nas amostras favorecem a adesão celular.

Medeiros et al. (2006) estudaram o processo biomimético aplicado a amostras de titânio poroso em um processo de tratamento a quente com duas temperaturas diferentes. Para isso, utilizaram amostras de titânio poroso com dimensões de 8 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento. Estas amostras passaram por um tratamento químico utilizando um pó de titânio grau 2 com partículas variando de 149 – 177  $\mu\text{m}$  de tamanho e, após este tratamento as amostras foram imersas em solução fluida corporal a 400°C e 600°C, permanecendo por 2 e 7 dias. Após o período dos experimentos os autores concluíram que os tratamentos químicos e quentes aplicados ao titânio poroso mostraram-se capazes de produzir um indicador de titanato de sódio e aumentar a bioatividade das superfícies. Os autores concluíram ainda que o período de imersão de 7 dias apresentou melhores resultados para a fase rica de Ca e P apresentando um crescimento no revestimento de fosfato de cálcio quando comparados com o outro tempo de imersão na solução fluida corporal.

Com a realização de uma revisão da literatura mais aprofundada sobre a influência da textura superficial em implantes dentários, (NAGEM FILHO et al., 2007) concluíram que a

superfície de titânio com uma rugosidade e microestrutura complexa aumentam a osseointegração na interface osso/implante com o aumento da área da osseointegração, elevando a força de torque de remoção “*in vivo*” e a diferenciação “*in vitro*” dos osteoblastos. Além disso, observaram que em superfícies de implantes tratadas com plasma de titânio (TPS), jateadas com areia e condicionadas com ácido (SLA) tanto a rugosidade como o tratamento químico das superfícies podem influenciar bastante a força de remoção. Além de promover macrorrugosidade, o tratamento da superfície elimina a contaminação e o estado hidrofóbico da superfície, permitindo uma melhor adsorção de proteínas. Por outro lado, possibilita aperfeiçoar o procedimento, podendo ainda, permitir a aplicação de forças nos implantes de forma mais rápida e ampliar a gama de aplicações possíveis para osso alveolar de densidade inferior ou favorecer sua aplicação em osso regenerado.

Neste mesmo ano de 2007, Vaz estudou a morfologia de revestimentos de titânio a fim de contribuir para um melhor entendimento e confirmação dos parâmetros adequados para uma otimização desta superfície, através do processo plasma spray, para que possua uma morfologia favorável a osseointegração. Utilizou amostras jateadas com óxido de alumínio branco, revestidas pelo processo de aspersão térmica plasma spray com Titânio comercialmente puro, sendo que um dos lados, além do revestimento teve um jateamento superficial posterior com esferas de vidro e em metade das amostras, fez-se um pré-aquecimento. Utilizou a microscopia eletrônica de varredura para verificar as propriedades mecânicas superficiais e as fases presentes no material. Após deixar as amostras em solução SBF (Fluido Corporal) por 30 dias, verificaram a bioatividade da superfície. Ao final de seu estudo, observou que a presença de óxido de titânio na fase rutilo foi significativa, que ocorreu um aumento na rugosidade da superfície e, com isso, houve modificações na morfologia do titânio comercialmente puro revestido.

Gehrke et al. (2008) estudaram o acondicionamento da textura superficial de implantes dentários através da análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para esta análise os autores utilizaram amostras de implantes usinados em titânio grau I de diâmetro 4 mm e comprimento de 8,5 mm, nas quais sofreram um tratamento superficial com jateamento e triplo ataque ácido. No jateamento utilizaram partículas de óxido de alumínio a uma distância de 5 cm e uma pressão de 100 psi. Após este jateamento, as amostras receberam um triplo ataque ácido (ácido fluorídrico, ácido sulfúrico mais ácido clorídrico e ácido nítrico) formando quatro grupos de análises de acordo com o tempo de imersão nos ácidos: GT1 – 5 minutos, GT2 – 7 minutos, GT3 – 10 minutos e GT4 – 15 minutos. Nas análises no MEV, os autores concluíram que a rugosidade superficial é um fator importante que influencia a escolha do implante sendo que de acordo com o tratamento que a superfície recebe, aumenta-se a área de contato ósseo e conseqüentemente aumenta a

osseointegração. Além disso, os autores observaram que o jateamento associado com a aplicação de ácido sulfúrico mais ácido clorídrico por dez minutos foi a condição que apresentou a textura superficial mais regular e uniforme permitindo uma melhor adsorção de proteínas.

## 2.2. Ensaio “*In Vitro*” de Cultura de Células

A ausência de estudos da formação do tecido ósseo “*in vitro*” utilizando células da medula óssea de animais adultos foi fundamental para que Maniatopoulos; Sodek; Melcher (1988) estudasse tal formação óssea através da cultura de células da medula óssea de ratos com 40 a 43 dias de vida. A cultura foi feita no meio contendo  $\alpha$ -MEM, 15% de soro fetal bovino, antibióticos e 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico. E também em meio suplementado com 10 mM Na- $\beta$ -glicerofosfato,  $10^{-8}$ M de dexametasona, ou uma combinação de ambos. Após a cultura, células foram examinadas e eles observaram que a colagenase e nódulos de mineralização exibindo características similares ao do osso foram formados. Células associadas com os nódulos de mineralização apresentaram atividade de fosfatase alcalina. As análises mostraram ainda que o tecido ósseo pode ser sintetizado “*in vitro*” por cultura de células de medula óssea jovem/adulta, desde que contenha ambos os meios,  $\beta$ -glicerofosfato e, particularmente, dexametasona.

Keller; Grotendorst; Dougherty (1989) publicaram um estudo da capacidade de adesão celular sobre discos de titânio puro com três tipos de esterilização: autoclave, óxido de etileno e álcool etílico (100%). Os discos foram imersos em meio de cultura para fibroblastos por 60 minutos e após esse período os discos foram analisados e observaram que os índices de adesão celular para cada uma das esterilizações foram de 82%, 76% e 75%, respectivamente. No entanto, foram utilizados plásticos tratados para adesão celular como grupo controle, ou seja, 60 minutos era igual a 96% adesão. Diante disso, os autores concluíram que o tipo de esterilização pode afetar na resposta biológica dos tecidos aos implantes.

No mesmo ano, Michaelset al. fizeram um estudo comparativo do grau de adesão celular entre superfícies lisas e rugosas. Utilizaram discos de titânio que foram limpos e colocados imersos no meio de cultura contendo fibroblastos de ratos por 2 horas. Paralelamente, outras amostras foram colocadas imersas no meio de cultura contendo osteoblastos pelo mesmo tempo. Após os 15 minutos iniciais, os índices de adesão na cultura de fibroblastos para superfícies lisas e rugosas foram de 41% e 21%, respectivamente. Decorridas as 2 horas o índice foi o mesmo para ambas as superfícies. Por outro lado, em cultura de osteoblastos, após os primeiros 15 minutos, obtiveram o

mesmo índice de adesão para as duas superfícies. Já após as 2 horas, obtiveram 63% para superfícies rugosas e 47% para superfícies lisas. Com esses resultados, os autores observaram que as superfícies rugosas possibilitariam uma maior aderência ao longo do tempo e que células osteoblásticas proporcionariam melhores resultados nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Bowerset al. (1992) avaliaram a adesão de células osteoblásticas em superfícies rugosas provida por um jateamento com  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; por polimento e lixamento; por ataque ácido com HF 3,5%/HNO<sub>3</sub> 25% e em superfícies produzidas utilizando papel metalográfico de granulação 60 ou 120. Como grupo de controle, foram utilizadas amostras polidas usando papel metalográfico 600. Após avaliarem a rugosidade superficial das amostras em um perfilômetro, as mesmas foram colocadas em meios de cultura de calvária de ratos. Ao retirar as amostras dos meios, as amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e observaram que a superfície provida por jateamento demonstrou ser mais conducente para a adesão celular do que as outras superfícies apresentando níveis significativamente altos.

Gomi e Davies (1993) observaram em ensaios “*in vitro*” que a rugosidade do substrato da superfície influencia ambas a soma e a distribuição espacial do osso. Estes ensaios foram realizados em discos de poliestireno com 3,5 mm de diâmetro distribuído em três grupos: superfície lisa, superfície rugosa obtida com uma lixa de grãos de carboneto de silício de tamanho 26  $\mu\text{m}$  (granulometria 600) e superfície rugosa obtida com uma lixa de grãos de carboneto de silício de tamanho 46  $\mu\text{m}$  (granulometria 320). Além dos discos, utilizaram também células derivadas da medula óssea de rato durante um período de 2 semanas. Após este período, utilizaram o método de Von Kossa para a observação no microscópio de contraste de fase invertido e análise das imagens no Bio-Quant IV. Os autores também observaram diferenças nas distribuições dos tecidos mineralizados nos três grupos.

Em 1996, utilizando discos de titânio com as características superficiais: (PT) superfícies pré-tratadas com ácido fluorídrico (HF), ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e lavadas; (EP) superfícies eletro polidas; (FA) superfícies com jateamento de granulação fina e ataque ácido: ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); (CA) superfícies com jateamento de granulação grossa e ataque ácido: HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (TPS) superfícies com jateamento de granulação grossa e revestida com plasma de hidreto de titânio. Estas superfícies foram classificadas na ordem da mais lisa para a mais rugosa (EP, PT, FA, CA e TPS), MARTIN e colaboradores analisaram a morfologia celular, proliferação celular, a atividade de fosfatase alcalina dentre outros parâmetros importantes no processo de osseointegração. Estas análises foram feitas com discos de titânio puro de grau II que já foram usados, sendo que

os mesmos foram limpos e autoclavados, e utilizaram a mesma densidade de recobrimento com um tempo de 24 horas de cultura. Os autores observaram que a camada de fosfatase alcalina depois da cultura sobre as superfícies FA e TPS foi significativamente mais baixa do que sobre as outras superfícies. Constataram que não houve diferenças entre discos de titânio novo ou usado. Como resultado final, observou que a limpeza e esterilização não influenciaram a superfície dos implantes de titânio. Com isso, concluíram que os implantes poderiam ser reutilizados com segurança em um mesmo paciente.

Piattelliet al. (1997) estudaram dois implantes com tratamento superficial de plasma de titânio após 8 e 9 meses de carregamento. Neste estudo foi observado, utilizando análise microscópica, cerca de 60 a 70% de osso cortical em ambos os implantes. Foi encontrado também um número pequeno de osteoblastos na interface com a fosfatase alcalina e nenhuma célula positiva na interface com o ácido de fosfatase. Ao final do estudo, os autores relataram que carregamentos imediatos podem ser propícios para um paciente com boa qualidade óssea. Bons resultados têm sido relatados para implantes com superfícies usinadas, enquanto que em outras superfícies necessitam de mais informações antes de concluírem sobre carregamentos imediatos nas mesmas.

Em implantodontia, a biocompatibilidade dos tecidos ósseos para a superfície do implante e os fatores ambientais locais assume um importante papel no processo da cicatrização. Células derivadas de tecido ósseo intra-oral demonstram ser uma fonte de informação sobre células osteoprogenitoras necessárias para a cicatrização ao redor dos implantes periodontais. Neste caso, Mailhot e Borke (1998) apresentaram um método conveniente de isolamento e de cultura *"in vitro"* utilizando células osteoblásticas intra-orais humanas, derivadas da preparação do sítio local de um implante dentário. Os autores caracterizaram a fosfatase alcalina, a presença de osteonectina, de osteocalcina e de um precursor intracelular do colágeno do tipo I. Todas as análises foram feitas obedecendo a um protocolo específico para tais caracterizações. Nesta última análise, o colágeno do tipo I faz-se superior a 90% da proteína da matriz óssea e observaram também que em todas as culturas testadas, mostraram áreas de calcificação de graus variados.

Visando estudar o potencial da topografia da superfície do implante de titânio sobre o processo de formação e mineralização da matriz extracelular, Cooper et al. (1999) realizaram um estudo utilizando cultura de células osteoblásticas. Ao final de 14 e 21 dias de cultura observaram que houve a formação de matriz mineralizada em todas as superfícies que foram analisadas histologicamente. Detectaram que foi durante os primeiros 14 dias de cultura que ocorreu a formação de multicamadas mineralizadas. A principal descoberta deste estudo foi que a formação e mineralização da matriz osteoblástica é modificada de acordo com as alterações nas superfícies do implante. Observaram que as superfícies TPS

tiveram uma formação e mineralização da matriz mais significativa do que as outras superfícies. Concluíram também que a topografia da superfície contribui para a modulação do comportamento da cultura de células.

Orsiniet al. (2000) analisaram a adesão e a proliferação celular em implantes com superfícies usinadas, tratadas por ataque ácido (1% HF/30% HNO<sub>3</sub>) e jateamento. As superfícies tratadas tinham uma rugosidade média próxima a 2,15 µm. Com um tempo de cultura de 24 horas, os autores observaram que o ataque ácido e o jateamento são procedimentos seguros e previsíveis e podem melhorar a adesão e proliferação celular.

Perizzolo; Lacefield; Brunette (2001) verificaram que a topografia e a composição química influenciam na osteogênese e que existem interações entre as duas. Diante desse fato, analisaram superfícies lisas, com microranuras e superfícies revestidas com hidroxiapatita através da cultura de osteoblastos de ratos mantidas em um meio suplementado por 24 horas a 6 semanas. Observaram que em superfícies com hidroxiapatita houve uma maior produção de nódulos que a superfície de titânio com microranuras, que por sua vez, produziram mais nódulos mineralizados que as superfícies lisas. Além disso, havia também uma interação estatística significativa entre a topografia e a composição química das superfícies na formação de nódulos mineralizados. E ainda, uma forte correlação entre fosfatase alcalina com 2 semanas e nódulos com 6 semanas, sugerindo que a fosfatase alcalina possivelmente possa ser usada como principal indicador da osteogênese sobre superfícies fabricadas.

A atividade de fosfatase alcalina, a produção de osteocalcina e de colágeno foram estudadas em superfícies de titânio puro (Ti) e em superfícies revestidas de óxido de titânio e hidroxiapatita (TiO<sub>2</sub>/HA) com diferentes proporções: proporção 2:1 – TiO<sub>2</sub>/HA 0,5; proporção 1:1 – TiO<sub>2</sub>/HA 1; proporção 1:2 – TiO<sub>2</sub>/HA 2. Os autores concluíram que o crescimento e a morfologia das células foram similares em todos os materiais testados. A atividade de fosfatase alcalina e produção de colágeno na cultura de osteoblastos sobre revestimentos de TiO<sub>2</sub>/HA foram significativamente maiores do que sobre o Ti e sobre poliestireno. O crescimento de células osteoblásticas sobre o revestimento TiO<sub>2</sub>/HA 1 mostrou um aumento significativo na produção de osteocalcina (RAMIRES et al., 2001).

Montanaro et al. (2002) fizeram uma análise do número de células, da atividade de fosfatase alcalina e da produção de osteocalcina sobre superfícies de liga de titânio (Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V) com revestimento de fluorhidroxiapatita (FHA), nomeando as superfícies de baixa rugosidade de LR-FHA (R<sub>a</sub> = 5,6 µm) e as superfícies de alta rugosidade de HR-FHA (R<sub>a</sub> = 21,2 µm). Os autores perceberam que depois de 4 e 11 dias de cultura, a presença de células sobre as diferentes superfícies foram similares. Além disso, observaram que ambos os tipos de revestimentos (LR-FHA e HR-FHA) mostraram um aumento significativo na

atividade de fosfatase alcalina e concluíram que os mesmos suportam a adesão e crescimento de osteoblastos.

A boa biocompatibilidade de superfícies de titânio tem sido demonstrada em muitas pesquisas experimentais e clínicas. Diferentes topografias foram testadas em diferentes modelos de cultura de células. Uma busca sistemática foi realizada selecionando artigos, fazendo uma investigação de bibliografias de artigos identificados e aplicando critérios de inclusão e exclusão, selecionou 348 referências. Os autores deram maior ênfase em experimentos realizados com células humanas osteoblásticas MG63, originadas isoladamente de um osteosarcoma humano, cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio. Eles verificaram que superfícies texturizadas de titânio puro com valores de rugosidade média ( $R_a$ ) próximo de 4  $\mu\text{m}$  são bem aceitas por células MG63 (BÄCHLE; KOHAL, 2004).

Vidigal Júnior et al. (2004) fizeram um estudo buscando a compreensão dos fatores biomecânicos que influenciam a osseointegração. Neste estudo, observaram que a perda do implante após o período de cicatrização é provocada pela placa bacteriana ou por sobrecarga oclusal. Os autores relataram também que a área de contato osso/implante também é importante para o sucesso da osseointegração, ou seja, um maior contato ósseo provocado pelo aumento da área da superfície do implante diminui a tensão na interface implante/osso prevenindo a perda óssea na interface que poderá causar a perda do implante. Para os autores, a geometria do implante, o diâmetro, o comprimento do implante e a quantidade óssea da interface são fatores biomecânicos que influenciam no tratamento da implantodontia. Os autores concluíram que para evitar tais riscos das perdas é necessário fazer um planejamento cirúrgico protético onde se realizam todos os estudos possíveis das condições do paciente em receber um implante dentário.

Masakiet al. (2005) avaliaram os efeitos topográficos sobre diferentes superfícies de titânio. Para a realização desta análise foram utilizadas quatro superfícies,  $\text{TiO}_2$ Blast (superfícies jateadas com dióxido de titânio), Osseospead (superfícies jateadas com titânio e atacadas eletroquimicamente com ácido hidrófluorídrico diluído),  $\text{SLA}_1$  (superfícies jateadas com grãos grandes de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e atacadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ ) e  $\text{SLA}_2$  (superfície preparada por jateamento, ataque ácido, enxaguados sob proteção de  $\text{N}_2$  (gás nitrogênio) e armazenados em solução isotônica de NaCl). Além destas superfícies, os autores utilizaram plástico como controle. E com uma linhagem de células fibroblásticas humanas HEPM 1486 (ATCC) realizaram ensaios “*in vitro*”. As análises topográficas das superfícies foram realizadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) após 72 horas de cultura sendo que todas as análises foram feitas em triplicatas. No plaqueamento do ensaio “*in vitro*” utilizaram um número de 50.000 células por 10  $\mu\text{l}$  de meio. Os autores observaram melhores

resultados da expressão ALP nas superfícies modificadas (SLA<sub>2</sub>, hidrofílicas) e concluíram que as diferentes propriedades da superfície do implante podem influenciar na expressão de genes ósseos e fatores de transcrição das células.

Gebran e Wassal, em 2007, fizeram uma investigação da adesão de osteoblastos sobre implantes osseointegráveis com superfície tratada (Titamax II®). Os autores realizaram ensaios *“in vitro”* de cultura de células para fazer esta investigação onde utilizaram linhagens celulares derivadas do tecido ósseo de ratos recém nascidos, nove implantes Titamax II® - Neodent com 3,75 mm de diâmetro e 13 mm de comprimento. Após os ensaios *“in vitro”*, os autores analisaram as superfícies dos implantes no MEV e concluíram que a liga de titânio possui características biocompatíveis com células ósseas promovendo a adesão no implante e que o grau de rugosidade da superfície apresentou sucesso na adesão da linhagem de células ósseas e, o implante apresentou um excelente desempenho *“in vitro”* no tocante à adesão de células osteoblásticas.

Neste mesmo ano, Andrade Junior et al. (2007) compararam a proliferação *“in vitro”* de fibroblastos de origem animal sobre superfícies de titânio lisas e com tratamento superficial onde utilizaram amostras de titânio grau 2 que passaram por um tratamento químico com solução ácida (ácido fluorídrico e peróxido de hidrogênio, HF e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente). Após o tratamento as superfícies foram caracterizadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e um rugosímetro apalpador para medir a rugosidade. No estudo *“in vitro”* utilizaram linhagem de células fibroblásticas VERO. A proliferação celular foi medida através do método MTT que utiliza corante para identificar a quantidade de células vivas após 1, 2, 7 e 14 dias de cultura. Em suas análises, os autores observaram que a proliferação celular de fibroblastos foi menor em superfícies de titânio rugosas do que nas superfícies lisas não observando diferenças significativas no 14º dia de cultura.

Malaspina et al. (2008) fizeram um estudo *“in vitro”* de cultura de células osteoblásticas HFob 1.19 durante a fase de diferenciação celular visando modular a atividade de TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase). Neste estudo, os autores analisaram os marcadores osteogênicos, em particular, a atividade de fosfatase alcalina que foi analisada em 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultura e a formação dos nódulos mineralizados que foram analisados em 7 (grupo controle), 28 e 35 dias de cultura. Como resultados, os autores apresentaram que a atividade de fosfatase alcalina sofreu um aumento significativo no 21º dia e um decréscimo significativo entre o 28º e 35º dia do experimento. Já na formação dos nódulos foi observada uma mineralização visível no 28º dia e no 35º dia de cultura apresentou um aumento de tamanho dos nódulos mineralizados. Os autores



concluíram que a atividade de TRAP pode ser modulada durante a fase de diferenciação osteoblástica com as análises dos marcadores osteogênicos proposto no trabalho.

Mendonça et al. (2008) fizeram uma revisão para explorar as aplicações nanotecnológicas em superfícies de Ti avaliando novas oportunidades para a criação de novas superfícies de implantes endósseos através de um maior controle das células aderentes. Os autores concluíram que modificações na superfície na escala nano podem alterar as respostas celulares na interface osso-implante influenciando favoravelmente o processo da osseointegração. Além disso, em ensaio de cultura de células, os autores observaram que por causa destas modificações houve um aumento da formação de osso na interface e, estudos clínicos futuros serão responsáveis nos esclarecimentos das vantagens e desvantagens de se trabalhar com um implante cuja superfície é tratada na escala nanométrica.

Geris et al. (2009) investigaram os efeitos de vários parâmetros de carregamento do implante integrados a regeneração óssea em uma câmara com osso. Utilizaram modelos matemáticos capazes de capturar a regeneração óssea do peri-implante, modelos de elementos finitos bi-dimensionais e tri-dimensionais de um implante cilíndrico e tecido dentro da câmara. Sendo que nos modelos bi-dimensionais foram analisadas seções transversais (S1 a S5) e nos modelos tri-dimensionais foram analisados o modelo como um todo. Várias simulações com diferentes condições de carregamento foram feitas para comparar os dados experimentais com os resultados obtidos nas simulações. Após todas as simulações e comparações, os autores observaram que no modelo bi-dimensional os melhores valores para a fração óssea foram obtidos nas seções S1 e S5. Observaram também que ao variar a grandeza do deslocamento de 30 a 500  $\mu\text{m}$  notou desde uma ausência de contato osso-implante até a presença de uma camada de tecido fibroso, sendo que esta camada pode levar a falência do processo da osseointegração. No modelo tri-dimensional, observaram uma boa concordância entre os valores medidos e preditos da fração óssea. Após todas estas observações, os autores concluíram que os resultados numéricos e experimentais tiveram uma boa relação e que simulações com frequência de carregamento mais baixa favorecem a osseointegração do implante dentro da câmara.

Mironet al. (2010) avaliaram a ligação, a proliferação e a diferenciação através da fosfatase alcalina de células osteoblásticas de calvária de ratos sobre superfícies de titânio lisa (PT) e tratada com jateamento de partículas de titânio e ataque ácido HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SLA). E sobre estas superfícies ainda fizeram a aplicação do revestimento da matriz de esmalte (EMD). Estas análises foram feitas utilizando o ensaio “*in vitro*” de cultura de células. Nestes ensaios foi observado que com ou sem matriz de esmalte sobre o titânio, a morfologia celular não teve alteração. A proliferação celular foi maior nas superfícies lisas (PT) sem

revestimento do que nas superfícies SLA sem revestimento. Porém, a atividade de fosfatase alcalina foi significativamente maior nas superfícies com revestimento EMD do que em superfícies sem revestimento e, o mesmo resultado foi obtido na formação dos nódulos de mineralização. Os autores concluíram que as superfícies EMD melhora a diferenciação osteoblástica sobre superfícies de titânio, independente da topografia. Com isso, os autores sugeriram que o revestimento com matriz de esmalte pode ser uma ferramenta importante para a formação óssea ao redor dos implantes dentários.

### **2.3. Ensaio de Torque de Remoção**

Johansson e Albrektsson (1987) procuraram avaliar o torque de remoção de implantes utilizando um total de 25 coelhos adultos e 50 implantes sendo que cada animal recebeu 2 implantes. Após a inserção e decorridos 3 semanas, 1, 3, 6 e 12 meses, um grupo de coelhos era sacrificado e um implante era removido utilizando um torquímetro enquanto que o outro implante era removido por uma trefina para análise morfológica. Os torques observados durante o experimento para os intervalos de tempo definidos foram de 10 Ncm, 16,8 Ncm, 68 Ncm, 77,6 Ncm e 88 Ncm, respectivamente. Já a análise morfológica constatou que quanto maior o tempo pós-inserção maior era a quantidade de osso ao redor do implante.

Carlsson et al. (1988), fizeram um estudo comparativo dos implantes de titânio comercialmente puro com superfícies lisa e rugosa em tibia de coelhos em relação ao torque de remoção. Observaram que aos 6 meses de inserção os implantes com superfície rugosa, o torque foi maior do que com a superfície lisa. Uma vez que nos dois tipos de implantes houve a osseointegração.

Carret al. (1995) avaliaram a torque de remoção em três tipos de implantes com rosca de mesmo tamanho: Ti comercialmente puro,  $Ti_6Al_4V$  e revestido por hidroxiapatita. Os implantes foram inseridos em maxila e mandíbulas de 6 macacos. Após um período de cicatrização, 3 a 4 meses, os implantes foram removidos e o torque medido. Os valores foram analisados estatisticamente e obtiveram valores médios para hidroxiapatita, liga de titânio e para o Ti comercialmente puro iguais a 186 Ncm, 78,6 Ncm e 74 Ncm, respectivamente. Os valores de torque de remoção na mandíbula foram maiores que os da maxila, porém, não houve diferença significativa. Os autores concluíram que um torque de 35 Ncm seria ideal para uma colocação de um intermediário e forneceria uma margem de segurança para outros implantes com geometria similar aos deste estudo.

Em 1997, Pebéet al. propuseram um estudo piloto para avaliar o torque de remoção de implantes rosqueados com superfícies usinadas, tratadas por jateamento e tratadas com

ataque ácido sob condições de carregamento e descarregamento. Os autores observaram que a resistência da interface osso/implante obtida através do torque de remoção é influenciada por diferentes características das superfícies sendo que as superfícies tratadas com ataque ácido resistiram mais as forças de remoção quando comparadas com as superfícies jateadas ou usinadas. Na avaliação histológica do contato ósseo com as várias superfícies de implantes não mostraram diferenças significativas entre elas.

Com a necessidade de uma compreensão mais abrangente sobre o fenômeno da osseointegração, Lourenço Júnior (1998) estudou as características deste fenômeno ao redor de implantes NAPIO inseridos em tíbias de coelhos utilizando no experimento um total de sete animais, sendo que em cada animal foram inseridos dois implantes, um para avaliação histológica e outro para a obtenção da força do torque de remoção. Os resultados observados para esta última após 15 dias, 3 e 6 meses foram 7,30 Ncm, 52,65 Ncm e 79,7 Ncm, respectivamente. Observou também que os valores obtidos foram muito similares com os valores obtidos por Johansson e Albrektsson (1987) sendo que as diferenças podem estar relacionadas com a rugosidade superficial apresentadas pelo sistema NAPIO e NOBELPHARMA. O torque de remoção apresentou uma relação diretamente proporcional ao intervalo de tempo pós-inserção, ou seja, quanto maior o tempo decorrido após o ato cirúrgico, maior o torque necessário para a remoção do implante.

Procurando avaliar a resposta óssea para duas superfícies com diferentes rugosidades comparando-as com a superfície porosa com malha de fibras, D'Lima et al. (1998) utilizaram um total de 60 coelhos adultos e machos pesando entre 3 e 3,5 Kg para a inserção de implantes cilíndricos com 25 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro visando medir a osseointegração para as diferentes superfícies. As superfícies analisadas foram: superfícies revestidas com malha de fibra, com poros médios de 400  $\mu\text{m}$  de tamanho; superfícies tratadas por jateamento com rugosidade de 6  $\mu\text{m}$ ; superfícies tratadas por ataque ácido com rugosidade média de 18  $\mu\text{m}$ . Após a avaliação histológica e mecânica, os autores concluíram que para as superfícies testadas, o aumento da rugosidade proporciona um aumento da osseointegração quando comparadas com a superfície controle com malha de fibra, mais não aumenta a resistência de cisalhamento da interface do implante com o suporte.

Em um estudo de torque de remoção, Buser et al. (1998) compararam as diferenças de dois diferentes implantes de titânio tipo parafuso em maxila de porcos. Utilizaram implantes com superfícies SLA com rugosidade média de 2,0  $\mu\text{m}$  e implantes com superfícies Osseotite com rugosidade de 1,3  $\mu\text{m}$ . Depois de 4, 8 e 12 semanas, observaram que as características superficiais têm um impacto significativo sobre a força de cisalhamento, ou seja, implantes com superfícies SLA sem ranhuras têm valores de torque de remoção maiores que nos implantes Osseotite com quatro ranhuras. Além disso, os valores do torque

de remoção nas superfícies SLA variavam de 109 a 196 Ncm enquanto que nas superfícies Osseotite os valores estavam entre 62 a 96 Ncm.

Li et al. (1999) estudaram os efeitos do tratamento de superfícies por jateamento modificado em implantes dentários através da análise da força de remoção. Os implantes foram inseridos em cães e retirados após 2, 4 e 12 semanas. Os resultados mostraram que a força de remoção do implante com a superfície tratada foi aproximadamente cinco vezes maior do que a força de remoção medida sobre as superfícies lisas. Os autores concluíram que superfícies rugosas de implantes de titânio criadas a partir de um jateamento modificado podem ter uma grande influência sobre a força de remoção gerada pela interface osso/implante.

Buseret al. (1999) propuseram um estudo para avaliar a força de cisalhamento em implantes de titânio SLA na maxila de porcos. Em seus estudos utilizaram superfícies usinadas, superfícies SLA e superfícies TPS (tratadas com plasma de titânio) como grupo controle. Nos experimentos, depois de 4, 8 e 12 semanas de cicatrização, observaram diferenças significantes entre as superfícies usinadas e as outras duas superfícies com tratamento superficial (SLA e TPS) sendo que os valores médios de torque de remoção nestas últimas superfícies foram maiores do que na primeira superfície. Outra observação foi que a posição do implante também influencia nas forças de cisalhamento do implante devido à densidade da estrutura óssea onde se localiza cada implante.

Em 2002, Cochran et al. avaliaram a colocação e restauração de implantes dentários ITI® com superfície tratada por jateamento e por ataque ácido (superfície SLA). A inserção do pilar com o implante foi feita com um torque de 35 Ncm depois de aproximadamente seis semanas de cicatrização. Os resultados demonstraram um alto índice de sucesso para a conexão do pilar assim como para o implante depois de um ou dois anos de carregamento. Estudos experimentais em animais mostraram que esta superfície de titânio, em particular, resultou em um alto grau de contato ósseo com o implante e altos valores de torque de remoção. Os resultados deste estudo reforçam o conceito de formação de osso ao redor da superfície tratada com jateamento e ataque ácido possibilitando um tempo de cicatrização reduzido.

#### **2.4. Ensaio de Energia Superficial**

Conterno et al. (2004) onde analisaram a influência do material e tamanho das partículas utilizadas no tratamento de jateamento. Para esta análise, os autores utilizaram discos de titânio comercialmente puro grau 2 de 6 mm de diâmetro e 4 mm de espessura e para realizarem os ensaios de molhamento utilizaram lâminas de titânio comercialmente

puro grau 2 de 20x10x0,1 mm tratadas com as mesmas condições de jateamentos que os discos. Utilizaram ainda  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Alumina) e vidro como material para realizar o tratamento de jateamento com diferentes tamanhos das partículas, mantendo constantes as outras condições do processo. Nos ensaios de molhamento, utilizaram o sistema  $\text{TiO}_2$  – sangue, sendo que, nos ensaios estáticos utilizaram um volume de gota de 7  $\mu\text{l}$  e para os ensaios dinâmicos um volume de 30  $\mu\text{l}$ . Após as análises, observaram que as topografias apresentaram diferenças de acordo com o material utilizado. No caso do jateamento com  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , as topografias geradas apresentaram desgarramento de material e uma alta densidade de irregularidades homoganeamente distribuídas. Já no jateamento com esfera de vidro, observaram zonas com aparente deformação plástica e zonas de desprendimento de material. Concluíram que o aumento da rugosidade das amostras em função do tamanho das partículas apresentou em ambos os materiais uma relação linear. Os resultados dos ensaios de molhamento, tanto os ensaios estáticos como os dinâmicos não mostraram valores com tendência definida.

Santos et al. (2008) avaliaram o efeito de envelhecimento nas propriedades físico-químicas de superfícies de titânio que sofreram tratamento e que não sofreram tratamento. Utilizaram 45 amostras de titânio com 15 mm de diâmetro e 15 mm de espessura. As amostras foram embutidas, polidas, limpas antes de receberem os diversos tratamentos superficiais. Após isso, as amostras foram submetidas ao ensaio de molhabilidade e de acordo com os resultados obtidos, os autores observaram que o tempo de envelhecimento aumenta o ângulo de contato (ângulo medido no ensaio) e conseqüentemente, diminui a molhabilidade e a adesão celular concluindo que a limpeza da amostra e a modificação da superfície de titânio por vários tratamentos têm influência direta no ângulo de contato.

Em 2008, Wilmowsky et al. fizeram um estudo “*in vivo*” em porcos domésticos visando comparar as superfícies sem tratamento de titânio comercialmente puro (grupo controle) com superfícies de titânio quimicamente modificadas com HCl (ácido clorídrico) e NaOH (hidróxido de sódio). Utilizaram 60 cilindros de titânio comercialmente puro e destes 30 sofreram tratamento químico com ataque ácido. Após isso, as amostras foram esterilizadas usando radiação gama para serem inseridas na parte frontal do crânio de 30 porcos domésticos. Cada porco recebeu dois implantes, um com a superfície quimicamente modificada e outro sem tratamento (grupo controle). Os animais foram sacrificados após 3, 7, 14, 60 e 90 dias. A rugosidade das amostras foi analisada por meio de um microscópio confocal a laser com amplificação de 1000x. A hidrofiliçidade foi analisada através do método de eletrobalanço de Wilhelmy. Na avaliação histológica da interface osso/implante, os autores observaram que os implantes do grupo controle foram parcialmente encapsulados por tecido fibroso, enquanto que na superfície quimicamente modificada não

foi observado nenhum tecido fibroso ao seu redor. Com isso, os autores concluíram que superfícies quimicamente modificadas com HCl e NaOH melhoram a formação óssea ao redor do implante quando comparadas com a superfície do grupo controle. Além disso, as superfícies quimicamente modificadas demonstraram um contato ósseo mais significativo nos dias 14, 30 e 90 dias de cicatrização do que a superfície do grupo controle levando a um aumento da osseointegração e estabilidade do implante.

Lim e colaboradores (2008) examinaram como a energia superficial afeta o crescimento de células osteoblásticas e o comportamento da mineralização usando um tempo médio de cultura. Para isso, os autores utilizaram ensaios "*in vitro*" de cultura de células HFob 1.19 sobre superfícies com duas energias superficiais extremas, ou seja, em superfícies hidrofílicas (energia superficial alta) e hidrofóbicas (energia superficial baixa). Até os 21 dias de cultura, os autores observaram a morfologia celular com técnicas de microscopia óptica, varredura e confocal e a mineralização foi observada com ensaio mineral e microscopia. Os autores observaram que em superfícies hidrofílicas houve um crescimento homogêneo das células enquanto que em superfícies hidrofóbicas foi observado a formação de grupos celulares. A matriz mineralizada quantificada pelos ensaios de Alizarina Red foi significativamente maior para as células HFob 1.19 sobre as superfícies hidrofílicas que em superfícies hidrofóbicas. Os autores concluíram que a energia superficial pode afetar o crescimento espacial osteoblástico tão bem quanto o comportamento da quantidade e qualidade da mineralização até 21 dias de cultura. Os autores ainda sugerem que o potencial do crescimento espacial celular medido por energia superficial do substrato pode ser positivamente correlacionado com a mineralização.

## **2.5. Modelos Matemáticos Computacionais**

Buscando um melhor entendimento da remodelação óssea, Weinans; Grootenboer (1992) estudaram o comportamento da remodelação óssea em três estruturas diferentes: um fêmur proximal, uma placa quadrada e um modelo de duas unidades com dois sensores. Estes modelos são baseados em um princípio de que a remodelação óssea é induzida por um sinal mecânico que ativa as células regulares (osteoblastos e osteoclastos). Estes modelos também foram estudados matematicamente e simulados numericamente utilizando o código de Elementos Finitos MARC. Foi desenvolvido todo um equacionamento matemático com equações diferenciais parciais visando realizar a simulação numérica integrando a formulação desenvolvida no código numérico. Após ajustes no refinamento das malhas os autores observaram que o osso é de fato um material de auto aperfeiçoamento que produz uma morfologia trabecular auto similar com pesos mínimos e

que as estruturas morfológicas e dimensionais dependem das características de carregamento local procurando o grau máximo da mineralização do osso.

Um modelo matemático que relaciona a rugosidade da superfície e a resistência do cisalhamento interfacial para implantes osseointegrados quando se conhece as características topográficas da rugosidade superficial foi estudado por Hansson e Norton (1999). Utilizando os parâmetros de rugosidade superficial obtidos a partir do desenvolvimento matemático com a micro geometria conhecida, pode-se estimar a força de resistência ao cisalhamento. Os autores concluíram após as análises que as rugosidades das superfícies dos implantes com micro geometria otimizada poderão trazer um aumento substancial na força de resistência ao cisalhamento interfacial tal como a superfície otimizada poderá ser caracterizada contendo densidades acondicionadas de poços com diâmetro inicial excedendo um valor, com uma profundidade suficiente para não restringir a força de resistência nos planos de fratura e com uma geometria inicial favorável.

## **CAPÍTULO III**

### **IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS**

De acordo com a literatura existem quatro tipos de implantes dentários: os implantes intramucosos; os implantes justaósseos; os implantes transmandibulares e os implantes endósseos. Estes últimos, como resultado da cirurgia pode promover uma necrose óssea resultando no encapsulamento por uma camada fibrosa ou serem envolvidos por osso conseguindo assim uma futura osseointegração (NAERT; VAN STEENBERGHE e WORTHINGTON, 1998).

A osseointegração de um material estranho “implantado”, contudo, é possível apenas se for feito de um material biocompatível, se for provido de uma estrutura de superfície definida e se a forma do implante permitir transmissão de carga controlada ao osso periimplante. Uma técnica cirúrgica atraumática e um período adequado para a cicatrização e remodelação óssea são também elementos importantes para o sucesso do implante (NAERT; VAN STEENBERGHE e WORTHINGTON, 1998).

A recolocação dos tecidos moles e duros perdidos, a reabilitação e melhora da função mastigatória, além do conforto bucal são possibilitadas pela ocorrência da osseointegração. Dessa forma, pode-se observar uma melhor qualidade de vida para as pessoas que passaram pela colocação de um implante.

Os implantes osteointegráveis surgiram para reabilitar dentes perdidos. No entanto uma pequena falta de tecido ósseo poderia impossibilitar a instalação e a manutenção dos implantes, já que o pré-requisito básico continua sendo a existência de quantidade e qualidade óssea, suficiente para sua inserção, de maneira que as cargas mastigatórias sejam transmitidas adequadamente ao osso adjacente (ZABLOTSKY et al., 1991).

O avanço da bioengenharia e biotecnologia no desenvolvimento dos materiais odontológicos de preenchimento possibilitou a reconstrução dos maxilares de forma bastante satisfatória oferecendo assim, maiores alternativas para as reabilitações.



A instalação de implantes osteointegráveis requer um volume ósseo suficiente que permita a fixação e estabilidade dos mesmos no osso alveolar. Em muitos casos, a reabsorção alveolar após a exodontia, trauma ou patologias resultam num rebordo alveolar com inadequada altura e/ou espessura óssea (MICH, 1996).

Adellet al. (1990) e Jaffin e Berman (1991) comentam que a retenção mecânica, obtida através de parafusos ou de elementos rosqueados de titânio, é feita através do contato com a camada de óxido, que se forma na superfície destes implantes, com o tecido ósseo. A consequência mais importante da presença desta camada de óxido é que as moléculas e as células, que se aproximam do implante vindas do osso, reagem ao óxido metálico, e não à superfície metálica.

De acordo com Meffert et al. (1992) existem dois mecanismos básicos de retenção dos sistemas de implante: a retenção mecânica e a retenção bioativa. A retenção mecânica refere-se basicamente a substratos metálicos implantados, como o titânio ou ligas de titânio. A retenção é feita, em nível macroscópico, por fendas, roscas ou túneis e envolve o contato direto entre a superfície oxidada do implante e o tecido ósseo. A nível microscópico, pela rugosidade das superfícies permitindo uma íntima união entre o tecido ósseo e o implante, sem a ocorrência de ligações químicas. Alguns implantes utilizam uma subestrutura de titânio ou liga de titânio, recoberta por uma fina camada de fosfato de cálcio ou de hidroxiapatita. A hidroxiapatita e outras fases de fosfato de cálcio podem conferir ao implante uma superfície bioativa, que acelera o crescimento ósseo, induzindo uma união direta entre o implante e o tecido ósseo. Este fenômeno denomina-se biointegração.

Os estudos histológicos sobre a osseointegração mostraram que o implante é envolvido por tecido não-mineralizado durante a fase inicial de cicatrização. Dessa forma, ele fica sensível às pressões e aos movimentos nas primeiras semanas de cicatrização. A diferenciação das células ósseas é perturbada por qualquer micromovimento do implante superior a 150 µm, podendo levar a uma interface fibrosa. A escolha do tipo de implante depende do volume ósseo disponível (1), do espaço protético residual (2) e das exigências mecânicas (3), como mostrado na Fig. 3.1. A análise das exigências protéticas e cirúrgicas permite determinar os parâmetros da escolha racional do implante (DAVARPANA et al., 2007).

### **3.1. Superfícies de Implantes**

Desde o início dos anos 80, várias equipes tentaram melhorar a superfície dos implantes, acrescentando novos materiais: pulverização de plasma de titânio (TPS) ou hidroxiapatita (HA) (LUTHY; STRUB e SCHARER, 1987; BOWERS et al., 1992). Outros

tipos de tratamento de superfície foram também propostos: jato de areia, ataque ácido (HCl – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HFNO<sub>3</sub>). O objetivo dessas técnicas é melhorar a qualidade da osseointegração e aumentar a superfície de contato. Elas têm por base novos conceitos de textura e tipo de superfície, como mostrado na Tab. 3.1.

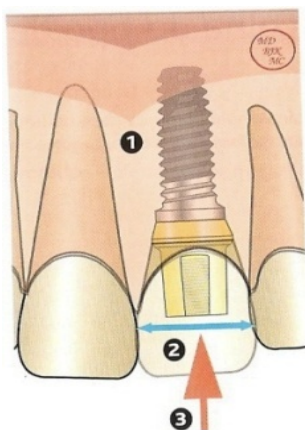


Figura 3.1- O implante deve obedecer as três condições citadas acima. (DAVARPANA et al., 2007)

Tabela 3.1 - Características de diferentes superfícies (DAVARPANA et al., 2003)

Superfície Características	Superfície usinada	TPS	HA	Tratamento com areia TiO	Ataque por NF – NO <sub>3</sub>	Ataque por HCl – H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Contaminantes presentes	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Partículas projetadas	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Superfícies acrescidas	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Forças de desprendimento	Fracas	Moderadas Elevadas	Elevadas	Moderadas	Fracas Moderadas	Elevadas
Contato osso-implante	Fracas	Moderado	Elevado	Moderado	Fraco Moderado	Elevado

As técnicas TPS e HA modificam a superfície do implante por um processo aditivo. Já as técnicas que utilizam o tratamento com ácido ou jato de areia são processos subtrativos que permitem eliminar partículas microscópicas da superfície do implante, criando assim uma morfologia irregular. Os métodos subtrativos aumentam a superfície sem contaminação por micropartículas adicionadas. A camada de titânio comercialmente puro é preservada por este processo. A probabilidade de contaminação da superfície e de disseminação de micropartículas nos tecidos é reduzida.

Entre os diferentes tratamentos de superfície com ácido estudados, a combinação HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> parece ser a mais fraca para a obtenção de uma superfície uniformemente rugosa. A análise da topografia de um implante tratado com esse tipo de ácido mostra picos

de 0,3 a 1,5 micra (medida horizontal) e de 1 a 2 micra em altura (medida vertical). O conhecimento dessas dimensões é importante, uma vez que, existe a tendência da matriz óssea se inserir dentro dos poros de 1 a 2 micra.

Uma superfície rugosa favorece a adesão e a inserção celular (MASUDA et al., 1997). Entretanto, numerosos estudos demonstraram os riscos de mucosite e/ou de periimplantite utilizando implantes de superfície rugosa. Observações em longo prazo nos implantes de titânio de superfície lisa relataram uma saúde perfeita dos tecidos moles. Esta superfície ofereceu a maior compatibilidade com a mucosa periimplantar. Com isso, novas superfícies foram concebidas para responder tanto às necessidades dos tecidos moles quanto às do osso. A parte coronária do implante, até a terceira espira aproximadamente, apresentou uma superfície lisa. A partir da terceira espira até o ápice, a superfície era tratada com ácido (HCl – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Essa associação de duas superfícies garantiu a perenidade dos tecidos moles no nível da plataforma do implante e favoreceu uma melhor osseointegração graças à uma maior rugosidade da superfície tratada.

A interação entre implante com o sistema e os tecidos ósseo, conjuntivo e epitelial vem a ser o fator determinante no sucesso longitudinal de implantes endósseos. Predominantemente, a maioria dos estudos em relação ao contato entre implante e os tecidos biológicos têm se concentrado na interface osso/implante, já que o conceito de osseointegração se baseia na previsibilidade desta interface.

Contudo a busca por uma superfície ideal continua e os fabricantes trabalham com diferentes tecnologias, sendo que todas apresentam um aspecto em comum que é aumentar a rugosidade da superfície usinada do titânio; uma vez que o aumento da rugosidade da superfície resulta em aumento na superfície de contato com o tecido ósseo (WENNERBERG et al., 1998) e, além disso, diversos estudos com culturas de células ósseas mostraram que os osteoblastos têm predileção pelas superfícies rugosas, apresentando maior espalhamento de seus processos citoplasmáticos, aumento do número de mitoses e produção de componentes da matriz do que em superfícies usinadas de titânio.

Recentemente alguns fabricantes passaram a jatear a superfície de seus implantes com partículas de óxido de titânio; que apesar de representarem um maior custo no processo de fabricação diminuíram as fontes de contaminação, aumentando a biocompatibilidade da superfície dos implantes. Além disso, ensaios biomecânicos mostram que as superfícies usinadas apresentam os menores valores de remoção ao torque, quando comparadas às superfícies jateadas e às atacadas por ácido; e as atacadas por ácido mostraram maiores valores de remoção ao torque que as jateadas.

As superfícies lisas não permitem uma adesão osso-célula aceitável. Em geral, elas levam a um “encapsulamento fibroso”, qualquer que seja o material do implante utilizado.

Uma certa irregularidade da superfície parece, pois, necessária para permitir uma adesão celular adequada. O inconveniente das superfícies recobertas por uma pulverização de plasma de titânio é que, ao aumentar a superfície do implante, a retransmissão iônica é aumentada, criando talvez assim uma alteração da osseointegração.

Vários parâmetros envolvidos na remodelação do osso marginal estão associados tanto ao material usado (geometria e textura de superfície do implante, e dos componentes transmucosos) quanto aos procedimentos clínicos e as condições teciduais prévias (ABRAHAMSSON et al., 1996 e 1999; BERGLUNDH et al., 1991; HERMANN et al., 2000; ROMPEN et al., 2003).

Estudos histológicos (VIDIGAL JR. et al., 1999; GOTTLANDER et al., 1992) mostraram que implantes de titânio recobertos com uma fina camada de hidroxiapatita, com cerca de 50 – 100  $\mu\text{m}$  de espessura apresentaram maiores quantidades de osso mineralizado na interface com o implante, em períodos curtos de tempo, cerca de 3 – 6 meses, quando comparados aos implantes de TiCp usinados. Quando a superfície do titânio é tocada por outro metal, há a transferência de íons para o titânio, modificando-lhe a superfície; denomina-se esta forma de contaminação de transferência metálica.

Diversas superfícies de implante vêm sendo criadas por meio de jateamento ou bombardeamento com partículas de maior granulação de superfície, seguidos, algumas vezes, de condicionamento ácido. Esta área de superfície otimizada, em geral, permite uma maior área de transferência de carga de osso contra a superfície do implante. A capacidade de definir o que é a rugosidade de superfície tem levado a controvérsias na literatura. Vários pesquisadores definiram como rugosidade de superfície ideal aquelas nas quais existe a presença de fissuras ou cavidades de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  (ALBREKTSSON, 1983; JOHNS, JEMT e HEATH, 1992). Estas características macromecânicas de superfície influenciam de certa forma, o processo de osseointegração secundária (OESTERLE; CRONIN e RANLY, 1993; QUIRYNEN; NAERT e VAN STEENBERGHE, 1992). Uma vantagem adicional do ataque ácido ou do crescimento eletromecânico do óxido é de aumentar a rugosidade da superfície jateada, como também de limpar e remover granulações residuais da superfície do implante (WORTHINGTON; LANG e RUBENSTEIN, 2005).

### **3.2.O Fenômeno da Osseointegração**

O processo de osseointegração vem sendo estudado a muito tempo no intuito de entender adequadamente o processo para que novos procedimentos e técnicas possam ser empregados no sentido de melhorar a qualidade de vida para o ser humano. Na década de quarenta surgiram implantes que eram inseridos sobre o tecido ósseo e ainda, fixavam a

prótese logo após o processo cirúrgico. Mas esta técnica não durou por muito tempo, pois começaram a aparecer sérios problemas periodontais. A partir desta época surgiram vários tipos de implantes fabricados a partir de material biocompatível e foram iniciados os primeiros estudos sobre o processo da osseointegração.

Em 1952, na Suécia, pesquisadores implementaram este novo conceito de implantes osseointegráveis com uma melhor eficácia que foram comprovadas através de métodos experimentais e clínicos, e em geral, suportavam próteses em plena função por longos períodos de tempo. Com isso, este grupo de pesquisadores foram os primeiros a relatarem sobre uma interface de contato direto osso-titânio, sem interposição de tecido mole (BRÅNEMARK et al., 1969).

Para Brånemark a osseointegração é composta de 4 estágios, sendo o primeiro a perfuração e a colocação do implante causando um trauma com coágulos de sangue, uma vez que, o sangue é o primeiro tecido a entrar em contato com a superfície do implante. O segundo estágio é caracterizado pela cicatrização sem a colocação de carga sobre o trauma podendo assim obter a regeneração óssea. Os terceiros e quarto estágios é o implante já osseointegrado, ou seja, apresenta uma maior aposição óssea obtida da resposta à carga mastigatória aplicada (BRÅNEMARK, 1985), como mostra a Fig. 3.2.

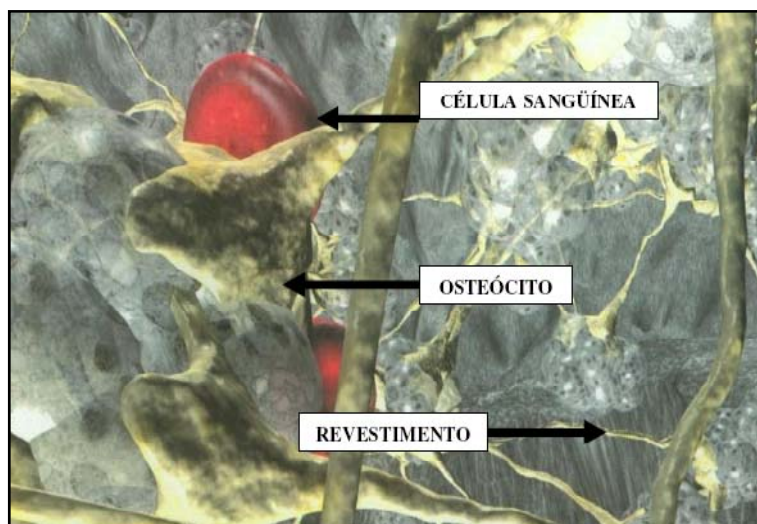


Figura 3.2 – Processo da osseointegração ao redor de um implante (DA SILVA, 2006).

Após muitos estudos, existia muita controvérsia sobre o verdadeiro princípio por não saber se o contato direto entre o osso e o implante era realmente possível de ser alcançado. Então, os autores sugeriram uma nova definição para o processo da osseointegração como sendo a conexão direta, estrutural e funcional entre o tecido ósseo e a superfície do implante em função (BRÅNEMARK, 1985). Não concordando com a definição acima,

Albrektsson et al. (1990), definiu a osseointegração como sendo uma coexistência estrutural e funcional, possivelmente de forma simbiótica, entre o tecido biológico diferenciado e adequadamente remodelado com componentes sintéticos duráveis, definido e controlados, com função clínica específica e sem rejeição mecânica. A Figura 3.3 mostra a morfologia básica do processo de osseointegração.

Davies (2000, 2003) descreveu o processo da osseointegração em três etapas: hemostasia, formação de tecido de granulação e formação óssea no qual o objetivo é a formação do coágulo que é facilitado quando se trabalha com superfícies rugosas, pois oferecem maior retenção da rede de fibrina. A segunda etapa é caracterizada pela fagocitose de restos teciduais, neoformação vascular e deposição de matriz, formando um arcabouço para emergência do sistema vascular. A formação óssea é composta pela migração das células para a área peri-implantar e conseqüentemente, diferenciação das células em osteoblastos e mineralização da matriz extracelular.

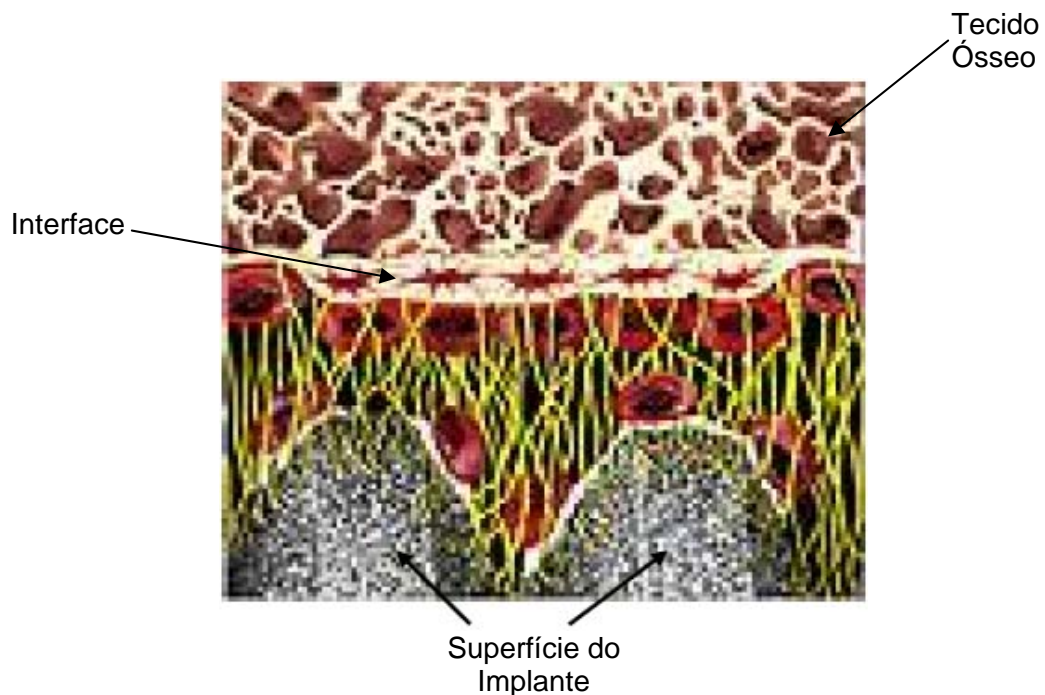


Figura 3.3 – Morfologia básica do processo de osseointegração (DA SILVA, 2006).

Em 1981, Thomaz Albrektsson propôs seis fatores determinantes para a obtenção da osseointegração, quando simultaneamente controlados. Conhecidos nos meios acadêmicos como os seis fatores de Albrektsson:

1. Biocompatibilidade do material;
2. Desenho do implante (macroestrutura);
3. Superfície do implante (microestrutura);

4. Status do leito receptor;
5. Técnica cirúrgica;
6. Condições de carregamento.

O material do implante é um fator fundamental e importante no sucesso do processo da osseointegração. O titânio comercialmente puro (Ticp), o nóbio e o tântalo são tolerados pelo tecido ósseo. A resposta óssea a esses metais depende da camada de óxido de superfície, muito aderente e muito estável no ambiente corporal.

O titânio foi descoberto em 1791 por William Gregor (GIACAGLIA, 2000) e desde então não cessaram os estudos sobre este material. O titânio é considerado biocompatível por apresentar um baixo nível de rejeição e não causar reações imunológicas locais que venham a prejudicar o paciente. Por isso, a maioria dos implantes que existem no mercado são feitos de titânio comercialmente puro tornando-o um dos metais mais importantes na indústria na atualidade por se tratar de um material de baixa densidade e alta resistência à corrosão, além de possuir um módulo de elasticidade relativamente baixo. Os implantes também podem ser encontrados em liga de titânio,  $TiAl_6V_4$ , tendo em vista que esta é mais utilizada para a fabricação de conexões protéticas por possuírem uma boa resistência mecânica.

A caracterização dos biomateriais baseia-se fundamentalmente na avaliação de propriedades físicas e químicas como a composição do material, sua resistência à corrosão e suas propriedades mecânicas (MEFFERT; LANGER e FRITZ, 1992; OLEINICK, 1993). As propriedades físicas do titânio comercialmente puro (Ticp) podem variar de acordo com o grau de impureza de elementos sendo classificado em quatro diferentes tipos, de acordo com os traços dos elementos considerados como impurezas (DA SILVA, 2006). A Tabela 3.1 mostra a composição química do titânio comercialmente puro de acordo com a norma ASTM F 67 e as Tabs. 3.2 e 3.3 mostram as principais propriedades mecânicas do titânio comercialmente puro (GIACAGLIA, 2000).

Um aspecto importante que deve ser analisado e que diz respeito a sua biocompatibilidade que é como o meio biológico responde aos estímulos induzidos pelo material estranho, e ao mesmo tempo, como esse material implantado responde química e fisicamente ao ambiente biológico (GROSS, 1988).

O Ticp é uma liga de titânio e de oxigênio. Em função da porcentagem de oxigênio, distinguem-se quatro tipos de ligas de titânio (normas DIN 17850 e ASTM F67), grau I, II, III e IV, conforme mostrado na Tab. 3.2.

O Ticp comercializado é puro em pelo menos 99,5%. Ele guarda algumas impurezas (N, C, H) (DOSSIERS, 2003). O  $Ti_6Al_4V$  é uma liga muito utilizada. Contém 90% de titânio,

6% de alumínio, 4% de vanádio e uma fração de porcentagem de oxigênio. O alumínio aumenta as propriedades mecânicas e diminui a densidade, ao passo que o vanádio tende a melhorar a resistência à corrosão. A vantagem das propriedades das ligas de titânio deve-se à camada de óxido que aparece na presença de oxigênio e que evita a corrosão. A espessura dessa camada é importante (50 a 200° Å). As moléculas biológicas nunca entram em contato com o metal, pois ele é recoberto por uma camada de óxido de titânio.

As propriedades da superfície do titânio são de fundamental relevância na sua tendência de adsorver átomos ou moléculas estranhas. Diferentes superfícies têm diferentes propriedades de adsorção, e estas diferenças estão intimamente relacionadas com aspectos químicos de biocompatibilidade (MEACHIM, 1993). No Ticp existem vários óxidos havendo uma predominância de TiO e adjacente ao tecido encontra-se o TiO<sub>2</sub> (ALBREKTSSON, 1983). Em meios fisiológicos a camada de óxido é altamente protetora prevenindo o contato entre o meio e o metal base. Isso significa que possivelmente não existe o contato direto entre o metal e seus tecidos hospedeiros, mas certamente entre o tecido e a superfície do óxido formado (KASEMO, 1983).

Tabela 3.2 - Propriedades e composição do Ticp (GIACAGLIA, 2000).

Tipo	Composição Química					
	N (%)	Fe (%)	O (%)	C(%)	H (%)	Ti (%)
Grau I	0,03	0,20	0,18	0,10	0,0125-0,015	99,5
Grau II	0,03	0,30	0,25	0,10	0,0125-0,015	99,3
Grau III	0,05	0,30	0,35	0,10	0,0125-0,015	99,1
Grau IV	0,05	0,50	0,40	0,10	0,0125-0,015	98,9

Tabela 3.3 - Propriedades mecânicas do Ticp (GIACAGLIA, 2000).

Tipo	Condições	Módulo de Elasticidade (10 <sup>6</sup> psi)	Tensão de Ruptura (kpsi)	Tensão de Escoamento (kpsi)	Alongamento (%)
Grau I	Recozido	14,9	38	27	30
Grau II	Recozido	14,9	60	45	28
Grau III	Recozido	15,0	75	60	25
Grau IV	Recozido	15,1-15,5	90-100	75-85	17-20



A força da ligação entre a biomolécula e a superfície determina se haverá ou não dessorção ou substituição das biomoléculas. A hidratação do óxido é um outro processo que provavelmente ocorre e que pode ser muito importante para o estabelecimento de um ambiente químico apropriado para as biomoléculas como mostrado na Fig. 3.4. (PARSEKIAN, 1983).

Inicialmente, ocorre uma adsorção de moléculas de oxigênio que se dissociam imediatamente para átomos como mostra a Fig. 3.5. Após 10 nanossegundos forma-se a primeira camada monoatômica de oxigênio, aproximadamente dentro de um milissegundo, uma camada de óxido de 1nm cuja espessura pode crescer na superfície em poucos segundos, o crescimento de óxido pode-se completar virtualmente para uma espessura de poucos nanômetros; e dentro de 1 minuto, a espessura de óxido estará na ordem de 5 a 10 nm. A espessura, composição química e microestrutura do óxido nesta fase, dependerão de alguns fatores tais como: pressão e velocidade de usinagem, que determinam a temperatura da superfície, desta forma pode-se esperar variações consideráveis da superfície de óxido com diferentes condições de usinagem (KASEMO, 2002).

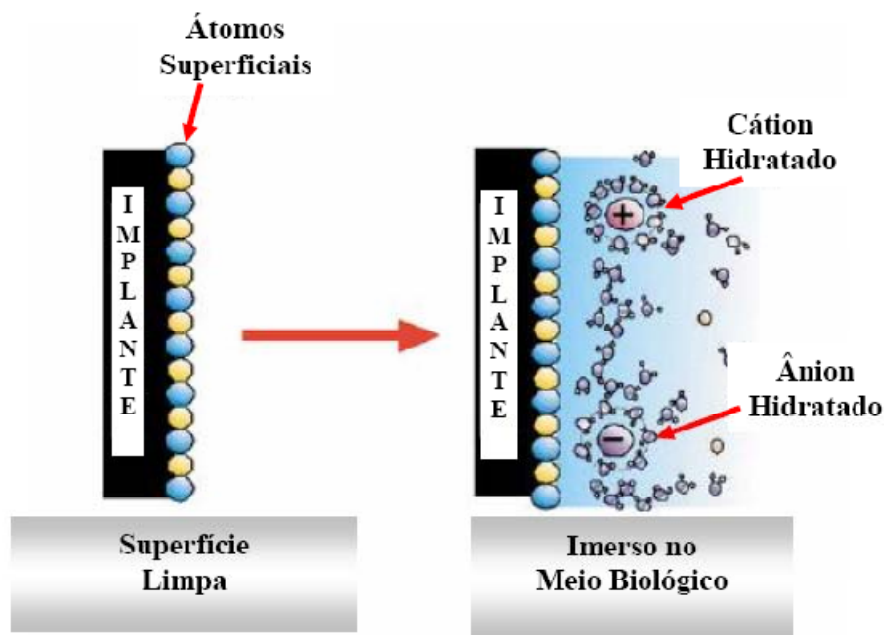


Figura 3.4 – Processo de hidratação da superfície do implante (KASEMO, 2002).

Um fator indispensável nesta abordagem é como a superfície do material interage com a água. Se a superfície se ligar fortemente com a água, ou seja, se for uma superfície hidrofílica, a proteína com sua cápsula de água considerará a superfície como similar à água. Essa proteína provavelmente interagirá com o material indiretamente, através da

intermediação de uma camada de água, e permanecerá em seu estado conformacional normal. Se, ao contrário, a superfície repelir ou tiver uma ligação frágil com a água, ou seja, se a superfície for hidrofóbica, a proteína estará mais próxima a formar ligações diretamente com os átomos da superfície, os quais poderão causar então mudanças conformacionais ou sua desnaturação. Essa é mais uma combinação da microarquitetura e de composição química da superfície a fim de determinar completamente a interação mútua entre o implante e o sistema biológico. Outros fatores são também importantes, como posicionamento do implante durante o procedimento cirúrgico e condições cicatriciais (KASEMO, 2002).

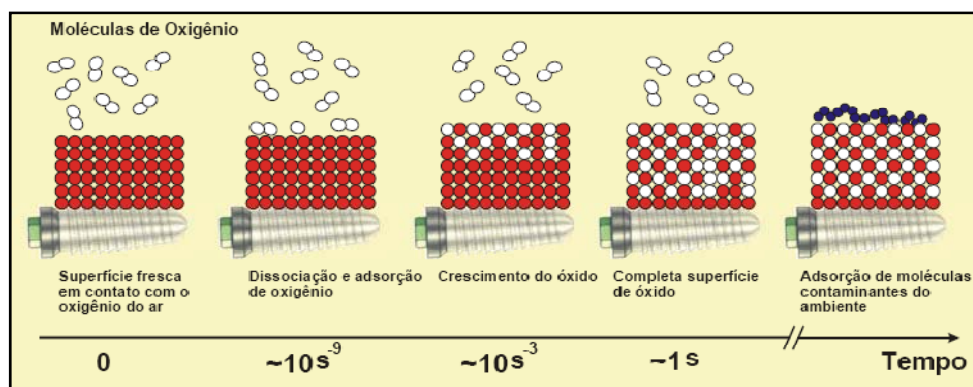


Figura 3.5 - Oxidação da superfície do implante (KASEMO, 2002).

Além dos fatores citados acima, a caracterização da superfície influencia no processo da osseointegração e no desempenho do implante. Na Fig. 3.6 é mostrado como ocorre a interação das células, proteínas e água ao redor de um implante após a inserção em um paciente.

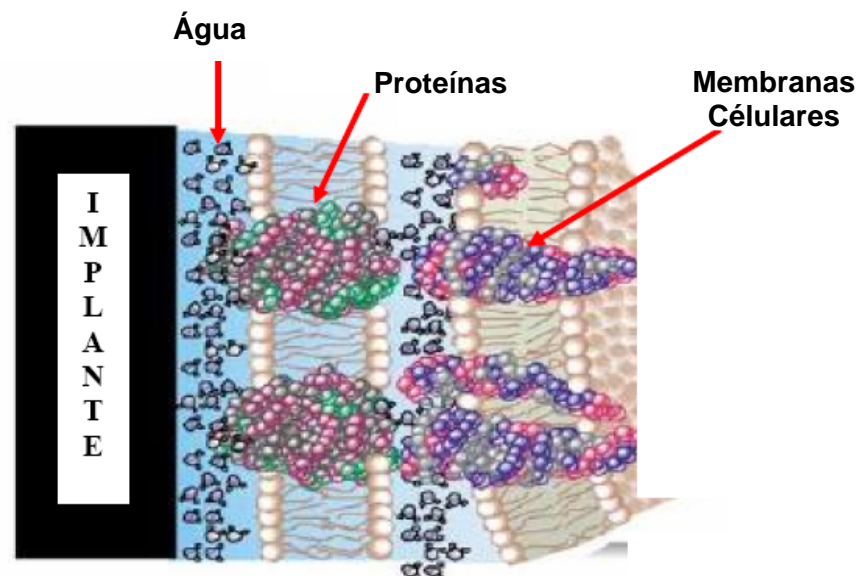


Figura 3.6 – Esquema do processo da Osseointegração(KASEMO, 2002).

A Figura 3.7 mostra que o contato osso-implante não é uniforme. A qualidade da osseointegração depende da percentagem de contato direto osso-implante. A definição é, portanto, fundamentada essencialmente na estabilidade do implante e na análise radiográfica. Clinicamente, a osseointegração se traduz por um ancilose, isto é, a ausência de mobilidade do implante.

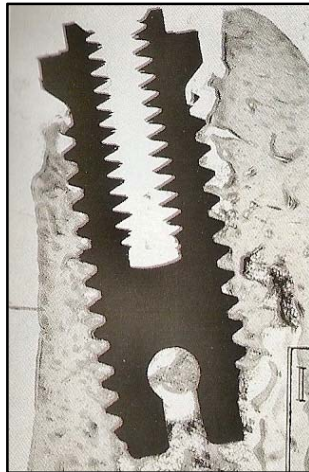


Figura 3.7 – Corte histológico de um implante osseointegrado (DAVARPANA et al., 2003).

O osso possui um forte potencial de regeneração ao redor dos implantes. Qualquer que seja o osso considerado, o mecanismo da cicatrização é idêntico. As condições necessárias para a obtenção de reparação óssea satisfatória é a presença de células adequadas, um estímulo apropriado e uma nutrição adequada dessas células.

A primeira etapa da cicatrização é a substituição de um tecido ósseo periimplantar não vivo. Entre as paredes ósseas do sítio cirúrgico e a superfície do implante, uma neoformação óssea se produz rapidamente, como mostra a Fig. 3.8. Este osso é imaturo, de tipo trabecular. É, portanto pouco resistente às forças de mastigação.

A segunda etapa diz respeito à remodelação deste osso durante diversos meses. Se um prazo satisfatório for observado antes da colocação em função do implante, os espaços entre as trabéculas do osso imaturo serão cobertos de osso maduro (laminar). A maior parte do espaço osso-implante será assim preenchida por tecido ósseo, persistindo uma interface não-óssea em contato com o implante. O osso compacto então formado será bastante resistente para suportar as forças oclusais. Estima-se que o tempo necessário para a formação do osso compacto no nível da interface do implante é de aproximadamente 18 semanas.

Observações em microscópio ótico mostram a presença de osso maduro cortical periimplantar e uma interface osso-implante ao final do período de cicatrização.

Habitualmente o osso cortical está em contato com o implante em sua porção coronária. O osso trabecular está em contato direto com a superfície do implante. Quando o implante está em função, um osso cortical se forma por um período mais longo, ao redor do implante.

A presença de tecido conjuntivo entre o osso e o implante é sinônimo de fracasso, como representado na Fig. 3.9.

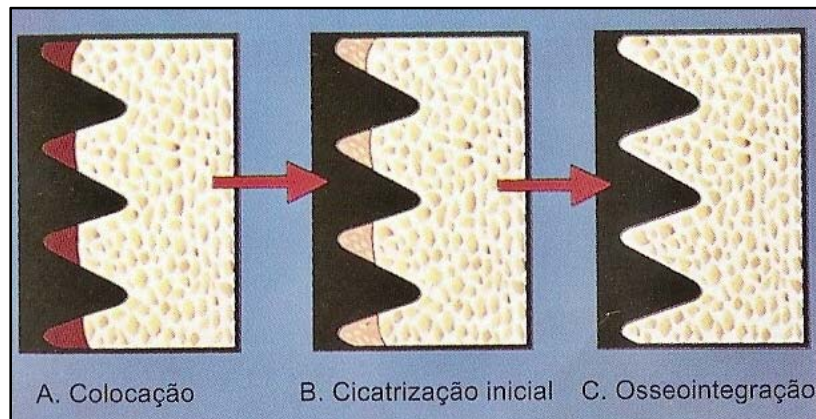


Figura 3.8 – Cicatrização óssea. (A) Na inserção do implante quando forma uma zona de necrose. (B) Início da formação óssea entre o implante e o osso. (C) Implante osseointegrado (BRÅNEMARK, 1985)

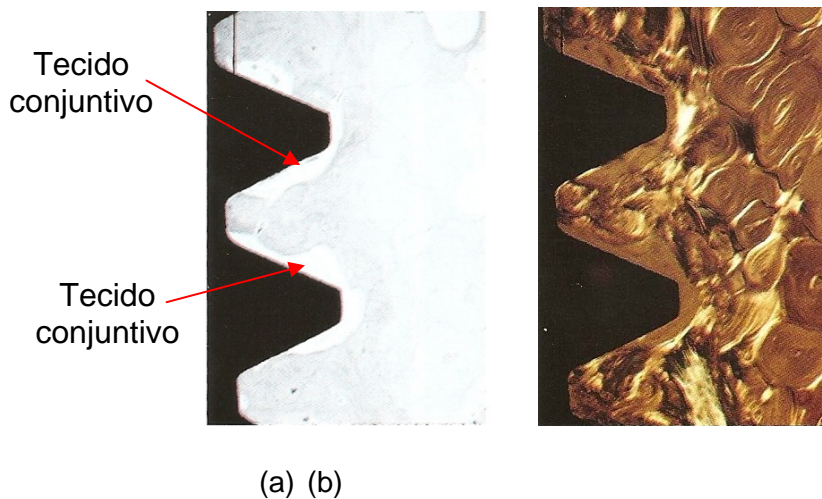


Figura 3.9 – (a) Tecido conjuntivo na interface osso-implante. (b) O mesmo corte com luz polarizada (DAVARPANA et al., 2003).

A conservação da osseointegração exige uma remodelação contínua do osso no nível da interface e do osso de suporte vizinho, como mostra a Fig.3.10.

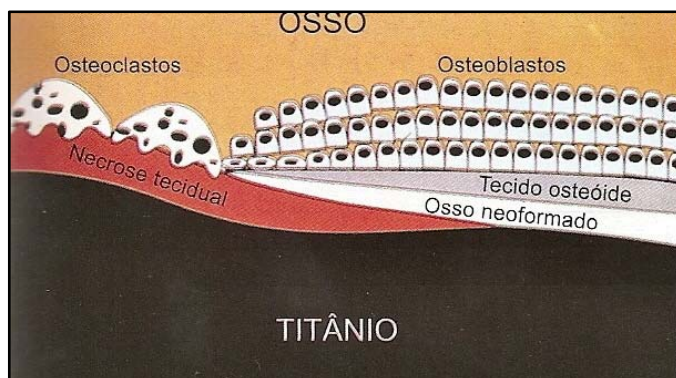


Figura 3.10 – Influência das células na remodelação óssea (DAVARPANA et al., 2003).

Inúmeros fatores (LUTHY; STRUB e SCHARER, 1987; BOWERS et al., 1992; MASUDA et al., 1997; DZIEDZIC et al., 1996; ALBREKTSSON, 1983; JOHNS; JEMT e HEATH, 1992; OESTERLE; CRONIN e RANLY, 1993; QUIRYNEN; NAERT e VAN STEEBERGHE, 1992) podem influenciar a cicatrização óssea ou osseointegração. Podem ser citados:

- Idade do paciente, sexo, doenças cardiovasculares, doenças do metabolismo ósseo, doenças endócrinas, doenças reumáticas, doenças hematológicas, medicações, doenças malignas;
- Tabagismo, alcoolismo;
- Integridade dos tecidos moles que recobrem o sítio do implante e a capacidade de osteogênese e de remodelação óssea;
- Estado da mucosa;
- Quantidade e qualidade óssea;
- Estabilidade primária do implante;
- Grau de reabsorção;
- Doenças periodontais;
- Defeitos congênitos.

A biomecânica da osseointegração também estuda as propriedades dos tecidos que irão alojar a fixação, a configuração do osso receptor e a ação dos músculos sobre estes, quando estiverem se osseointegrado e, futuramente, em funcionalidade. As qualidades metalúrgicas e mecânicas dos instrumentais utilizados no preparo do leito e na inserção dos implantes também são objetos de estudo da biomecânica.

Didaticamente, pode-se dividir a biomecânica para os tecidos biológicos e para os elementos mecânicos em biomecânica Intrínseca e biomecânica Extrínseca (NAERT; VAN STEENBERGHE e WORTHINGTON, 1998)



### 3.3. O Processo da Osteogênese

O tecido ósseo é classificado histologicamente em osso cortical que reveste externamente os ossos do corpo humano, e no qual cerca de 90% do volume apresenta-se calcificado; e osso esponjoso, que se divide em osso medular e osso trabecular, e que apresenta cerca de 15 - 20% do seu volume calcificado. As forças transmitidas ao osso cortical são dissipadas pelo osso trabecular. O osso apresenta um metabolismo dinâmico e sua taxa de renovação anual oscila entre 5 e 10%, sendo que o osso esponjoso apresenta uma área maior para as trocas metabólicas que o osso cortical.

O osso pode ser classificado em (LEKHOLM e ZARB, 1985; DAVARPANAH et al., 2007):

- Classe I: constituída quase exclusivamente de osso compacto homogêneo;
- Classe II: osso compacto espesso ao redor de um núcleo esponjoso com trabeculado denso;
- Classe III: osso cortical fino ao redor de um núcleo esponjoso com trabeculado denso;
- Classe IV: osso cortical fino ao redor de um núcleo esponjoso pouco denso.

Existem diversos fenômenos celulares que resultam em células adequadas, descritas como,

- a) Osteoblastos: células de origem local que produzem a matriz óssea;
- b) Osteócitos: células do osso vivo que podem participar dos processos de remodelação;
- c) Osteoclastos: células derivadas da linhagem sangüínea mononucleada, responsáveis pela reabsorção óssea, cuja ativação é igualmente dependente dos osteoblastos e dos osteócitos;
- d) Células indiferenciadas multipotentes mesenquimatosas que podem ser estimuladas para uma indução osteogênica por transformação em osteoblastos;
- e) Uma quantidade apropriada de tecido mole neoformado que inclui capilares.

O osso é apto a desempenhar função e ser carregado em um nível fisiológico. Cargas abaixo deste nível resultam em atrofia tanto da massa óssea como de sua estrutura. Este limite de carregamento do osso é cerca de 10% do seu limite de resistência (NAERT, VAN STEENBERGHE e WORTHINGTON, 1998).

O osso possui um forte potencial de regeneração em torno dos implantes. Qualquer que seja o tipo de osso considerado, o mecanismo de cicatrização é idêntico. As condições necessárias à obtenção de uma reparação óssea satisfatória são:

- presença de células adequadas;
- nutrição adequada dessas células;
- estímulo apropriado para a reparação óssea.

Durante o processo de cicatrização pós-operatório, na osseointegração estão envolvidos três tipos de osso: osso imaturo, lamelar e composto. O osso imaturo é o osso que além de ser altamente celular, apresenta uma velocidade alta de formação, possui uma baixa quantidade de mineral, as fibras que o constitui apresentam uma orientação desordenada e possui uma resistência pobre. O osso imaturo também desempenha um papel importante na fixação do implante nas fases iniciais da cicatrização. Além disso, o osso imaturo necessita de uma resistência às forças da mastigação e quem fornece uma melhor resistência a estas forças é o osso trabecular que é o componente predominante da interface osso/implante. Já o osso lamelar se forma com uma velocidade mais lenta (menos de 1µm/dia), possui também uma rede de fibras expostas organizadamente e mineralizadas. E finalmente, o osso composto é uma combinação do osso lamelar para-vascular depositado em uma matriz imatura e a formação do osso composto é um passo importante na estabilização do implante durante o processo da osseointegração.

A resposta do osso cortical a um implante integrado envolve cinco importantes estágios fisiológicos:

- Formação do calo: uma resposta citoquina dirigida inicial, para estabilizar a fixação (0,5 mês);
- Maturação do calo: compactação lamelar, a remodelação e redução do calo (0,5 a 1,5 mês);
- Fenômeno de aceleração regional (FAR): remodelação da interface não-vital e osso de suporte (1,5 a 12 meses);
- Maturação da osseointegração: complemento do FAR, mineralização secundária do novo osso e aumento do contato direto na interface (4 a 12 meses);
- Manutenção da osseointegração a longo prazo: remodelação contínua localizada para reparar os danos causados por fadiga nos ossos da interface e de suporte (superior a 12 meses).

Em condições ideais, a reparação não produz cicatriz. O osso morto vai conservar uma capacidade de suportar certas forças e então contribuirá à função; e, quando a

reabsorção óssea predomina, a cicatrização ocorre por formação de tecido fibroso que marca a ausência de osseointegração, como mostrado na Fig. 3.11.

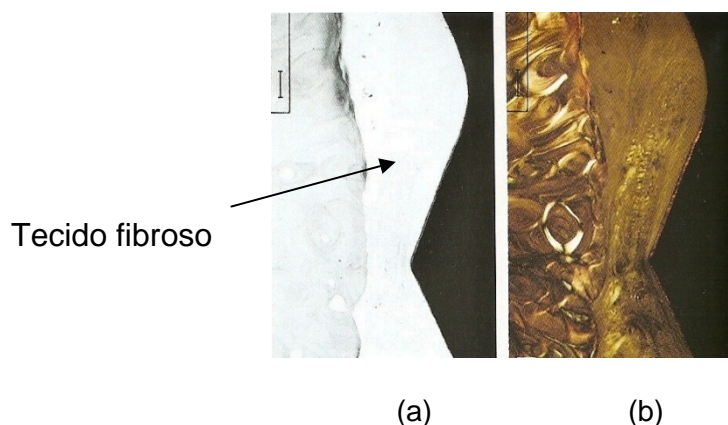


Figura 3.11- Fracasso total do implante. (a) Presença de tecido fibroso entre o osso e o implante. (b) Mesmo corte com luz polarizada (DAVARPANA et al., 2003).

A resposta inicial do tecido ósseo após a instalação do implante é caracterizada por uma reação inflamatória que se desenvolve devido ao trauma cirúrgico local e a presença do implante. Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes, ocorre uma lesão do tecido ósseo rompendo vasos sanguíneos (HUNT, 1990; DAVIES, 2003; FRANCHI et al., 2005). O sangue entra em contato com a superfície do implante, que será recoberta por uma camada de proteínas plasmáticas que irão definir a resposta celular subsequente, uma vez que as células interagem inicialmente com as proteínas e não com a superfície do implante (PUELOe NANJI, 1999; DAVIES, 2000). Em poucos minutos o sangue extravasado sofre coagulação, ocorrendo ativação plaquetária, liberação de fatores de crescimento, fatores vasoativos, e formação da rede de fibrina, através da qual as células inflamatórias migrarão (MARCOet al., 2005). Os neutrófilos são as primeiras células a atingir o sítio do implante, mas em seguida os macrófagos tornam-se predominantes, sendo encontrados na interface osso-implante tanto nos momentos iniciais da cicatrização peri-implantar, como após a neoformação óssea (PARK e DAVIES, 2000; SOSKOLNEet al., 2002). Células da linhagem osteogênica ou mesmo células mesenquimais, quando estimuladas por citocinas e fatores de crescimento liberados pelos macrófagos e plaquetas, migram para a região peri-implantar, ligam-se a camada de glicoproteínas plasmáticas adsorvidas na superfície do implante, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a deposição de matriz óssea (REFAIet al., 2004; MARCOet al., 2005). Este processo, conhecido como osteogênese de contato, ocorre a partir da superfície do implante em direção à superfície óssea. Entretanto, este não é o único processo responsável pela formação óssea ao redor dos implantes. Na osteogênese à distância, o tecido ósseo é formado a partir de células osteogênicas



presentes no tecido ósseo peri-implantar, resultando na formação óssea em direção ao implante (DAVIES, 2003; MARCO *et al.*, 2005).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada, conferindo a este tecido, propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também concentram fosfato e cálcio, participando da mineralização da matriz (WATZEK, 2004; ZAFFE, 2005). A Figura 3.12 mostra a microestrutura do osso cortical.

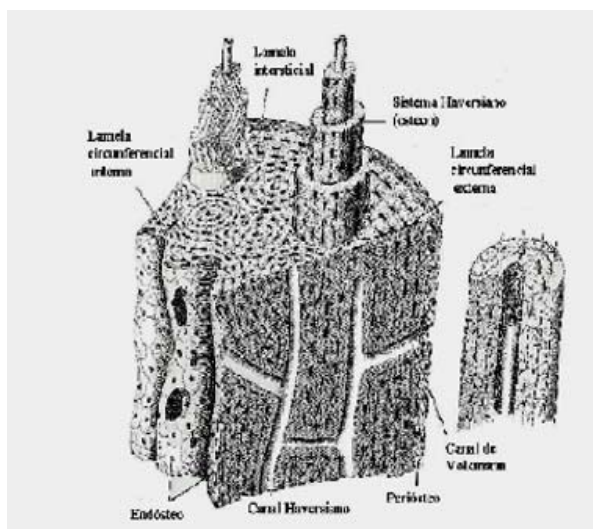


Figura 3.12 - Vista esquemática da estrutura óssea. (PRADO DA SILVA, 2006)

O componente orgânico da matriz, produzido pelos osteoblastos, é predominantemente constituído pela proteína colágeno do tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágenos tipo III e V (5%). As proteínas não colagênicas da matriz, juntas, perfazem os 10% restantes (TZAPHILIDOU, 2005). As proteínas não colágenas da matriz são importantes na mineralização, organizam a matriz extracelular, controlam as interações célula-célula, célula-matriz, e enviam sinais para as células ósseas (DAVIES, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; WATZEK, 2004).

A osteopontina (OPN) é expressa nos estágios iniciais da osteogênese, antes da diferenciação das células ósseas e após o início da mineralização (DAVIES, 2000; YOUNG, 2003; DE OLIVEIRA e NANJI, 2004).

A mineralização da matriz óssea é regulada pelas proteínas da matriz e por enzimas, principalmente pela fosfatase alcalina (ROSA e BELOTI, 2003; XAVIER *et al.*, 2003; DECLERCQ *et al.*, 2005). Em cultura de células osteogênicas, um aumento nas atividades de fosfatase alcalina (ALP) marca o início da mineralização e a diferenciação das células osteogênicas em fenótipo de osteoblasto (DECLERCQ *et al.*, 2005; DAVIES, 2003; BELOTI e ROSA, 2005).

Variações na topografia do implante influenciam a adesão dos macrófagos e osteoblastos e podem influenciar a produção e a concentração dos fatores de crescimento no sítio peri-implantar (SCHWARTZ e BOYAN, 1994). A síntese de colágeno, de matriz extracelular, de citocinas e fatores de crescimento, são favorecidas pela rugosidade superficial do implante (ROSA e BELOTI, 2003).

O estudo “*in vitro*” da osteogênese tem sido impulsionado por pesquisas utilizando biomateriais na ortopedia e na implantodontia, principalmente após o advento da osseointegração (DAVIES, 2003). Essas culturas podem ser feitas a partir de osteoblastos da calvária de roedores neo-natos, de “*explants*” ósseos, células da medula óssea de humanos ou de animais, e também a partir de linhagens celulares imortalizadas (DAVIES, 2000; HENG *et al.*, 2004). Logo, em uma mesma cultura pode haver células monopotenciais e células multi ou bi potenciais (ANDRADES *et al.*, 1999; DAVIES, 2000; YAMADA *et al.*, 2000).

Estimativas feitas por diluição indicam que células osteoprogenitoras estão presentes em baixa frequência em cultura proveniente de calvária (<1%), e medula de rato e camundongo (<1%) (AUBIN, 1999).

Osteoblastos provenientes da calvária de rato analisados com dois marcadores (ALP e PTH) no 21º dia de cultura são expressos simultaneamente indicando a presença de células em diferentes estágios de diferenciação. Dessa forma, osteoblastos histologicamente idênticos, completamente diferenciados, são molecularmente heterogêneos (DAVIES, 2000).

Hormônios e citocinas regulam a atividade osteoblástica e sua diferenciação “*in vitro*”, mas existem discrepâncias e até mesmo efeitos opostos quando se comparam células provenientes de medula óssea e células isoladas de outros ossos, embora algumas atividades e princípios sejam comuns (HENG *et al.*, 2004).

Existem evidências crescentes de que algumas ações como crescimento e diferenciação dependem do estágio de diferenciação das células (WATZEK, 2004).

O osso é neoformado por intermédio da osteogênese de proximidade e da osteogênese de contato (BRANEMARK; ZARB e ALBREKTSSON, 1988). O primeiro fenômeno permite a formação de uma trama de tecido conjuntivo ou “plexo de fibrina” periimplantar proveniente da bainha óssea face ao implante. Na osteogênese de contato, a neoformação óssea se faz em contato direto com a superfície implantar graças à aderência do plexo de fibrina. Uma superfície tratada com ácido (HCl – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) permite uma excelente dispersão do sangue e do fluido seroso no momento da colocação do implante. A microtopografia criada por esse tratamento químico aumenta a qualidade de se tornar úmido o titânio comercialmente puro. A presença de rugosidades microscópicas nas superfícies tratadas facilita a retenção do plexo de fibrina.



## CAPÍTULO IV

### ENSAIO “*IN VITRO*” DE CULTURA DE CÉLULAS

Em geral, os experimentos “*in vitro*” são realizados utilizando cultura de células primárias (“*explants*” ósseos), células da calvária de roedores neo-natos, células da medula óssea e linhagem de células derivadas de osteoblastos humanos ou outras espécies sobre diferentes superfícies de corpos de prova (discos de titânio). Neste trabalho o ensaio de cultura de células foi realizado com linhagem de células sobre discos de titânio que sofreram tratamentos superficiais de subtração (jateamento e ataque ácido). Os discos são obtidos de barras de titânio comercialmente puro com condições de superfícies preparadas aos objetivos da avaliação e que, geralmente, possam ser aplicadas aos produtos comerciais.

As culturas realizadas sobre a superfície dos corpos de prova visam a análise dos seguintes parâmetros osteogênicos: proliferação e viabilidade celular, medida da atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada.

Nos ensaios de cultura de células foram utilizados 03 corpos de prova para cada medida analisada, sendo feitas análises após 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o início da cultura de células.

#### 4.1. Preparação dos Reagentes

Os reagentes utilizados na cultura foram preparados previamente, aliquotados na concentração de trabalho e armazenados adequadamente até a sua utilização. O meio total suplementado (MTS) 10%, composto de uma mistura de DMEM com DMEM/F-12 a 10% de soro fetal bovino estéril e inativado (v/v – Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas - SP), bicarbonato de sódio de acordo com o protocolo de cada fabricante do meio e antibiótico, tais como, gentamicina (5 µg/ml) e anfotericina B (2,5 µg/ml). O DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma) tem em sua composição 4,5 g/L glicose o que é considerado meio com alta glicose, L-glutamina. Já o DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium:

Nutrient Mixture F-12 Ham – Gibco) é composto por 15 mM de Substância Tampão HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil]-etanosulfônico), L-glutamina e Vitamina B6 (cloridrato de piridoxina). A Figura 4.1 mostra o meio DMEM e DMEM/F-12 antes do preparo e após o preparo.



Figura 4.1 – (a) DMEM e DMEM/F-12 antes do preparo; (b) DMEM e DMEM/F-12 após o preparo.

Para avaliar a viabilidade celular foi usado o Azul de Tripán 1% que é utilizado para fazer a diluição do sedimento celular auxiliando na contagem de células na câmara de Neubauer. O Azul de Tripán 1% é um indicador que só entra na célula se a mesma estiver morta, caso contrário, a célula fica refringente. A Figura 4.2 mostra uma câmara de Neubauer (Hemocitômetro) e um quadrante da câmara de Neubauer visto com aumento de 40x ao microscópio ótico sem célula e na Fig. 4.3 mostra uma câmara de Neubauer com célula diluída no Azul de Tripán 1%.

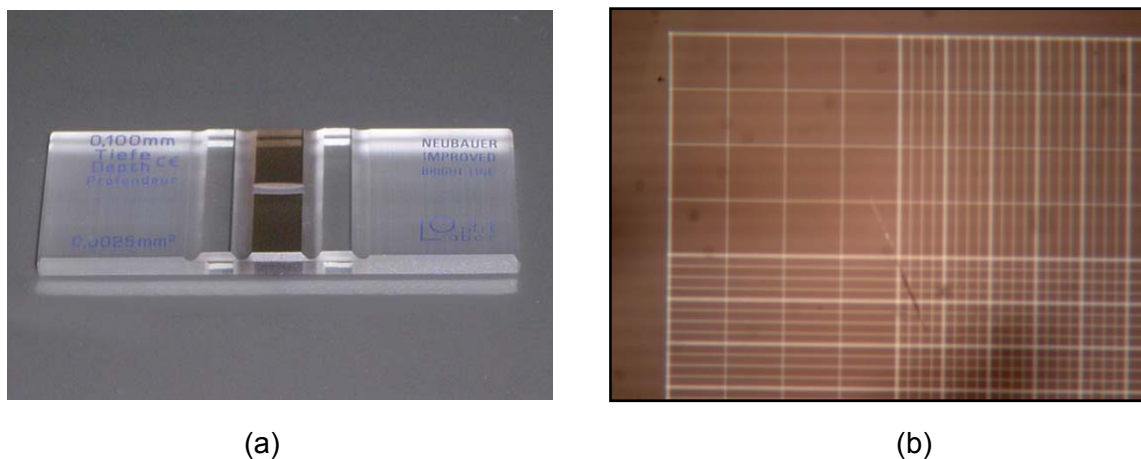


Figura 4.2 – (a) Câmara de Neubauer; (b) Um quadrante da Câmara de Neubauer sem célula visto ao microscópio ótico com aumento de 40x.

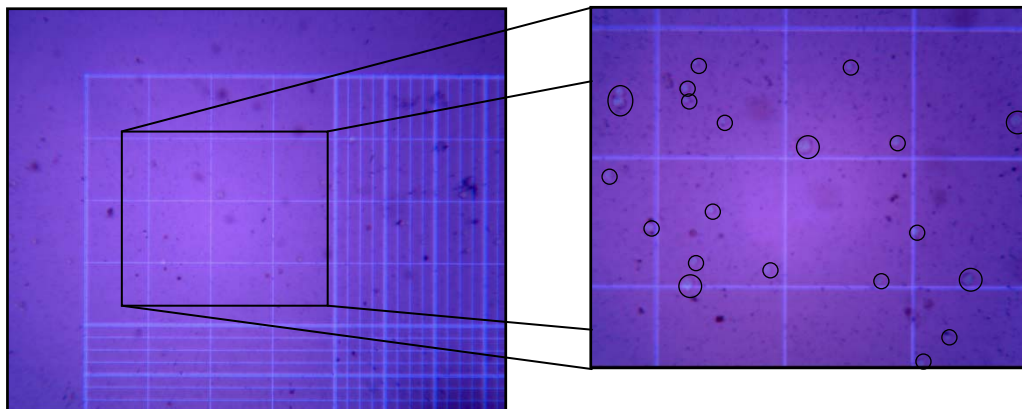


Figura 4.3 – O mesmo quadrante com célula diluída no Azul de Tripán 1% onde se tem destacado nos círculos as células presentes na faixa do zoom do quadrante.

Outro reagente utilizado no ensaio “*in vitro*” é a Solução Tampão Salina – Fosfato pH: 7,2, na concentração de 1x (PBS 1x) que tem em sua composição NaCl (Cloreto de sódio), KCl (Cloreto de potássio),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fosfato dissódico),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fosfato monopotássico). O PBS 1x tem a função de eliminar o soro presente no meio que estava sobre as células quando realiza a lavagem das células, uma vez que, o soro contém componentes que impedem a ação da solução de Tripsina-EDTA que é utilizada para desprender as células do fundo das garrafas para fazer um repique ou plaqueamento. Para preparar o PBS 1x, diluiu-se o PBS 10x (LGC Biotecnologia) na proporção de 1:10. Ou seja, para o preparo de 1 litro de PBS 1x, utilizou 100 ml de PBS 10x e 900 ml de água destilada. Foi feita uma mistura e em seguida levada para autoclavar a fim de esterilizar. Antes do uso em lavagem das células, filtra-se o conteúdo e aliquota em quantidades menores para facilitar o manuseio e prevenir uma possível contaminação mantendo sempre resfriado em geladeira.

Na medida da proliferação e viabilidade celular são utilizados os reagentes MTT (Invitrogen Corporation, EUA) e Isopropanol-Ácido (HCl). O MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) atua nas cristas mitocondriais que identifica a vida das células resultando no sobrenadante roxeado conforme mostra a Fig. 4.4. Para a utilização do MTT, dissolve-se 5 mg de MTT para 1 ml de PBS 1x filtrado e estéril. Após a mistura, conserve em temperatura ambiente até o uso. Por exemplo, 0,025 g de MTT para 5 ml de PBS 1x. O Isopropanol-ácido tem como função parar a reação do MTT sobre as células e é composto por isopropanol e ácido clorídrico (HCl). Para cada 100 ml de isopropanol adicione 400  $\mu\text{l}$  de HCl, misture e armazene em temperatura ambiente até a sua utilização.

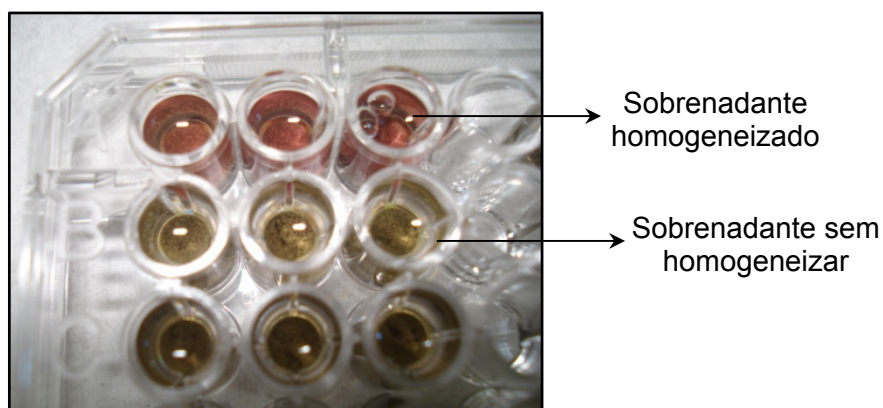


Figura 4.4 – Sobrenadante homogeneizado (cor roxeada) com MTT nas células após 4 horas incubados.

Para a obtenção da medida da atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi utilizado um kit comercial (Sigma, St. Louis, MO, EUA) seguindo as instruções do fabricante aos 7, 14 e 21 dias de cultura. E ainda, neste mesmo ensaio, foi feita a medida do conteúdo da proteína total utilizando o método de Bradford, BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EUA). A Figura 4.5 mostra a placa de cultura sendo realizada o ensaio de fosfatase alcalina onde a parte roxeada mostra a produção de proteína existente.

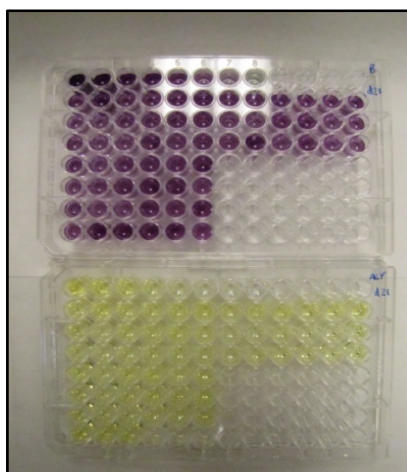


Figura 4.5 – Atividade de fosfatase alcalina sendo quantificada utilizando a quantificação de proteína total (roxeada).

Para a obtenção da medida dos nódulos de mineralização foi utilizado um corante de pigmentação vermelha-laranja derivado originalmente da raiz da garança denominado *Alizarin red S* 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) que tem como composição química  $C_{14}H_7NaO_7S$ . A Alizarin Red S é utilizada para identificar a formação dos nódulos mineralizados (formação de cálcio) sobre as superfícies de titânio após 28 dias de cultura. A solução de Alizarin Red S é preparada em 0.1% hidróxido de amônio (Sigma, St. Louis,



MO,EUA). Na Figura 4.6 mostra a solução de Alizarin Red S sobre os discos durante a pigmentação dos nódulos de mineralização.

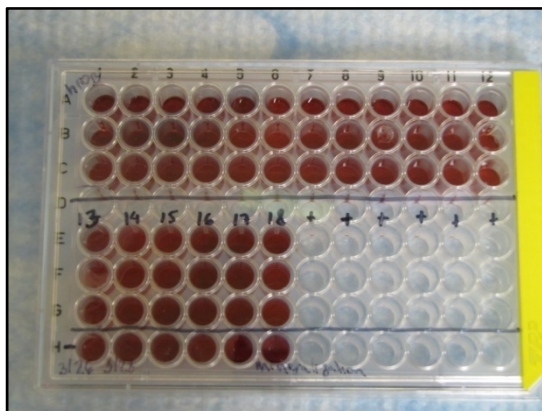


Figura 4.6 – Nódulos de mineralização sendo corados com Alizarin Red S.

#### 4.2. Aquisição das Células

As células da linhagem osteoblástica foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Lyndon Cooper da Universidade da Carolina do Norte – USA. Elas foram armazenadas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> com 5 ml de MTS e levadas para a incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. A Figura 4.7 mostra a capela de fluxo laminar utilizada durante todos os procedimentos do ensaio “*in vitro*” visando evitar a contaminação da cultura. A Figura 4.8 mostra garrafas de cultura com meio pronta para ser transportada para a incubadora e a Fig. 4.9 mostra as respectivas células nessa garrafa.



Figura 4.7 – Capela de fluxo laminar.

O meio de cultura das garrafas de 25 cm<sup>2</sup> foi trocado a cada três dias até obter uma confluência para realizar o procedimento de repique. Na Figura 4.10 mostra uma garrafa com células confluentes prontas para realizar o repique. Obtendo esta confluência, deve-se



retirar o meio de cultura das garrafas, lave três vezes com PBS 1x a fim de remover o soro fetal bovino (SFB) das células.

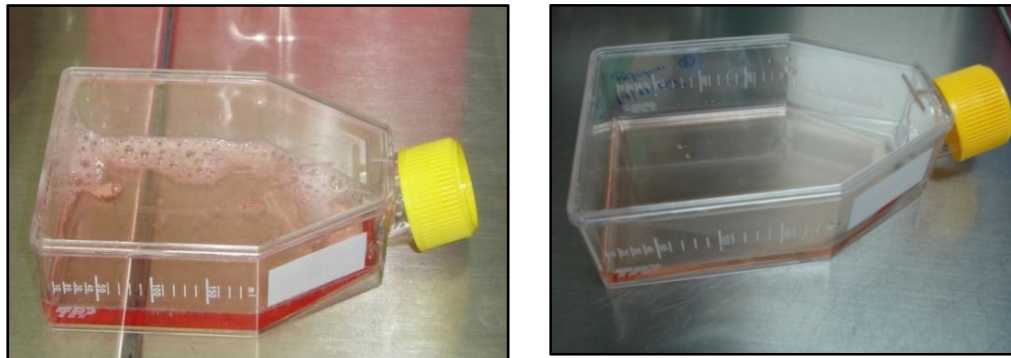


Figura 4.8 – Garrafas de cultura prontas para serem incubadas.

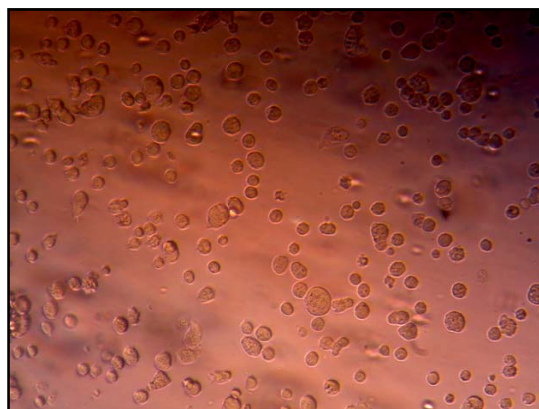


Figura 4.9 – Células dentro da garrafa de cultura no instante zero da cultura.

Após esta lavagem, adicionou-se 1 ml de Solução Tripsina-EDTA. A tripsina é uma solução balanceada com tripsina sem íons, cálcio e magnésio e com um agente quelante que age permitindo o "descolamento" das células do fundo das garrafas e/ou desagregando células entre si através de sua propriedade proteolítica sobre proteínas intercelulares, e ainda alterando a estabilidade das membranas ao quelar o íon cálcio. Adicionado a solução de tripsina na garrafa, deve-se observar no microscópio até que as células adquirem um aspecto redondo e individualizado, deslocando-se da garrafa, pode-se interromper o processo com a adição de 5 ml de meio total suplementado (MTS). A Figura 4.11 mostra células se soltando do fundo da garrafa com a ação da tripsina e formando um aglomerado de células. Como o soro possui alfa 1-anti-tripsina, ele neutraliza a ação da tripsina. Após ter feito isso, as células foram homogeneizadas e transferido 30 ml do meio com células para outra garrafa maior (75 cm<sup>2</sup>) e completando com mais 7 ml de MTS 10% em cada garrafa visando sempre uma maior proliferação das células. Este procedimento de repique é realizado com as outras garrafas de cultura quando atingiram a confluência para o tal. Feito

isso, as garrafas foram colocadas na incubadora a uma temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. A Figura 4.12 mostra as garrafas de cultura de células dentro da incubadora a 37°C e a incubadora utilizada durante todo o ensaio “*in vitro*” de cultura de células.

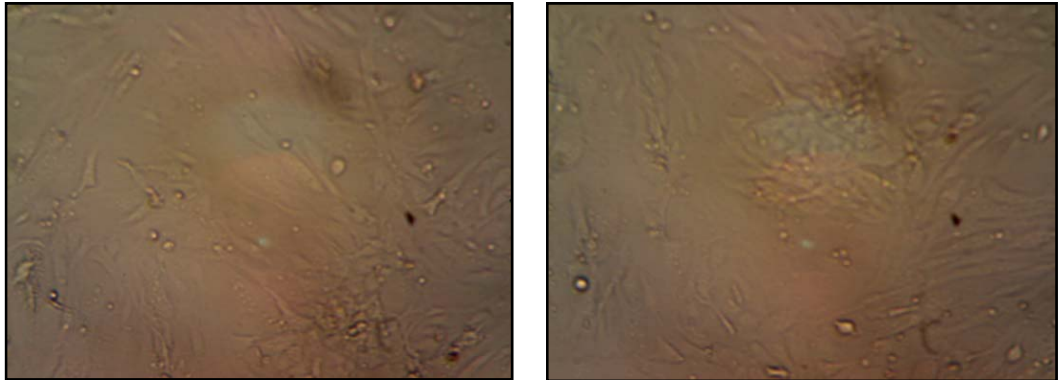


Figura 4.10 – Confluência das células nas garrafas.

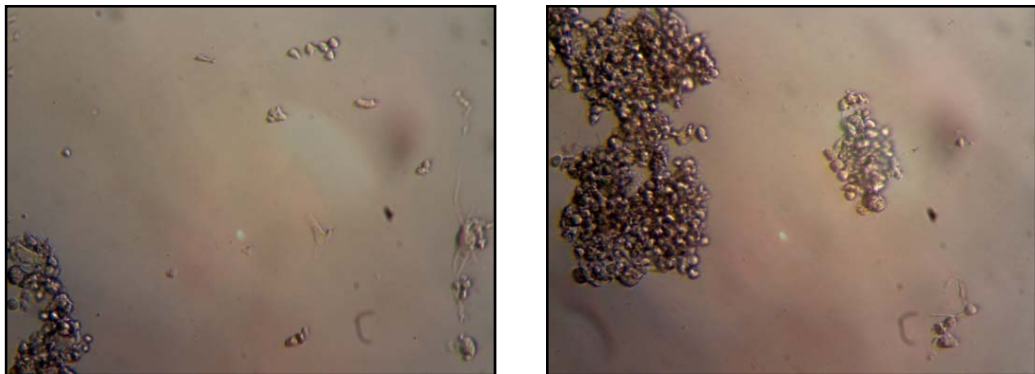


Figura 4.11 – Células “descolando” do fundo da garrafa com a ação da solução de tripsina.



(a)



(b)

Figura 4.12– (a) Garrafas da cultura de células osteoblásticas Hfob 1.19 dentro da incubadora a 37°C; (b) Incubadora utilizada para manter as garrafas na temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> adequadas.

### 4.3. Preparação das amostras

Os discos de titânio utilizados para a obtenção dos parâmetros osteogênicos nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células foram fabricados pela Empresa Neodent Implantes Osteointegráveis, parceira deste trabalho. Todos os discos de titânio possuem diâmetro de 6 mm e espessura média de 2 mm e diferentes tratamentos de superfícies. Considerando a modelagem matemática a ser desenvolvida no Capítulo V é necessário ter-se uma sensibilidade das condições de tratamentos das superfícies, com isso, foram fornecidos pela empresa 18 grupos de superfícies, como mostra a Tab. 4.1. A Tabela 4.2 mostra como foram distribuídos os jateamentos utilizados no preparo das superfícies dos discos de titânio juntamente com a granulometria, o tempo de jateamento, a distância do jato e a pressão do jato que foram exercidos sobre a superfície durante o processo de jateamento. A Tabela 4.3 mostra a variação dos ácidos e a temperatura utilizada nas superfícies dos discos de titânio.

Tabela 4.1 – Grupos de superfícies fornecidos pela Empresa Neodent.

GRUPO	JATO	ACIDO
G01	J1	A1
G02	J1	A2
G03	J1	A3
G04	J1	A4
G05	J1	A5
G06	J1	A6
G07	J2	A1
G08	J2	A2
G09	J2	A3
G10	J2	A4
G11	J2	A5
G12	J2	A6
G13	J3	A7
G14	J4	A7
G15	J5	A7
G16	J6	A8
G17	J7	A7
G18	J8	A7

Tabela 4.2 – Jateamentos utilizados nas superfícies fornecidas pela Empresa Neodent.

	<b>Granulometria</b>	<b>Tempo (s)</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>Pressão (Bar)</b>
<b>J1</b>	240µm	3	10	20
<b>J2</b>	280µm	3	10	20
<b>J3</b>	280µm	4	10	15
<b>J4</b>	280µm	3	15	15
<b>J5</b>	280µm	4	10	20
<b>J6*</b>	---	--	--	--
<b>J7</b>	280µm	3	15	20
<b>J8</b>	280µm	2	10	30

\* Sem Jateamento

Tabela 4.3 – Ataque ácidos utilizados nas superfícies fornecidas pela Empresa Neodent.

	<b>ÁCIDOS</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>
<b>A1</b>	F2	60	30'
<b>A2</b>	F1	60	30'
<b>A3</b>	F1	AMBIENTE	30'
<b>A4</b>	F2	AMBIENTE	30'
<b>A5</b>	F3	60	30'
<b>A6</b>	F3	AMBIENTE	30'
<b>A7</b>	F3	60	1 h
<b>A8</b>	F3	60	2 h

Nos ensaios de cultura de células foram utilizados 03 corpos de prova para cada medida analisada, sendo feitas análises no primeiro dia, sétimo dia, décimo quarto dia, vigésimo primeiro dia e vigésimo oitavo dia após o início da cultura de células utilizando um total de 21 discos. Logo, a quantidade de corpos de prova utilizados foram **378 discos de titânio**. Como pretende-se caracterizar as diferentes superfícies através da determinação da rugosidade, da espessura da camada de óxido de titânio e da energia superficial, utilizou-se adicionalmente 02 amostras para cada condição diferente que implicou em **108 discos** adicionais. Portanto, foram utilizados um total de **486 discos de titânio** como mostra a Tab. 4.4.A Figura 4.13 mostra como cada disco de titânio foi embalado e esterilizado pela Empresa.



Figura 4.13 – Disco de titânio embalado separadamente para evitar contaminação e pronto para o uso.

Tabela 4.4 – Quantidade de discos de titânio fornecida pela Empresa Neodent.

<b>Grupos</b>	<b>Superfície jateada</b>	<b>Superfície tratada com ácido</b>	<b>Quantidade de corpos de prova ensaio “<i>in vitro</i>”</b>	<b>Quantidade de corpos de prova medidas de rugosidade, esp. da camada oxidada e energia superficial</b>	<b>Sub- total amostras</b>
<b>G01</b>	J1	A1	21	06	27
<b>G02</b>	J1	A2	21	06	27
<b>G03</b>	J1	A3	21	06	27
<b>G04</b>	J1	A4	21	06	27
<b>G05</b>	J1	A5	21	06	27
<b>G06</b>	J1	A6	21	06	27
<b>G07</b>	J2	A1	21	06	27
<b>G08</b>	J2	A2	21	06	27
<b>G09</b>	J2	A3	21	06	27
<b>G10</b>	J2	A4	21	06	27
<b>G11</b>	J2	A5	21	06	27
<b>G12</b>	J2	A6	21	06	27
<b>G13</b>	J3	A7	21	06	27
<b>G14</b>	J4	A7	21	06	27
<b>G15</b>	J5	A7	21	06	27
<b>G16</b>	J6	A8	21	06	27
<b>G17</b>	J7	A7	21	06	27
<b>G18</b>	J8	A7	21	06	27
<b>TOTAL</b>					<b>486</b>

#### 4.4. Parâmetros Osteogênicos Analisados

##### 4.4.1. Medida da Proliferação e Viabilidade Celular

Inicialmente foi feito o plaqueamento das células que foram desprendidas do fundo da garrafa, utilizando uma digestão enzimática com solução de Tripsina-EDTA. Com o auxílio de um raspador “tipo falcon” as células foram cuidadosamente desprendidas do fundo da garrafa. A Figura 4.14 mostra a remoção das células aderidas à garrafa após a digestão enzimática, como parte do processo de plaqueamento. As células liberadas, em suspensão, devem ser transferidas para tubos “Falcon” de 15 ml contendo MTS 10%, centrifugadas por 10 minutos a uma velocidade de 2000 rpm.

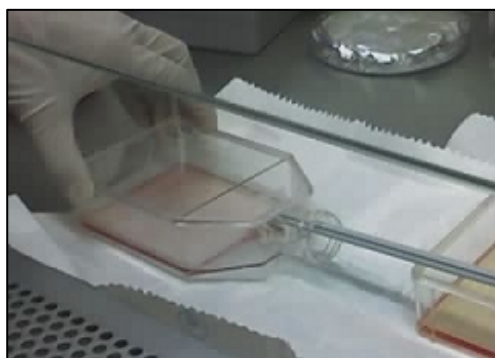


Figura 4.14 – Remoção das células aderidas na garrafa de cultura com o auxílio de um raspador.

A Figura 4.15 mostra os tubos em equilíbrio na quantidade de meio para serem centrifugados e a Fig. 4.16 mostra o equipamento utilizado para centrifugar as células. A Figura 4.17 mostra os tubos posicionados na centrífuga colocados em oposição um em relação ao outro. Após centrifugar, deve-se juntar as células de todos os tubos para efetuar a sua contagem. Para a medida da proliferação e viabilidade celular, tem-se três tempos de análise, 1, 7 e 14 dias, portanto em cada tempo é utilizado uma placa de cultura de 96 poços com a mesma configuração. Assim, em cada placa se tem 54 poços com discos das 18 superfícies diferentes que foram feitos em triplicata (três discos de cada superfície) mais 6 poços como grupo controle resultando em 60 poços por placa e totalizando 180 poços que foram plaqueados para a medida da proliferação e viabilidade celular nos três tempos. A Figura 4.18 mostra o desenho esquemático desta medida para a análise de acordo com as 18 superfícies.



Figura 4.15 – Tubos em equilíbrio prontos para serem centrifugados.

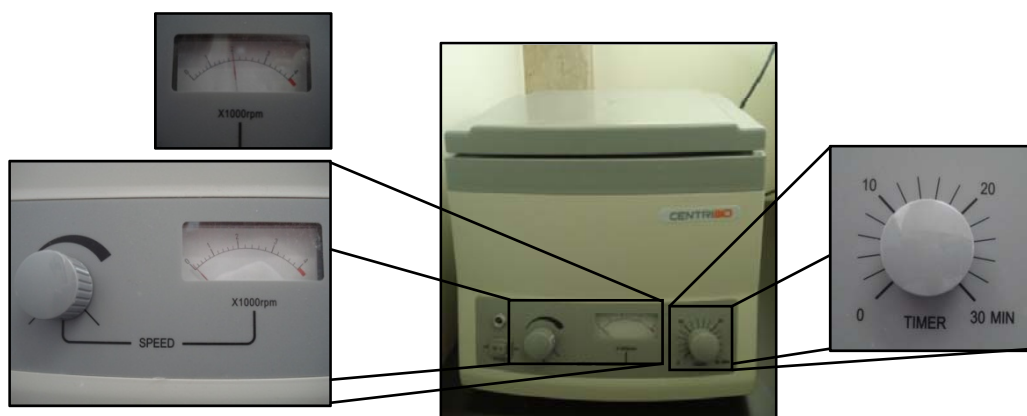


Figura 4.16 – Centrífuga utilizada no ensaio de cultura de células. Em detalhe destaca o marcador do tempo e o regulador da velocidade.



Figura 4.17 – Tubos “Falcon” posicionados dentro da centrífuga.

Ao saber o número de quantos poços utilizados, foi necessário saber o volume total dasuspensão celular que precisará ser plaqueado sendo que sobre cada disco e cada poço controle foram colocados 100  $\mu$ l de suspensão celular. Para isso, basta multiplicar a quantidade de poços utilizados por 100  $\mu$ l. Logo, em uma placa com 60 poços utilizou-se 6 ml de suspensão celular. Para saber o número de células nesses 6 ml, uma vez que, em 100  $\mu$ l encontra aproximadamente  $1 \times 10^4$  células. Portanto, em 6 ml são previstos ter  $6 \times 10^5$  células. Vale ressaltar que este número de células foi para uma placa, como utilizou três



placas para a análise de proliferação e viabilidade celular, multiplicou-se por três esta quantidade de células previstas em 6 ml, logo, em 18 ml foram necessário  $1,8 \times 10^6$  células.

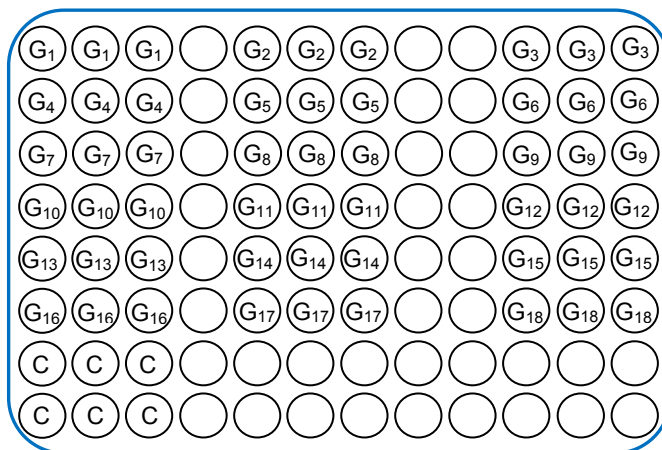


Figura 4.18 – Desenho esquemático da placa de cultura de 96 poços para o plaqueamento e obtenção da medida de proliferação e viabilidade celular.

Finalmente, a contagem das células é feita da seguinte forma:

- Retira-se uma amostra (100  $\mu$ l) do tubo que contém a suspensão celular e mistura-se com um mesmo volume do corante vital Azul de Tripan 1%;
- Coloca-se uma pequena amostra colorida com Azul de Tripan na Câmara de Neubauer para contagem das células;
- Leva-se a câmara de Neubauer para o microscópio ótico conforme mostra a Fig. 4.19 e conta-se quantas células existem, como mostradona Fig. 4.3;
- Em seguida, multiplicou-se por 2 que é o fator de diluição, pois diluiu-se em Azul de Tripan 1%; posteriormente, multiplicou-se por  $10^4$  que é o fator de correção da câmara de Neubauer, obtendo-se a quantidade de células existente em 1 ml de suspensão celular.

Neste estudo, uma amostra colocada na câmara de Neubauer continha 15 células. Logo, 15 células x 2 (fator de diluição) x  $10^4$  (fator de correção) =  $30 \times 10^4$  células =  $3 \times 10^5$  células em 1 ml de suspensão celular.

Como o volume total de sedimento celular foi ressuspenseo em 6 ml, o número de células nesses 6 ml foi:  $3 \times 10^5$  células x 6 ml =  $18 \times 10^5$  =  $1,8 \times 10^6$  células em 6 ml. Em seguida, apenas completou o volume necessário com MTS 10%, uma vez que encontrou o número de células desejado para os 18 ml.

Após a contagem, as células foram plaqueadas sobre as superfícies dos corpos de prova de titânio e dos 6 poços do grupo controle das placas de poliestirenode 96 poços colocando 100  $\mu$ l desuspensão celular como mostrado na Fig. 4.20. Na obtenção desta



medida foram utilizados três placas de poliestireno para cultura como mostra a Fig. 4.21. Na sequência, as placas foram levadas para a incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

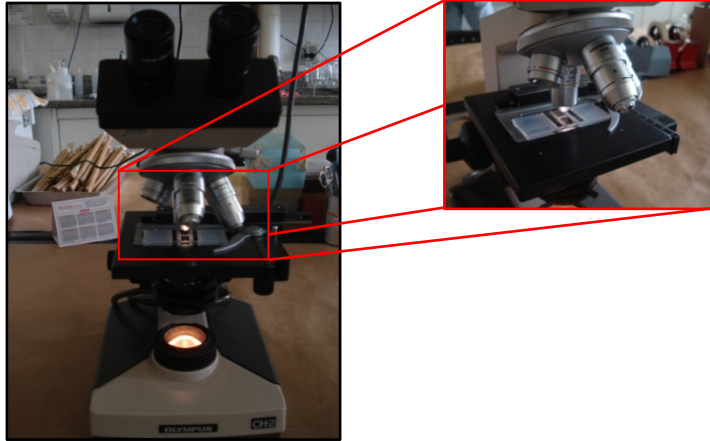


Figura 4.19 – Microscópio Ótico com a câmera de Neubauer para a contagem das células.

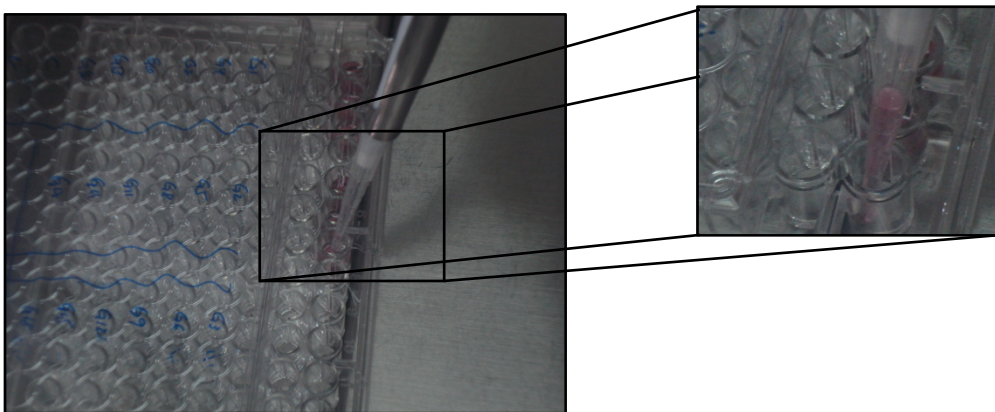


Figura 4.20 – Plaqueamento das células nas placas de 96 poços dentro do fluxo.

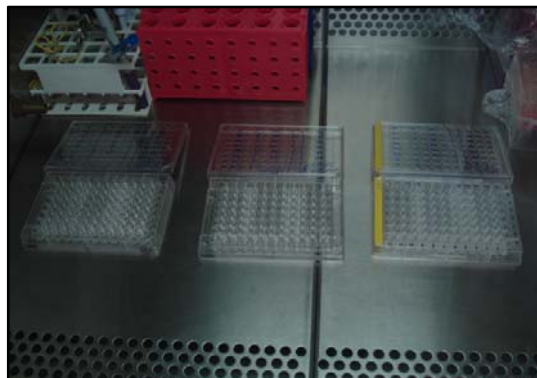


Figura 4.21 – Placas de cultura utilizadas para o plaqueamento das células na obtenção da medida da proliferação e viabilidade celular dentro do fluxo laminar.

A medida da proliferação e viabilidade celular é obtida através da leitura da absorbância em cada tempo produzida após 4 horas de incubação e reação com a solução do MTT (Invitrogen Corporation, EUA). Posteriormente, fez-se uma equivalência entre o valor da absorbância do teste obtida com a absorbância do controle resultando na porcentagem de vitalidade das células dada pela Eq. (4.1). Em seguida, relacionou esta porcentagem com o número de células plaqueadas referentes ao grupo controle de 24 horas de cultura.

$$Vit = \frac{\text{média da absorbância do teste}}{\text{média da absorbância do controle}} \times 100 \quad (4.1)$$

Após 24 horas, levou-se a placa para o fluxo, adicionou-se 10µl de MTT para cada 100 µl de meio contido no poço foram incubados por mais 4 horas. A Figura 4.22 mostra o momento da colocação do MTT na placa equivalente a 24 horas e mostra também a placa com MTT em todos os poços.

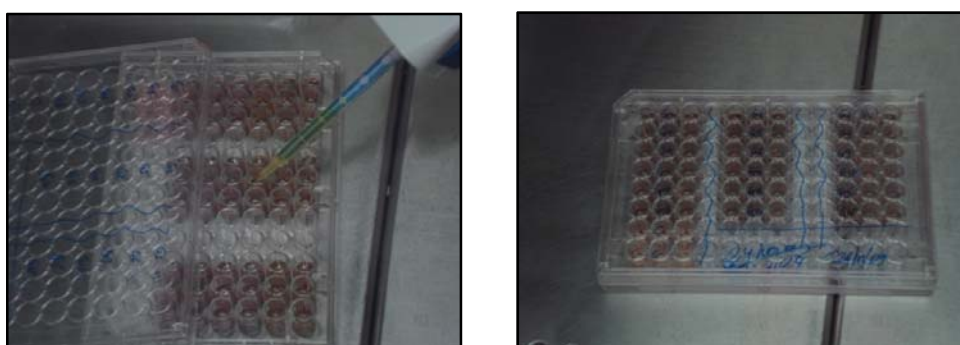


Figura 4.22 – Momento da aplicação do MTT e a placa completa com MTT.

Após 4 horas, ao retirar a placa da incubadora foram observados sobre os discos depósitos de cristais de formazana que indica a reação do MTT conforme mostra a Fig. 4.23. Adiciona 100 µl de Isopropanol-Ácido (HCl) visando interromper a ação do MTT e homogeneíze dissolvendo os cristais de formazana até obter uma cor roxeada como mostra a Fig. 4.24. A Figura 4.25 mostra a placa com o sobrenadante homogeneizado.

Após a homogeneização de todos os poços da placa, foi realizada a transferência do sobrenadante para uma outra placa de cultura de 96 poços a fim de efetuar a leitura da placa em uma leitora de placa. A Figura 4.26 mostra a placa com os discos de titânio e a placa com os sobrenadantes transferidos. Após a transferência dos sobrenadantes, a placa foi levada embrulhada em papel alumínio até a leitora de placa. A Leitora de Microplaca de 96 poços utilizada foi a TP Reader (ThermoPlate) pertencente ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia.

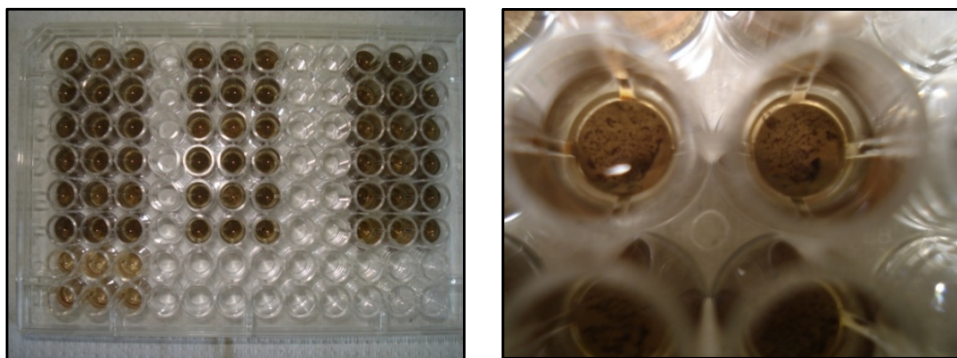


Figura 4.23 – Placa após a incubação e em detalhe, os depósitos formados com a ação do MTT sobre as células.

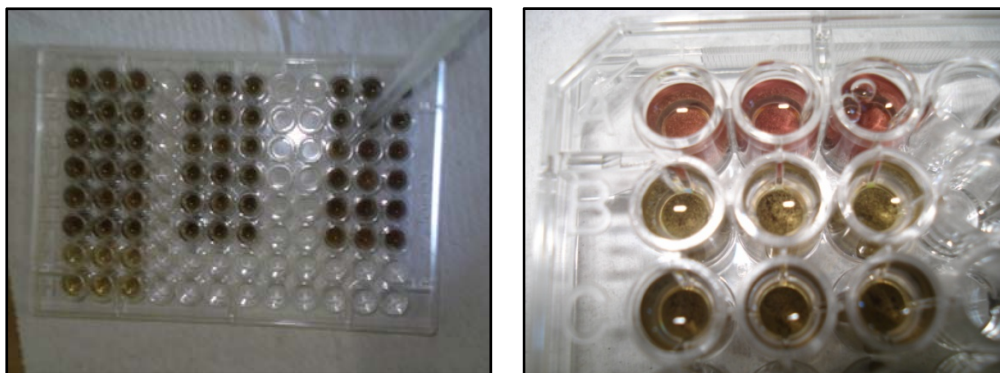


Figura 4.24 – Aplicação do Isopropanol-Ácido em todos os poços da placa de cultura após 4 horas de incubação. Apresenta também a cor roxeada após a homogeneização da solução.

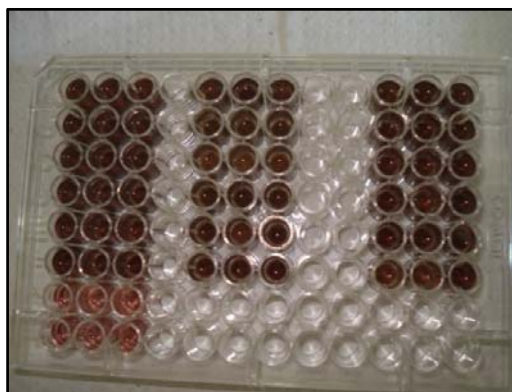


Figura 4.25 – Placa com o sobrenadante homogeneizado.

Para efetuar as leituras, colocou-se a placa com o sobrenadante homogeneizado no local apropriado, fechou a tampa e definiu o programa que realiza a medida da absorbância para o teste de MTT com um comprimento de onda 590 nm. Após alguns segundos a leitora fornece os resultados da leitura da placa dando a possibilidade de efetuar a impressão dos mesmos. A Figura 4.27 mostra a leitora de microplacas e em detalhe a placa de 96 poços

encaixada no local apropriado da leitora para a realização da leitura. Já a Figura 4.28 mostra a impressão dos resultados após a leitura.

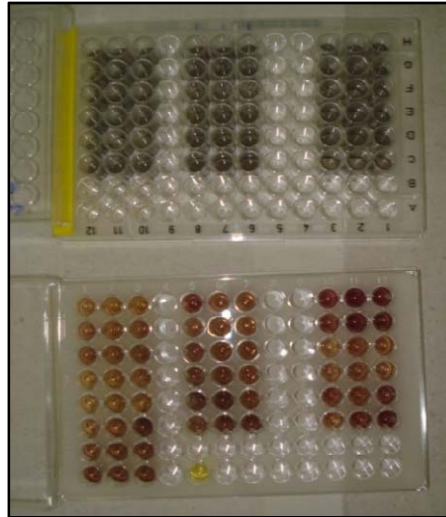


Figura 4.26 – Placa com discos de titânio e placa com o sobrenadante para a leitura.

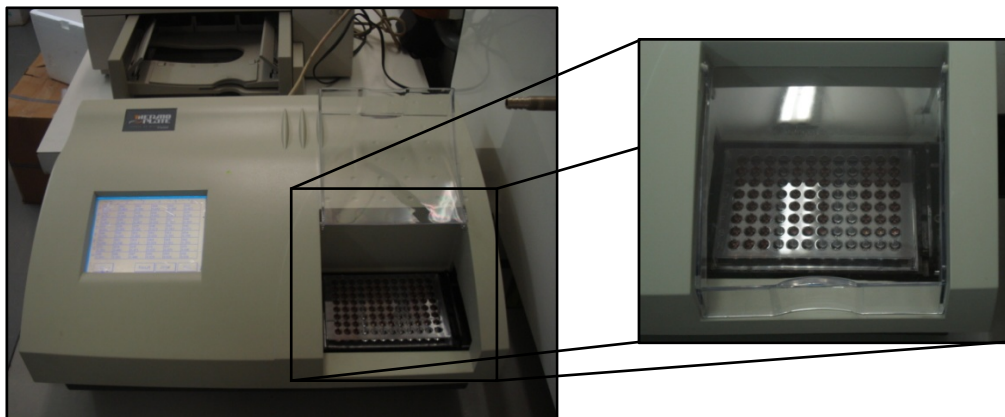


Figura 4.27 – Leitora com a placa e em detalhe a placa encaixada no local apropriado para a realização da leitura.

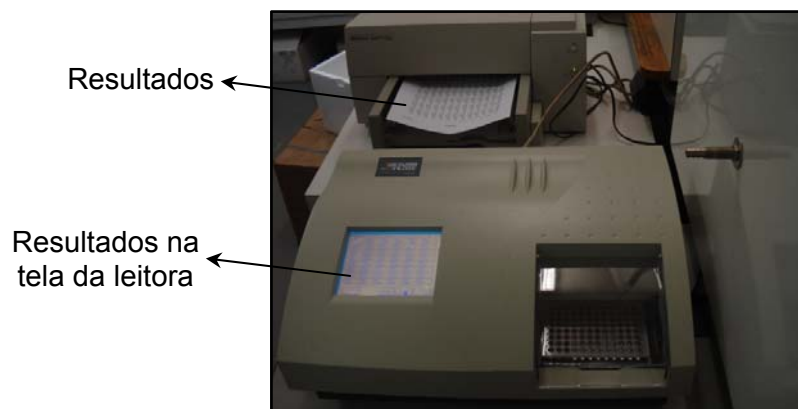


Figura 4.29 – Impressão dos resultados após a leitura.



#### 4.4.2. Medida da Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi medida aos 7, 14 e 21 dias utilizando um kit comercial (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. O meio de cultura das células foi removido, os poços lavados três vezes com PBS a 4°C. Em seguida foi adicionado 1% Triton X-100 a 4°C que ficou em contato com as células por 1h sob agitação. Em seguida, 25µl de cada amostra foi transferido para uma nova placa de 96 poços e adicionado 200µl do substrato *p*-nitrophenolphosphate em tampão 2-amino-2-methyl-1-propanol (*p*-NPP) (Sigma) e incubado a 37°C por 1h como mostra a Fig. 4.29. ALP hidrolisa *p*-nitrofenil fosfato em *p*-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade de atividade de fosfatase alcalina foi medida lendo a absorbância em um espectrofotômetro (Microplate Reader, Modelo 550, Bio-RadLaboratories, EUA), com comprimento de onda de 405nm. A Figura 4.30 mostra o espectrofotômetro utilizado para a obtenção da medida da absorbância no ensaio de atividade de fosfatase alcalina.

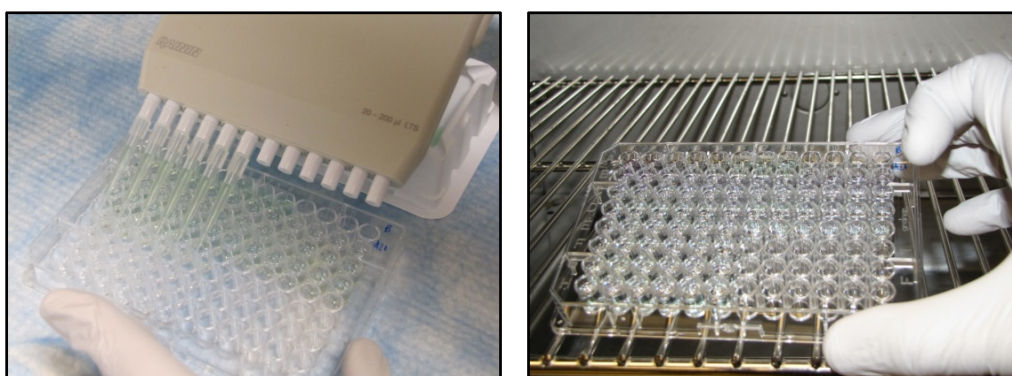


Figura 4.29 – Adicionando na placa de cultura o substrato *p*-nitrophenolphosphate em tampão 2-amino-2-methyl-1-propanol (*p*-NPP) e incubando por 1 hora a 37°C.



Figura 4.30 – Espectrofotômetro utilizado na obtenção da medida de ALP.

A atividade de ALP, expressa em µmol de *p*-NPP/concentração de proteína/min, foi calculada a partir da quantidade de proteína total em cada amostra. Para a normalização dos dados, foi medido o conteúdo de proteína total, utilizando o método de Bradford, BCA

protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA), onde 25µl de cada amostra dos mesmos poços utilizados para medida da atividade de ALP foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e misturados com 200µl de BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Microplate Reader, Modelo 550, Bio-Rad Laboratories, USA), com comprimento de onda de 570nm. O conteúdo de proteína total em µg/µl foi calculado em cada poço com base em uma curva padrão feita a partir de albumina bovina (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). A Figura 4.31 mostra placa de cultura dosando a proteína padrão (de coloração roxeada) e placa de cultura dosando a ALP (de cor amarelada).

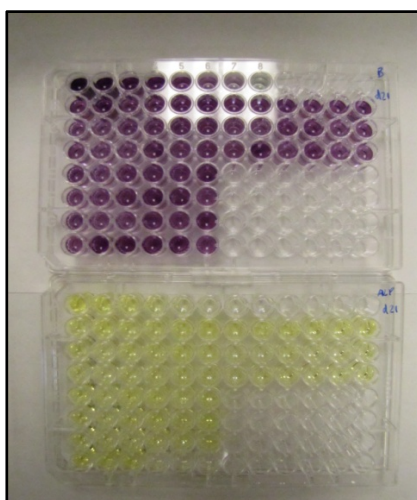


Figura 4.31 – Dosagem de proteína padrão e ALP.

#### 4.4.3. Medida dos Nódulos de Mineralização

Aos 28 dias foi feita a medida dos nódulos de mineralização onde foi observada a formação de nódulos mineralizados por epifluorescência. A presença de cálcio e de fosfato em áreas nodulares de matriz mineralizada é evidenciada pela cor vermelha utilizando o método histoquímico da Alizarin Red S.

O meio de cultura das células foi removido, os poços lavados três vezes com PBS à 4°C e fixados com Metanol 100% por 30 minutos. Os discos de Ticp foram lavados duas vezes com água destilada e, em seguida, corados com *Alizarinred S* 1% (Sigma, St. Louis, MO,USA) em 0.1% hidróxido de amônio (Sigma, St. Louis, MO,USA), que colore em vermelho os nódulos de mineralização ricos em cálcio por 10 minutos como mostra a Fig. 4.32. Os discos de Ticp foram lavados três vezes com água destilada e deixados secar a temperatura ambiente conforme mostra a Fig. 4.33.

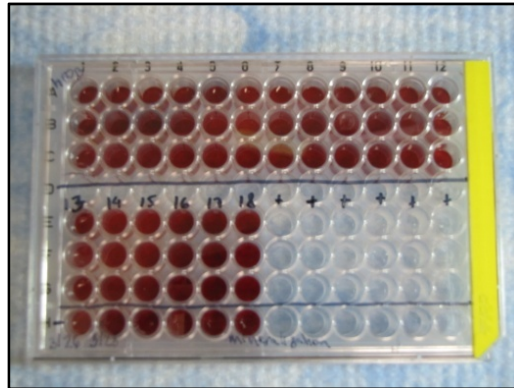


Figura 4.32 – Coloração dos nódulos de mineralização.



Figura 4.33 – Discos secando em temperatura ambiente após a coloração dos nódulos de mineralização com Alizarin Red S.

Após secos, os discos foram colados em lâminas para microscopia e levados para análise em um microscópio invertido de epifluorescência (DP72 Olympus America - BoneBiologyandImplantTherapyLaboratory, DepartmentofProsthodontics, Universityof North Carolina), com comprimento de onda de excitação de 530-560 nm e comprimento de onda de emissão de 580 nm. A Figura 4.34 mostra uma lâmina montada com os grupos 10, 11 e 12 estudados neste trabalho e a Fig. 4.35 mostra o microscópio invertido utilizado para a obtenção das imagens. As imagens digitais dos discos corados foram avaliadas em software específico para análise de imagens digitais (ImageJ, “downloaded” do National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA, disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij>). A Figura 4.36 mostra uma imagem adquirida dos nódulos de mineralização sobre um disco de titânio.

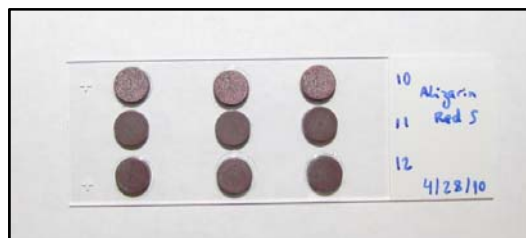


Figura 4.34 – Lâmina montada com os Grupos 10, 11 e 12 após a coloração dos nódulos de mineralização.

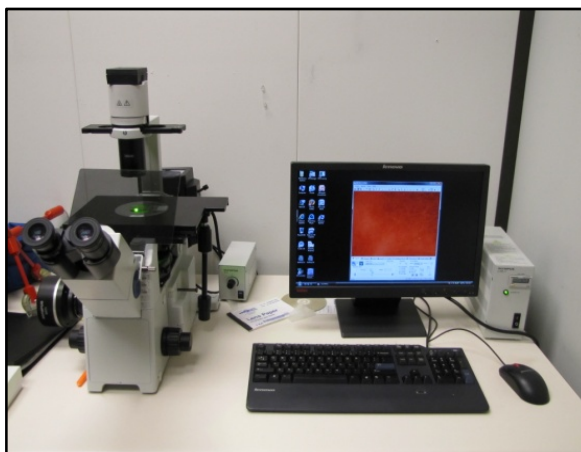


Figura 4.35 – Microscópio de epifluorescência utilizado na obtenção das imagens dos nódulos mineralizados corados nos discos de titânio. (BoneBiologyandImplantTherapyLaboratory/ UNC–USA).

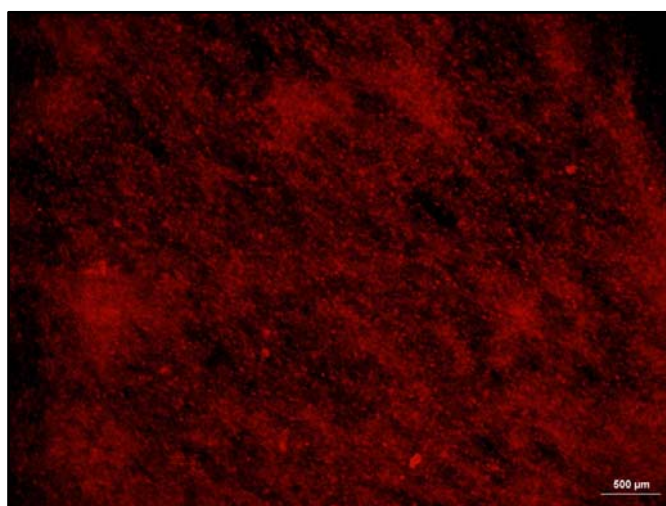


Figura 4.36 – Nódulos ricos em cálcio fluorescente sobre o disco de titânio.

Na sequência foi obtido a intensidade média da área corada e também a porcentagem da área total corada utilizando o software ImageJ e os resultados são descritos no Capítulo VII.





# CAPÍTULO V

## MODELO MATEMÁTICO

### 5.1. Introdução

Os principais mecanismos relacionados ao processo de osseointegração dos implantes são similares aos que ocorrem durante o reparo de uma fratura óssea, e envolvem uma série de eventos celulares e moleculares (DAVIES, 2003; FRANCHI et al., 2005).

O estudo "*in vitro*" da osteogênese tem sido impulsionado por pesquisas utilizando biomateriais na ortopedia e na implantodontia, principalmente após a descoberta do fenômeno da osseointegração (DAVIES, 2003). Essas culturas podem ser feitas a partir de osteoblastos da calvária de roedores neonatos, de explantes ósseos, células da medula óssea de humanos ou de animais, e também a partir de linhagens celulares imortalizadas (DAVIES, 2000; HENGE et al., 2004) sendo utilizadas como ferramentas de análise da biocompatibilidade e do potencial osteogênico desses biomateriais.

Osteoblastos provenientes de cultura primária de osso humano podem ser obtidos a partir de digestões enzimáticas ou desprendidos do próprio fragmento, constituindo os explantes (DAVIES, 2000), os quais fornecem osteoblastos diferenciados e células osteoprogenitoras. No entanto, culturas obtidas a partir de roedores têm sido um modelo de estudo bastante utilizado, devido ao maior potencial proliferativo das células. Os osteoblastos e células osteoprogenitoras respondem às variações na composição do microambiente (citocinas e fatores de crescimento) e a mudanças na microtextura dos implantes, o que pode ser usado pela bioengenharia para favorecer a osseointegração (DAVIES, 2000, 2003).

Segundo Brånemark (1985), o sucesso da osseointegração depende de seis fatores:

- Biocompatibilidade do implante;
- Características da geometria do implante;

- Características da superfície;
- Estado do leito hospedeiro;
- Técnica cirúrgica;
- Tipo e intensidade das cargas aplicadas.

Neste trabalho é proposto um modelo matemático para estimar o grau de osteogênese em superfícies de titânio com diferentes condições de rugosidade, espessura da camada de óxido de titânio e energia superficial da superfície. A formulação foi definida e validada considerando ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Como descrito anteriormente, os processos celulares que caracterizam a geração de células ósseas viáveis (Osteogênese) dependem de inúmeros fatores. Alguns destes fatores podem ser analisados em estudos “*in vitro*” de cultura de células:

- Atividade de Fosfatase Alcalina ( $\eta_1$ );
- Proliferação e Viabilidade Celular ( $\eta_2$ );
- Nódulos de Mineralização ( $\eta_3$ ).

Portanto, foi necessário estabelecer um índice que quantificasse a osteogênese considerando as variáveis descritas anteriormente, para que, na seqüência, utilizando métodos de similitude, fosse obtida uma equação para a estimativa da osteogênese.

Para a aplicação dos métodos de similitude é preciso avaliar a sensibilidade de cada variável isoladamente no fenômeno estudado, ou seja, a medida da intensidade da osteogênese gerada. Portanto, em geral, o número de experimentos é relativamente grande dependendo do número de variáveis analisadas.

## 5.2. Medida da Intensidade da Osteogênese

A medida da intensidade da osteogênese foi estimada considerando variáveis medidas no ensaio “*in vitro*” de cultura de células, ou seja, proliferação e viabilidade celular, fosfatase alcalina e nódulos de mineralização.

As células foram cultivadas sobre as diferentes superfícies de titânio visando avaliar o processo de osteogênese. Essas modalidades de cultura, obtidas a partir de células de humanos, aproximam a pesquisa laboratorial da prática clínica, e tem sido amplamente valorizados pela literatura, na tentativa de desvendar os eventos celulares e moleculares que regulam a osseointegração. Os resultados das análises “*in vitro*” foram utilizados para modelar matematicamente o fenômeno, considerando variáveis de análise, qualidades

diferentes de superfícies através de diferentes processos com ataque ácido e diferentes condições de jateamento.

Existem evidências crescentes de que o crescimento e a diferenciação dependem do estágio de diferenciação celular (WATZEK, 2004). Os mecanismos moleculares ligados a esses efeitos são pouco conhecidos, mas a localização e o nível de expressão de receptores e ligantes de citocinas em subgrupos específicos de células osteogênicas, podem ajudar a entender os caminhos que levam ao desenvolvimento e regulação da osteogênese (DAVIES, 2000; YAMADA et al., 2000). Os osteoblastos são células responsáveis pela produção da matriz óssea e seus constituintes orgânicos, além de concentrarem fósforo e cálcio, participam da mineralização da matriz (WATZEK, 2004; ZAFFE, 2005).

A porção inorgânica da matriz óssea é composta de íons fósforo e cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita (CARBONARE et al., 2005; TZAPHILIDOU, 2005). O processo de mineralização da matriz óssea é controlado pelas proteínas colágenas e não colágenas da matriz e por enzimas, sobretudo, a fosfatase alcalina (ALP) (ROSA e BELOTI, 2003; XAVIER et al., 2003; DECLERCQ et al., 2005). Um aumento da atividade e da expressão da ALP em uma cultura de células osteogênicas marca o início do processo de mineralização e a diferenciação dessas células em fenótipo de osteoblastos (DECLERCQ et al., 2005; DAVIES, 2003; ROSA e BELOTI, 2003).

Além da fosfatase alcalina, os nódulos de mineralização também são marcadores da diferenciação de osteoblastos e apresentam correlação positiva com os níveis de ALP (ROSA e BELOTI, 2003; XAVIER et al. 2003). Apesar de fornecerem informação sobre o estado da cultura e funções das células, normalmente são analisados ao final de uma cultura, pois seu método de avaliação representa o fim da mesma (WANG et al., 1996).

De acordo com a literatura (PERIZZOLO; LACEFIELD e BRUNETTE, 2001; CARVALHO, 2005; XAVIER, 2002) pode-se estimar que, quanto maior os valores de ( $\eta_i$ ), maior a viabilidade da osteogênese e conseqüentemente melhor a eficiência da osseointegração.

Aqui, propõe-se um novo procedimento para estimar a osteogênese através de uma função quantificada pelas variáveis ( $\eta_1, \eta_2, \eta_3$ ). Para isto, a literatura indica que todos as variáveis analisadas são importantes no processo, porém, a proliferação e viabilidade celular e a atividade de fosfatase alcalina exibem uma maior importância na formação final da estrutura óssea. Portanto, para modelar esta intensidade normalizou-se todas as variáveis em termos de quantidade de células e ponderou-se cada variável utilizando pesos, que foram definidos de acordo com a sua influência no fenômeno. Portanto, o nível de osteogênese ( $\Psi$ ), é definido da seguinte forma:

$$\Psi_i = \bar{\eta}_1 \rho_1 + \bar{\eta}_2 \rho_2 + \bar{\eta}_3 \rho_3 \quad (5.1)$$

onde:

$\bar{\eta}_i$ : Variáveis normalizadas obtidas do ensaio “*in vitro*”.

$\rho_i$ : Pesos relativos de cada variável de influência

Na Equação (5.1) os valores de  $\bar{\eta}_i$  são determinados através de ensaios experimentais “*in vitro*” de cultura de células.

Conforme descrito anteriormente, a variável  $\bar{\eta}_1$  refere-se à atividade de fosfatase alcalina, determinada através da quantidade de micromol por hora por miligrama de proteína após 7, 14 e 21 dias.

A variável  $\bar{\eta}_2$  relaciona-se com a proliferação e viabilidade celular, determinada através da quantidade de células proliferadas e viáveis no sétimo e décimo quartodias após a ativação celular.

A variável  $\bar{\eta}_3$  relaciona-se aos nódulos de mineralização determinados como a porcentagem da área corada por Alizarin Red S da área total dos discos de titânio onde as células foram cultivadas durante 28 dias.

Como mencionado os pesos  $\rho_i$  são determinados em função da importância de cada variável no processo final da osteogênese. De acordo com a literatura, a proliferação e viabilidade celular e a atividade de fosfatase alcalina são os fatores mais importantes para uma maior eficiência da osteogênese. É proposto um peso relativo para cada variável que representa um índice de influência para um processo ótimo da osteogênese, da seguinte forma,

- Fosfatase Alcalina: 50% ( $\rho_1 = 0,50$ )
- Proliferação e Viabilidade celular: 30% ( $\rho_2 = 0,30$ )
- Nódulos de Mineralização: 20% ( $\rho_3 = 0,20$ )

Portanto, utilizando os pesos definidos anteriormente e a Eq. (5.1) é possível obter uma estimativa para a determinação do grau da osteogênese específica de cada ensaio, ou seja,

$$\Psi_i = \bar{\eta}_1 0,50 + \bar{\eta}_2 0,30 + \bar{\eta}_3 0,20 \quad (5.2)$$

Na Equação (5.2) é possível observar que para uma mesma quantidade de células medidas nas diferentes variáveis, a proliferação e viabilidade celular e a medida de atividade de fosfatase alcalina respondem juntos por uma eficiência de 80% no efeito de geração de células ósseas viáveis.

### 5.3. Equação de Predição

Os osteoblastos são sensíveis à topografia da superfície do implante (ZINGER et al., 2003). Em geral, as células cultivadas sobre superfícies rugosas apresentam características morfológicas de osteoblastos em um estado mais diferenciado e secretam maior quantidade de fosfatase alcalina (DE OLIVEIRA e NANJI, 2004). Variações na porosidade e rugosidade superficial do titânio influenciam o metabolismo celular e a liberação de citocinas e fatores de crescimento, como os osteoblastos (BOYAN et al., 2003; RICE et al., 2003).

Os tratamentos de superfície modificam a topografia e até as características químicas do titânio. Vários estudos já demonstraram que essas modificações podem afetar não só as propriedades da superfície como a resposta celular para aquela superfície, sendo que a rugosidade de uma superfície pode ter efeito até maior que a própria composição química (ROSA e BELOTI, 2003; SCHMIDT et al., 2003; XAVIER et al., 2003).

Em estudos recentes, as superfícies rugosas têm mostrado efeito positivo na diferenciação dos osteoblastos, o que contribuiria para a neoformação óssea (BOYAN et al., 2003). Além disso, superfícies rugosas também favoreceriam a síntese de colágeno, a atividade da ALP, fatores de crescimento e citocinas como, por exemplo, prostaglandinas (ROSA e BELOTI, 2003). É válido também ressaltar que superfícies microtexturizadas diminuem a adesão e a proliferação celular (BOYAN et al., 2003; ROSA e BELOTI, 2003). Contudo, é importante considerar que existem discrepâncias entre os resultados apresentados pelos vários estudos sobre mineralização e que podem ser provocadas pela diferença no método e no tipo de cultura de células (XAVIER et al., 2003).

Diferentes condições de rugosidade podem ser obtidas através de diferentes condições de jateamento e ataque ácido aplicados nos implantes dentários. Portanto, dependendo das variáveis de influência do fenômeno, a osteogênese pode se consolidar em diferentes graus.

A medida da osteogênese foi definida pela Eq. (5.1). A equação matemática final será obtida através da teoria de similitude, que permite a determinação de uma função preditiva nas variáveis de influência usando como base de validação ensaios experimentais.

Considerando os grupos dimensionais das variáveis, a teoria da similitude estabelece critérios que devem ser impostos sobre os modelos e permite estabelecer parâmetros

característicos do sistema físico em estudo. Através da equação preditiva, pode-se estimar o comportamento físico do sistema, ou seja, avaliar o grau de osteogênese considerando as variáveis de influência.

Para a determinação da função de predição utiliza-se o “Teorema de Buckingham” ou “Teorema dos  $\pi$ -Termos” (GLENN MURPHY, 1950). A utilização deste procedimento permite a obtenção de uma função matemática expressa em termos de parâmetros dimensionais e uma função correlata expressa em termos de parâmetros adimensionais.

O primeiro passo para a determinação do modelo matemático é a identificação de todos os parâmetros ou variáveis que influenciam o fenômeno físico. Portanto, o problema resume-se em encontrar relações matemáticas que representam o nível de osteogênese de acordo com os ensaios “*in vitro*” de cultura de células. A análise de sensibilidade de cada variável sobre o fenômeno da osteogênese pode ser feita variando um parâmetro e mantendo todos os outros constantes definidos através do critério de Buckingham. Para estimar a função preditiva da osteogênese, deve-se considerar a influência de todas as variáveis, ou seja,

$$\pi_1 = f(\pi_2, \pi_3, \pi_4, \dots, \pi_i) \quad (5.3)$$

onde,

$\pi_1$  = Grau da Osteogênese obtida pela Eq. (5.1)

$\pi_i$  = Variáveis de influência

Supondo um problema composto por duas variáveis de influência, tem-se que,

$$\pi_1 = f(\pi_2, \pi_3) \quad (5.4)$$

O primeiro passo é obter uma equação que represente o modelo real observando a sensibilidade do grau de osteogênese ( $\pi_1$ ) variando  $\pi_2$  e mantendo constante  $\pi_3$ , escrita da seguinte forma:

$$\pi_1 = f(\pi_2, \bar{\pi}_3) \quad (5.5)$$

De forma análoga, obtém-se a função matemática para o grau de osteogênese ( $\pi_1$ ) variando  $\pi_3$  e mantendo constante  $\pi_2$ , ou seja,

$$\pi_1 = f(\bar{\pi}_2, \pi_3) \quad (5.6)$$

De acordo com a teoria da similitude, as Eqs. (5.5) e (5.6) são chamadas de equações componentes. Elas podem ser combinadas, sob certas condições, para formar uma equação preditiva geral através de uma função produto ou de uma função soma. Quem vai definir a melhor forma de se combinar as equações será um teste de validade utilizando as equações componentes.

Supondo que as equações componentes possam ser combinadas como uma função produto tem-se que,

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3) = f_1(\pi_2, \bar{\pi}_3) \cdot f_2(\bar{\pi}_2, \pi_3) \quad (5.7)$$

A condição testada na Eq. (5.7) pode ser avaliada para a condição particular considerando  $\pi_3$  constante, ou seja,

$$F(\pi_2, \bar{\pi}_3) = f_1(\pi_2, \bar{\pi}_3) \cdot f_2(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \Rightarrow f_1(\pi_2, \bar{\pi}_3) = \frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3)}{f_2(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.8)$$

O segundo conjunto de dados que pode ser obtido da Eq. (5.7), considerando  $\pi_2$  constante pode ser obtido por,

$$F(\bar{\pi}_2, \pi_3) = f_1(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \cdot f_2(\bar{\pi}_2, \pi_3) \Rightarrow f_2(\bar{\pi}_2, \pi_3) = \frac{F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{f_1(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.9)$$

Substituindo as Eqs. (5.8) e (5.9) na Eq. (5.7) tem-se que,

$$F(\pi_2, \pi_3) = \frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3) \cdot F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{f_2(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \cdot f_1(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.10)$$

Mas,

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) = f_1(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \cdot f_2(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \quad (5.11)$$

Logo,



$$F(\pi_2, \pi_3) = \frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3) \cdot F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.12)$$

Para avaliar o grau de correlação das funções como uma combinação por função produto é preciso fazer um “teste de validade”. O teste é feito assumindo que a Eq. (5.12) seja válida também para um novo conjunto de dados, ou seja, para outro valor de  $\bar{\pi}_2$  constante ou ainda para um novo conjunto de dados com  $\bar{\pi}_3$  constante. Assim,

$$F(\pi_2, \pi_3) = \frac{F(\pi_2, \bar{\pi}_3) \cdot F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.13)$$

Tornando as Eqs. (5.12) e (5.13) iguais, tem-se que,

$$\frac{F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} = \frac{F(\bar{\pi}_2, \pi_3)}{F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3)} \quad (5.14)$$

Portanto, se a Eq. (5.14) for satisfeita, a equação preditiva final pode ser combinada por uma função produto.

As equações componentes, Eqs. (5.5) e (5.6), também podem ser combinadas através de uma função soma para formar a equação preditiva final. Neste caso, a função preditiva é dada por,

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3) = f(\pi_2) + g(\pi_3) \quad (5.15)$$

Então,

$$F(\bar{\pi}_2, \pi_3) = f(\bar{\pi}_2) + g(\pi_3) \Rightarrow g(\pi_3) = F(\bar{\pi}_2, \pi_3) - f(\bar{\pi}_2) \quad (5.16)$$

$$F(\pi_2, \bar{\pi}_3) = f(\pi_2) + g(\bar{\pi}_3) \Rightarrow f(\pi_2) = F(\pi_2, \bar{\pi}_3) - g(\bar{\pi}_3) \quad (5.17)$$

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) = f(\bar{\pi}_2) + g(\bar{\pi}_3) \quad (5.18)$$

Substituindo as Eqs. (5.16) e (5.17) na Eq. (5.15) tem-se que,

$$F(\pi_2, \pi_3) = F(\bar{\pi}_2, \pi_3) - f(\bar{\pi}_2) + F(\pi_2, \bar{\pi}_3) - g(\bar{\pi}_3)$$

Logo,

$$\pi_1 = F(\pi_2, \pi_3) = F(\bar{\pi}_2, \pi_3) + F(\pi_2, \bar{\pi}_3) - F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \quad (5.19)$$

No “teste de validade” considera-se um novo valor constante para  $\pi_2$  ou  $\pi_3$ . Logo, a Eq. (5.19) pode ser escrita da seguinte forma,

$$F(\pi_2, \pi_3) = F(\pi_2, \bar{\pi}_3) + F(\bar{\pi}_2, \pi_3) - F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \quad (5.20)$$

Das Eqs. (5.18) e (5.19), tem-se que,

$$F(\bar{\pi}_2, \pi_3) - F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) = F(\bar{\pi}_2, \pi_3) - F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) \quad (5.21)$$

Se a Eq. (5.21) for satisfeita, a equação preditiva final pode ser obtida a partir da soma das funções componentes.



# CAPÍTULO VI

## CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

Neste trabalho todas as superfícies dos discos de titânio utilizadas nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células osteoblásticas HFob 1.19 descrito no Capítulo IV, passaram por uma caracterização onde foi possível quantificar a rugosidade e a energia superficial da superfície.

### 6.1. Rugosidade

Na atualidade, está amplamente aceitado que a rugosidade superficial de um implante é um fator determinante de sua qualidade superficial, qualquer que seja o material do que este é fabricado ou sua aplicação (BUSER, 2001). As trocas topográficas da superfície têm influência significativa na cascata de eventos que chegam com a aceitação do mesmo por parte do hospedeiro (BOYAN et al., 2001), desde a adsorção de proteínas até a mineralização da matriz extracelular do tecido ósseo, passando pela adesão, proliferação e diferenciação, tanto dos osteoblastos como dos osteoclastos (BÁDENAS, 2004).

Tem-se publicado uma grande quantidade de estudos que demonstram que a topografia (textura e rugosidade) dos substratos influencia em distintos parâmetros da resposta celular. Sem embargo, como já se tinha mencionado anteriormente, o jateamento não confere textura à superfícies de titânio, sim uma configuração isotropicamente rugosa. Portanto, também no caso de análises da resposta celular “*in vitro*” sobre implantes dentários de TiCpjateados, a principal variável de estudo é a rugosidade. (BADENÁS, 2004)

Os diferentes processos de fabricação de componentes mecânicos determinam acabamentos diversos nas suas superfícies. As superfícies, por mais perfeitas que sejam, apresentam irregularidades. E essas irregularidades compreendem dois grupos de erros, os erros macrogeométricos e erros microgeométricos. Erros macrogeométricos são os erros de forma, verificáveis por meio de instrumentos convencionais de medição, como micrômetros,

relógios comparadores, projetores de perfil, etc. Entre esses erros, incluem-se divergências de ondulações, ovalização, retilineidade, planicidade, circularidade, etc. Durante a usinagem, as principais causas dos erros macrogeométricos são: defeitos em guias de máquinas-ferramenta; desvios da máquina ou da peça; fixação errada da peça; distorção devida ao tratamento térmico. Erros microgeométricos são os erros conhecidos como rugosidade (DAGNALL, 1986; WHITEHOUSE, 2002).

Rugosidade pode ser definida como um conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências e reentrâncias que caracterizam uma superfície. Essas irregularidades podem ser avaliadas com aparelhos eletrônicos, a exemplo do rugosímetro ou interferômetro a laser. A rugosidade desempenha um papel importante no comportamento dos componentes mecânicos. Ela influi na qualidade dos deslizamentos; resistência ao desgaste; possibilidade de ajuste de acoplamento forçado; resistência oferecida pela superfície ao escoamento de fluidos e lubrificantes; qualidade de aderência que a estrutura oferece às camadas protetoras; resistência à corrosão e à fadiga; vedação; aparência. A grandeza, a orientação e o grau de irregularidade da rugosidade podem indicar suas causas que, entre outras, são: imperfeições nos mecanismos das máquinas-ferramenta; vibrações no sistema peça-ferramenta; desgaste das ferramentas; o próprio método de conformação da peça (DAGNALL, 1986; WHITEHOUSE, 2002).

Rubio e Velten Filho (2005) definem a rugosidade superficial ou textura primária consiste de finas imperfeições que podem ser, da ordem de  $\mu\text{m}$ , originadas durante o processo de fabricação e possuem uma estreita relação com a ferramenta de corte.

Um dos critérios para avaliar a rugosidade é o comprimento de amostragem,  $l_e$ , (*Cut-off*) de acordo com a norma NBR 6405/1988. Como o perfil efetivo apresenta rugosidade e ondulação, o  $l_e$  filtra a ondulação. É recomendado pela norma ISO que os rugosímetros devam medir 5 comprimentos de amostragem ( $l_m$ : *comprimento de medição*) devendo indicar o valor médio como mostra a Fig. 6.1 (DAGNALL, 1986; WHITEHOUSE, 2002).

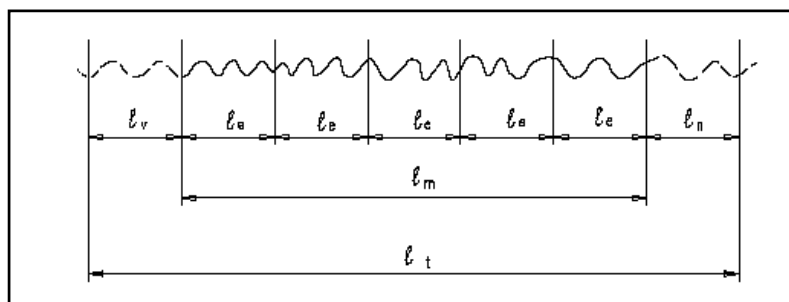


Figura 6.1 – Indica o comprimento que deve ser lido na análise da rugosidade.

$l_m$ : comprimento do percurso de medição;

$l_t$ : comprimento total de medição

$l_v$ : comprimento para atingir a velocidade de medição;

$l_n$ : comprimento para parada do apalpador.

### 6.1.1. Rugosidade Média ( $R_a$ )

O parâmetro  $R_a$  mede a rugosidade média da superfície analisada, considerando os picos e vales como mostra a Fig. 6.2. É o mais utilizado para controle de qualidade geral e é dado por:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (6.1)$$

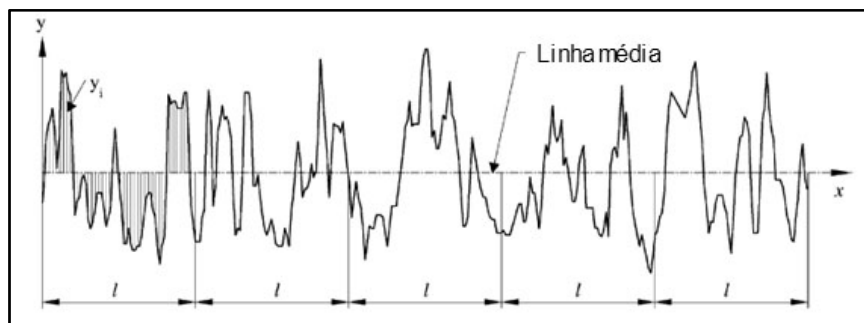


Figura 6.2 – Definição da rugosidade média ( $R_a$ )

### 6.1.2. Rugosidade Média Quadrática ( $R_q$ )

Este parâmetro é conhecido como valor RMS da rugosidade. Representa o desvio padrão da distribuição da superfície sendo mais sensitivo que a rugosidade média ( $R_a$ ) para grandes desvios da linha média. A sua definição matemática é dada por:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (6.2)$$

### 6.1.3. Profundidade Máxima do Vale ( $R_v$ )

É definida como a profundidade máxima do vale do perfil abaixo da linha média dentro do comprimento permitido como mostra a Fig. 6.3.

### 6.1.4. Altura Máxima do Pico ( $R_p$ )

É definida como a altura máxima do pico do perfil acima da linha média dentro do comprimento permitido mostrado na Fig. 6.3.

### 6.1.5. Altura Máxima do Perfil ( $R_t$ )

É definida como a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo ao longo do comprimento do perfil. Da Figura 6.3, tem-se que:

$$R_{max} = R_p + R_v = R_{p3} + R_{v4} \quad (6.3)$$

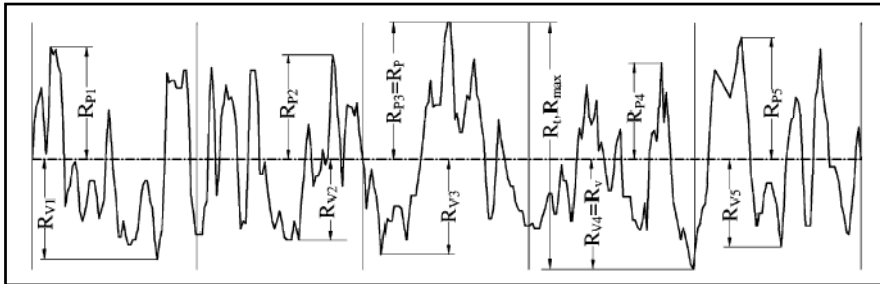


Figura 6.3 – Definição dos parâmetros  $R_v$ ,  $R_p$ .

Neste trabalho, foram medidos os valores de  $R_a$ ,  $R_q$  e  $R_t$  dos corpos de prova (discos de titânio) utilizando um interferômetro a laser (UBM) acoplado a um microcomputador pertencente ao Laboratório de Tribologia e Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia. A Figura 6.4 mostra o interferômetro a laser utilizado para a análise dos valores de rugosidade.

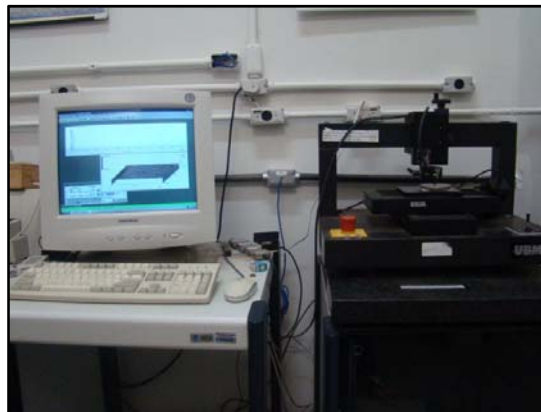


Figura 6.4 – Interferômetro a laser UBM (LTM/UFU).

Na interferometria a laser das superfícies foram obtidos três perfis linha de rugosidade de 4 mm de comprimento em três posições arbitrárias na superfície do disco para cada amostra de cada grupo estudado mostrado na Fig. 6.5. Após a interferometria das superfícies foi utilizado o programa UBSOft 1.9 (UBM Messtechnik GmbH Ettlingen, Germany) para a obtenção dos parâmetros de rugosidade ( $R_a$ ,  $R_q$  e  $R_t$ ). A Fig. 6.6 mostra o processo de realização de uma interferometria a laser.

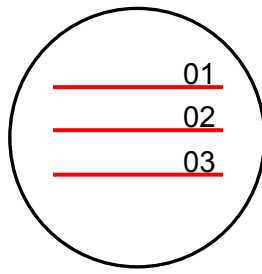
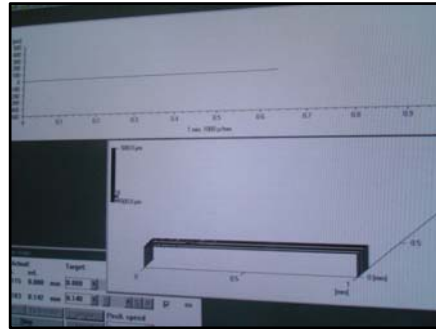


Figura 6.5 – Posições arbitrárias que foi medida os parâmetros de rugosidade linha na superfície do disco.



(a)



(b)

Figura 6.6 – (a) Mostra a realização da interferometria a laser da superfície. (b) Mostra o processamento dos dados durante a realização da interferometria.

A seguir, são descritos os passos para a utilização do programa no cálculo da rugosidade.

- a) Ao entrar no programa UBSOFT 1.9, clique em abrir, na janela que se abre seleciona a unidade e a pasta onde os arquivos foram salvos. Em “listar arquivos do tipo”, escolhe-se a opção que foi realizada o ensaio de interferometria (ponto, linha ou área). Neste estudo, para calcular a rugosidade fez-se análises em linha (line files \*.UB2). Por fim, o arquivo é selecionado através do seu nome. A Fig. 6.7 mostra a abertura do arquivo salvo em linha e um outro salvo em área. E a Fig. 6.8 mostra os perfis analisados na interferometria.

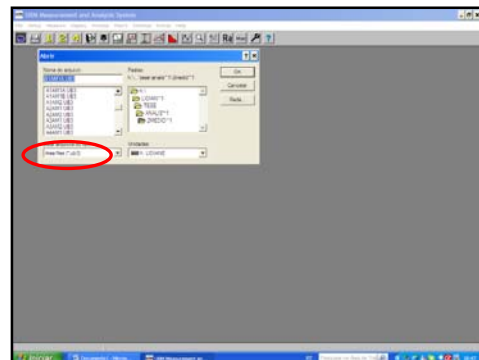
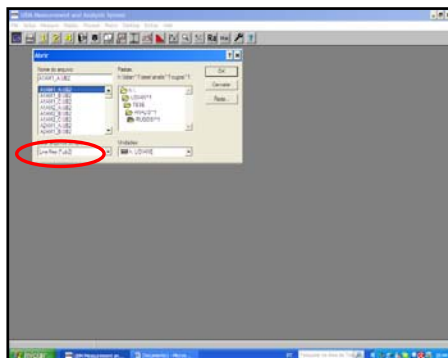


Figura 6.7 – Abertura do arquivo linha e área.



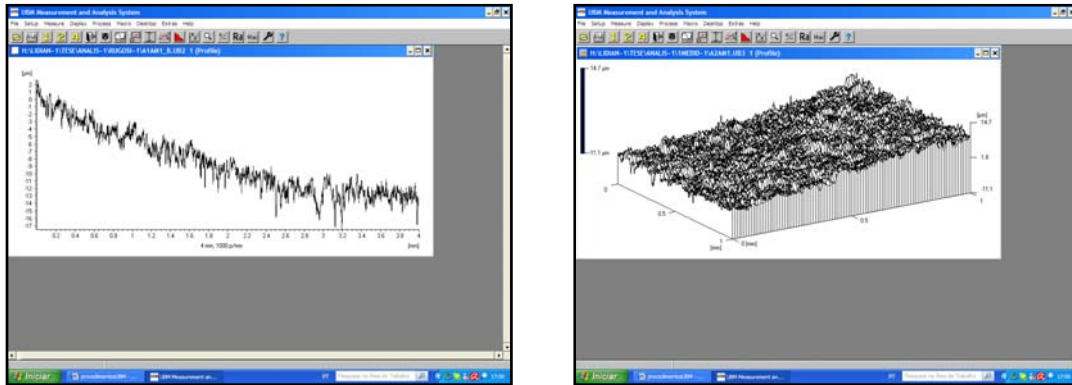


Figura 6.8 – Perfis de linha e de área para a análise da rugosidade.

- b) Para o cálculo da rugosidade, clique em  $R_a$  na barra de ferramentas na parte superior da janela e na sequência é aberta uma nova janela com o nome “Cut off wavelength” e configura a dimensão que se deseja calcular a rugosidade. Se estiver com um perfil linha, basta colocar a dimensão em x. Entretanto, se estiver com um perfil de área, coloca-se o comprimento dos lados da área que foi feita a interferometria. Configure a amplitude CUT offwavelength com 75% e recomenda-se utilizar um filtro Gaussiano, como mostra a Fig. 6.9. A seguir, clique em OK e será aberta uma nova janela com os parâmetros de rugosidade mostrado na Fig. 6.10. Clicando em OK novamente, as medidas dos parâmetros de rugosidade serão calculados como mostrado na Fig.6.11.

Após o cálculo de todas as rugosidades, os perfis de rugosidade das superfícies para cada amostra de cada grupo estudado foram obtidos utilizando o Programa Mountains Map Universal – versão 3.0.11. A seguir são descritos os passos para a obtenção dos perfis da rugosidade linha e da superfície.

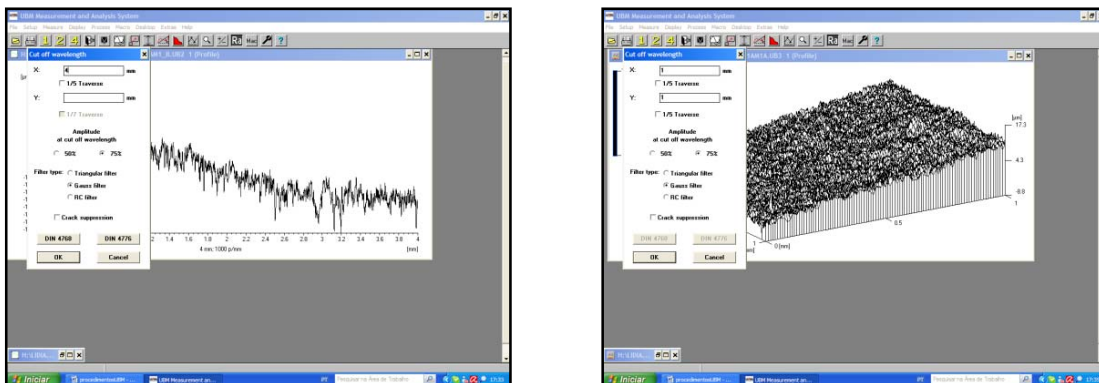


Figura 6.9 – Configuração da Cut off wavelength.

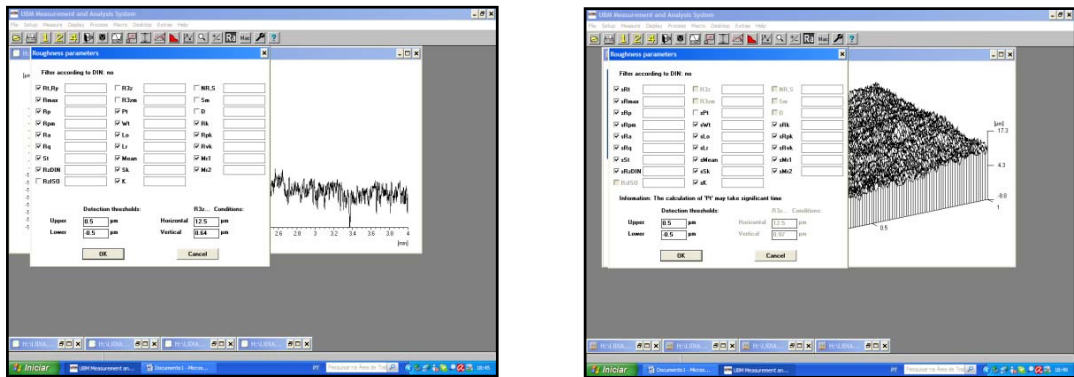


Figura 6.10 – Janela que mostra os parâmetros de rugosidade.

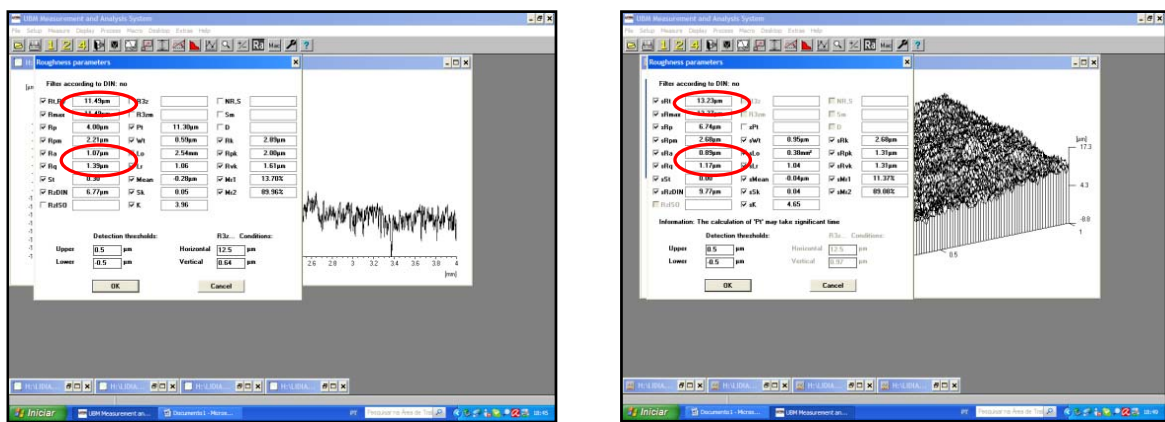


Figura 6.11 – Parâmetros de rugosidade obtidos nas análise de linha e área através da interferometria da superfície.

Ao abrir o programa Mountains Map Universal, clique em File – Open a Studiable e na próxima caixa que abrir, o arquivo foi selecionado e aberto como mostra a Fig. 6.12. Como extrai o perfil de uma rugosidade linha, ao abrir o arquivo, foi apresentado o perfil de imediato de acordo com a Fig. 6.13, pois na análise de interferometria realizada foi adquirido os parâmetros da rugosidade linha. Na Figura 6.14 mostra um perfil linha de rugosidade.

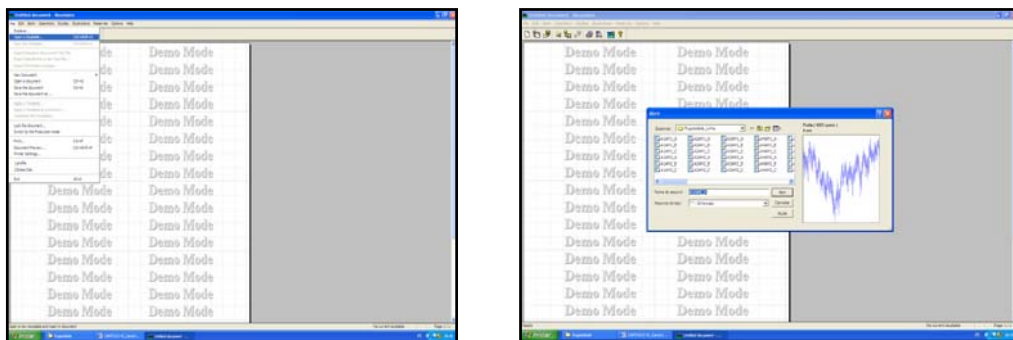


Figura 6.12 – Arquivo do perfil da rugosidade linha sendo aberto através do Programa Mountains Map Universal onde mostra selecionando a abertura do arquivo “Open a studiable” emostra também selecionando o arquivo.

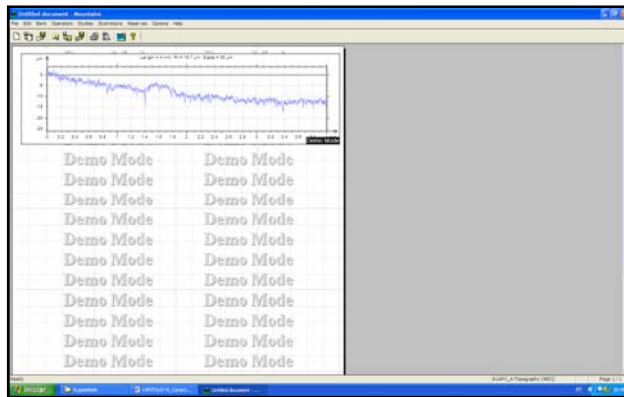


Figura 6.13 – Arquivo aberto e perfil da rugosidade linha.

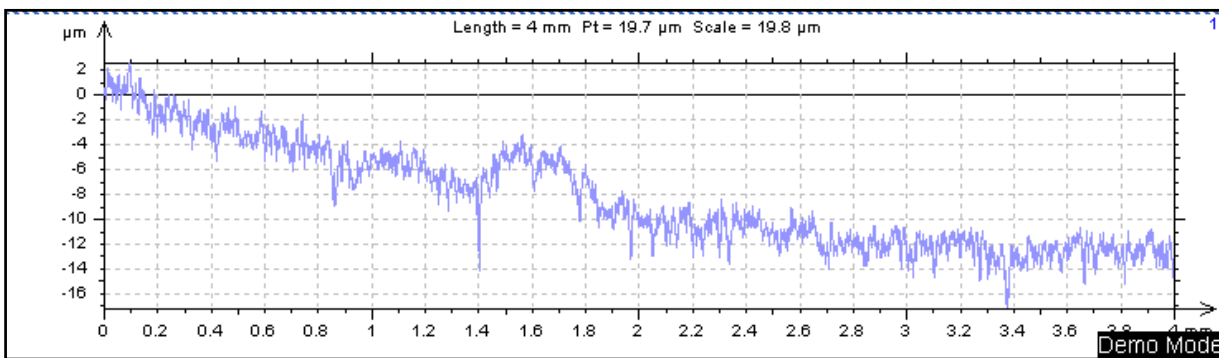
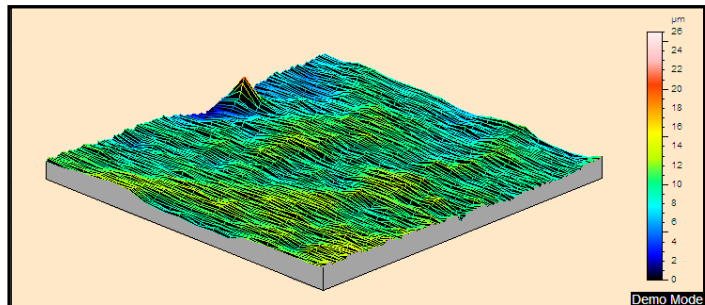
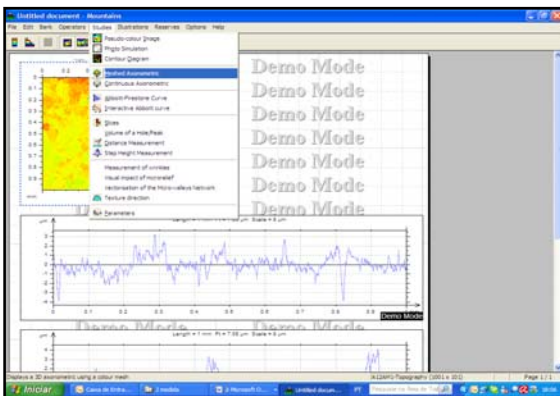


Figura 6.14 – Perfil linha de rugosidade em 4mm de comprimento obtido através do Programa Mountains Map Universal.

Após obter o perfil de rugosidade, foram extraídos os perfis das superfícies de 1 mm<sup>2</sup> analisada na interferometria, clique em “Studies – MeshedAxonometric” que se tem a superfície malhada como mostra a Fig. 6.15.

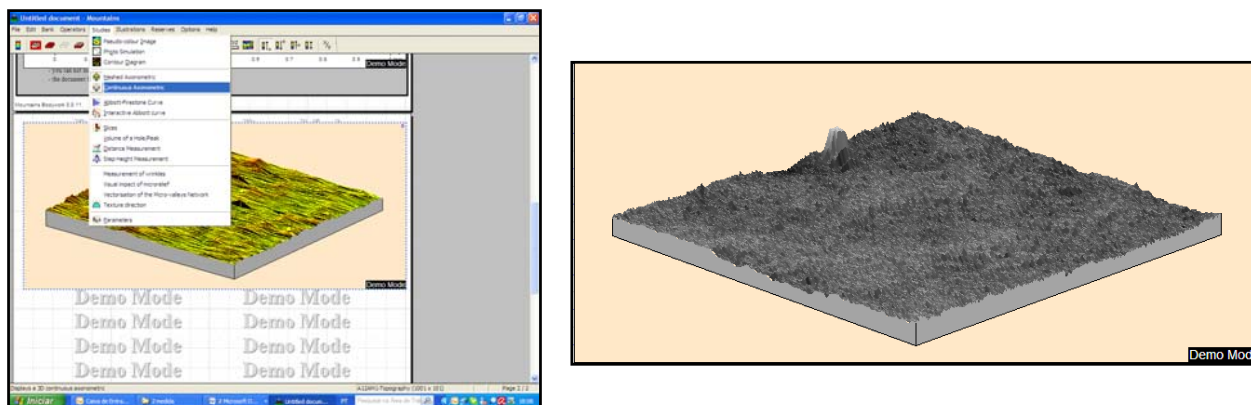


(a)

(b)

Figura 6.15 – (a) Obtenção do perfil da superfície com malha no programa. (b) O perfil da superfície obtida.

A seguir, clique em “Studies – ContinuousAxonometric” para obter o perfil da superfície sem malha como mostra a Fig. 6.16.



(a)

(b)

Figura 6.16 – (a) Janela do programa selecionando “Studies - ContinuousAxonometric” para obtenção do perfil da superfície sem malha. (b) O perfil da superfície obtida.

Vale ressaltar que todos os perfis linha e de área de todas as amostras de cada grupo se encontram no Apêndice deste trabalho. E os resultados dos parâmetros de rugosidade são listados no Capítulo VII.

## 6.2. Medida da Energia Superficial

O comportamento de materiais interagindo-se em diferentes estados é regido por leis da Física. Em um sólido ou líquido, os átomos e moléculas estão em equilíbrio e encontram-se unidos através de forças de atração mútua. Em geral, estas forças existem em todas as direções dos átomos, o que nos leva a concluir que nas superfícies dos materiais, deverão existir forças que não se encontram na condição de equilíbrio, que resultam em uma tensão na superfície do material (FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

Portanto, a energia superficial quantifica a quebra das ligações entre as moléculas quando uma superfície é criada. Superfícies possuem condições de energia menos favoráveis comparadas ao material como um todo, ou seja, a energia da superfície pode ser obtida considerando este excesso de energia.

Para um líquido, a tensão superficial e a densidade da energia da superfície possuem os mesmos valores. Por exemplo, a água possui uma densidade de energia superficial de  $0,072 \text{ mJ/m}^2$  e a tensão superficial de  $0,072 \text{ N/m}$ .

### 6.2.1. Energia Superficial de um Líquido

Thomas Young em 1805 descreveu a energia superficial como sendo a interação entre as forças de coesão e as forças de adesão que indica se ocorre ou não o molhamento ou espalhamento do líquido sobre a superfície. Se o molhamento completo não ocorre, então uma bolha de líquido será formada e na maioria dos casos, a geometria da gota será uma pequena esfera sobre a superfície e a energia superficial do sistema pode ser medida através do ângulo de contato, ou seja, a inclinação da gota com relação ao plano horizontal (sólido). Para realizar as medições dos ângulos de contato, utiliza-se um goniômetro, como mostrado na Fig. 6.17.



Figura 6.17 – Goniômetro utilizado para obter as imagens para o cálculo do ângulo de contato (OURA et al., 2003).

A equação de Young define o balanço entre as forças de interação causadas por uma gota sobre uma superfície seca (OURA et al., 2003). O ângulo de contato da gota com a superfície será maior se a superfície for hidrofóbica. A equação de Young é dada por:

$$\gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} \quad (6.4)$$

Onde  $\gamma_{SL}$ ,  $\gamma_{LV}$  e  $\gamma_{SV}$  são as tensões superficiais entre o sólido e o líquido, o líquido e o vapor, e o sólido e o vapor, respectivamente. O ângulo de contato que a gota faz com a superfície é denotado por  $\theta$ .

Na Equação (6.4) consideram-se superfícies perfeitamente planas, e em muitos casos, devido às rugosidades das superfícies e eventuais impurezas podem levar a variações do ângulo de contato real relativo aquele previsto pela equação de Young.

Para uma superfície perfeitamente lisa, a gota assume uma faixa de ângulos de contato variando desde um valor mais alto (de avanço,  $\theta_A$ ), até um valor menor (de

retrocesso,  $\theta_R$ ). O ângulo de contato de equilíbrio ou resultante é calculado de acordo com a equação de Tadmor(OURA et al., 2003).

$$\theta_c = \arccos\left(\frac{r_A \cos\theta_A + r_R \cos\theta_R}{r_A + r_R}\right) \quad (6.5)$$

Onde,

$$r_A = \sqrt[3]{\frac{\text{sen}^3\theta_A}{2 - 3\cos\theta_A + \cos^3\theta_A}} \text{ e } r_R = \sqrt[3]{\frac{\text{sen}^3\theta_R}{2 - 3\cos\theta_R + \cos^3\theta_R}}$$

### 6.2.2. Energia Superficial de um Sólido

Como descrito, a energia superficial de um líquido pode ser medida pelo espalhamento da membrana líquida sob o sólido. Neste caso, aumentando a área superficial do líquido ( $\delta A$ ), a quantidade de trabalho ( $\gamma\delta A$ ) depende da densidade da energia superficial do líquido ( $\gamma$ ). Entretanto, tal método não pode ser usado diretamente para medir a energia superficial de um sólido porque o alongamento da membrana sólida induz energia elástica que indiretamente aumenta a energia superficial.

A energia superficial de um sólido é usualmente medida em altas temperaturas de tal forma que a temperatura induza uma taxa de deformação e carga uniaxial constante (P). Na condição de equilíbrio, a densidade de energia superficial de uma barra cilíndrica ( $\gamma$ ) de raio (r) e comprimento ( $\ell$ ) é dada por,

$$\gamma = \frac{P\delta\ell}{\delta A} \quad (6.6)$$

A área superficial da barra ( $\delta A$ ) é obtida por,

$$\delta A = 4\pi r\delta r + 2\pi\ell\delta r + 2\pi r\delta\ell \quad (6.7)$$

Como o volume (V) da barra permanece constante, a variação ( $\delta V$ ) do volume é nula, ou seja,

$$\delta r = -\frac{r}{2\ell}\delta\ell \quad (6.8)$$

Das equações (6.6), (6.7) e (6.8), tem-se que,

$$\gamma = \frac{\ell P}{\pi r(\ell - 2r)} \quad (6.9)$$

Portanto, observa-se na Eq. (6.9) que a densidade de energia superficial de um sólido pode ser obtida medindo P para r e  $\ell$  constantes.

### 6.2.3. O Conceito de Molhamento

Molhamento é a habilidade de um líquido para manter contato com uma superfície sólida, quando colocados juntos, devido às interações intermoleculares, ou seja, é um fenômeno de união metalúrgica que depende da energia superficial. O grau de molhamento (molhabilidade) é determinado por um balanço entre forças de adesão e coesão.

Molhamento é importante na união ou aderência de dois materiais. Forças adesivas entre um líquido e um sólido causam o espalhamento da gota sobre a superfície. Forças coesivas dentro do líquido evitam o espalhamento da gota que evitam o molhamento da superfície, como mostrado na Fig. 6.18(OURA et al., 2003).

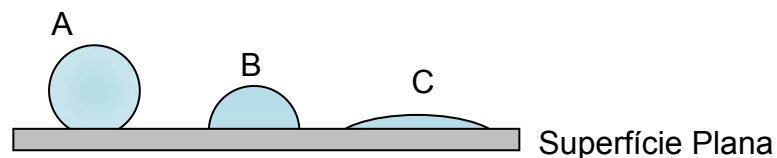


Figura 6.18 - Ângulo de contato entre as interfaces de uma superfície plana com a gota.

O ângulo de contato  $\theta$ , como visto na Fig. 6.18 é o ângulo entre a interface líquida/vapor com a interface sólida/líquida. Este é determinado pela resultante entre as forças adesivas e coesivas e fornece uma medida inversa da molhabilidade, ou seja, um ângulo de contato menor que  $90^\circ$  (ângulo de contato baixo) usualmente indica que o molhamento da superfície é muito favorável e o fluido espalhará sobre a grande área da superfície. Ângulos de contato maior que  $90^\circ$  (ângulo de contato alto) indicam que o molhamento da superfície é desfavorável, desse modo, minimizarão o contato do fluido com a superfície formando uma gota compacta, mostrado na Fig. 6.19.

Existem dois tipos de superfícies sólidas que os líquidos podem interagir, superfícies sólidas de alta energia e de baixa energia. Sólidos como metais, vidros e cerâmicas são conhecidos como “sólidos rígidos” onde a união química que os mantém juntos é muito forte. Com isso, estas superfícies são chamadas de superfícies de alta energia e a maioria dos



líquidos moleculares realiza um molhamento completo sobre estas superfícies. Outros tipos de sólidos obtidos por cristais moleculares frágeis (por exemplo, fluorcarboneto, hidrocarboneto, etc), onde as moléculas são mantidas juntas essencialmente por forças de Van der Waals, por exemplo, e, por isso, são unidos por forças de baixa intensidade, determinando as chamadas superfícies de baixa energia e dependendo do tipo de líquido, o molhamento pode ser completo ou parcial sobre tais superfícies (SCHRANDER e LOEB, 1992; GENNES, 1985).

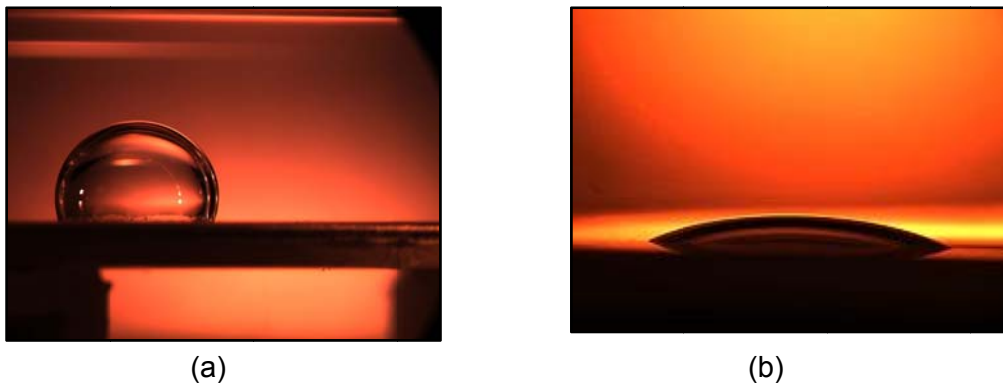


Figura 6.19 – (a) Mostra um ângulo de contato alto, (b) Mostra um ângulo de contato baixo(OURA et al., 2003).

Uma superfície sólida plana, rígida, perfeitamente lisa, quimicamente homogênea e com uma histerese do ângulo de contato igual a zero é considerada uma superfície sólida ideal. Uma histerese do ângulo de contato igual a zero implica que os ângulos de contato de avanço e de retrocesso são iguais.

A Figura 6.20 mostra as interfaces entre as três fases. No equilíbrio, a força por unidade de comprimento que atua ao longo da linha de contorno entre as três fases deve ser zero.

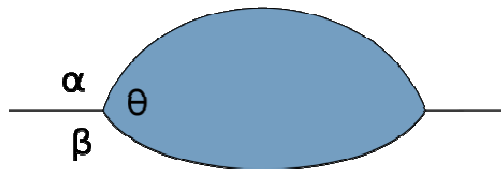


Figura 6.20 – Linhas de contato entre as três fases;  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$  são os ângulos de contato entre as fases(OURA et al., 2003).



As componentes de forças na direção das interfaces podem ser obtidas considerando superfícies sólidas ideais e um estado em que as interfaces não se movimentam e a linha de contorno das fases está em equilíbrio, ou seja,

$$\begin{aligned}\gamma_{\alpha\theta} + \gamma_{\theta\beta}\cos\theta + \gamma_{\alpha\beta}\cos\alpha &= 0 \\ \gamma_{\alpha\theta}\cos\theta + \gamma_{\theta\beta} + \gamma_{\alpha\beta}\cos\beta &= 0 \\ \gamma_{\alpha\theta}\cos\alpha + \gamma_{\theta\beta}\cos\beta + \gamma_{\alpha\beta} &= 0\end{aligned}\tag{6.10}$$

Onde  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$  são os ângulos das interfaces, mostrados na Fig. 6.20 e  $\gamma_{ij}$  é a energia superficial entre as duas fases indicadas. As relações também podem ser expressas por uma analogia com um triângulo conhecido como Triângulo de Neumann, mostrado na Fig. 6.21.

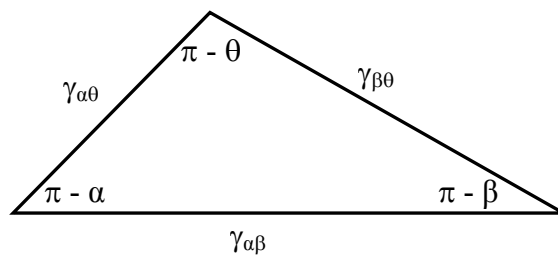


Figura 6.21 – Triângulo de Neumann

Se a fase  $\beta$  é substituída por uma superfície rígida plana, como mostra a Fig. 6.22,  $\beta$  será  $\pi$  rd e o segundo termo da Eq. (6.10) reduz-se à equação de Young (Eq. 1).

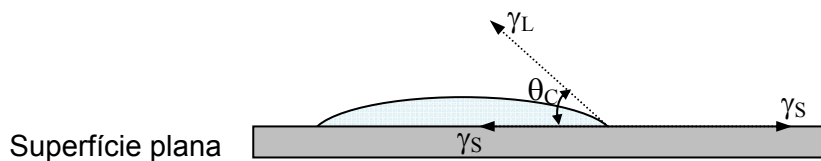


Figura 6.22 – Ângulo de contato de uma gota com uma superfície sólida rígida.

A Equação de Dupre-Young (Eq. 6.4) diz que  $\gamma_{SG}$  ou  $\gamma_{SL}$  não pode ser maior do que a soma das outras duas energias superficiais. A consequência desta restrição é a previsão do molhamento completo quando  $\gamma_{SG} > \gamma_{SL} + \gamma_{LG}$  e um molhamento zero quando  $\gamma_{SL} > \gamma_{SG} + \gamma_{LG}$ . A falta de uma solução para a Equação de Dupre-Young é um indicativo que não existe equilíbrio quando o ângulo de contato varia  $0^\circ$  e  $180^\circ$  para estas soluções.

Um parâmetro útil que mede a intensidade do molhamento é o parâmetro  $S$  de espalhamento, ou seja,

$$S = \gamma_{SG} - (\gamma_{SL} + \gamma_{LG}) \quad (6.11)$$

Quando  $S$  for positivo ocorre um molhamento completo da superfície e se  $S$  for negativo ocorre um molhamento parcial. Combinando o parâmetro de espalhamento com a relação de Young, obtém-se a equação de Dupre-Young que só tem soluções físicas para  $S$  menor do que zero, ou seja,

$$S = \gamma_{SG}(\cos\theta - 1) \quad (6.12)$$

Superfícies sólidas que não apresentam uma superfície perfeitamente lisa, não rígida, sem homogeneidade química e apresentam histerese do ângulo de contato são ditas superfícies sólidas não ideais ou reais.

A histerese do ângulo de contato ( $H$ ) é definida pela diferença entre o ângulo de avanço com o ângulo de retrocesso, como mostra a Fig. 6.23, ou seja,

$$H = \theta_A - \theta_R \quad (6.13)$$

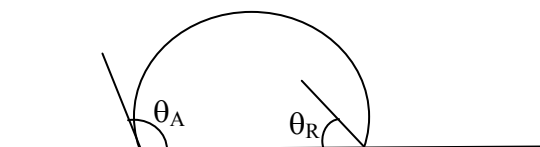


Figura 6.23 – Ângulo de contato de avanço e de retrocesso.

Uma boa saída para a idealidade é quando a superfície de interesse tem uma textura rugosa. Um molhamento homogêneo é quando o líquido preenche as ranhuras da superfície rugosa. Por outro lado, um molhamento heterogêneo é gerado pelo preenchimento não uniforme. Tais superfícies têm efeitos variados dos ângulos de contato de molhamento de líquidos.

Os modelos de Cassier-Baxter e Wenzel são os mais utilizados para descrever o molhamento de superfícies texturizadas. Entretanto, estas equações se aplicam somente quando o tamanho da gota é suficientemente grande quando comparado com a escala da rugosidade superficial (MARMUR, 2003).

O modelo de Wenzel descreve o molhamento homogêneo para superfícies rugosas, como visto na Fig. 6.24, sendo definido por,

$$\cos\theta^* = r\cos\theta \quad (6.14)$$

Onde  $\theta^*$  é o ângulo de contato aparente que corresponde a um estado de equilíbrio estável. A razão de rugosidade ( $r$ ) é a medida de como a rugosidade da superfície afeta uma superfície homogênea, sendo definida como a razão da área verdadeira da superfície do sólido com a área aparente. O ângulo  $\theta$  é o ângulo de contato de Young para uma superfície ideal.

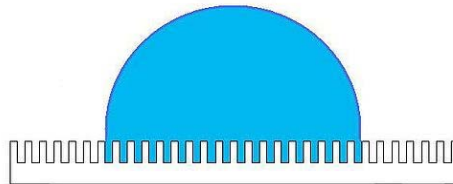


Figura 6.24 – Molhamento de acordo com o Modelo de Wenzel(FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

Para uma superfície heterogênea, o modelo de Wenzel não é adequado. Quando vários materiais estão envolvidos utiliza-se o modelo de Cassie-Baxter para medir a variação do ângulo de contato aparente, Fig. 6.25. A equação de Cassie-Baxter é dada por:

$$\cos\theta^* = r_f f \cos\theta + f - 1 \quad (6.15)$$

Onde  $r_f$  é a razão de rugosidade da superfície molhada e  $f$  é a fração da área superficial sólida molhada pelo líquido. Uma observação importante é quando  $f = 1$  e  $r_f = r$ . Neste caso, a equação de Cassie-Baxter transforma-se na equação de Wenzel. Por outro lado, quando existem muitas frações diferentes de rugosidade, cada fração da área superficial total é denotada por  $f_i$ .

A superfície total é igual ao somatório de todos os  $f_i$  que será unitário. A equação de Cassie-Baxter pode ser reformulada como,

$$\gamma \cos\theta^* = \sum_{n=1}^N f_i (\gamma_{i,SV} - \gamma_{i,SL}) \quad (6.16)$$

Onde,  $\gamma$  é a tensão superficial Cassie-Baxter entre o líquido e o vapor,  $\gamma_{i,SV}$  é a tensão superficial sólido/vapor da cada componente e  $\gamma_{i,SL}$  é a tensão superficial sólido/líquido de cada componente.

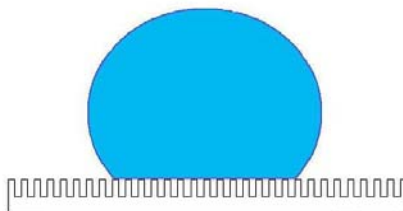


Figura 6.25 – Molhamento com o modelo de Cassie-Baxter(FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

#### 6.2.4. Ângulo de contato

O ângulo de contato é medido entre a interface líquido/vapor com a superfície sólida, ou ainda, é o ângulo entre a superfície da amostra sólida com a tangente que a borda da gota faz com a superfície, como mostrou a Fig. 6.19. Em geral, o ângulo de contato é medido utilizando um goniômetro, como foi visto na Fig. 6.17. A geometria da gota é determinada pela Relação de Young. Além disso, o ângulo de contato fornece informações diretamente sobre a interação entre a energia superficial com o líquido.

Um grande ângulo de contato indica uma baixa energia superficial ou uma afinidade química baixa. Demonstra também um baixo grau de molhamento da superfície. Por outro lado, um pequeno ângulo de contato indica uma alta energia superficial ou uma alta afinidade química. O molhamento completo se dá quando o ângulo de contato da borda da gota com a superfície plana é  $0^\circ$ . A Fig. 6.26 mostra alguns exemplos de molhamentos de acordo com o ângulo de contato.

Se um líquido é fortemente atraído por uma superfície sólida, a gota espalhará completamente sobre a mesma e o ângulo de contato será nulo. Exceto sólidos fortemente hidrofílicos terão um ângulo de contato até  $90^\circ$  e ainda, sobre algumas superfícies altamente hidrofílicas, gotículas de água exibirão ângulos de contato entre  $0^\circ$  e  $30^\circ$ . Se a superfície sólida é hidrofóbica, o ângulo de contato será maior do que  $90^\circ$  e sobre superfícies altamente hidrofóbicas, as gotículas exibirão ângulos de contato entre  $150^\circ$  e  $180^\circ$  não ocorrendo um molhamento significativo de alguma parte da superfície. Estas últimas superfícies são denominadas de super-hidrofóbicas.

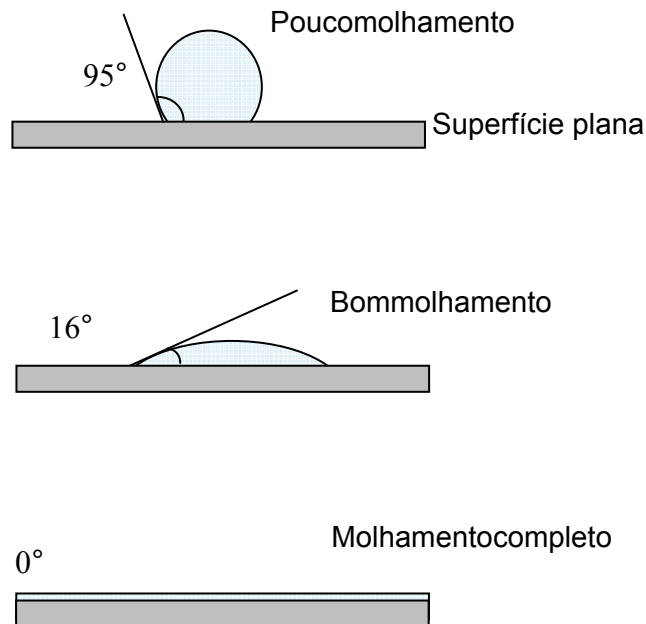


Figura 6.26 – Exemplos de molhamento de acordo com os ângulos de contato.

#### 6.2.4.1 Métodos de Medição do Ângulo de Contato

Conforme descrito anteriormente, o ângulo de contato entre uma gota repousando em uma superfície sólida, expressa muitas informações a respeito de propriedades físicas do sólido e do líquido. Em especial, é possível caracterizar a energia superficial do sólido utilizando, basicamente, os ângulos de contato medidos. Existem duas possibilidades de medição destes ângulos de contato, descritos a seguir:

##### a) Método Estático da Gota Sésil

Este método utiliza um equipamento denominado de goniômetro de ângulo de contato para medir o ângulo entre a interface líquido/vapor com a superfície plana do sólido. O equipamento, mostrado na Fig. 6.17, utiliza uma câmera de alta resolução para capturar o perfil do líquido sobre um substrato sólido. O valor do ângulo é determinado via software de processamento de imagens.

A vantagem deste método é o fato de uma superfície ser suficientemente grande para a análise de várias gotas (ou vários ângulos de contato) em diversas localidades da superfície para determinar a heterogeneidade. Esta reprodutibilidade dos valores particulares dos ângulos de contados refletirá a heterogeneidade das propriedades das energias superficiais. A desvantagem é que se a amostra é grande suficientemente para apenas uma gota, se torna difícil calcular esta heterogeneidade ou mesmo assumir a

heterogeneidade. Isto é verdadeiro porque os goniômetros convencionais não avaliam a gota tridimensionalmente e sim como uma superfície plana mostrando o ângulo de contato em apenas dois pontos: do lado direito e do lado esquerdo da borda da gota. Além disso, a medição é dificultada pela sua subjetividade inerente.

### b) Método Dinâmico da Gota Sésil

Este método é similar ao estático, porém as condições de obtenção da gota são diferentes. Neste o volume de líquido é adicionado dinamicamente ao substrato sólido e os maiores valores medidos dinamicamente determinam o ângulo de contato de avanço. A gota pode ser depositada por uma seringa diretamente sobre a superfície plana e os ângulos serem medidos visualmente por um transferidor ou utilizando um software de imagens, ver Fig. 6.27. O volume também é removido e os menores ângulos de contato são medidos para obter o ângulo de retrocesso. A diferença destes ângulos indica a histerese do ângulo de contato.

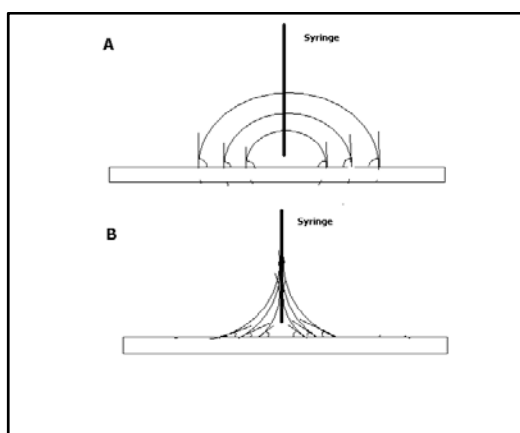


Figura 6.27 – Esboço do ângulo de contato, como visto por um goniômetro. Em A, mostra o aumento de volume da gota e em B mostra a redução de volume. Sendo que em cada momento, o ângulo de contato é medido (FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

Em geral, a caracterização de diferentes superfícies sólidas metálicas pode ser feita adequadamente utilizando apenas o método estático da gota Sésil. A seguir, esta metodologia é descrita em detalhes.

#### 6.2.5. A Técnica da Gota Sésil

A técnica da gota sésil é utilizada para determinar a energia superficial de sólidos e, em alguns casos, aspectos da energia superficial de líquidos. A estimativa da energia superficial dos sólidos é feita utilizando líquidos sensores, ou seja, de energia superficial conhecida. Neste caso, uma gota deste líquido é depositada sobre a superfície a ser

analisada e a forma final da gota (ângulo de contato) é avaliada. Através do valor do ângulo de contato medido é possível utilizar diferentes métodos para obter a energia superficial do sólido. Em geral, diferentes líquidos sensores são requeridos para determinar a energia superficial do sólido. A Tabela 6.2 mostra alguns líquidos sensores que podem ser utilizados e suas principais tensões superficiais. A técnica da gota séssil pode ser utilizada para obter a tensão superficial de líquidos utilizando sólidos de referência.

Tabela 6.2 – Líquidos sensores e suas tensões superficiais.

Líquido	Tensão Superficial Total (mJ/m <sup>2</sup> )	Componente Dispersivo (mJ/m <sup>2</sup> )	Componente Polar (mJ/m <sup>2</sup> )	Componente Ácido (mJ/m <sup>2</sup> )	Componente Básico (mJ/m <sup>2</sup> )
Ciclohexano	25,5	25,5	0	0	0
Clorofórmio	27,1	23,3	3,8	3,8	0
Tetrahidrofurano	27,4	12,4	15,0	0	15,0
Diodometano	50,8	50,8	0	0	0
Águadeinonizada	72,8	26,4	46,4	23,2	23,2

### 6.2.5.1 Estimativa da Energia Superficial

Os valores obtidos com a técnica Séssil dependem não só da amostra sólida, mais também das propriedades do líquido de prova que está sendo utilizado e da teoria utilizada para avaliar os parâmetros.

Existem várias teorias que diferem entre si pela formulação e convenções, porém, a principal diferença é o número de componentes ou parâmetros.

Os métodos mais simples, que contém poucos parâmetros, simplificam o sistema de tal forma que concentram a energia superficial em um número, enquanto que métodos mais complexos com maior quantidade de parâmetros são utilizados para avaliar vários parâmetros da energia superficial.

Como descrito, a energia superficial de sólidos e líquidos depende dos diferentes tipos de interações moleculares, tais como, interações dispersivas (Van der Waals), polar e ácido/base. Teorias que utilizam dois componentes são mais aplicadas em materiais de engenharia sujeitos a interação de líquidos e sólidos.

### a) Teoria para um componente

A Teoria de Zisman é a teoria mais simples e comum utilizada em superfícies não-polares. Isto significa que superfícies de polímeros que foram submetidos a tratamentos térmicos, tratamentos corona, limpeza com plasmas, ou polímeros que contém heteroátomos não são válidos para esta teoria. A teoria de Zisman também é mais útil em superfícies de menor energia (FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

Esta teoria define que a energia superficial é igual a energia superficial do líquido mais alta que molha completamente o sólido. Isto é, a gota dispersará tanto quanto possível a fim do molhar completamente a superfície para este líquido e alguns líquidos com menor energia superficial, mais isto não ocorrerá para líquidos com maior energia superficial.

Com isso, a melhor maneira de determinar a energia superficial através do método de Zisman é adquirir um conjunto de pontos para vários líquidos sobre a superfície em análise e plotar o gráfico do cosseno do ângulo versus a energia superficial conhecida do líquido. Construindo o gráfico de Zisman, pode-se extrapolar a maior energia superficial, real e hipotética, que resultará no completo molhamento da amostra com o ângulo de contato de  $0^\circ$ , como mostrado na Fig. 6.28. Neste método a precisão dos resultados depende da precisão dos valores das energias superficiais dos líquidos sensores utilizados na análise.

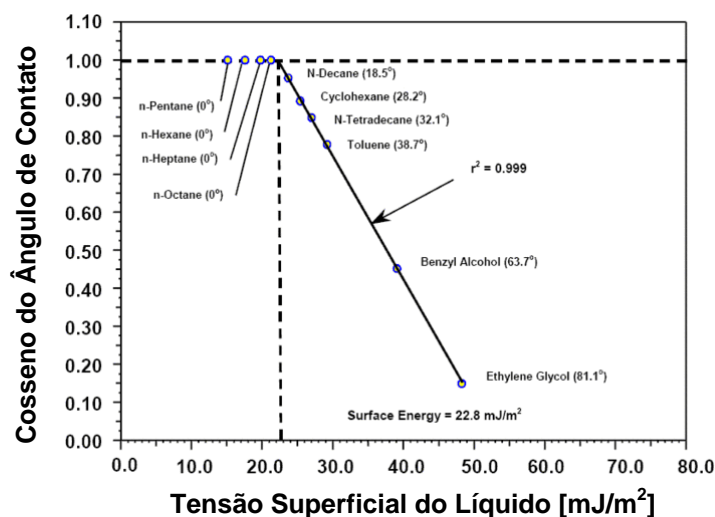


Figura 6.28 – Gráfico de Zisman para o cálculo da energia superficial de polietileno.(FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

### b) Teorias para dois componentes

A teoria de Owens/Wendt divide a energia superficial em dois parâmetros: a energia superficial devido a interações dispersivas e a energia superficial devido às interações polares. Esta teoria é derivada da Relação de Young que relaciona o ângulo de contato com as energias superficiais do sólido/líquido e com a tensão da interface. A equação de



Goodque retrata a tensão da interface com as componentes polares e dispersivas da energia superficial é dada pela Eq. (6.17), ou seja,

$$\frac{\sigma_L(\cos\theta + 1)}{2\sqrt{\sigma_L^D}} = \frac{\sqrt{\sigma_S^P}\sqrt{\sigma_L^P}}{\sqrt{\sigma_L^D}} + \sqrt{\sigma_S^D} \quad (6.17)$$

Note que a equação tem a forma de  $y = mx + b$ , onde,

$$y = \frac{\sigma_L(\cos\theta + 1)}{2\sqrt{\sigma_L^D}}; m = \sqrt{\sigma_S^P}; x = \frac{\sqrt{\sigma_L^P}}{\sqrt{\sigma_L^D}} \text{ e } b = \sqrt{\sigma_S^D}$$

As componentes polares e dispersivas da energia superficial do sólido são determinadas pela inclinação e interseção do gráfico resultante, ver Fig. 6.29.

O principal problema para obter o gráfico é que torna-se necessário conhecer especificamente como obter as componentes polar e dispersiva. Para fazer isto, pode-se reverter o processo testando um líquido sensor contra um sólido padrão que não é capaz de ter interações polares, como por exemplo PTFE (Polytetrafluoretileno). Neste caso, a Eq. (6.17) reduziria a,

$$\sigma_L^D = \frac{(\sigma_L(\cos\theta + 1))^2}{72} \quad (6.18)$$

Desde que a tensão superficial total do líquido é conhecida, a Eq. (6.18) determina o componente dispersivo e a diferença entre os componentes, total e dispersivo fornece o componente polar.

Esta teoria é aplicada para superfícies com baixa tensão superficial e polaridade moderada, tais como: PVC, poliamidas, poliéster, policarbonatos, poliuretanos e outros.

A teoria de Fowkes é derivada da teoria de Owens/Wendt, apenas multiplicando ambos os lados da Eq. (6.17) por  $\sqrt{\sigma_L^D}$ , ou seja,

$$\frac{\sigma_L(\cos\theta + 1)}{2} = \sqrt{\sigma_S^P}\sqrt{\sigma_L^P} + \sqrt{\sigma_S^D}\sqrt{\sigma_L^D} \quad (6.19)$$

Portanto, a medida da energia superficial pode ser feita de forma idêntica a teoria de Owens. Porém, é possível fazer testes usando líquidos sem componente polar ( $\sigma_L^P = 0$ ;  $\sigma_L =$

$\sigma_L^D$ ) e a seguir utilizar líquidos que possuam componentes, polar e dispersivos. Em seguida, lineariza-se as equações. Os líquidos recomendados diodometano e água.

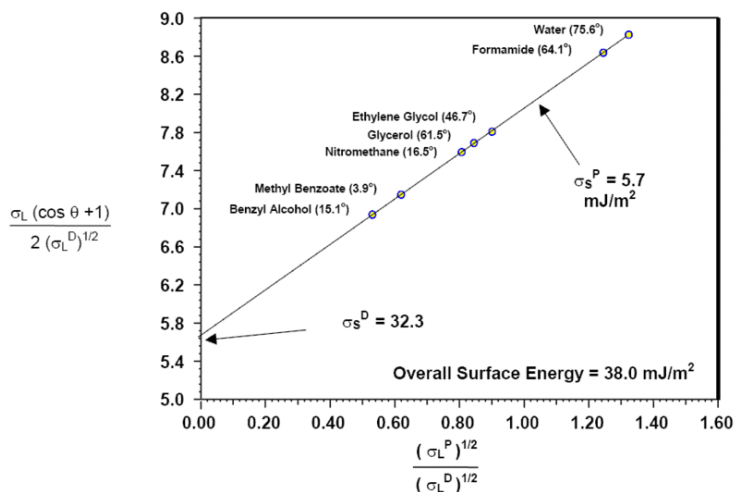


Figura 6.29 – Gráfico de Owens-Wendt para a determinação da energia superficial de Poli-metil-metacrilato(FÖRCH, SCHÖNHERR e JENKINS, 2009).

Outro método que utiliza dois componentes é a teoria de Wu, também similar às teorias de Owens/Wendt e Fowkes em que se divide a energia superficial em componentes polar e dispersiva. A diferença é que a teoria de Wu utiliza médias harmônicas em vez de médias geométricas para as tensões superficiais conhecidas, e subseqüentemente o uso de uma formulação matemática mais rigorosa.

A teoria de Schultz é aplicável somente em sólidos com energias superficiais muito altas. Além disso, esta teoria também é similar às teorias de Owens/Wendt, Fowkes e Wu, mas é projetada para situações onde medições exigidas pelos outros métodos são impossíveis de serem efetuadas. Na classe de sólidos com alta energia superficial, por exemplo, metais puros, a maioria dos líquidos molha completamente a superfície com um ângulo de contato igual a 0°, e desse modo, nenhum dado útil pode ser acumulado. Nesta teoria uma gota séssil do líquido sensor é depositada na superfície sólida enquanto o sistema é submergido em outro líquido e não no ar. Como resultado a maior pressão “atmosférica” devido ao contorno do líquido causa uma compressão da gota possibilitando uma leitura do ângulo de contato.

O método de Schultz é robusto, porém é mais complexo, matematicamente e experimentalmente. Além disso, os ajustes da câmera são mais complicados devido às propriedades de refração do contorno do líquido.

### c) Teorias para três componentes

Neste caso, o principal método é a teoria de Van Oss que separa a energia superficial de sólidos e líquidos em três componentes. Isto inclui a energia superficial dispersiva, como antes, e subdivide a componente polar como sendo a soma de duas componentes específicas: a energia superficial devido a interações ácidas e devido a interações básicas. Esta teoria é mais adequada para testes de energias superficiais de superfícies inorgânicas, organometálicas e superfícies contendo íons, como por exemplo, pigmentos, farmacêuticos e papéis.

### 6.2.5.2 Estimativa Proposta da Energia Superficial

O cálculo da energia superficial das superfícies de titânio com diferentes tratamentos superficiais utilizadas nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células foi abordado de acordo com a Teoria de Fowkes descrita anteriormente utilizando dois componentes através da Técnica da Gota Sessil. Foi construído um dispositivo experimental contendo uma pequena mesa circular para a fixação da amostra, uma fonte de luz e uma câmera fotográfica (LINUX) mostrado na Fig. 6.30.

Para a obtenção dos ângulos de contato foram utilizados dois líquidos sensores, água deionizada e clorofórmio que possuem componentes dispersivos e polares, mostrados na Tab. 6.2. Durante o processo experimental utilizou também um peso de 70 gramas no intuito de que a gota colocada sobre a superfície do disco de titânio fosse sempre com o mesmo volume. A Fig. 6.31 mostra o peso sobre a seringa no momento em que se deseja colocar a gota na superfície.

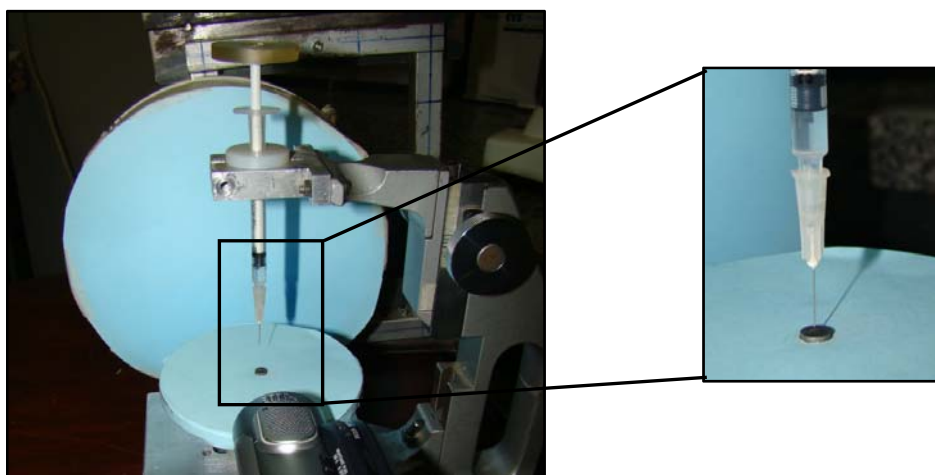


Figura 6.30– Aparato experimental para a obtenção das imagens para o cálculo do ângulo de contato. Em detalhe mostra a posição fixa da agulha.

A Fig. 6.32 mostra uma gota de água deionizada e uma gota de clorofórmio sobre superfícies dos discos de titânio. No Apêndice são mostradas todas as imagens de cada grupo estudado com a água deionizada e com o clorofórmio, além das superfícies lisas.



Figura 6.31 – Dispositivo com o peso sobre a seringa.

O procedimento para obtenção da medida do ângulo de contato foi feita no software de análise de imagens digitais (ImageJ, “downloaded” do NationalInstituteof Health, Bethesda, MD, EUA, disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Neste software foram realizadas seis medidas de ângulo externo da gota sendo três medidas do lado esquerdo e três medidas do lado direito da gota como mostra a Fig. 6.33 para a água deionizada. Para o clorofórmio foram feitas seis medidas de ângulo interno da gota. Após a aquisição das medidas foi feita a média aritmética para cada grupo sendo que para a água foi obtido o suplemento da média.



(a)



(b)

Figura 6.32 – Procedimento experimental na superfície do titânio, em (a) mostra uma gota de água deionizada e em (b) mostra uma gota de clorofórmio sobre a superfície do Grupo 04.

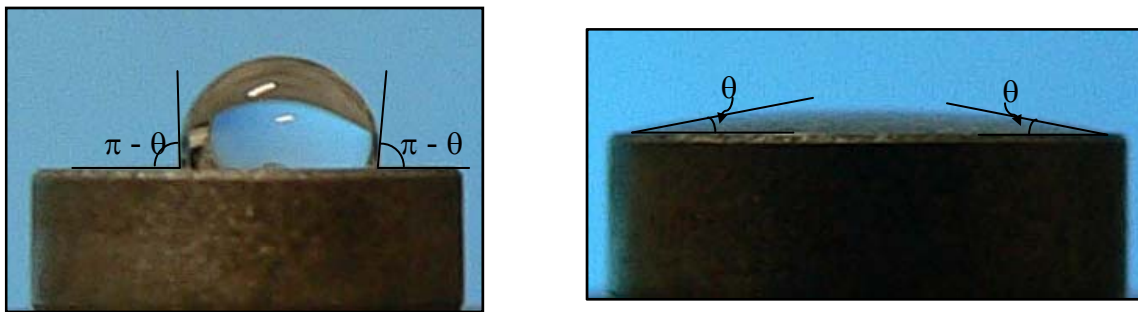


Figura 6.33 – Medição dos ângulos de contato na água e no clorofórmio.

Logo após a realização das medidas dos ângulos e obtenção das médias dos ângulos de contato foi calculada a energia superficial do sólido utilizando a energia superficial dos líquidos sensores (água deionizada e clorofórmio). Então, de acordo com a Tab. 6.2 tem-se que,

$$\text{Água deionizada: } \sigma_L^D = 26,4 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2}; \sigma_L^P = 46,4 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2} \text{ e } \sigma_L = 72,8 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2} \text{ (total)}$$

$$\text{Clorofórmio: } \sigma_L^D = 23,3 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2}; \sigma_L^P = 3,8 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2} \text{ e } \sigma_L = 27,1 \frac{\text{mJ}}{\text{m}^2} \text{ (total)}$$

Medindo os ângulos de contato das gotas e utilizando as energias superficiais definidas acima para os líquidos sensores, a energia superficial do sólido utilizado foi estimada através da Eq. (6.19). Por exemplo, para o G01 foi obtido um  $\theta = 83,16^\circ$  para a água deionizada e um  $\theta = 9,07^\circ$  para o clorofórmio. Aplicando na Eq. (6.19) tem-se que:

Água deionizada:

$$\frac{72,8[\cos(83,16) + 1]}{2} = \sqrt{\sigma_S^P} \cdot \sqrt{46,4} + \sqrt{\sigma_S^D} \cdot \sqrt{26,4}$$

$$40,77 = 6,81 \sqrt{\sigma_S^P} + 5,14 \sqrt{\sigma_S^D} \quad (6.20)$$

Clorofórmio:

$$\frac{27,1[\cos(9,07) + 1]}{2} = \sqrt{\sigma_S^P} \cdot \sqrt{3,8} + \sqrt{\sigma_S^D} \cdot \sqrt{23,3}$$

$$6,71 = 1,95 \sqrt{\sigma_S^P} + 4,83 \sqrt{\sigma_S^D} \quad (6.21)$$

De (6.20) e (6.21) tem-se um sistema com duas equações e duas incógnitas,

$$\begin{cases} 40,77 = 6,81\sqrt{\sigma_S^P} + 5,14\sqrt{\sigma_S^D} \\ 6,71 = 1,95\sqrt{\sigma_S^P} + 4,83\sqrt{\sigma_S^D} \end{cases}$$

E resolvendo o sistema tem-se que:

$$\sigma_S^D = 2,19 \frac{mJ}{m^2} \text{ e } \sigma_S^P = 23,72 \frac{mJ}{m^2}$$

Como a energia superficial do sólido pode ser estimada pela equação  $\sigma_S = \sigma_S^D + \sigma_S^P$ , para o G01 a energia superficial do sólido é de  $25,91 \frac{mJ}{m^2}$ .

De forma análoga foram obtidas as energias superficiais para os outros grupos que são mostrados no Capítulo VII.



# CAPÍTULO VII

## RESULTADOS

A obtenção de uma equação de predição para o nível de osteogênese em diferentes condições superficiais será feita através de métodos de similitude em engenharia utilizando dados obtidos por ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Além da avaliação de todo o fenômeno de crescimento celular em diferentes superfícies, esta equação permite fazer uma estimativa de um importante fator relacionado com o fenômeno da osseointegração que é a osteogênese de posse de variáveis medidas, rugosidade e energia superficial. Neste caso, a partir de um valor padrão estabelecido pode-se classificar uma nova superfície quanto a este efeito sem que necessariamente seja feito um ensaio “*in vitro*” de cultura de células que, em geral, é oneroso e de alto custo.

Neste capítulo são apresentados todos os resultados dos ensaios de cultura de células realizados e paralelamente, estes dados são utilizados para definir uma medida ou intensificação da osteogênese. Esta medida é utilizada como variável de referência para definir uma equação de predição do fenômeno. São apresentados também todos os resultados das caracterizações das superfícies analisadas, rugosidade e energia superficial.

### 7.1. Caracterização das Superfícies

#### 7.1.1. Medida da Rugosidade

As amostras foram avaliadas no Interferômetro a Laser para determinar os diferentes parâmetros da rugosidade. Os valores médios e o desvio padrão de  $R_a$  (rugosidade média),  $R_q$  (rugosidade média quadrática),  $R_t$  (rugosidade total) são mostrados na Tab. 7.1.

Utilizando uma análise de variância e um teste de Bonferroni com um nível de significância de 95% (GraphPadSoftware, Inc. - Prism 5.0) verificou-se que para os valores de  $R_a$ ,  $R_q$  e  $R_t$  dos grupos quando comparados com os valores da superfície lisa (GRUPO CONTROLE) são estatisticamente diferentes. A Figura 7.1 mostra as médias com os



desvios padrões de  $R_a$ , a Fig. 7.2 mostra as médias de  $R_q$  e a Fig. 7.3 mostra as médias de  $R_t$ .

Tabela 7.1 – Resultados dos parâmetros de rugosidade obtidos na Interferometria a Laser.

Grupos	$R_a \pm DP$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_q \pm DP$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_t \pm DP$ ( $\mu\text{m}$ )
AMOSTRA LISA	$0,58 \pm 0,21$	$0,72 \pm 0,26$	$4,32 \pm 1,22$
G01	$0,97 \pm 0,15$	$1,21 \pm 0,15$	$7,91 \pm 0,72$
G02	$1,08 \pm 0,16$	$1,32 \pm 0,27$	$9,54 \pm 1,11$
G03	$0,97 \pm 0,15$	$1,25 \pm 0,18$	$8,64 \pm 1,87$
G04	$0,79 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,05$	$6,71 \pm 0,70$
G05	$0,91 \pm 0,12$	$1,15 \pm 0,14$	$7,53 \pm 0,74$
G06	$0,79 \pm 0,06$	$1,01 \pm 0,07$	$6,98 \pm 0,66$
G07	$1,10 \pm 0,14$	$1,38 \pm 0,19$	$8,34 \pm 1,21$
G08	$0,88 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,07$	$7,80 \pm 1,07$
G09	$0,85 \pm 0,08$	$1,09 \pm 0,09$	$7,79 \pm 0,75$
G10	$0,73 \pm 0,16$	$0,95 \pm 0,21$	$6,36 \pm 1,27$
G11	$0,76 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,11$	$6,63 \pm 0,44$
G12	$0,53 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,06$	$5,27 \pm 0,79$
G13	$0,81 \pm 0,14$	$1,04 \pm 0,20$	$7,21 \pm 1,31$
G14	$1,02 \pm 0,12$	$1,27 \pm 0,13$	$7,78 \pm 0,63$
G15	$0,93 \pm 0,12$	$1,19 \pm 0,16$	$7,43 \pm 0,89$
G16	$0,68 \pm 0,19$	$0,88 \pm 0,27$	$5,10 \pm 1,36$
G17	$0,80 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,07$	$7,66 \pm 1,09$
G18	$0,98 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,08$	$8,16 \pm 0,34$

Na análise da rugosidade realizada no interferômetro a laser (LTM/UFU) foi extraído o perfil da rugosidade de cada grupo juntamente com a topografia da superfície. As Figuras 7.4, 7.5 e 7.6 mostram três perfis de rugosidade obtidos após a interferometria no programa UBSOFT 1.9 conforme descrito no Capítulo VI. As Figuras 7.7, 7.8 e 7.9 mostram três topografias das superfícies obtidas no programa UBSOFT 1.9 utilizando uma área de  $1 \text{ mm}^2$  qualquer do disco. O restante dos perfis e das topografias são mostradas no Apêndice deste trabalho.

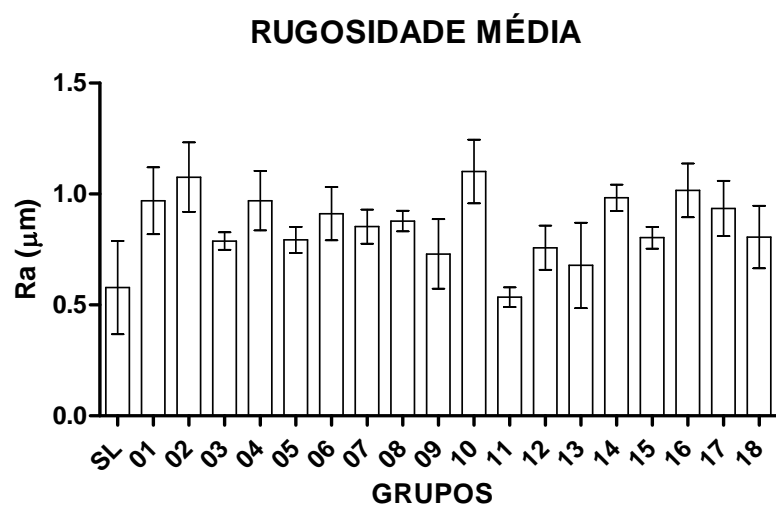


Figura 7.1 – Média e desvio padrão de  $R_a$ .

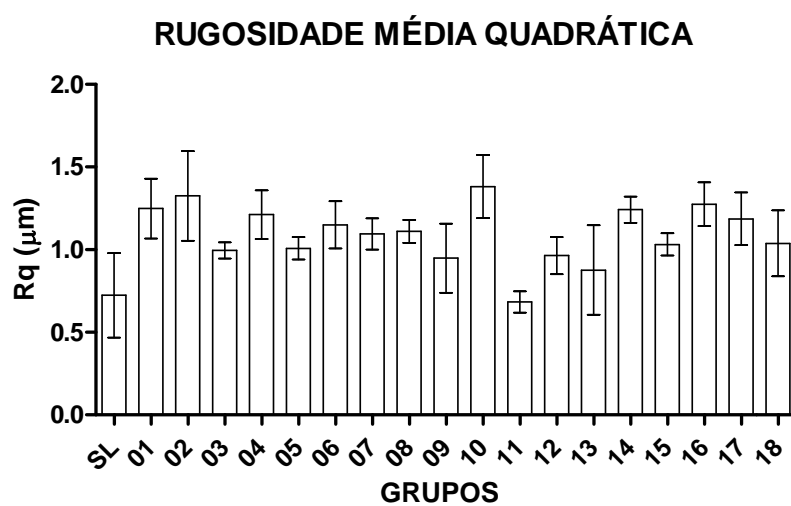


Figura 7.2 – Média e desvio padrão de  $R_q$ .

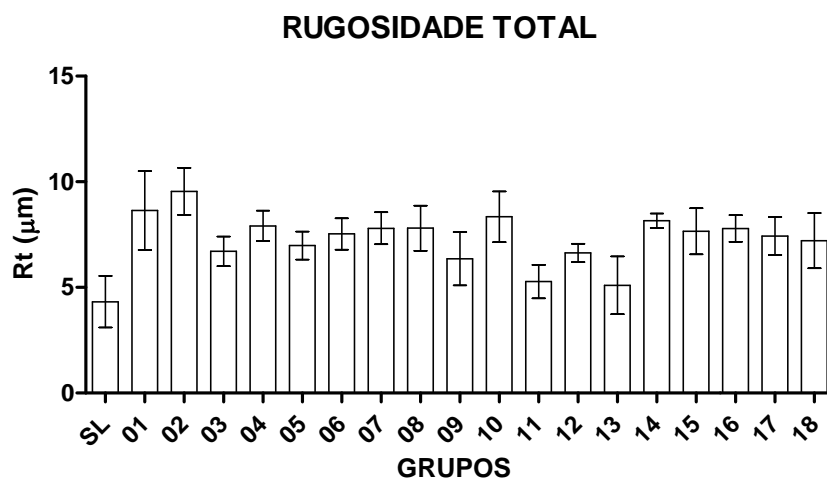


Figura 7.3 – Média e desvio padrão de  $R_t$ .

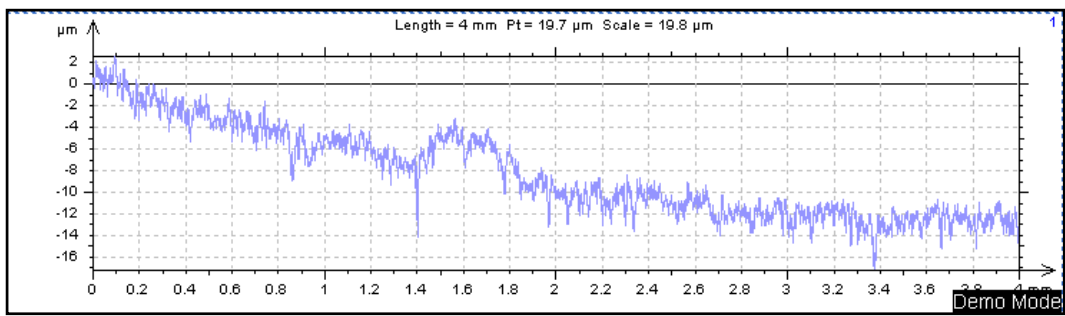


Figura 7.4 – Perfil de rugosidade do GRUPO 04.

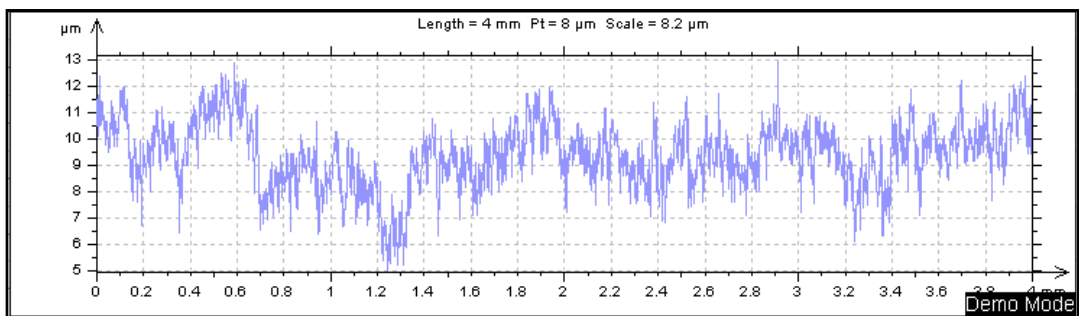


Figura 7.5 – Perfil de rugosidade do GRUPO 06.

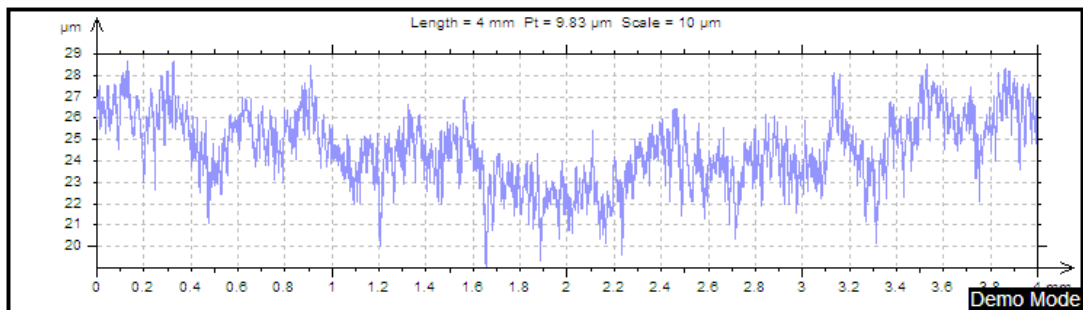


Figura 7.6 – Perfil de rugosidade do GRUPO 16.

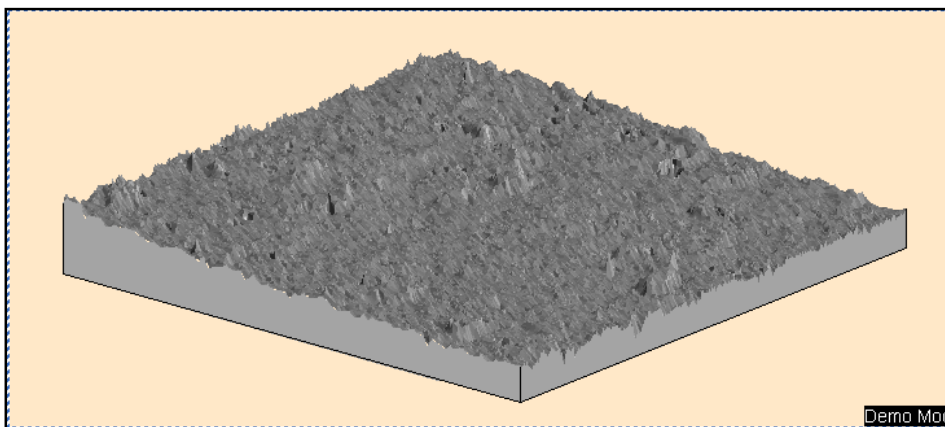


Figura 7.7 – Topografia da superfície GRUPO 02.

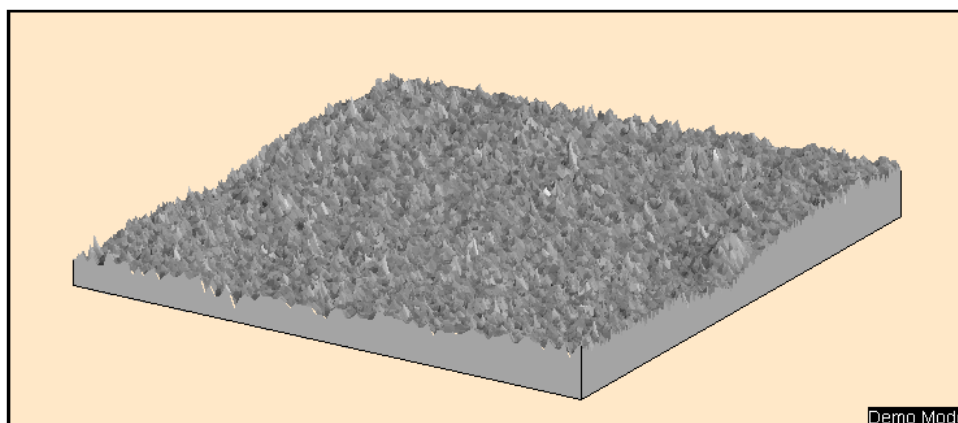


Figura 7.8 – Topografia da superfície GRUPO 10.

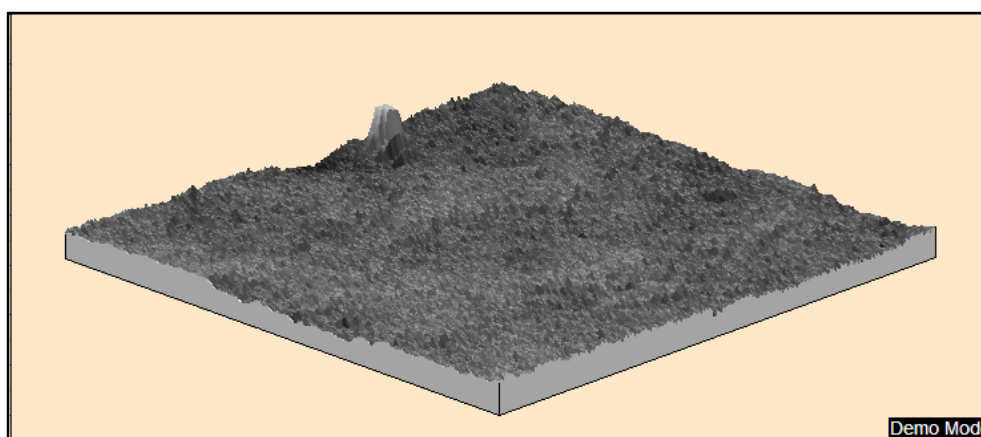


Figura 7.9 – Topografia da superfície GRUPO 18.

Pode-se observar uma influência da granulometria utilizada para a realização do jateamento da superfície e conseqüentemente nos valores de rugosidade média, rugosidade média quadrática e rugosidade total obtidos com a interferometria.

A superfície mostrada na Fig. 7.8 possui um aspecto mais uniforme, porém com uma rugosidade média maior que da superfície mostrada na Fig. 7.9. Isto pode ser justificado pelo tempo de jateamento sendo que no GRUPO 10 foi utilizado um tempo de 3" enquanto que no GRUPO 18 utilizou um tempo de 2". Além disso, a pressão exercida no jateamento no GRUPO 10 foi de 20 Bar enquanto que a pressão do GRUPO 18 foi de 30 Bar, uma vez que, a granulometria não foi alterada entre estes grupos. Porém, houve um condicionamento químico que suaviza os picos gerados pelo jateamento e no GRUPO 10, o ataque ácido foi com um ácido F2 em temperatura ambiente e durante um tempo de 30', enquanto que no GRUPO 18 utilizou um ácido F3 em uma temperatura de 60°C e um tempo de exposição ao ácido por 1 hora.

As Figuras 7.10 e 7.11 mostram duas superfícies observadas em um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S-4700, Tokyo, Japan - Chapel Hill Analytical and Nanofabrication Laboratory (CHANL) da University of North Carolina).

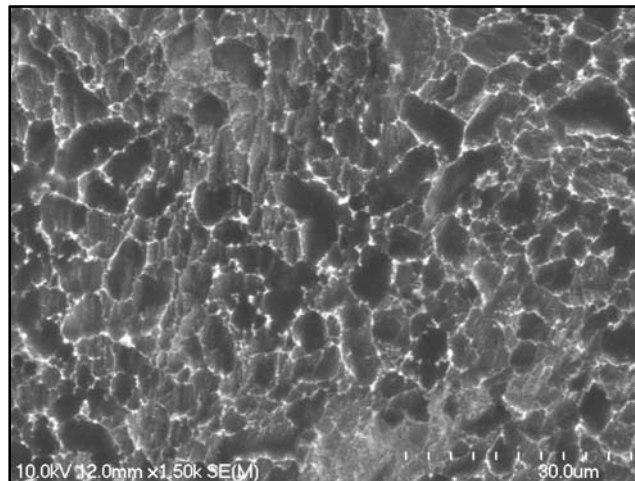


Figura 7.10 – Topografia da superfície do GRUPO 04 através do MEV – CHANL/UNC com um aumento de 1 500X.

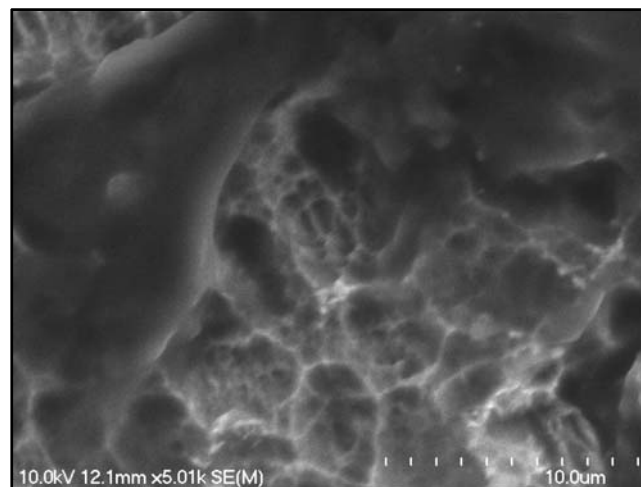


Figura 7.11 – Topografia da superfície do GRUPO 14 através do MEV – CHANL/UNC com um aumento de 5 000X.

### 7.1.2. Medida da Energia Superficial

O cálculo da energia superficial dos discos de titânio em estudo foi feito conforme descrito no Capítulo VI, utilizando os ângulos de contato entre uma gota de um líquido sensor e a superfície do disco. Os líquidos sensores utilizados foram a água deionizada e o clorofórmio. Utilizando a Teoria de Fowkes foi possível obter a energia superficial dos discos de titânio como mostra a Tab. 7.2. Aplicando ANOVA e o teste de Bonferroni com 95% de confiança, verificou-se diferença significativa entre os valores das energias ( $P < 0,0001$ ), como mostra a Fig. 7.12, entre as energias obtidas com os ângulos de contato. As Figuras

7.13, 7.14 e 7.15 mostram imagens das gotas de água deionizada e de clorofórmio sobre os discos de titânio estudados.

Tabela 7.2 – Média das Energias Superficiais do Titânio.

Grupos	Energia Superficial (mJ/m <sup>2</sup> )	DP
G01	28,21	1,51
G02	26,76	0,13
G03	27,71	0,86
G04	33,81	4,64
G05	28,20	2,47
G06	29,03	1,73
G07	29,61	2,17
G08	27,63	0,66
G09	30,38	1,31
G10	32,79	1,09
G11	31,36	4,59
G12	33,66	1,00
G13	26,92	0,07
G14	29,83	2,35
G15	27,15	0,32
G16	26,10	0,06
G17	27,55	0,22
G18	26,79	0,03

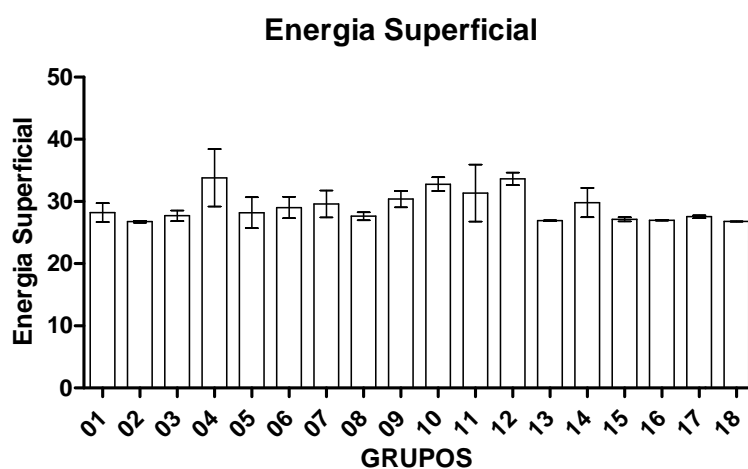


Figura 7.12 – Média e desvio padrão da energia superficial calculada através da Teoria de Fowkes.

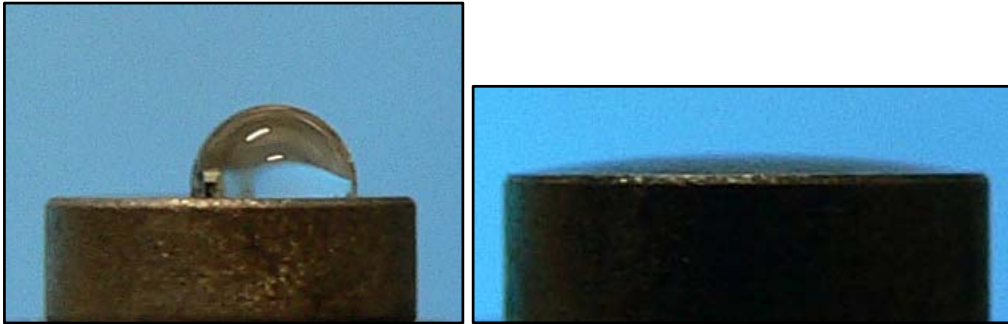


Figura 7.13 – Imagens obtidas no ensaio de energia superficial com a água deionizada e com o clorofórmio – GRUPO 02.

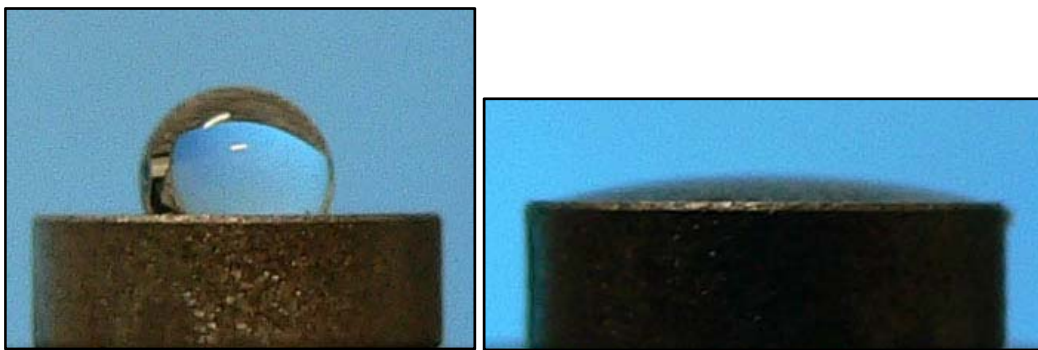


Figura 7.14 – Imagens obtidas no ensaio de energia superficial com a água deionizada e com o clorofórmio – GRUPO 08.

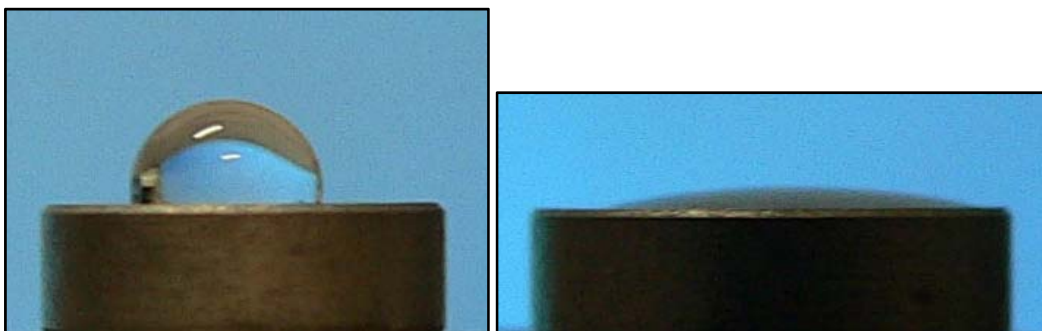


Figura 7.15 – Imagens obtidas no ensaio de energia superficial com a água deionizada e com o clorofórmio – GRUPO 16.

De forma similar, outras imagens das gotas tanto para a água deionizada quanto para o clorofórmio serão mostrados no Apêndice deste trabalho.

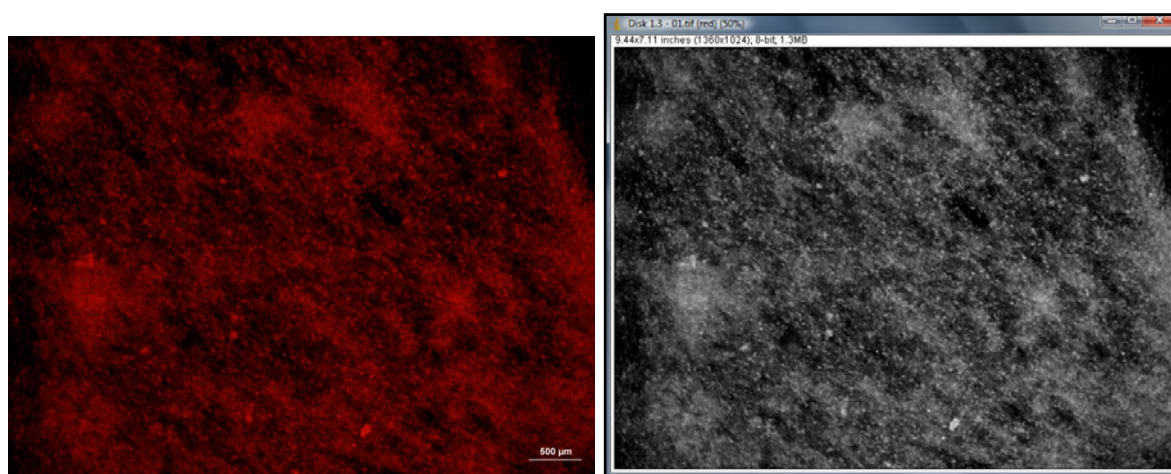
## 7.2 Medida ou Intensificação da Osteogênese

Através dos ensaios “*in vitro*” de cultura de células foram avaliados os seguintes parâmetros de análise celular: a proliferação e viabilidade celular, a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização. As Tabelas 7.1 e 7.2 mostraram os 18 grupos ou condições superficiais, em discos de titânio, avaliados neste trabalho.

A Tabela 7.3 mostra valores médios obtidos para os três parâmetros de análise celular representando-os através das respectivas nomenclaturas definidas no Capítulo V, ou seja, medida da atividade de fosfatase alcalina ( $\eta_1$ ), proliferação e viabilidade celular ( $\eta_2$ ), e nódulos de mineralização ( $\eta_3$ ).

A unidade para  $\eta_1$  é expressa em  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  protein/min (micromol de timolftaleína por micrograma de proteína por minuto). A unidade de  $\eta_2$  é número de células e a unidade para  $\eta_3$  é expressa em  $\text{mm}^2$  (porcentagem da área corada com Alizarina Red S convertida na área superficial superior do disco em contato com as células).

A Tabela 7.4 mostra novamente os dados organizados para a rugosidade R e a energia superficial para os 18 grupos analisados. A Figura 7.16 mostra uma imagem real e uma imagem processada no software ImageJ para avaliar os nódulos de mineralização.



(a) (b)

Figura 7.16 – Superfície de titânio do GRUPO G03 (a) real; (b) analisada no software ImageJ para determinação dos nódulos de mineralização.

Inicialmente, a determinação de um valor quantitativo para a osteogênese é feita normalizando as variáveis de influência pelo número total de células plaqueadas. Na seqüência, as variáveis são adimensionalizadas. Finalmente, os pesos ou índices de influência das variáveis medidas são considerados para estimar um índice para a osteogênese.



Tabela 7.3 – Valores médios dos parâmetros celulares analisados nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células.

Grupos	$\eta_1(\mu\text{M}/ \mu\text{g protein /min})$			$\eta_2(\text{células})$		$\eta_3(\text{mm}^2)$
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	
G01	3,20	6,70	3,14	6.862	7.851	14,35
G02	2,56	8,46	4,50	6.266	10.357	11,91
G03	3,65	7,59	7,25	5.988	6.613	23,58
G04	3,41	10,52	4,79	5.816	14.815	19,46
G05	2,73	6,56	2,90	7.892	13.476	21,18
G06	2,41	7,25	4,40	8.480	8.422	18,21
G07	2,04	6,36	2,39	5.343	6.267	20,56
G08	2,73	6,54	2,64	8.284	9.613	9,59
G09	3,25	6,27	2,43	6.666	9.089	20,01
G10	2,69	6,37	4,62	7.557	7.595	19,48
G11	2,39	7,97	4,48	7.058	7.119	24,29
G12	2,18	9,06	3,03	7.238	9.184	22,72
G13	1,18	3,23	2,20	6.290	11.184	16,18
G14	1,76	4,71	4,61	6.290	8.750	19,98
G15	2,01	5,14	2,65	6.086	10.333	20,97
G16	3,90	5,54	3,85	6.813	6.464	18,50
G17	2,16	5,74	2,11	7.557	10.797	20,15
G18	3,03	5,33	4,99	10.204	11.535	16,23

Portanto, tem-se que:

**1º: Normalização pelo número de células plaqueadas (ncel):**

$$r_1 = \frac{\eta_1}{ncel} \left( \frac{\mu\text{mol}}{h / \text{mg} / \text{células}} \right)$$

$$r_2 = \frac{\eta_2}{ncel}$$

$$r_3 = \frac{\eta_3}{ncel} \left( \frac{\text{mm}^2}{\text{células}} \right)$$

(7.1)

Tabela 7.4 – Valores de rugosidade  $R_a$  e energia superficial para os 18 grupos. Valores com desvio padrão.

Grupos	Rugosidade $R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	Energia Superficial ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ )
G01	0,97 $\pm$ 0,15	28,21 $\pm$ 1,51
G02	1,08 $\pm$ 0,16	26,76 $\pm$ 0,13
G03	0,97 $\pm$ 0,15	27,71 $\pm$ 0,86
G04	0,79 $\pm$ 0,04	33,81 $\pm$ 4,64
G05	0,91 $\pm$ 0,12	28,20 $\pm$ 2,47
G06	0,79 $\pm$ 0,06	29,03 $\pm$ 1,73
G07	1,10 $\pm$ 0,14	29,61 $\pm$ 2,18
G08	0,88 $\pm$ 0,05	27,63 $\pm$ 0,66
G09	0,85 $\pm$ 0,08	30,38 $\pm$ 1,31
G10	0,73 $\pm$ 0,16	32,79 $\pm$ 1,09
G11	0,76 $\pm$ 0,10	31,36 $\pm$ 4,59
G12	0,53 $\pm$ 0,04	33,66 $\pm$ 1,00
G13	0,81 $\pm$ 0,14	26,92 $\pm$ 0,07
G14	1,02 $\pm$ 0,12	29,83 $\pm$ 2,35
G15	0,93 $\pm$ 0,12	27,15 $\pm$ 0,32
G16	0,68 $\pm$ 0,19	26,10 $\pm$ 0,06
G17	0,80 $\pm$ 0,05	27,55 $\pm$ 0,22
G18	0,98 $\pm$ 0,06	26,79 $\pm$ 0,03

## 2º: Adimensionalização das variáveis:

A variável  $\eta_2$  já é adimensional. Para a adimensionalização da ALP ( $\eta_1$ ) utilizou-se como um fator de quantificação celular para os níveis de  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  protein/min da ALP o valor máximo desta atividade no 7º dia, ponderada pela quantidade total de células plaqueadas, ou seja,

$$Nfat = (ncel / \max(ALP)_{7 \text{ dia}}) \quad (\text{cel}/(\mu\text{mol}/\mu\text{g} \text{ protein}/\text{min})) \quad (7.2)$$

Para os nódulos de mineralização, considerou-se que na condição ótima as ( $n_{\text{prol}}$ ) células proliferadas ocupariam a área total do disco de titânio ( $A$ ). Neste caso, é possível obter a relação do número de células pela área do disco de titânio. Portanto, das informações anteriores e da Eq. 7.1 tem-se que,

$$\begin{aligned} a_1 &= \frac{\eta_1}{n_{\text{cel}}} N_{\text{fat}} \\ a_2 &= r_2 \\ a_3 &= \frac{\eta_3}{n_{\text{cel}}} \frac{n_{\text{prol}}}{A} \end{aligned} \tag{7.3}$$

### 3º: Determinação da intensificação ou nível da osteogênese:

Utilizando a Eq. (5.1), com as variáveis de influência normalizadas definidas no 2º passo e os respectivos pesos, estima-se um valor quantitativo para a osteogênese considerando os resultados do ensaio “*in vitro*”.

Um valor específico ( $\Psi_i$ ) indica que este valor adimensional mede ou estima uma proporção da condição ótima da osteogênese que, naturalmente, seria de 100% ou 1, considerando os corpos de prova analisados. Considerando a formulação proposta é possível estimar os valores de  $\Psi$  para todos os grupos.

Foi desenvolvido um programa em ambiente Matlab® (*vitro.m*) para organizar todos os dados do ensaio de cultura de células e caracterização de superfície. No programa é possível gerar os gráficos, calcular os níveis de osteogênese e obter os ajustes de curvas necessários para a obtenção da equação de predição da osteogênese. A Tabela 7.5 mostra os valores de  $\Psi$  de todos os grupos considerando os dados fornecidos na Tab. 7.4 e Eqs. 7.1, 7.2 e 5.1. Neste caso, as amostras de titânio possuíam diâmetro de 6 mm com área superficial ( $A$ ) de 28,27 mm<sup>2</sup>. A Figura 7.17 mostra como se comporta a variação deste índice de osteogênese nos diferentes grupos de diferentes condições superficiais dadas por 7 condições de jateamento e 6 condições de ataque ácido.

Observa-se que o nível de osteogênese aumenta de 0,5 a 0,73 nos grupos de 1 a 4 e reduzindo nos demais grupos. O valor máximo é de 0,73 no grupo G04 e nos grupos de G06 a G18 os valores variam dentro de uma faixa de 0,4 a 0,64.

As Figuras 7.18 e 7.19 mostram a variação dos níveis da osteogênese em função dos diferentes parâmetros de caracterização das superfícies dos 18 grupos, rugosidade e energia superficial, respectivamente. Nestas figuras são mostradas as curvas ajustadas aos dados experimentais que correlacionam, respectivamente, os valores dos níveis de

osteogênese com os valores de rugosidade e energia superficial. Devido a não linearidade dos dados a melhor curva adaptada a todos os dados foi uma curva de Fourier. Neste caso, a Tabela 7.6 mostra os valores das constantes de Fourier para cada curva específica que foi ajustada através do programa Matlab® (vitro.m). Deve-se ressaltar que alguns pontos experimentais de grande desvio foram desconsiderados no momento do ajuste de curvas. Este procedimento foi realizado com o objetivo de obter uma boa correlação entre os dados, uma vez que, o objetivo era verificar a tendência dos níveis de osteogênese em face de cada parâmetro de caracterização da superfície.

Tabela 7.5 - Valores de  $\Psi$  para os 18 grupos.

Grupos	Índice de Osteogênese ( $\Psi$ )
G01	0,51
G02	0,57
G03	0,63
G04	0,74
G05	0,66
G06	0,58
G07	0,41
G08	0,47
G09	0,51
G10	0,58
G11	0,58
G12	0,58
G13	0,43
G14	0,49
G15	0,50
G16	0,52
G17	0,56
G18	0,65

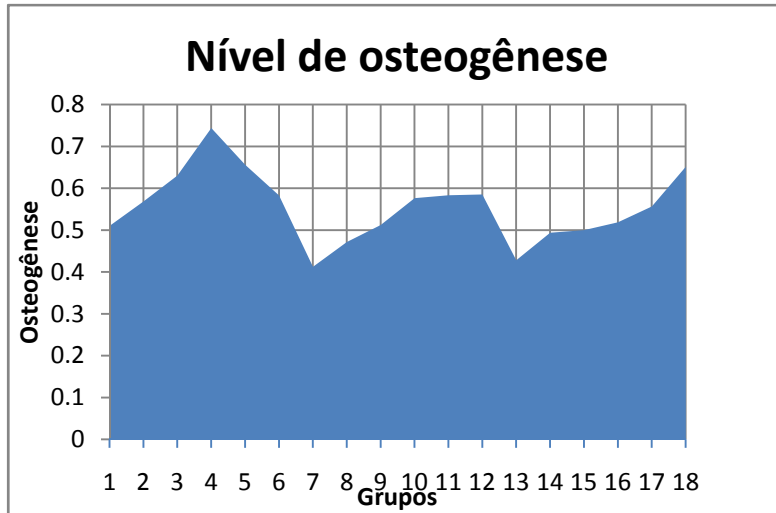


Figura 7.17 – Nível de osteogênese estimada nos 18 grupos analisados.

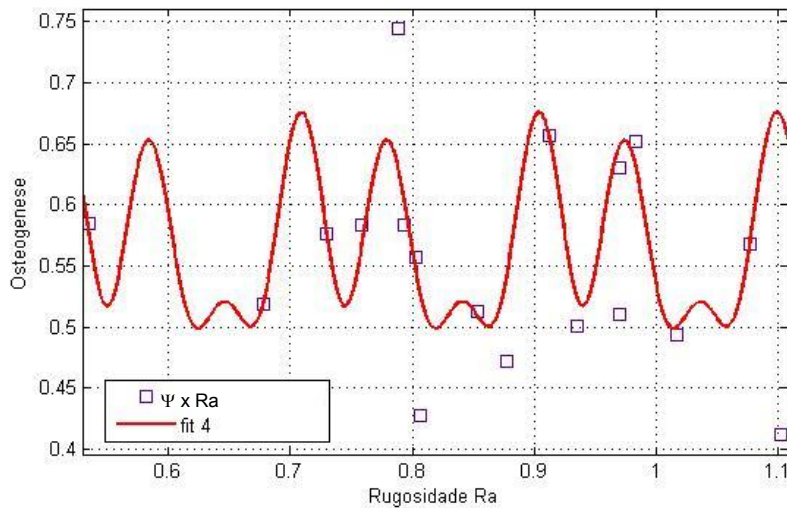


Figura 7.18 – Variação dos níveis de osteogênese estimados com a rugosidade. Nesta figura mostra a curva de ajuste aos pontos experimentais através de uma função de Fourier.

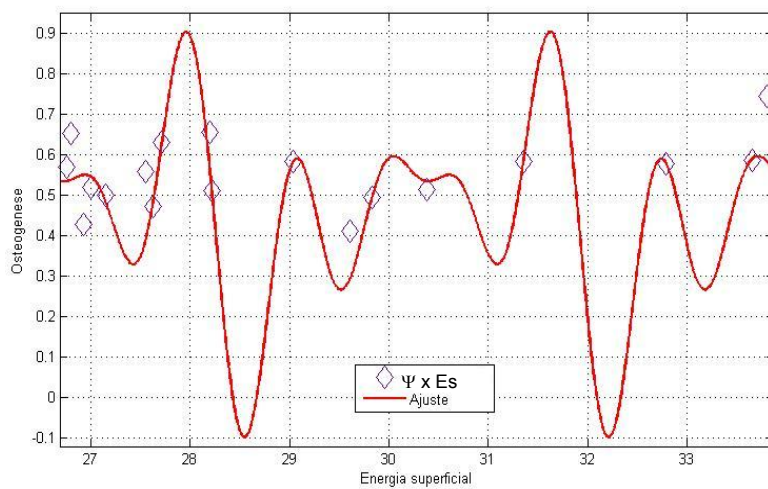


Figura 7.19 – Variação dos níveis de osteogênese estimados com a energia superficial. Nesta figura mostra a curva de ajuste aos pontos experimentais através de uma função de Fourier.

Tabela 7.6 – Coeficientes das funções de Fourier<sup>1</sup> ajustadas aos dados experimentais da osteogênese quando comparada com a rugosidade superficial  $R_a$  e a energia superficial.

Coeficientes	$\Psi \times$ Rugos	$\Psi \times$ Ener
$a_0$	0,57	0,45
$a_1$	0,01	-0,10
$b_1$	-0,05	0,08
$a_2$	0,03	0,04
$b_2$	0,04	0,11
$a_3$	0,04	0,11
$b_3$	-0,02	-0,19
$a_4$	0	-0,12
$b_4$	0	-0,09
$a_5$	0	0
$b_5$	0	0
w	32,21	1,71

(1) : Função de Fourier - Função(x) =  $a_0 + a_1\cos(xw) + b_1\sin(xw) + a_2\cos(2xw) + b_2\sin(2xw) + a_3\cos(3xw) + b_3\sin(3xw) + a_4\cos(4xw) + b_4\sin(4xw) + a_5\cos(5xw) + b_5\sin(5xw)$

### 7.3 Determinação da Equação Preditiva

Uma metodologia que utiliza a técnica de similitude em engenharia, definida no Capítulo V, foi utilizada para determinar a função matemática que correlaciona as variáveis de influência analisadas com o nível de osteogênese. Neste modelo estas variáveis estão sintetizadas através de dois parâmetros globais de caracterização superficial, definidos como condições de jateamento (J) e condições de ataque ácido (A).

Foram utilizadas 8 valores de J (inclusive uma condição sem jateamento) e 8 valores de A. Como mostrado no Capítulo V, um grupo específico foi pré-definido em função de uma combinação entre J e A. Neste caso, foram gerados 18 grupos, ou seja, 18 condições superficiais diferentes que foram caracterizadas através da rugosidade e energia superficial. Estas condições foram planejadas de tal forma que uma determinada condição fosse mantida constante enquanto modificava-se a outra condição. Neste aspecto, os diversos valores dos níveis de osteogênese foram determinados utilizando ensaios “*in vitro*” para os vários grupos, como especificado anteriormente. Deve-se observar que uma condição específica de jateamento é definida pela granulometria do pó, pressão, tempo e distância. As condições de ataque ácido foram modificadas em função do tipo de ácido, temperatura e

o tempo de exposição ao ácido. Portanto, considerando a metodologia definida no Capítulo V, os termos adimensionais são:

$$\begin{aligned} \pi_1 &= \Psi \\ \pi_2 &= J \\ \pi_3 &= A \end{aligned} \quad (7.4)$$

A Tabela 7.5 mostra os diferentes níveis de osteogênese obtidos para as diferentes condições de jateamento e ataque ácido. As Figuras 7.20 a 7.22 mostram estes pontos considerando  $\overline{\pi_3}, \overline{\pi_2}, \overline{\pi_1}$ , respectivamente. Nas Figuras 7.20 a 7.22 são mostrados os ajustes em cada curva específica que foi determinada através do programa Matlab®. Na Tabela 7.7 o ponto J6, A8 não foi considerado na estimativa do ajuste de curva, uma vez que, neste caso é uma condição no qual o valor do ácido muda e não determina a sensibilidade desta variável na equação final representada na Fig. 7.20.

As curvas ajustadas aos pontos experimentais, mostradas nas Figs. 7.20 a 7.22, com os respectivos coeficientes de correlação foram, respectivamente,

$$\begin{aligned} \pi_1 &= 0,0008256 (\pi_2)^{2,879} + 0,423 & (R^2 = 0,96) \\ \pi_1 &= 0,01386 (\pi_3)^{4,552} + 0,5085 & (R^2 = 0,97) \\ \pi_1 &= 2,442 (\pi_3)^{0,04168} - 2,033 & (R^2 = 0,96) \end{aligned} \quad (7.5)$$

Seguindo a nomenclatura definida na seção 5.3, utilizando os valores constantes,

$$J = \overline{\pi_2} = 1; J = \overline{\pi_2} = 2; \overline{\pi_3} = 7 \quad (7.6)$$

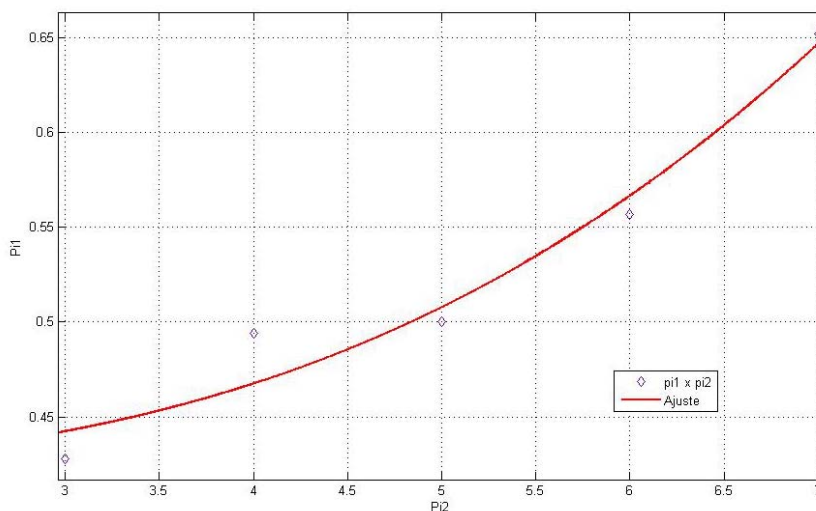
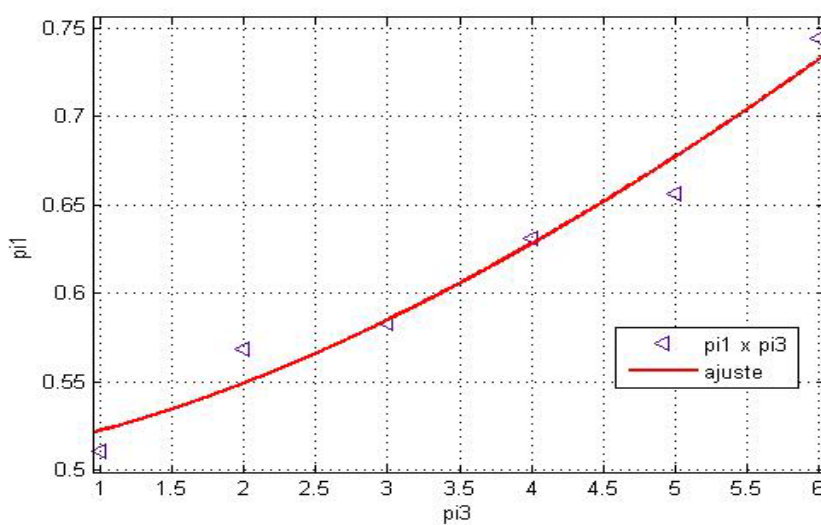


Figura 7.20 – Valores de  $\pi_1 \times \pi_2$ , mantendo  $\pi_3$  constante, ou seja, com uma condição específica de ataque ácido (A7).

Tabela 7.7 – Níveis de osteogênese para os diferentes  $\pi$ -termos.

$J (\pi_2)$	$A (\pi_3)$	$\Psi (\pi_1)$
1	1	0,51
1	2	0,57
1	3	0,63
1	4	0,74
1	5	0,66
1	6	0,58
2	1	0,41
2	2	0,47
2	3	0,51
2	4	0,58
2	5	0,58
2	6	0,58
3	7	0,43
4	7	0,49
5	7	0,50
6	8	0,52
7	7	0,56
8	7	0,65

Figura 7.21 – Valores de  $\pi_1 \times \pi_3$ , mantendo  $\pi_2$  constante, ou seja, com uma condição específica de jateamento.



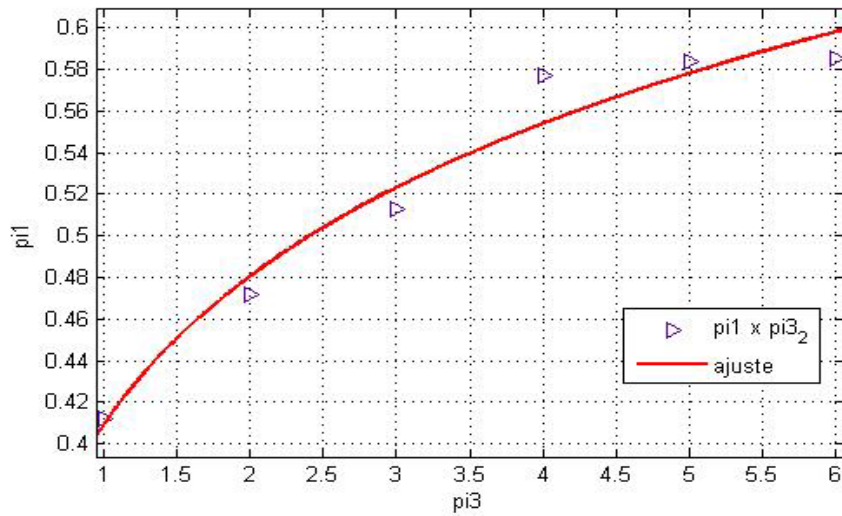


Figura 7.22 – Valores de  $\pi_1 \times \pi_3$ , mantendo um novo valor de  $\pi_2$  constante, ou seja, com uma nova condição específica de jateamento.

De acordo com as equações componentes (Eqs. 7.5) tem-se que,

$$\pi_1 = F(\pi_2, \bar{\pi}_3): \quad \Psi = 0,0008256 (J)^{2,879} + 0,423 \quad (7.7)$$

$$\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \pi_3): \quad \Psi = 0,01386 (A)^{1,552} + 0,5085 \quad (7.8)$$

$$\pi_1 = F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3): \quad \Psi = 2,442 (A)^{0,04168} - 2,033 \quad (7.9)$$

Das Eqs.7.8 e 7.9 tem-se que,

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) = 0,7925 \quad (7.10)$$

$$F(\bar{\pi}_2, \bar{\pi}_3) = 0,6153 \quad (7.11)$$

Combinando as Eqs. 7.7, 7.8 e 7.10 como uma função produto descrita pela Eq. 5.11 pode-se estimar a equação preditiva geral, ou seja,

$$\Psi = 1,44E^{-5}A^{1,522}J^{2,879} + 5,29E^{-4}J^{2,879} + 7,38E^{-3}A^{1,522} + 0,27 \quad (7.12)$$

O teste de validade descrito na Eq. (5.13) pode ser feito assumindo que a Eq. (7.12) seja válida também para um novo conjunto de dados. Supondo  $J = 2 (\bar{\pi}_2)$ , tem-se que,

$$\frac{0,01386 (A)^{1,552} + 0,5085}{0,7925} = \frac{2,442 (A)^{0,04168} - 2,033}{0,6153} \quad (7.13)$$

Para avaliar o erro da estimativa da equação preditiva determinou-se as curvas de cada membro da Eq. 7.13, mostradas na Fig. 7.23. De acordo com a Fig. 7.23, observa-se uma boa concordância com um erro relativo máximo de 11%. Diante da não-linearidade do fenômeno, considera-se que a equação preditiva estimada (Eq. 7.12) é válida nos intervalos  $1 \leq J \leq 7$  e  $1 \leq A \leq 7$ .

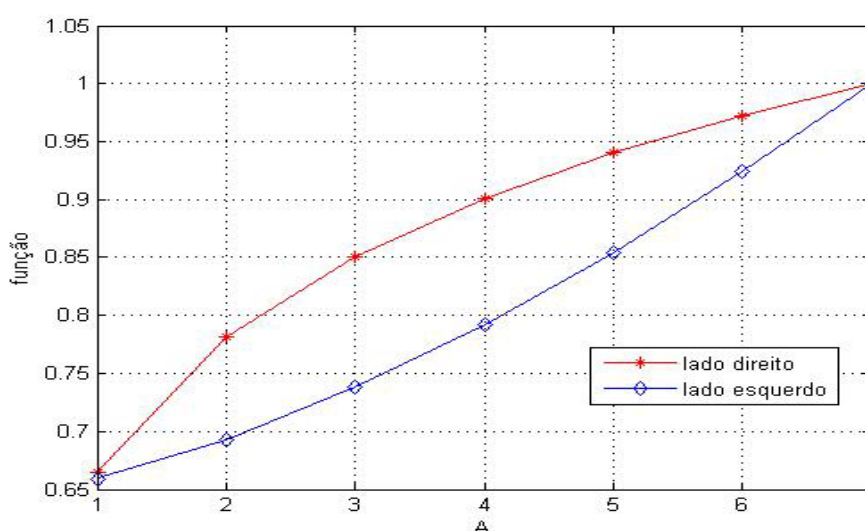


Figura 7.23 - Representação gráfica dos membros da Eq. 7.13 do teste de validade.

Utilizando a Eq. 7.12 é possível estimar um nível de osteogênese em amostras de titânio com diferentes superfícies conseguidas com diferentes condições de ataque ácido e jateamento dentro da faixa de validade. Portanto, com diferentes combinações de J e A estima-se um valor de osteogênese que pode ser comparada com um valor padrão. Neste caso, o valor padrão adequado seria a superfície normalmente utilizada nos implantes comerciais da empresa Neodent Implantes Osteointegráveis Ltda. Como esta condição não foi referenciada pela empresa, sendo, portanto desconhecida, neste trabalho a condição padrão para a superfície será aquela para a qual o nível da osteogênese seja máximo.

Avaliando a Eq. 7.12 observa-se que a condição de máximo é a condição limite para os valores de A e J igual a 7, uma vez que, a equação é de potência e positiva. Substituindo estes valores na Eq. 7.12 obtém-se um valor de osteogênese unitário ( $\Psi = 1$ ) que será então o valor tomado como padrão ou referência para comparação de outras condições superficiais quanto ao nível da osteogênese.

Esta condição padrão é conseguida com os seguintes parâmetros relativos a A,J igual a 7,

- Granulometria : 280  $\mu\text{m}$
- Tempo de jato: 2 s
- Distância do jato: 10 cm
- Pressão do jato: 30 bar
- Ácido: F3
- Temperatura do ácido: 60 °C
- Tempo no ácido: 1h

Considerando as faixas dos parâmetros avaliados neste trabalho, os resultados acima indicam que a pressão no jateamento parece ser mais importante do que a granulometria do abrasivo, o tempo de aplicação e a distância do jato. Paralelamente, a temperatura de 60 °C e um maior tempo de exposição do ácido F3 são os fatores mais influentes na superfície quando se avalia valores ótimos para a osteogênese. Na condição ótima acima os valores de rugosidade e energia superficial são,

$$R_a = 0,98 \pm 0,06 \mu\text{m}$$

$$E_s = 26,79 \pm 0,04 \text{ mJ/m}^2$$

Análises futuras utilizando a Eq. 7.12 em eventuais superfícies a serem obtidas com parâmetros diferentes daqueles avaliados neste trabalho devem automaticamente ser enquadrados utilizando algum procedimento dentro das faixas operacionais analisadas aqui, ou seja, eventuais combinações que se adaptam dentro do espectro de 1 a 7 para os valores de J e A.

#### **7.4. Análise de uma Nova Superfície de Titânio Baseada na Equação Preditiva**

As equações de Fourier definidas na Tab. 7.6 possibilitam fazer uma estimativa dos níveis de osteogênese em superfícies de titânio em função de valores medidos para a rugosidade e energia superficial. Estas equações foram estimadas ajustando-se curvas aos dados experimentais de caracterização das superfícies. Finalmente uma superfície específica pode ser conseguida graças à aplicação de variadas condições de jateamento e ataque ácido.

Este procedimento de medida é aceitável considerando as possíveis variações nos erros de medida, uma vez que, foi avaliada considerando ensaios “*in vitro*” de cultura de

células. No entanto, um modelo mais robusto para a estimativa da osteogênese seria a utilização da equação preditiva (Eq. 7.12).

O fluxograma mostrado na Fig. 7.24 indica como uma nova superfície de titânio obtida, por exemplo, através de um novo produto poderia ser avaliada quanto a uma estimativa de um nível de osteogênese a ser gerada comparada com um valor padrão, sem ter que realizar ensaios “*in vitro*” ou “*in vivo*”, apenas utilizando as metodologias propostas neste trabalho. Neste caso, seriam conhecidos os valores de rugosidade superficial e/ou energia superficial. Em caso de se conhecer apenas um destes parâmetros adota-se como estimativa o valor isolado como referência, caso contrário, pode ser adotado um valor médio como referência. Este valor pode então ser comparado com um valor padrão.

Outra possibilidade de se avaliar o nível da osteogênese de um novo produto seria através da equação preditiva (Eq. 7.12). Neste caso, deve ser indicado um nível de tratamento superficial através de um índice para J e A. A Figura 7.25 mostra um fluxograma indicando os passos básicos deste procedimento. Os valores devem situar-se de 1 a 7 e podem ser escolhidos em função das características do jateamento (granulometria, tempo, pressão e distância) e características do ataque ácido (tipo de ácido, temperatura e tempo). Valores diferentes dos que foram estudados neste trabalho não poderiam ser analisados diretamente, uma vez que, uma análise de sensibilidade específica dos parâmetros destes tratamentos não foram avaliados. No entanto, se os valores destes parâmetros situarem-se dentro das faixas estudadas, diferentes combinações de J e A podem ser utilizadas com algum critério, como por exemplo, indicando que o fator pressão no jateamento é o fator de maior influência. Esta abordagem poderia ser a base de desenvolvimento de um software de controle de qualidade do produto utilizando como referência o nível de osteogênese estimado comparado com um valor padrão. Este software não foi desenvolvido neste trabalho, sendo sugerido como trabalhos futuros.

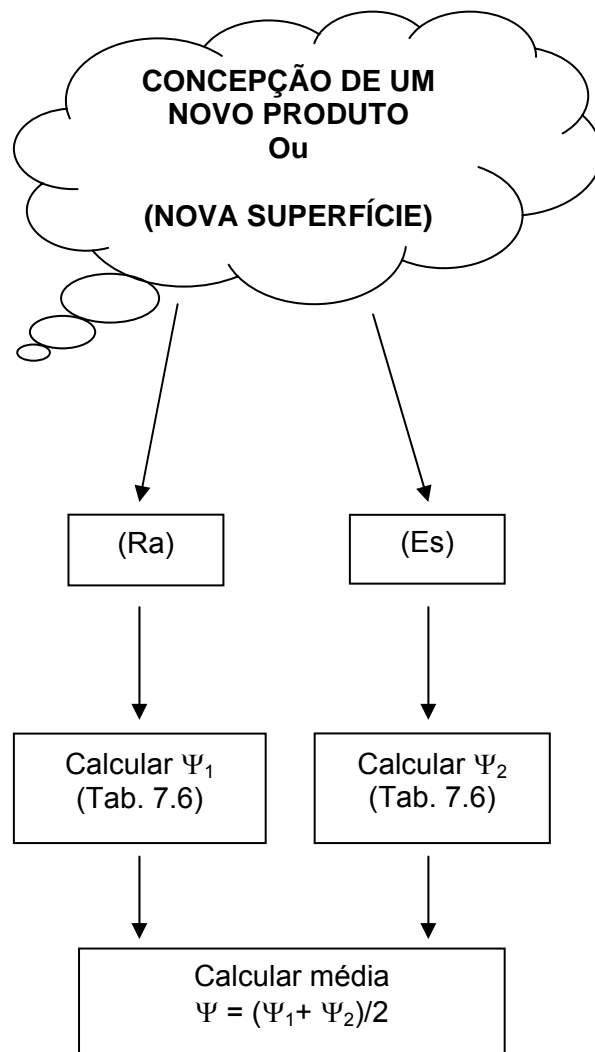


Figura 7.24 – Fluxograma indicando a possibilidade de estimativa do índice de osteogênese conhecendo-se os parâmetros de rugosidade superficial e/ou espessura da camada de óxido de titânio e/ou energia superficial.

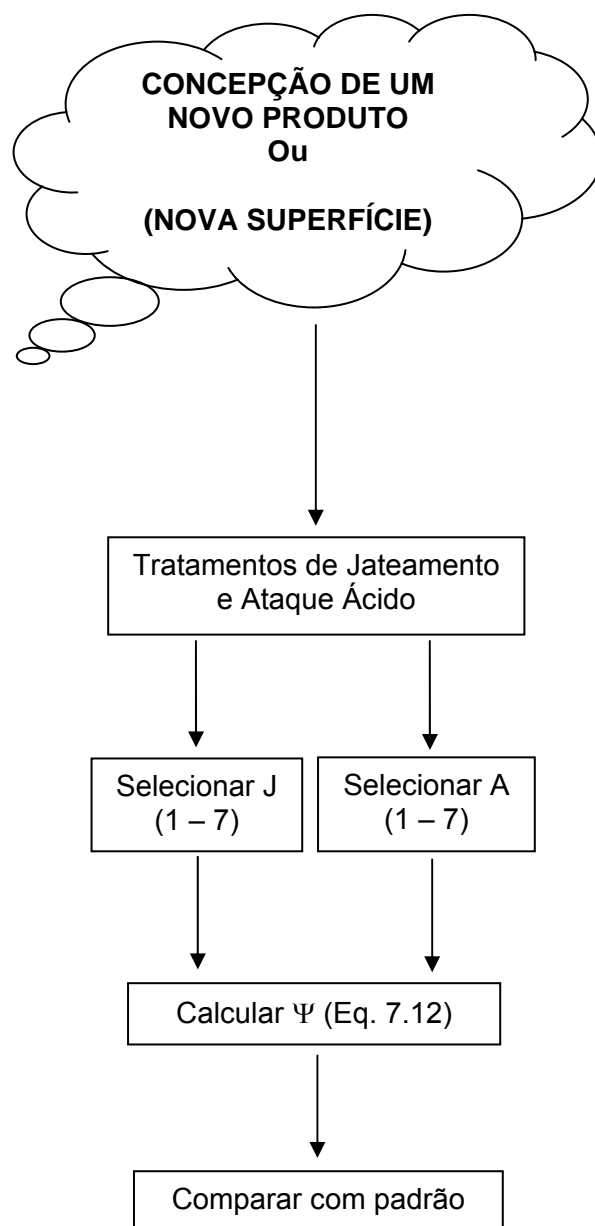


Figura 7.25 – Fluxograma indicando a possibilidade de estimativa do índice de osteogênese fornecendo valores de referência de J e A.



## CAPÍTULO VIII

### DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A maioria dos implantes dentários atuais se caracterizam por possuírem uma superfície externa tratada ou modificada com processos de jateamento, ataque ácido e em alguns casos, recobrimentos. O objetivo destes tratamentos é buscar condições adequadas, principalmente, em termos de rugosidades e microcavidades para que as células ósseas possam aderir e formar uma rede de sustentação que possibilite uma adequada osseointegração (MEFFERT; BLOCK e KENT, 1987; VIDIGAL JÚNIOR e GROISMAM, 1997; WENNERBERG et al.; 1998; PIATTELLI et al., 1998).

O processo de osseointegração em diferentes condições superficiais em titânio tem sido bastante estudado, apesar de que alguns fundamentos celulares e químicos ainda não estão bem esclarecidos. Neste aspecto a osteogênese é de importância fundamental no processo de osseointegração.

Sabe-se que as características da superfície dos implantes dentários feitos de titânio quando em contato com o sangue originado da cirurgia de implantação funciona como um receptor químico e possibilita interações e importantes modificações celulares. Atualmente, a forma de se avaliar a intensidade deste fenômeno é através de ensaios "*in vitro*" ou através de pesquisas clínicas em seres humanos ou animais. Nestes últimos casos, tais estudos são de caráter avaliativo ou macro onde, por exemplo, se comparam torques de remoção. Portanto, uma análise direta do processo de osteogênese é de difícil execução e custo relativamente alto.

Este trabalho propõe uma alternativa a esta dificuldade através da utilização de um modelo matemático para estimar os valores de osteogênese para diferentes condições de superfície. O modelo proposto não foi formulado para avaliar os fenômenos biológicos do processo de osteogênese e sim fazer uma análise quantitativa do fenômeno quando comparado com valores padronizados. Neste trabalho, as superfícies de titânio foram avaliadas através da determinação das rugosidades e da energia superficial.



De acordo com Gomi e Davies (1993) a rugosidade do substrato da superfície influencia ambas a soma e a distribuição espacial do osso. Neste trabalho, foi observado que todos os valores de rugosidade da superfície estudados ficaram entre  $R_a = 0,53 \pm 0,04 \mu\text{m}$  (G12) e  $R_a = 1,10 \pm 0,14 \mu\text{m}$  (G07). Sendo que estes valores extremos foram obtidos com as mesmas condições de jateamento (J2), porém quando aplicado o ácido F2 a uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , foi obtido o maior valor da rugosidade do que quando foi aplicado o ácido F3 em temperatura ambiente, uma vez que, o tempo de exposição ao ataque ácido foi o mesmo, ou seja, 30'. Este resultado contradiz aos achados de Bádenas (2004) que afirmou que o tamanho das partículas de projeção é a variável mais importante para o controle da rugosidade final de uma superfície jateada, de tal maneira que a medida que aumenta o tamanho, aumenta a rugosidade. Deve-se destacar que em nosso estudo não foram comparados diferentes granulometrias, ou seja, foram utilizadas duas granulometrias (240 e  $280 \mu\text{m}$ ). Alguns autores mencionam que a rugosidade média seria na faixa  $R_a = 2 - 6 \mu\text{m}$  quando se trabalha nesta faixa de granulometria (BUSER et al., 1991; BUSER et al., 1999; HACKING et al., 1999). Vale lembrar que estas superfícies não sofreram um condicionamento químico com ataque ácido e isso pode ser levado em consideração ao verificar o fato dos valores da rugosidade no nosso estudo não terem ultrapassado  $R_a = 1,10 \pm 0,14 \mu\text{m}$  (G07). Wennerberg (1996) obteve um valor de rugosidade fazendo análises de histomorfometria em fêmur de coelhos. Este valor ótimo foi estabelecido em  $R_a = 1,5 \mu\text{m}$ . Aqui foi obtido um valor ótimo, ou seja, de máxima osteogênese com  $R_a = 0,98 \pm 0,03 \mu\text{m}$ . Este resultado está de acordo com o trabalho de Badenas (2004) que reporta que a maior adesão celular (MG63 – células derivadas de osteosarcomas) aconteceu sobre as superfícies de titânio jateadas com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e uma rugosidade de  $0,87 \mu\text{m}$  e estas células se diferenciam tanto mais quanto maior é a rugosidade.

Em 1995, Martin et al. analisaram discos de titânio de grau II com várias superfícies: (PT) superfícies pré-tratadas com ácido fluorídrico (HF), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e lavadas; (EP) superfícies eletro polidas; (FA) superfícies com jateamento de granulação fina e ataque ácido: ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); (CA) superfícies com jateamento de granulação grossa e ataque ácido: HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; (TPS) superfícies com jateamento de granulação grossa e revestida com plasma de hidreto de titânio. Os autores analisaram os parâmetros osteogênicos nas superfícies dos discos de titânio e em suas análises, observaram que quando comparadas com culturas de células sobre o controle de plástico, o número de células foi reduzido nas superfícies TPS e aumentado sobre as superfícies EP, enquanto que o número de células sobre as outras superfícies foi equivalente com o observado sobre controle de plástico. Quanto à atividade de fosfatase alcalina em particular

foram encontradas células isoladas que tendem a diminuir com o aumento das superfícies rugosas.

Segundo Baier e Meier (1988) e Uittoet al. (1992), a energia superficial do material do implante influencia o comportamento celular levando a um efeito na configuração e conformação de proteínas absorvidas sobre o substrato. Os valores da energia superficial obtidos neste estudo variaram entre 26,76 a 33,81  $\frac{mJ}{m^2}$ . De acordo com a literatura, o valor da energia superficial do titânio está na faixa de 28 a 35  $\frac{mJ}{m^2}$ , o que comprova que os valores obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura. Observa-se na Tab. 7.4 que não houve uma variação muito grande da energia superficial para os diversos grupos. Para a energia superficial máxima (G04) o nível de osteogênese foi de 0,74 e para o valor mínimo (G02) o nível da osteogênese foi de 0,57, ou seja, uma diferença de 30%. Apesar deste efeito ser não linear parece que uma maior energia superficial está relacionada com maiores níveis de osteogênese.

A linhagem de células osteoblásticas humana utilizada em nosso estudo são células aderentes sobre uma superfície para a realização do ensaio “*in vitro*” de cultura de células. E por se tratar de células aderentes, não foi determinado o valor do parâmetro osteogênico, adesão celular. Vários autores (ASSIS et al., 2009; BOWERS et al., 1992; MALASPINA et al., 2009; MICHAELS et al., 1989) confirmam que células osteoblásticas são células aderentes.

Os níveis de osteogênese estimado para os 18 grupos estudados como foi mostrado na Tab. 7.7. Neste caso, o grupo que teve o nível de osteogênese mais próximo do valor ótimo foi o G04 sendo que este grupo foi jateado com uma granulometria de 240  $\mu m$ , por um tempo de 3”, uma distância de 10 cm e com uma pressão de 20 Bar juntamente com uma ataque ácido com o ácido F2 em temperatura ambiente por um tempo de 30’. Nessas mesmas condições, com exceção da granulometria e da temperatura do ácido utilizado, o grupo G07 foi o grupo que ficou mais distante do nível ótimo. Fazendo uma análise estatística entre estes dois grupos foi observado que em relação a rugosidade média, estes dois grupos foram estatisticamente diferente ( $P < 0,01$ ), o que pode justificar a diferença do nível de osteogênese. Em relação a energia superficial, os dois grupos em questão não tiveram diferenças significativas entre eles o que pode ser observado na Tab. 7.6.

Em implantodontia, a biocompatibilidade dos tecidos ósseos para a superfície do implante e os fatores ambientais locais assumem papel importante no processo da cicatrização. Mailhot e Borke (1998) apresentaram um método conveniente de isolamento e de cultura “*in vitro*” utilizando células osteoblásticas intra-orais humanas, derivadas da preparação do sítio local de um implante dentário. Os autores caracterizaram a

fosfatase alcalina, a presença de osteonectina, de osteocalcina e de um precursor intracelular do colágeno tipo I. Nesta última análise, colágeno tipo I foi superior a 90% da proteína da matriz óssea e observaram também que em todas as culturas testadas, mostraram áreas de calcificação de graus variados.

Com o nosso trabalho foram avaliados os níveis de ALP, nódulos de mineralização e proliferação e viabilidade celular nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células. Observou-se que estes parâmetros sofreram influência das condições superficiais. O valor de ALP foi considerado como o parâmetro mais importante na determinação da osteogênese. Neste caso, o valor máximo de ALP encontrado foi para o Grupo G04 ( $\eta_1 = 10,52 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  protein/min) considerando a ALP em 14 dias. Neste mesmo período, foi observado uma maior proliferação para este Grupo G04 ( $\eta_2 = 14.815$  células). Por outro lado, o grupo que houve uma maior área para os nódulos de mineralização foi o Grupo G11 ( $\eta_3 = 24,29 \text{ mm}^2$ ) após 28 dias de cultura.

De acordo com os estudos de Linckset al. (1998), o número de células em superfícies de titânio puro de grau II com rugosidade variando de  $0,22 \mu\text{m}$  a  $4,24 \mu\text{m}$  foi reduzido quando comparados com o número de células sobre o plástico, enquanto que foi equivalente sobre as superfícies de liga de titânio. Após 24 horas de cultura a atividade de fosfatase alcalina teve uma significância maior sobre as superfícies mais rugosas. Portanto, os autores sugeriram que a rugosidade e a composição da superfície podem desempenhar um papel mais importante e que o melhor projeto para um implante é uma superfície de titânio puro com uma micro topografia áspera.

## CAPÍTULO IX

### CONCLUSÕES

Este trabalho propôs uma nova abordagem para estimar o processo de osteogênese em implantes dentários utilizando uma formulação matemática obtida por métodos de similitude e validada por ensaios “*in vitro*”.

As superfícies de titânio Grau IV avaliadas foram obtidas com diferentes condições de jateamento e ataque ácido totalizando dezoito grupos de análises. As superfícies foram caracterizadas através das medidas de rugosidade e energia superficial.

Os parâmetros osteogênicos determinados nos ensaios “*in vitro*” de cultura de células osteoblásticas foram a proliferação e viabilidade celular, a medida de fosfatase alcalina e os nódulos de mineralização. Utilizando estes parâmetros foi definida uma nova variável para estimar o nível de osteogênese considerando pesos relativos.

De todos os estudos realizados foi possível chegar as seguintes conclusões:

- Os níveis de rugosidade e energia superficial influenciam nos parâmetros celulares e conseqüentemente no nível de osteogênese;
- Os valores máximos da osteogênese foram para  $R_a = 0,98 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ;  $E_s = 26,79 \pm 0,04 \text{ mJ/m}^2$ ;
- A condição padrão adotada que corresponde ao valor máximo da osteogênese foi influenciada principalmente pela pressão de jateamento (30 Bar), tipo de ácido, maior temperatura e tempo de exposição ao ácido;
- Utilizando a equação preditiva é possível estimar os níveis de osteogênese de uma nova superfície de titânio, dentro de faixas específicas de jateamento e ataque ácido, evitando ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” que, em geral, são demorados e de alto custo.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Reavaliação do modelo de similitude utilizando variáveis específicas controladas (rugosidade, espessura da camada de óxido, energia superficial, etc.) obtidas com tratamentos controlados;
- Desenvolvimento de um software de controle de qualidade com os modelos desenvolvidos neste trabalho;
- Desenvolvimento de modelos matemáticos do processo celular de crescimento ósseo em implantes dentários;
- Avaliação de nanoestruturas quanto ao processo de osteogênese.

# CAPÍTULO X

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHANSSON, I.; BERGLUNDH, T.; WENNSTRON, J.; LINDHE, J. The Peri-Implant Hard and Soft Tissues at Different Implant Systems. A Comparative Study in Dog. **Clinical Oral Implants Research**. v. 7, n. 3, p. 212-219, 1996.

ABRAHANSSON, I.; BERGLUNDH, T.; MOON, I. S.; LINDHE, J. Peri-Implant Tissues at Submerged and Non-Submerged Titanium Implants. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 26, n. 9, p. 600-607, 1999.

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P. I. A 15-Year Study of Osseointegrated Implants in the Treatment of the Edentulous Jaw. **International Journal of Oral Surgery**. v. 10, n. 6, p. 387-309, 1981.

ADELL, R.; ERIKSSON, B.; LEKHOLM, U.; A Long-Term Follow-Up Study of Osseointegrated Implants in the Treatment of Totally Edentulous Jaws. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 5, n. 4, p. 347-359, 1990.

ALBREKTSSON, T. Direct Bone Anchorage of Dental Implants. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v. 50, n. 2, p. 255-261, 1983.

ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. Direct Bone Anchorage of Oral Implants: Clinical and Experimental Considerations of the Concept of Osseointegration. **The International Journal of Prosthodontics**. v. 3, n. 1, p. 30-41, 1990.

ANDRADES, J. A.; SANTAMARÍA, J. A.; NIMMI, M. E.; BECERRA, J. Selection, Amplification, Induction and Differentiation of Osteoprogenitor Cells: an Alternative for Bone Repair. **MapfreMedicina**. v. 10, n. 3, p. 190-201, 1999.

AUBIN, J. E. Osteoprogenitor Cell Frequency in Rat Bone Marrow Stromal Populations: Role for Heterotypic Cell-Cell Interactions in Osteoblast Differentiation. **JournalofCellularBiochemistry**.v. 72, n. 3, p. 396-410, 1999.

AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. Otimização das Superfícies dos Implantes: Plasma de Titânio e Jateamento com Areia Condicionado por Ácido-Estado Atual. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v 15, n. 2, p. 166-173, 2001.

ANDRADE JUNIOR, A. C. C.; CARVALHO, L.; STUMBO, A. C.; SABINO, K.; MACHADO, W. A. S.; FISCHER, R. G. Proliferação In Vitro de Fibroblastos Sobre Superfícies de Titânio Quimicamente Modificadas. **RevistaPeriodontia**. v. 17, n. 1, p. 16-20, 2007.

ASSIS, A. F.; BELOTI, M. M.; CRIPPA, G. E.; OLIVEIRA, P. T.; MORRA, M.; ROSA, A. L. Development of the Osteoblastic Phenotype in Human Alveolar Bone-Derived Cells Grown on a Collagen Type I-Coated Titanium Surface.**Clinical Oral Implants Research**. v. 20, n. 3, p. 240 – 246, 2009.

BÄCHLE, M.; KOHAL, R. J. A Systematic Review of the Influence of Different Titanium Surfaces on Proliferation, Differentiation and Protein Synthesis of Osteoblast-Like MG63 Cells.**Clinical Oral ImplantsResearch**. v. 15, n. 6, p. 683-692, 2004.

BÁDENAS, C. J. A. **Tratamientos de Superficie sore Titanio Comercialmente Puro para La Mejora de laOsteointegración de los Implantes Dentales**. 2004. 417f. Tese de Doutorado – UniversitatPolitècnica de Catalunya, Barcelona – Espanha.

BAIER, R. E.; MEYER, A. E. Implant Surface Preparation.**The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 3, n. 1, p. 9-20, 1988.

BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Osteoblast Differentiation of Human Bone Cells Under Continuous and Discontinuous Treatment with Dexamethasone. **Brazilian Dental Journal**.v.16, n. 2, p. 156-161, 2005.

BERGLUNDH, T.; LINDHE, J.; ERICSSON, I.; MARINELLO, C. P.; LILJENBERG, B.; THOMSEN, P. The Soft Tissue Barrier at Implants and Teeth. **Clinical Oral Implants Research**. v. 2, n. 2, p. 81-90, 1991.

BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I.; LAND, N. P.; LINDHE, J. De Novo Alveolar Bone Formation Adjacent to Endosseous Implants. A Model Study in the Dog. **Clinical Oral Implants Research**. v. 14, n. 3, p. 251-262, 2003.

BOYAN, B. D.; DEAN, D. D.; LOHMANN, C. H.; COCHRAN, D. L.; SYLVIA, V. L.; SCHWARTZ, Z. The Titanium Bone-Cell Interface In Vitro: The Role of the Surface in Promoting Osseointegration. Em "**Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications**"; Eds. BRUNETTE, D. M.; TENGVALL, P.; TEXTOR, M.; THOMSEN, P. Springer Verlag. Berlin, p. 561- 586, 2001.

BOYAN, B. D.; LOSSDORFER, S.; WANG, L.; ZHAO, G.; LOHMANN, C. H.; COCHRAN, D. L.; SCHWARTZ, Z. Osteoblasts Generate an Osteogenic Microenvironment when Grown on Surfaces with Rough Microtopographies. **European Cells and Materials**. v. 24, n. 6, p. 22-27, 2003.

BOWERS, K. T.; KELLER, J. C.; RANDOLPH, B. A.; WICK, D. G.; MICHAELS, C. M. Optimization of Surface Micromorphology for Enhanced Osteoblast Responses In Vitro. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 7, n. 3, p. 302- 310, 1992.

BRÅNEMARK P. I.; BREINE, U.; ADELL, R.; RANSSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intraosseous Anchorage of Dental Prostheses. I: Experimental Studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BRÅNEMARK, P. I. 1985. **Introduction to Osseointegration: Tissue-Integrated Prostheses**. Quintessence: Chicago Publ. Co.

BRÅNEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBRETSSON, T. **Prothèses Ostéointégrées**. Paris. CdP, 1988: (Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. Chicago: Quintessence Books, 1985).



BRUNETTE, D. M.; CHEHROUDI, B. The Effects of the Surface Topography of Micromachined Titanium Substrata on Cell Behaviour *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Biomechanical Engineering**. v. 121, n. 1, p. 49-57, 1999.

BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, S.; FIORELLINI, J. P.; FOX, C. H.; STICH, H. 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.

BUSER, D.; NYDEGGER, T.; HIRT, H. P.; COCHRAN, D. L.; NOLTE, L. P. Removal Torque Values of Titanium Implants in the Maxilla of Miniature Pigs. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 13, n. 5, p. 611-619, 1998.

BUSER, D.; NYDEGGER, T.; OXLAND, T.; COCHRAN, D. L.; SCHENK, R. K.; HIRT, H. P.; SNÉTIVY, D.; NOLTE, L. P. Influence of Surface Characteristics on the Interface Shear Strength Between Titanium Implants and Bone. A Biomechanical Study in the Maxilla of Miniature Pigs. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 45, n. 2, p. 75-83, 1999.

BUSER, D. Titanium for Dental Applications (II): Implant with Roughened Surfaces. Em "Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications"; Eds. BRUNETTE, D. M.; TENGVALL, P.; TEXTOR, M.; THOMSEN, P. Springer Verlag. Berlin, p. 875-885, 2001.

CARBONARE, L. D.; VALENTI, M. T.; BERTOLDO, F.; ZANATTA, M.; ZENARI, S.; REALDI, G.; LO CASCIO, V.; GIANNINI, S. Bone Microarchitecture Evaluated by Histomorphometry. **Micron**. v. 36, n. 7, p. 609-616, 2005.

CARLSSON, L.; RÖSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T. Removal Torques for Polished and Rough Titanium Implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 3, n. 1, p. 21-24, 1988.

CARR, A. B.; LARSEN, P. E.; PAPAZOGLU, E.; MCGLUMPHY, E. Reverse Torque Failure of Screw-Shaped Implants in Baboons: Baseline Data for Abutment Torque Application. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 10, n. 2, p. 167-174, 1995.

CARVALHO, D. R. **Caracterização e Avaliação da Biocompatibilidade *in vitro* de Titânio Grau II e IV com e sem Ataque Ácido.** 2005. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

COCHRAN, D. L.; SCHENK, R. K.; LUSSI, A.; HIGGINBOTTOM, F. L.; BUSER, D. Bone Response to Unloaded and Loaded Titanium Implants with a Sandblasted and Acid-Etched Surface: A Histometric Study in the Canine Mandible. **Journal of Biomedical Materials Research.** v. 40, n. 1, p. 1-11, 1998.

COCHRAN, D. L.; BUSER, D.; BRUGGENKETE, C. M.; WEINGART, D.; TAYLOR, T. M.; BERNARD, J. P.; PETERS, F.; SIMPSON, J. P. The Use of Reduced Healing Times on ITI® Implants with a Sandblasted and Acid-Etched (SLA) Surface: Early Results from Clinical Trials on ITI® SLA Implants. **Clinical Oral Implants Research.** v. 13, n. 2, p. 144-153, 2002.

CONTERNO, G.; PAZOS, L. M.; EGIDI, D. A.; PARODI, M. B.; CORENGIA, P. A.; CROSTA, R. Estudo de Superfícies de Titânio Tratadas com Ataque Ácido. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMATERIAIS EM ODONTOLOGIA, 2004, Natal – RN. **Anais do I Congresso Brasileiro de Biomateriais em Odontologia.**

CONTERNO, G.; PAZOS, L. M.; EGIDI, D. A.; CORENGIA, P. A.; ROSA, H. DE; CROSTA, R. Tratamento de Blasting: Estudo do Efeito das Partículas nas Características da Superfície em Implantes Dentais. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMATERIAIS EM ODONTOLOGIA, 2004, Natal – RN. **Anais do I Congresso Brasileiro de Biomateriais em Odontologia.**

COOPER, L. F.; MASUDA, T.; WHITSON, S. W.; YLIHEIKKILÄ, P.; FELTON, D. A. Formation of Mineralizing Osteoblast Cultures on Machined, Titanium Oxide Grit-Blasted, and Plasma-Sprayed Titanium Surfaces. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.** v. 14, n. 1, p. 37-47, 1999.

DAGNALL, H. **Exploring Surface Texture.** 1986, 170 p., 2 ed., Londres, Rank Taylor Hobson Limited.

D'LIMA, D. D.; LEMPERLE, S. M.; CHEN, P. C.; HOLMES, R. E.; COLWELL JR, C. W. Bone Response to Implant Surface Morphology. **The Journal of Arthroplasty.** v. 13, n. 8, p. 928-934, 1998.

DAVARPANA, M.; MARTINEZ, H.; KEBIR, M.; TECUCIANU, J. F. **Manual de Implantodontia Clínica**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2003, 337p.

DAVARPANA, M.; JAKUBOWICZ-KOHEN, B.; CARAMAN, M.; KEBIR-QUELIN, M. **Implantes em Odontologia**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2007, 139p.

DAVIES, J. E. 2000. 656 p. **Bone Engineering**. Toronto: em squared Inc.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**. v. 67, n. 8, p. 932-947, 2003.

DECLERCQ, H. A.; VERBEECK, R. M.; DE RIDDER, L. I.; SCHACHT, E. H.; CORNELISSEN, M. J. Calcification as in Indicator of Osseoinductive Capacity of Biomaterials in Osteoblastic Cell Cultures. **Biomaterials**. v. 26, n. 24 , p. 4964-4974, 2005.

DA SILVA, J.C. **Estudo Comparativo de Superfícies de Titânio Utilizadas em Implantes**. 2006. 68f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DE OLIVEIRA, P. T.; ZALZAL, S. F.; IRIE, K.; NANJI A. Early Expression of Bone Matrix Proteins in Osteogenic Cell Cultures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 51, n. 5, p. 633-641, 2003.

DE OLIVEIRA, P. T.; NANJI, A. Nanotexturing of Titanium-Based Surfaces Upregulates Expression of Bone Sialoprotein and Osteopontin by Cultured Osteogenic Cells. **Biomaterials**. v. 25, n. 3, p. 403-413, 2004.

DINIZ, M. G.; PINHEIRO, M. A. S.; ANDRADE JUNIOR, A. C. C.; FISCHER, R. G. Characterization of Titanium Surfaces for Dental Implants with Inorganic Contaminant. **Brazilian Oral Research**. v. 19, n. 02, p. 106-111, 2005.

DOSSIERS, A. D. F. **Implantologie Orale**. Paris: Association dentaire française, 2003.

DZIEDZIC, D. M.; BEATY, K. D.; BROWN, G. R.; HEYLUM, T.; DAVIES, J. E. Bone Growth in Metallic Bone Healing Chambers. Faculty of Dentistry and Center for Biomaterials at the University of Toronto. Fifth World Biomaterials Congress. **Annals of the Fifth World Biomaterials Congress**. Toronto: Canadá, 1996.

FERREIRA, M. C. **Preparo das Amostras para a Realização do Teste de Microdureza.** Apostila Utilizada pelos Alunos do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Estomatologia da UFSC. Florianópolis, 2004, 32p.

FÖRCH, R.; SCHÖNHERR, H.; JENKINS, A. T. A. **Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology.** Wiley, V. C. H., 2009, 511 p. ISBN: 3527407898

FRANCHI, M.; FINI, M.; MARTINI, D.; ORSINI, E.; LEONARDI, L.; RUGGERI, A.; GIAVARESI, G.; OTTANI, V. Biological Fixation of Endosseous Implants. **Micron.** v. 36, n. 7, p. 665-671, 2005.

GADELMAWLA, E. S.; KOURA, M. M.; MAKSOUD, T. M. A.; ELEWA, I. M.; SOLIMAN, H. H. Roughness Parameters. **Journal of Materials Processing Technology.** v. 123, n. 1, p. 133-145, 2002.

GEBRAN, M. P.; WASSAL, T. Avaliação In Vitro da Adesão de Osteoblastos sobre Implantes Osseointegráveis com Superfície Tratada (Titamax II®). **ImplantNews.** v. 4, n. 1, p. 79-84, 2007.

GENNES, P. G. Wetting: statics and dynamics. **Reviews of Modern Physics.** v. 57, n. 3, p. 827-863, 1985. [doi:10.1103/RevModPhys.57.827](https://doi.org/10.1103/RevModPhys.57.827).

GERIS, L.; VANDAMME, K.; NAERT, I.; SLOTEN, J. V.; DUYCK, J.; OOSTERWYCK, H. V. Numerical Simulation of Bone Regeneration in Bone Chamber. **Journal of Dental Research.** v. 88, n. 2, p. 158-163, 2009.

GEHRKE, S. A.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; MACHADO, L. Acondicionamiento de la Textura Superficial de Implantes Dentales. **Actas Odontológicas.** v. 5, n. 1, p. 30-37, 2008.

GIACAGLIA, G. E. O. **Curso Introductorio de Biomateriais e Aplicações a Implantes.** Universidade de Taubaté, 2000.

GLENN MURPHY, C. E. PhD. **Similitude em Engineering.** The Ronald Press Company, New York, 1950.

GOMI, K.; DAVIES, J. E. Guided Bone Tissue Elaboration by Osteogenic Cells *In Vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 27; n. 4; p. 429-431, 1993.

GOTTLANDER, M.; ALBREKTSSON, T.; CARLSSON, L. V. A Histomorphometric Study of Unthreaded Hydroxyapatite-Coated and Titanium-Coated Implants in the Rabbit Bone. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 7, n. 4, p. 485-490, 1992.

GROSS, U. M. Biocompatibility - The Interaction of Biomaterials and Host Response. **Journal of Dental Education**. v. 52, n. 12, p. 798-803, 1988.

HACKING, S.; ADAN, M.; BOBYN, J. D.; TANZER, M. M. D.; KRYGIER, J. J. The Osseous Response to Corundum Blasted Implant Surfaces in a Canine Hip Model. **Clinical Orthopaedics & Related Research: Section II: Original Articles: Research**. v. 364, p. 240-253, 1999.

HAHN, H.; PALICH, W. Preliminary Evaluation of Porous Metal Surfaced Titanium for Orthopedic Implants. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 4, n. 4, p. 571-577, 1970.

HANSSON, S.; NORTON, M. The Relation between Surface Roughness and Interfacial Shear Strength for Bone-Anchored Implants. A Mathematical Model. **Journal of Biomechanics**. v. 32, n. 8, p. 829-836, Ago. 1999.

HENG, B. C.; CAO, T.; STANTON, L. W.; ROBSON, P.; OLSEN, B. Strategies for Directing the Differentiation of Stem Cells Into the Osteogenic Lineage *In Vitro*. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**. v. 19, n. 9, p. 1379-1394, 2004.

HERMANN, J. S.; BUSER, D.; SCHENK, R. K.; COCHRAN, D. L. Crestal Bone Changes Around Titanium Implants. A Histometric Evaluation of Unloaded Non-Submerged and Submerged Implants in the Canine Mandible. **Journal of Periodontology**. v. 71, n. 9, p. 1412-1424, 2000.

HOBKIRK, J. A.; WATSON, R. M. **Implantologia Dental e Maxilofacial**. Artes Médicas, 1996.

HUNT, T. K. Basic Principles of Wound Healing. **Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care**. v. 30, p.122-128, 1990.

JAFFIN, R. A.; BERMAN, C. A. The Excessive Loss of Brånemark Fixtures in Type IV Bone: A 5-Years Analysis. **Journal of Periodontology**.v. 62, n. 1, p. 2-4, 1991.

JANUÁRIO, A. L.; SALLUM, E. A.; SALLUM, A. W.; DE TOLEDO, S.; LANDERS, R.; NOCITI JÚNIOR, F. H. Avaliação da Espessura e Contaminantes da Camada de Óxido de Diferentes Implantes Dentais. **RPG – Revista de Pós-Grauação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**.v. 12, n. 2, p. 205-211, 2005.

JOHANSSON, C.; ALBREKTSSON, T. Integration of Screw Implants in the Rabbit: a One-year Follow-up of Removable Torque of Titanium Implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**.v. 2, n. 2, p. 69-73, 1987.

JOHNS, R. B.; JEMT, T.; HEATH, M. R. A Multicenter Study of Overdentures Supported by Brånemark Implants. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**.v. 7, n. 4, p. 513-522, 1992.

KASEMO, B. Biocompatibility of Titanium Implants: Surface Science Aspects. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v. 49, n. 6, p. 832-837, 1983.

KASEMO, B. 2002. **Surface Science**. Thomson Scientific.

KELLER, J. C.; GROTENDORST, G. R.; DOUGHERTY, W. J. Cell Attachment to Sterilized C. P. Ti Surfaces. **Journal of Dental Research**. v. 68; p. 276, 1989.

LEKHOLM, U.; ZARB, G. A. Patient Selection and Preparation. In: Branemark P. I.; Zarb G. A.; Albrektsson T. (Eds.) **Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry**. Chicago: Quintessence, p. 199-209, 1985.

LI, D. H.; LIU, B. L.; ZOU, J. C.; XU, K. W. Improvement of Osseointegration of Titanium Dental Implants by a Modified Sandblasting Surface Treatment: An In Vivo Interfacial Biomechanics Study. **Implant Dentistry**. v. 8, n. 3, p.289-294, 1999.

Li, L-H.; KONG, T-M. ; KIM, H-W. ; KIM, Y-W.; KIM, H-E.; HEO, S-J.; KOAK, J-Y. Improved Biological Performance of Ti Implants Due to Surface Modification by Micro-Arc Oxidation. **Biomaterials**. v. 25, n. 14, p. 2867-2875, 2004.

LIM, J. Y.; SHAUGHNESSY, M. C.; XHOU, Z.; NOH, H.; VOGLER, E. A.; DONAHUE, H. J. Surface Energy Effects on Osteoblast Spatial Growth and Mineralization. **Biomaterials**. v. 29, n. 12, p. 1776-1784, 2008.

LINCKS, J.; BOYAN, B. D.; BLANCHARD, C. R.; LOHMANN, C. H.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Response of MG-63 Osteoblast-like Cells to Titanium and Titanium Alloy is Dependent on Surface Roughness and Composition. **Biomaterials**.v. 19, n. 23, p. 2219-2232, 1998.

LOURENÇO JR, E. T. **Estudo Metodológico de Avaliação do Crescimento Ósseo ao Redor de Implantes Osseointegrados através de Microscopia Confocal de Varredura a Laser e Torque de Remoção**. 1998. 168f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Bauru.

LUTHY, H.; STRUB, J. R.; SCHARER, P. Analysis of Plasma Flame-Sprayed Coatings on Endosseous Oral Titanium Implants Exfoliated in Man: Preliminary Results. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**.v. 2, n. 4, p. 197-202, 1987.

MAILHOT, J. M.; BORKE, J. L. An Isolation and in Vitro Culturing Method for Human Intraoral Bone Cells Derived from Dental Implant Preparation Sites. **Clinical Oral Implants Research**. v. 9, n. 1, p. 43-50, 1998.

MALASPINA, T. S. S.; SANTOS, C. X.; CAMPANELLI, A. P.; LAURINHO, F. R. M.; SOGAYAR, M. C.; GRANJEIRO, J. M. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Activity and Glutathione Levels are Modulated During HFob 1.19 Osteoblastic Differentiation. **Journal of Molecular Histology**. v. 39, n. 6, p. 627 – 634, 2008.

MALASPINA, T. S. S.; ZAMBUZZI, W. F.; SANTOS, C. X.; CAMPANELLI, A. P.; LAURINHO, F. R. M.; SOGAYAR, M. C.; GRANJEIRO, J. M. A Possible Mechanism of Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase (LMW – PTP) Activity Modulation by Glutathione Action During Human Osteoblast Differentiation. **Archives of Oral Biology**. v. 54, n. 7, p. 642-650, 2009.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone Formation In Vitro by Stromal Cells Obtained from Bone Marrow of Young Adult Rats. **Cells and Tissue Research**. v. 254, n. 2, p. 317-330, 1988.

MARCO, F.; MILENA, F.; GIANLUCA, G.; VITTORIA, O. Peri-Implant Osteogenesis in Health and Osteoporosis. **Micron**. v. 36, n. 7, p. 630-644, 2005.

MARTIN, J. Y.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT, T. W.; SCHRAUB, D. M.; SIMPSON, J.; LANKFORD, J. JR.; DEAN, D. D.; COCHRAN, D. L.; BOYAN, B. D. Effect of Titanium Surface Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein Synthesis of Human Osteoblast-like Cells (MG-63). **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 29, n. 3, p. 389-401, 1995.

MARMUR, A. Wetting of Hydrophobic Rough Surfaces: To Be Heterogeneous or Not to Be? **Langmuir**. v. 19, n. 20, p. 8343–8348, 2003. [doi:10.1021/la0344682](https://doi.org/10.1021/la0344682).

MARTIN, J. Y.; DEAN, D. D.; COCHRAN, D. L.; SIMPSON, J.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Proliferation, Differentiation, and Protein Synthesis of Human Osteoblast-like Cells (MG-63) Cultured on Previously Used Titanium Surfaces. **Clinical Oral Implants Research**. v. 7, n. 1, p. 27-37, 1996.

MASAKI, C.; SCHNEIDER, G. B.; ZAHARIAS, R.; SEABOLD, D.; STANFORD, C. Effects of Implants Surface Microtopography on Osteoblast Gene Expression. **Clinical Oral Implants Research**. v. 16, n. 6, p. 650-656, 2005.

MASUDA, T.; SALVI, G.; OFFENBACHER, S.; FELTON, D.; COOPER, L. Cell and Matrix Reactions at Titanium Implants in Surgically Prepared Rat Tibiae. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 12, n. 4, p. 473-485, 1997.

MEACHIM, G.; WILLIAMS D. F. Changes in Nonosseous Tissue Adjacent to Titanium Implants. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 7, n. 6, p. 555 - 572, 1993.

MEDEIROS, W. S.; OLIVEIRA, M. V.; PEREIRA, L. C.; CAIRO, C. A. A.; CALIXTO, M. A. Study of Calcium Phosphate Deposition on Porous Titanium Samples. **Journal Materials Science Forum**. v. Advanced Powder Technology V, p. 569-574, 2006.



MEFFERT, R. M.; BLOCK, M. S.; KENT, J. N. What is Osseointegration? **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**. v. 7, n. 4, p. 9 – 21, 1987.

MEFFERT, R. M.; LANGER, B.; FRITZ, M. E. Dental implants: a review. **Journal of Periodontology**. v. 63, n. 11, p. 859-870, 1992.

MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D. B. S.; ARAGÃO, F. J. L.; COOPER, L. F. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. **Biomaterials**. v. 29, n. 28, p. 3822-3835, 2008.

MICHAELS, C. M.; KELLER, J. C.; STANFORD, C. M.; SOLURSH, M.; MACKENZLE, I. C. *In Vitro* Connective Tissue Cell Attachment to Cp Ti. **Journal of Dental Research**. v.68, p. 276, 1989.

MIRON, R. J.; OATES, C. J.; MOLENBERG, A.; DARD, M.; HAMILTON, D. W. The Effect of Enamel Matrix Proteins on the Spreading, Proliferation and Differentiation of Osteoblasts Cultured on Titanium Surfaces. **Biomaterials**. v. 31, n. 3, p. 449-460, 2010.

MISCH, C. M. Ridge Augmentation Using Mandibular Ramus Bone Grafts for the Placement of Dental Implants: Presentation of a Technique. **Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry**. v. 8, n. 2, p. 127-135, 1996.

MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.; CAMPOCCIA, D.; CERVELLATI, M. *In Vitro* Effects on MG-63 Osteoblast-like Cells Following Contact with two Roughness-Differing Fluorohydroxyapatite-coated Titanium Alloys. **Biomaterials**. v. 23, n. 17, p. 3651-3659, 2002.

NAERT, I.; VAN STEENBERGHE, D.; WORTHINGTON, P. **Osseointegração na Reabilitação Bucal**. 1ª Ed. SP: Quintessence Editora Ltda, 1998, 212p.

NAGEN FILHO, H.; FRANCISCONI, P. A. S.; CAMPI JÚNIOR, L.; FARES, N. H. Influência da Textura Superficial dos Implantes. **Revista Odonto Ciência**. v. 22, n. 55, jan./mar., 2007.

OESTERLE, L. J.; CRONIN, R. J.; RANLY, D. M. Maxillary Implants and the Growing Patient. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**. v. 8, n. 4, p. 377-387, 1993.

OLEINICK, A. J. Osseointegration Versus Fibro-Osseointegration: Review of Endosseous Dental Implant Systems. **General Dentistry**. v. 41, n. 5, p. 406-408, 1993.

ORSINI, G.; ASSENZA, B.; SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; PEATTELLI, A. Surface Analysis of Machined versus Sandblasted and Acid-etched Titanium Implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**. v. 15, n. 6, p. 779-784, 2000.

OURA, K.; LIFSHITS, V. G.; SARANIN, A. A.; ZOTOV, A. V.; KATAYAMA, M. **Surface Science: An Introduction**. Springer-Verlag, Berlin, 2003. 440 p.

PARK, J. Y.; DAVIES, J. E. Red Blood Cell and Platelet Interactions with Titanium Implant Surfaces. **Clinical Oral Implant Research**. v. 11, n. 6, p. 530-539, 2000.

PARSEGIAN, V. A. Molecular Forces Governing Tight Contact Between Cellular Surfaces and Substrates. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v. 49, n. 6, p. 838-842, 1983.

PAREDES, R. S. C.; VAZ, A. P.; SILVA, J. C. Avaliação da Influência da Preparação da Superfície de Titânio Utilizado para Implantes Odontológicos Revestidos com Titânio Depositado por Aspersão Térmica P. S. In: 17° CBECiMat 2006 -CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2006, Foz do Iguaçu - PR, **Anais do 17° CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS**.

PEBÉ, P.; BARBOT, R.; TRINIDAD, J.; PESQUERA, A.; LUCENTE, J.; NISHIMURA, R.; NASR, H. Countertorque Testing and Histomorphometric Analysis of Various Implant Surfaces in Canines: A Pilot Study. **Implant Dentistry**. v. 6, n. 4, p. 259-265, 1997.

PERIZZOLO, D.; LACEFIELD, W. R.; BRUNETTE, D. M. Interaction Between Topography and Coating in the Formation of Bone in Culture for Hydroxyapatite-and Titanium – Coated Micromachined Surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 56, n. 4, p. 494-503, 2001.

PIATTELLI, A.; CORIGLIANO, M.; SCARANO, A. Microscopical Observations of the Osseous Responses in Early Loaded Human Titanium Implants: A Report of two Cases. **Biomaterials**. v. 17, n. 13, p. 1333-1337, 1996.

PIATTELLI, A.; PAOLANTONIO, M.; CORIGLIANO, M.; SCARANO, A. Immediate Loading of Titanium Plasma-Sprayed Screw-Shaped Implants in Man: A Clinical and Histological Report of two Cases. **Journal of Periodontology**. v. 68, n. 6, p. 591-597, 1997.

PIATTELLI, A.; CORIGLIANO, M.; SCARANO, A.; COSTIGLIOLA, G.; PAOLANTONIO, M. Immediate Loading of Titanium Plasma-Sprayed Implants: An Histologic Analysis in Monkeys. **Journal of Periodontology**. v. 69, n. 3, p. 321-327, 1998.

PILLIAR, R. M. Porous-Surfaced Metallic Implants for Orthopedic Applications. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 21, n. A1, p. 1-33, 1987.

PILLIAR, R. M.; DEPORTER, D. A.; WATSON, P. A.; VALIQUETTE, N. Dental Implant Design-Effect On Bone Remodeling. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 25, n. 4, p. 467-483, 1991.

PONZONI, D. **Avaliação da Osseointegração Promovida por Implantes Jateados por  $Al_2O_3$ . Análises Histológica e Histométrica em Cães**. 2004. 76f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba.

PRADO DA SILVA, M. H. **Apostila de Biomateriais**. 2006, 81p, <Disponível em: <http://www.ebah.com.br/apostila-de-biomateriais-pdf-a41526.html>>, Acesso em: 10 de Abril de 2006.

PUELO, D. A.; NANJI, A. Understanding and Controlling the Bone-Implant Interface. **Biomaterials**. v. 20, n. 23, p. 2311-2321, 1999.

QUIRYNEN, M.; NAERT, I.; VAN STEENBERGHE, D. Fixture Design and Overload Influence Marginal Bone Loss and Fixture Success in the Brånemark System. **Clinical Oral Implant Research**. v. 3, n. 3, p. 104-111, 1992.

RAMIRES, P. A.; ROMITO, A.; COSENTINO, F.; MILELLA, E. The Influence of Titânia/Hydroxyapatite Composite Coatings on In Vitro Osteoblasts Behaviour. **Biomaterials**. v. 22, n. 12, p. 1467-1474, 2001.

REFAI, A. K. ; TEXTOR, M. ; BRUNETTE, D. M. ; WATERFIELD, J. D. Effect of Titanium Surface of Topography on Macrophage Activation and Secretion of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A.** v. 70, n. 2, p. 194-205, 2004.

RICE, J. M.; HUNT, J. A.; GALLAGHER, J. A.; HANARP, P.; SUTHERLAND, D. S.; GOLD, J. Quantitative Assessment of the Response of Primary Derived Osteoblasts and Macrophages to a Range of Nanotopography Surfaces in Single Culture Model In Vitro. **Biomaterials.**v. 24, n. 26, p. 4799-4818, 2003.

RIGO, E. C. S.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, L. A.; BOSCH, A. O.; CARRODEGUAS, R. G. Implantes Metálicos Recobertos com Hidroxiapatita. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica.**v. 15, n. 1-2, p. 21-29, 1999.

ROMPEM, E.; TOUATI, B.; VAN DOOREN, E. Factors Influencing Marginal Tissue Remodeling Around Implants. **Practical Procedures & Aesthetic Dentistry.** v. 15, n. 10, p. 754-761, 2003.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of cpTi Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation. **Brazilian Dental Journal.** v. 14, n. 1, p. 16-21, 2003.

RUBIO, J. C. C.; VELTEN FILHO, A. G. Avaliação da Rugosidade através de Imagens Digitais. In: III COBEF 2005 - CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO, 2005, Joinville – SC, **ANAIS DO III CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO.**

SAMMONS, R. L.; LUMBIKANONDA, N; GROSS, M.; CANTZLER, P. Comparison of Osteoblast Spreading on Microstructured Dental Implant Surfaces and Cell Behaviour in an Explant Model of Osseointegration. A Scanning Electron Microscopic Study. **Clinical Oral Implant Research.** v. 16, n. 6, p. 657-666, 2005.

SADER, M. S.; BALDUINO, A.; SOARES, G.A.; BOROJEVIC, R. Effect of Three Distinct Treatments of Titanium Surface on Osteoblast Attachment, Proliferation and Differentiation. **Clinical Oral Implants Research.** v. 16, n. 6, p. 667-675, 2005.

SANTOS, P. R. F.; SÁ, J. C.; MENDES, M. W. D.; COSTA, T. H. C.; ALVES JUNIOR, C. Efeito do Tempo de Envelhecimento nas Propriedades Físico-Químicas de Superfícies de Titânio. In: 18° CBECiMat 2008 -CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 2008, Porto de Galinhas – PE, **Anais do 18° CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS.**

SCHMIDT, C.; STEINBACH, G.; DECKING, R.; CLAES, L. E.; IGNATIUS, A. A. IL-6 and PGE<sub>2</sub> Release by Human Osteoblasts on Implant Materials.**Biomaterials.** v. 24, n. 23, p. 4191 – 4196, 2003.

SCHRADER, M. E.; LOEB, G. I. 1992, 484 p. **Modern Approaches to Wettability.Theory and Applications.** New York: Plenum Press.,ISBN 0306439859.

SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Underlying Mechanisms at the Bone-Biomaterial Interface.**Journal of Cellular Biochemistry.** v. 56, n. 3, p. 340-347, 1994.

SIMON, Z.; WASTON, P. A. Biomimetic Dental Implants-News Ways to Enhance Osseointegration.**Journal of the Canadian Dental Association.** v. 68, n. 5, p. 286-288, 2002.

SPECTOR, M. Historical Review of Porous-Coated Implants.**The Journal of Arthroplasty.** v. 2, n. 2, p. 163-177, 1987.

SOSKOLNE, W. A., COHEN, S., SHAPIRA, L., SENNERBY, L., WENNERBERG, A.The Effect of Titanium Surface Roughness on Adhesion of Monocytes and Their Secretion of TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>.**Clinical Oral Implants Research.** v. 13, n. 1, p. 86-93, 2002.

TZAPHILIDOU, M. The Role of Collagen in Bone Structure: An Image Processing Approach. **Micron.** v. 36, n. 7, p. 593-601, 2005.

UITTO, V.J.; LARJAVA, H.; PELTONEN, J.; BRUNETTE, D.M. Expression of Fibronectin and Integrins in Cultured Periodontal Ligament Epithelial Cells.**Journalof Dental Research.**v. 71, n. 5, p.1203-1211, 1992.

VAZ, A. P. **Morfologia dos Revestimentos de Titânio.** 2007. 95f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VIDIGAL JUNIOR, G. M.; GROISMAN, M. Osseointegração x Biointegração: Uma Análise Crítica. **Revista Brasileira de Odontologia**.v. 4, p. 54, 1997.

VIDIGAL JUNIOR, G. M.; ARAGONES, L. C. A.; CAMPOS JR., A.; GROISMAN, M. Histomorphometric Analysis of Hydroxyapatite-Coated and Uncoated Titanium Dental Implants in Rabbit Cortical Bone. **Implant Dentistry**.v. 8, n. 3, p. 295-302, 1999.

VIDIGAL JUNIOR, G. M.; VIEIRA, A.; PEREIRA JUNIOR, F. J.; OLIVEIRA, L. M. C.. Aspectos Biomecânicos Associados à Perda de Implantes Osseointegrados. **Revista Gaúcha de Odontologia**. v. 52, n. 2, p. 107-110, 2004.

XAVIER, S. P.; CARVALHO, P. S. P.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Response of Rat Bone Marrow Cells to Commercially Pure Titanium Submitted to Different Surface Treatments. **Journal of Dentistry**. v. 31, n. 3, p. 173-180, 2003.

XAVIER, S. P. **Caracterização e Avaliação da Biocompatibilidade do Titânio Submetido À Diferentes Tratamentos de Superfície**. 2002. 112f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

XIE, Y.; LIU, X.; HUANG, A. ; DING, C.; Paul K., C. Improvement of Surface Bioactivity on Titanium by Water and Hydrogen Plasma Immersion Ion Implantation. **Biomaterials**. v. 26, n. 31, p. 6129-6135, 2005.

ZABLOSTSKY M.; MEFFERT R.; CAUDILL R.; EVANS, G. Histological and Clinical Comparison of Guided Tissue Regeneration on Dehiscenced Hydroxylapatite-Coated and Titanium Endosseous Implant Surfaces: A Pilot Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. v. 6, n. 3, p. 294-303, 1991.

ZAFFE, D. Some Considerations on Biomaterials and Bone. **Micron**. v. 36, n. 7, p. 583-592, 2005.

ZINGER, O.; ANSELME, K.; DENZER, A.; HABERSETZER, P.; LANDOLT, D. Time-Dependent Adhesion and Morphology of Osteoblastic Cells on Titanium Model Surfaces Featuring Scale-Dependent Topography. **European Cells and Materials**. v. 5, n. 1, p. 21-23, 2003.

WANG, J. Y.; WICKLUND, B. H.; GUSTILO, R. B.; TSUKAYAMA, D. T. Titanium, Chromium and Cobalt Ions Modulate the Release of Bone-Associated Cytokines by Human Monocytes/Macrophages *In Vitro*. **Biomaterials**. v. 17, n. 23, p. 2233-2240, 1996.

WATZEK, G. 2004, 181 p. **Implants in Qualitatively compromised bone**. Quintessence Publishing Co, Inc. São Paulo.

WEINANS, H.; GROOTENBOER, H. J. The Behavior of Adaptive Bone-Remodeling Simulation Models. **Journal of Biomechanics**. v. 25, n. 12, p. 1425-1441, 1992.

WENNERBEG, A.; HALLGREN, C.; JOHANSSON, C.; DANELLI, S. A. Histomorphometric Evaluation of Screw-Shaped Implants Each Prepared with two Surface Roughnesses. **Clinical Oral Implants Research**. v. 9, n. 1, p. 11-19, 1998.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested Guidelines for the Topographic Evaluation of Implant Surfaces. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**. v. 15, n. 3, p. 331-343, 2000.

WHITEHOUSE, D. J. **Surfaces and their Measurement**. 2002, 432 p. Hermes Penton Science, Londres, ISBN 1 9039 9601 5.

WILMOWSKY, C. V.; MULLER, L.; LUTZ, R.; LOHBAUER, U.; RUPP, F.; NEUKAM, F.; NKENKE, E.; SCHLEGEL, K. A.; MULLER, F. A. Osseointegration of Chemically Modified Titanium Surfaces: An In Vitro Study. **Advanced Engineering Materials**. v. 10, n. 12, p. B61-B66, 2008.

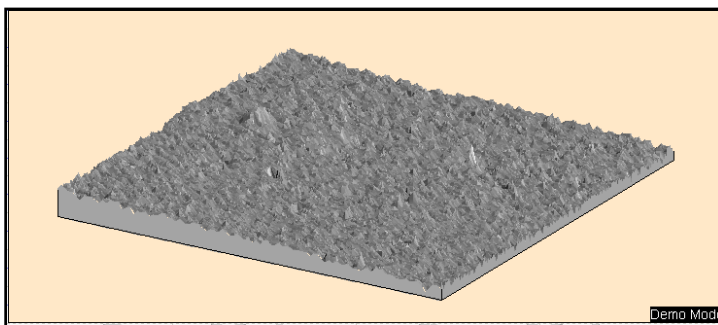
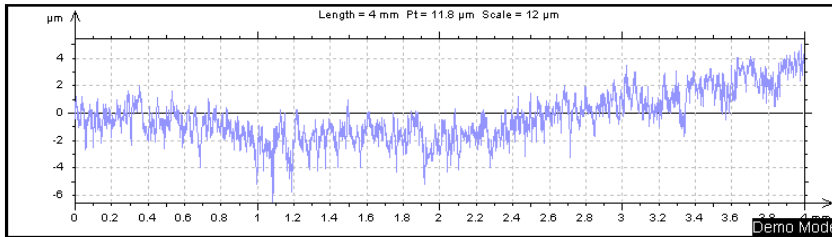
WORTHINGTON, P.; LANG, B. R.; RUBENSTEIN, J. E. 2005, 174 P. **Osseointegração na Odontologia. Uma Visão Geral**. Quintessence Editora Ltda, São Paulo.

YAMADA, M.; TANAKA-DOUZONO, M.; WAKIMOTO, N.; HATAKE, K.; HAYASAWA, H.; MOTOYOSHI, K. Effect of Cytokines on the Proliferation/Differentiation of Stroma-Initiating Cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 184, n. 3, p. 351-355, 2000.

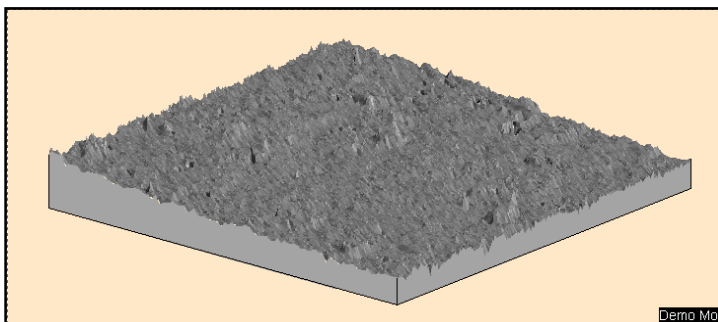
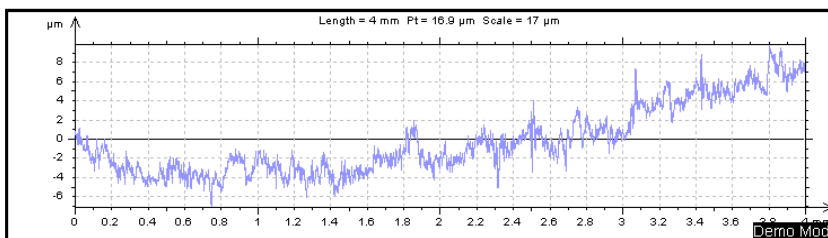
YOUNG, M. F. Bone Matrix Proteins: Their Function, Regulation, and Relationship to Osteoporosis. **Osteoporosis International**. v. 14, n. 3, p. 35-42, 2004.

## APÊNDICE I - Perfis de Rugosidade

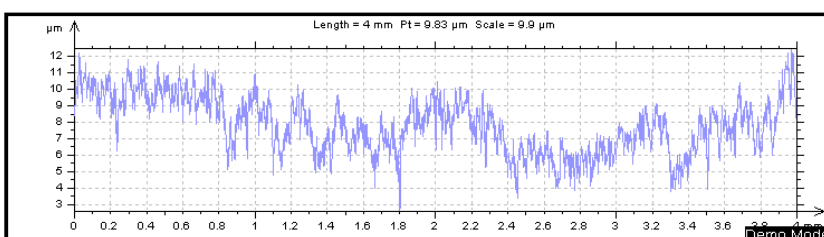
### GRUPO 01



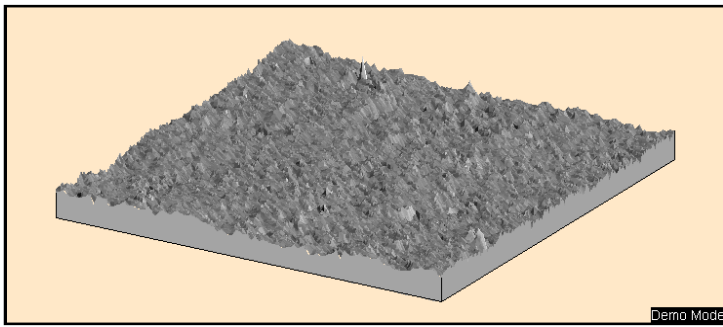
### GRUPO 02



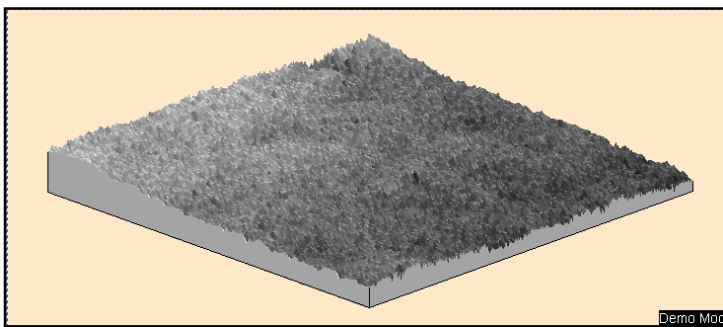
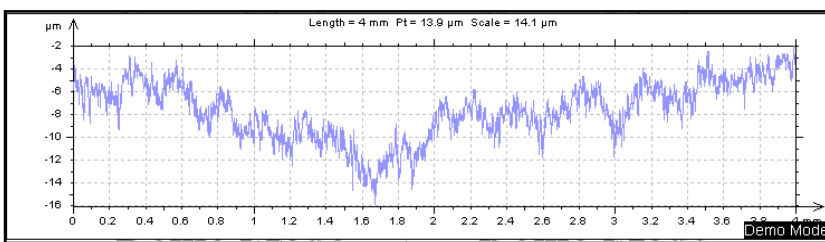
### GRUPO 03



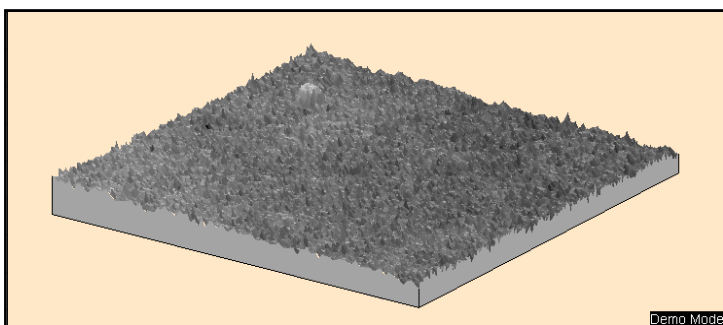
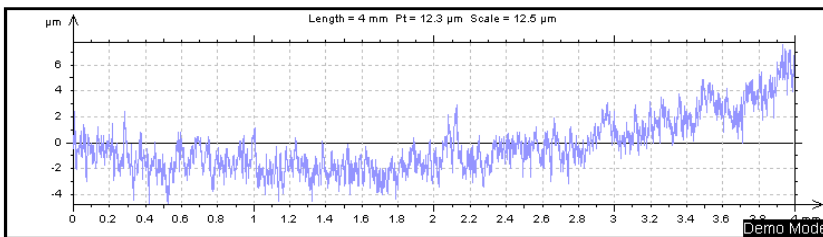




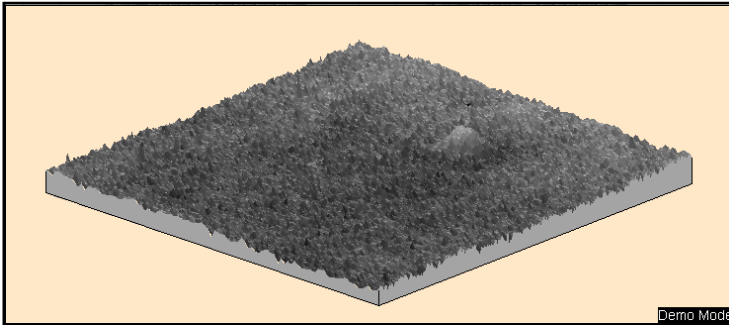
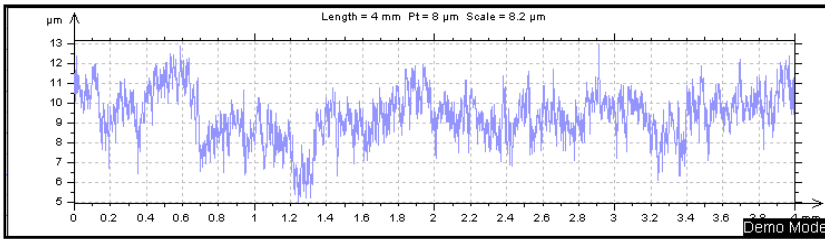
GRUPO 04



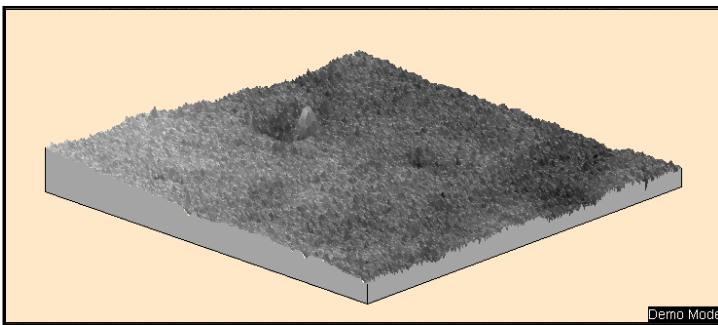
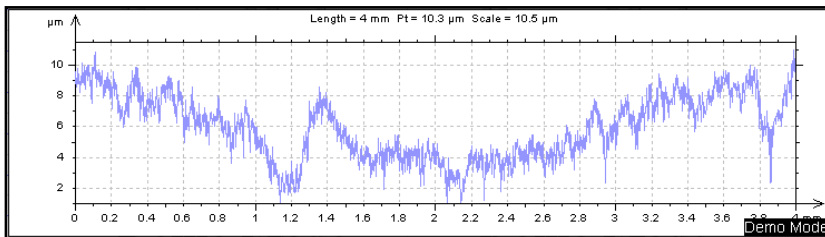
GRUPO 05



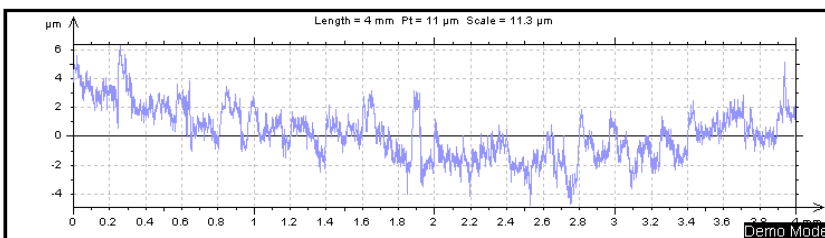
## GRUPO 06

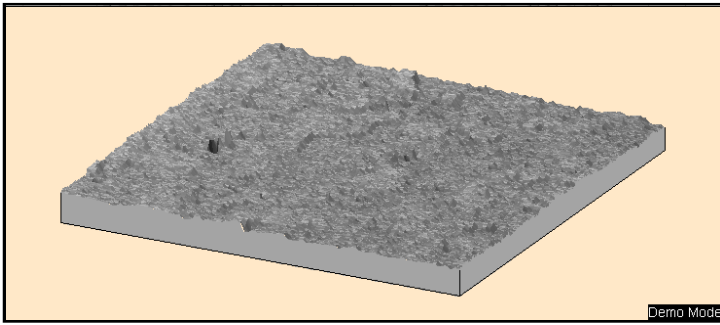


## GRUPO 07

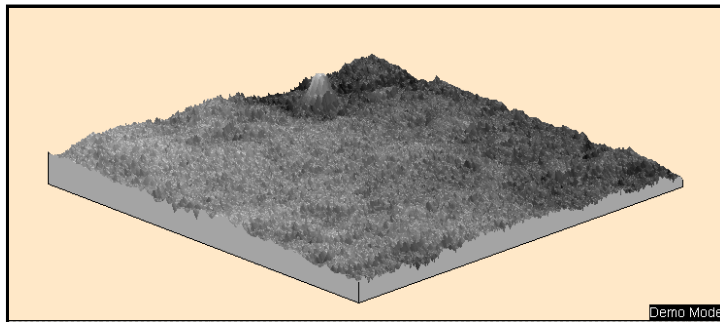
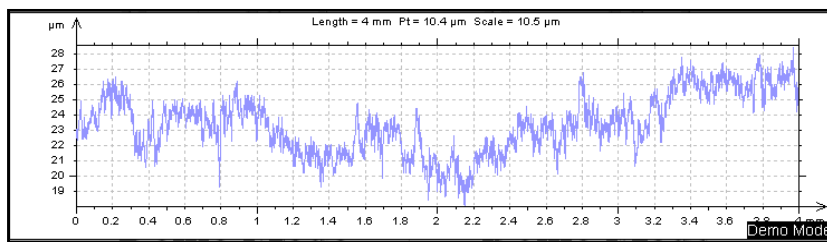


## GRUPO 08

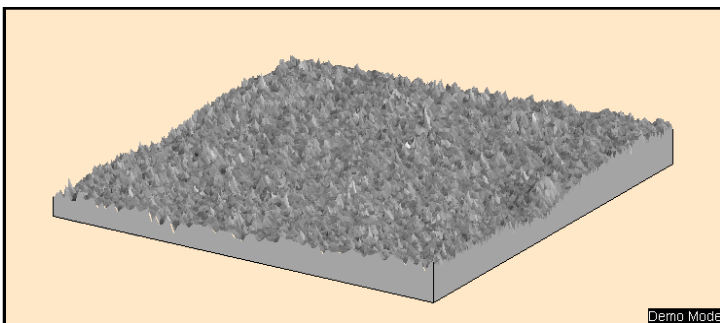
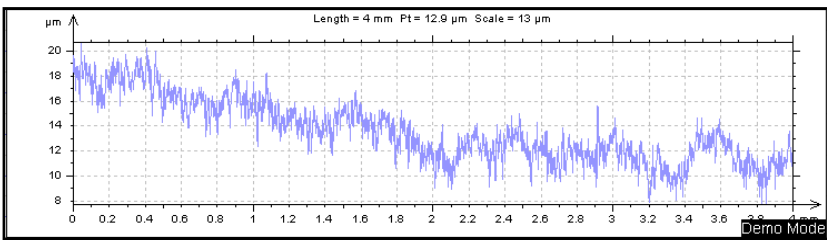




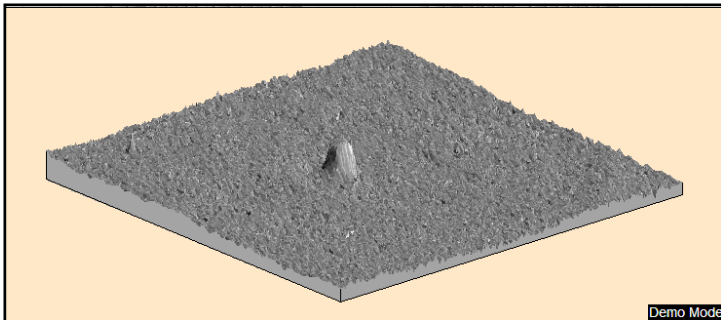
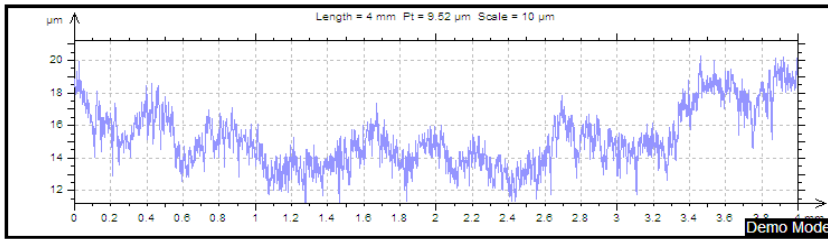
GRUPO 09



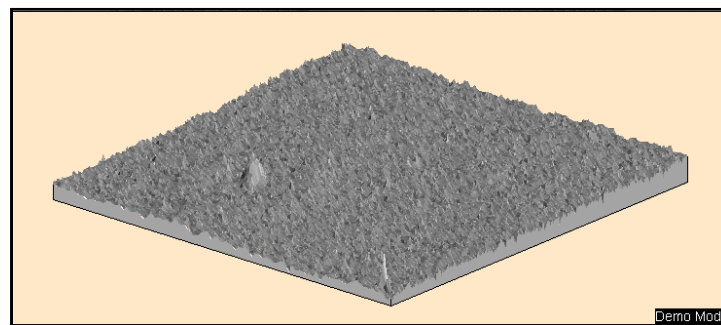
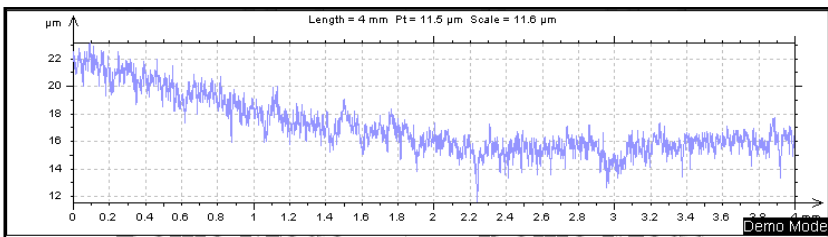
GRUPO 10



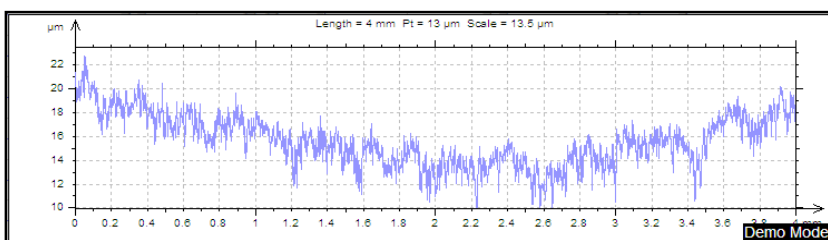
## GRUPO 11

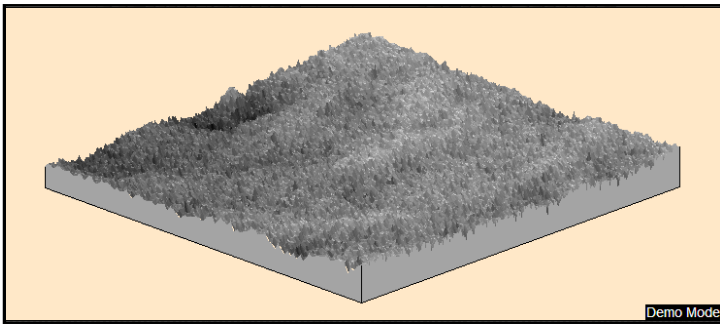


## GRUPO 12

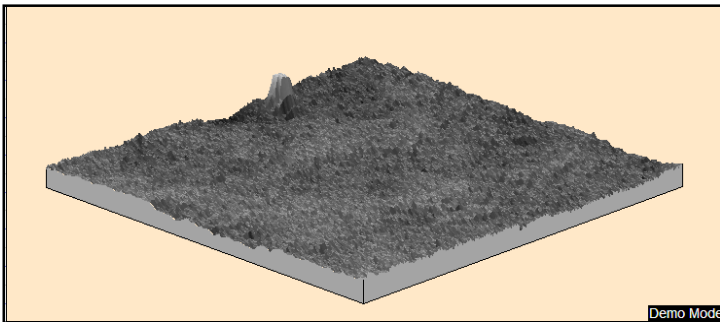
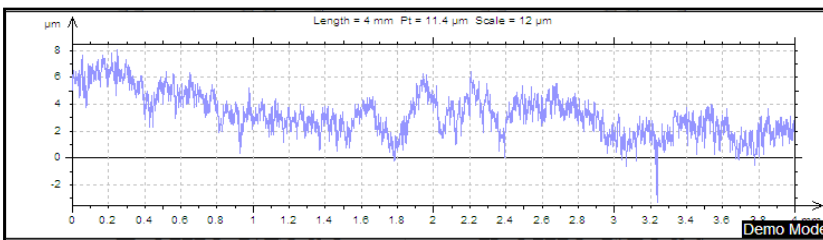


## GRUPO 13

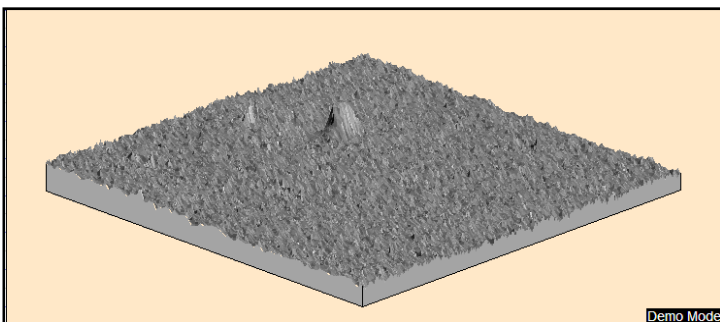
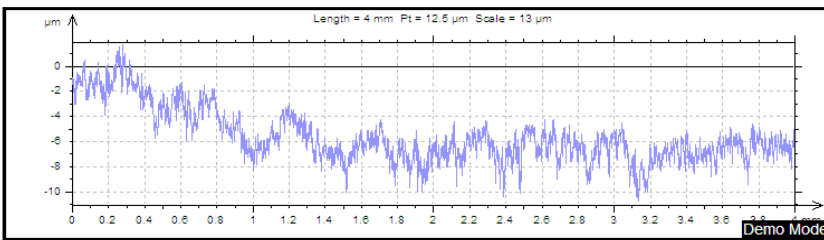




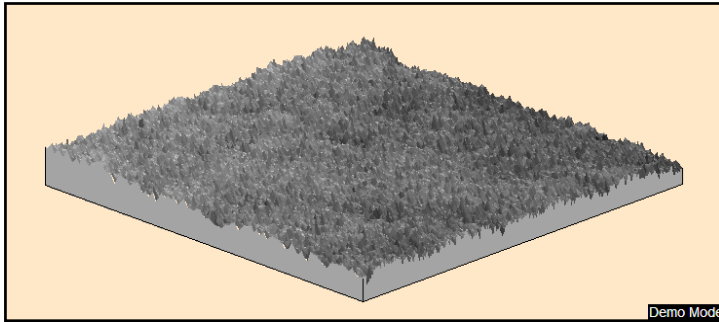
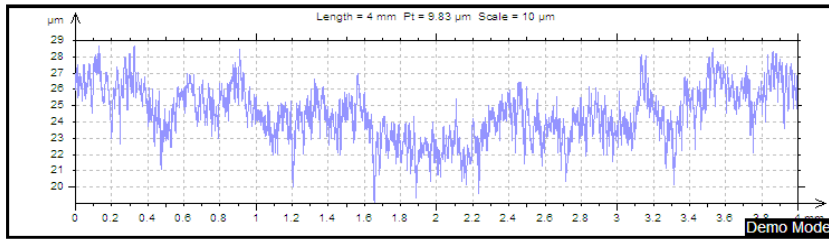
GRUPO 14



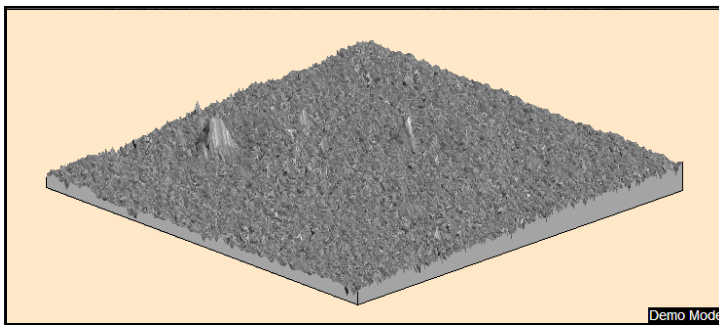
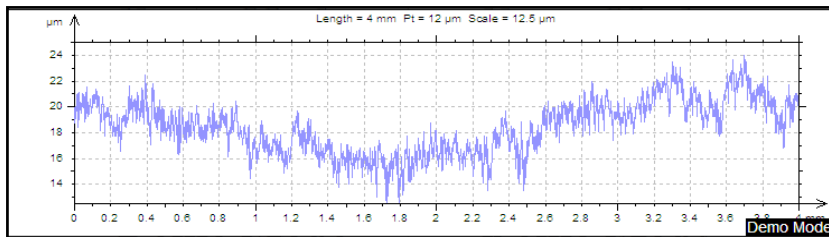
GRUPO 15



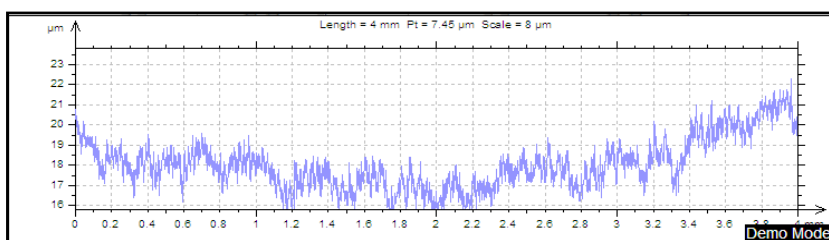
## GRUPO 16

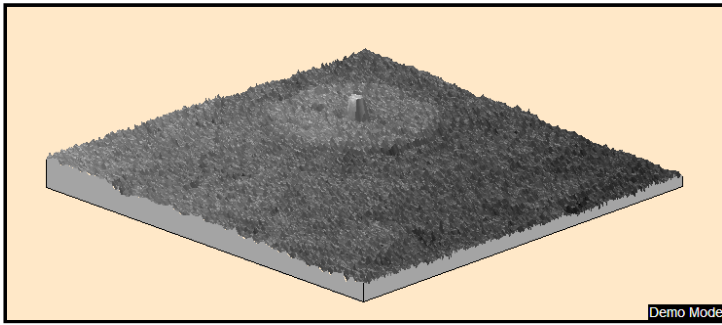


## GRUPO 17

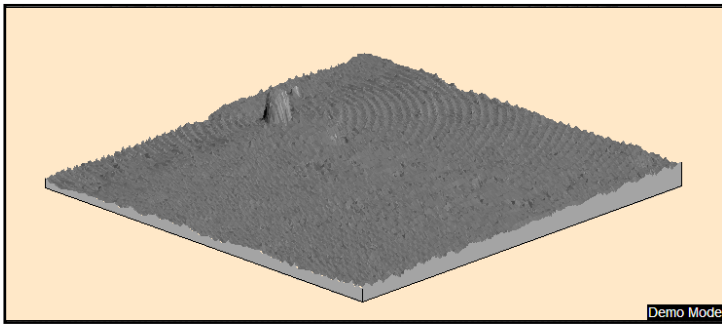
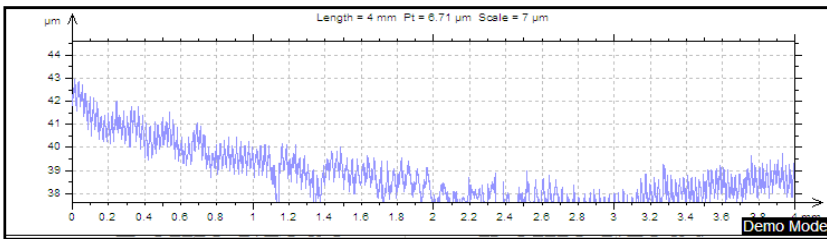


## GRUPO 18



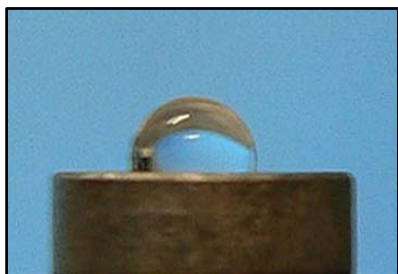


### AMOSTRA LISA

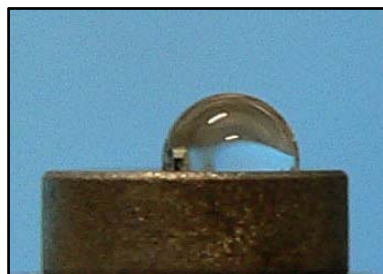




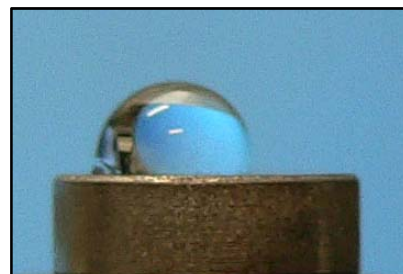
## APÊNDICE II–Técnica da Gota Séssil para a Água Deionizada



GRUPO 01



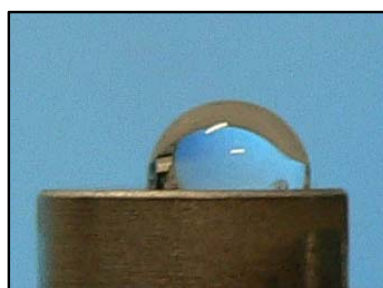
GRUPO 02



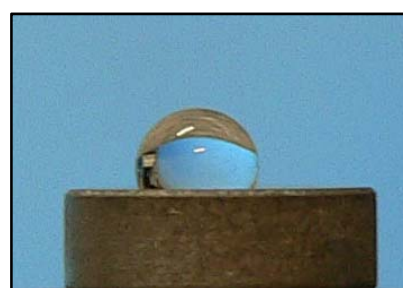
GRUPO 03



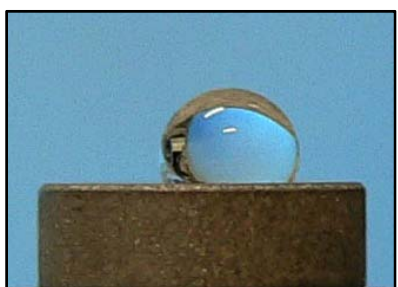
GRUPO 04



GRUPO 05



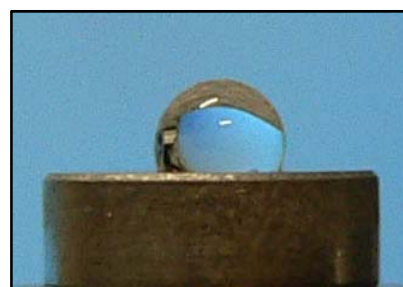
GRUPO 06



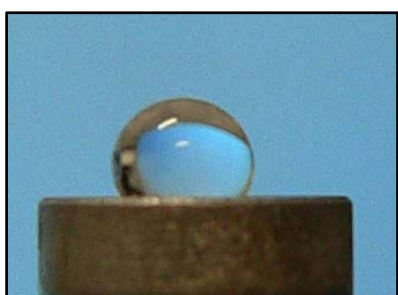
GRUPO 07



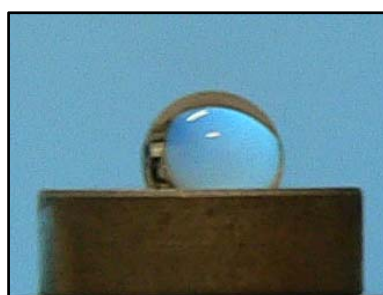
GRUPO 08



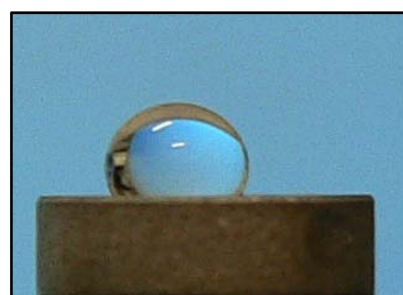
GRUPO 09



GRUPO 10

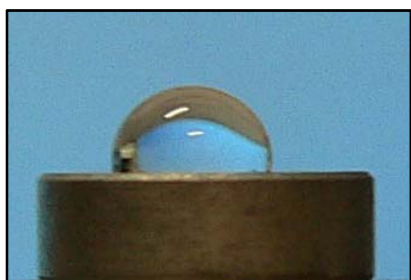


GRUPO 11



GRUPO 12





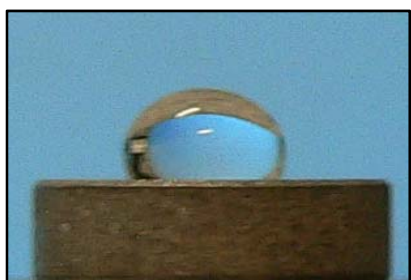
GRUPO 13



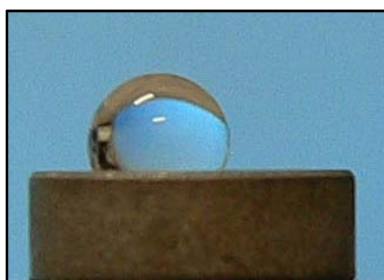
GRUPO 14



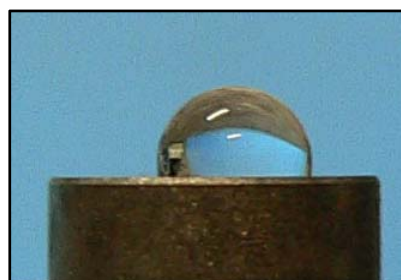
GRUPO 15



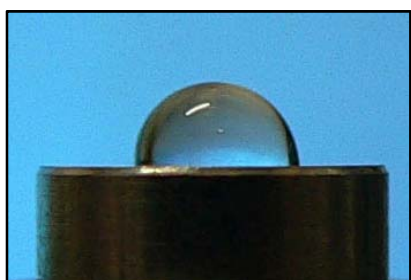
GRUPO 16



GRUPO 17



GRUPO 18



SUPERFÍCIE LISA

**APÊNDICE III – Técnica da Gota Sêssil para o Clorofórmio**

GRUPO 01



GRUPO 02



GRUPO 03



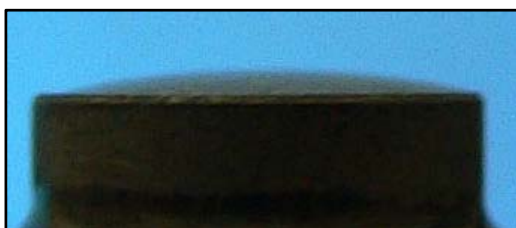
GRUPO 04



GRUPO 05



GRUPO 06



GRUPO 07



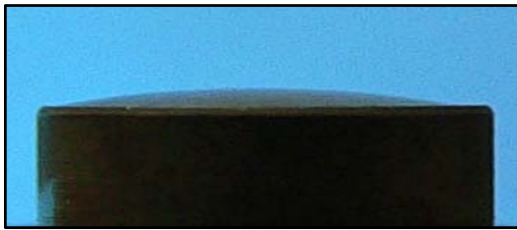
GRUPO 08



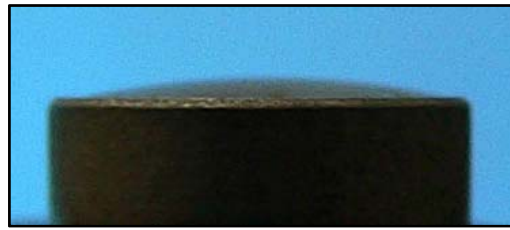
GRUPO 09



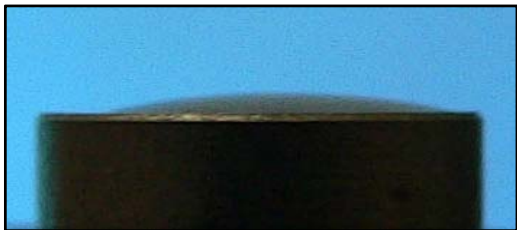
GRUPO 10



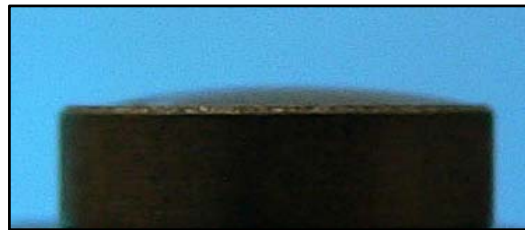
GRUPO 11



GRUPO 12



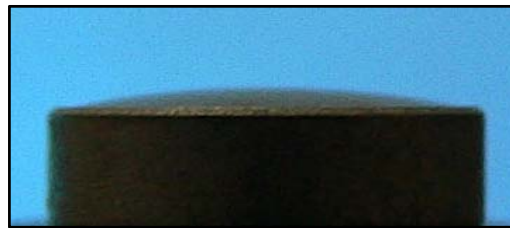
GRUPO 13



GRUPO 14



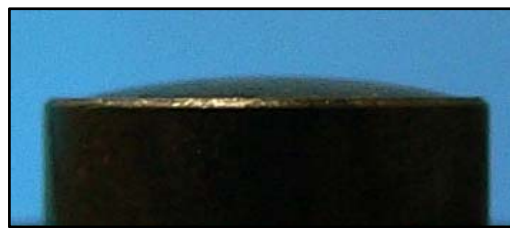
GRUPO 15



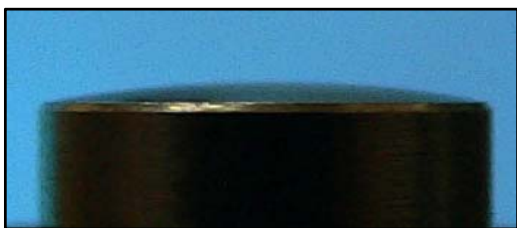
GRUPO 16



GRUPO 17



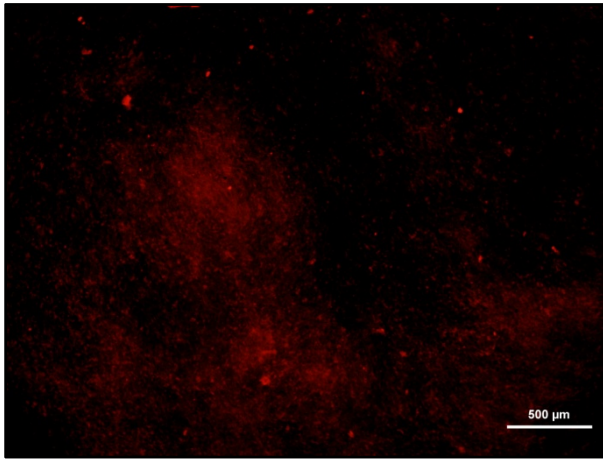
GRUPO 18



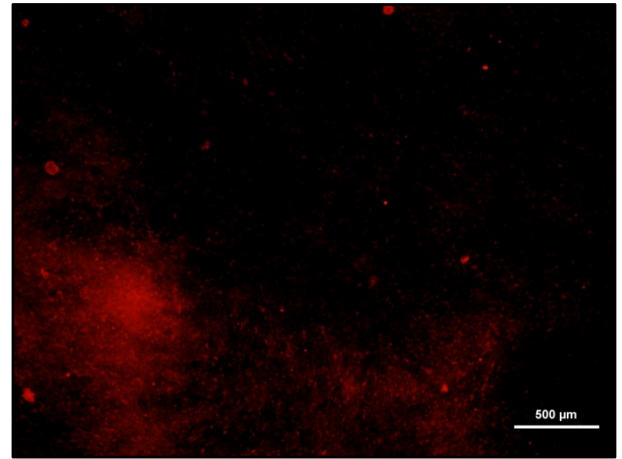
SUPERFÍCIE LISA



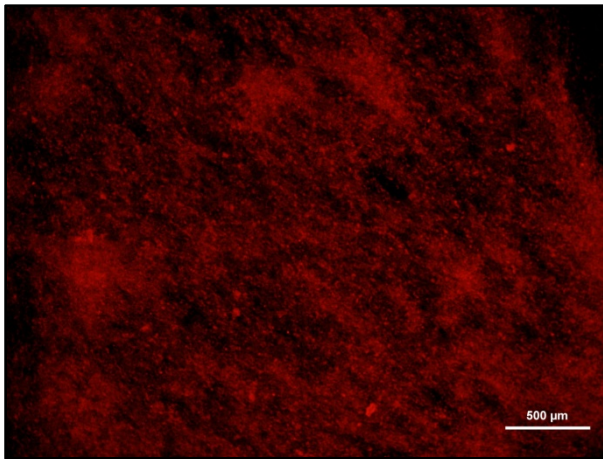
### APÊNDICE III –Nódulos de Mineralização



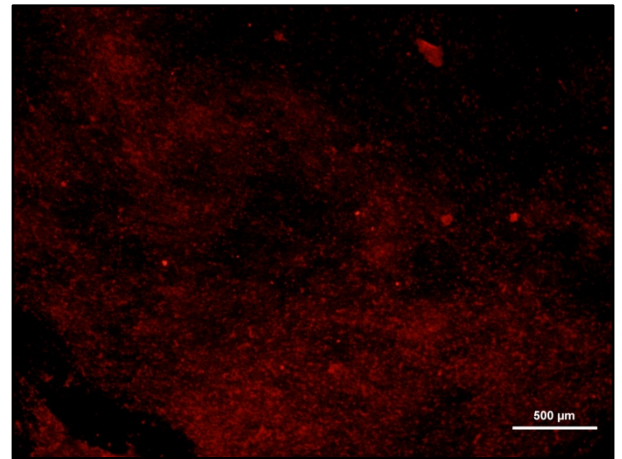
GRUPO 01



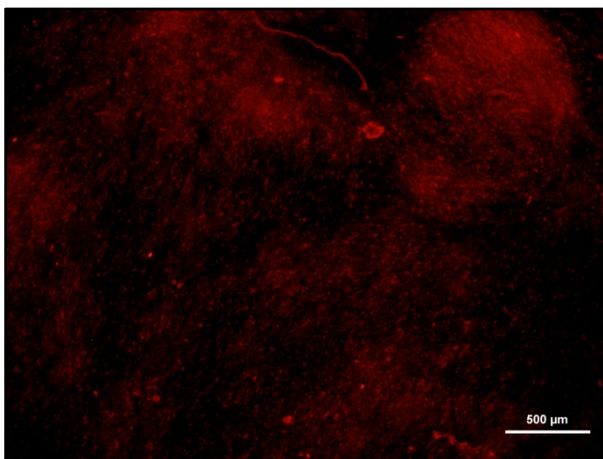
GRUPO 02



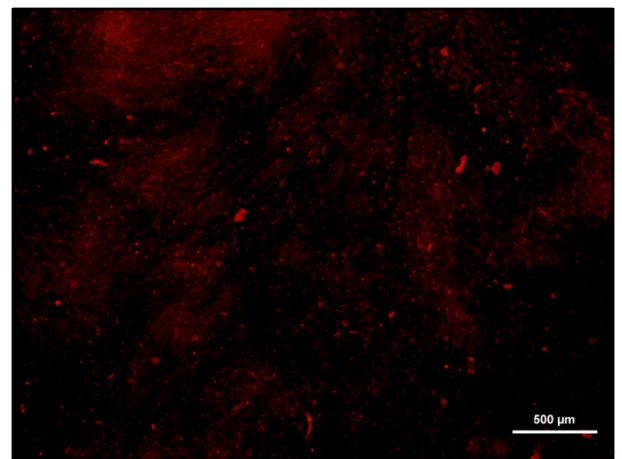
GRUPO 03



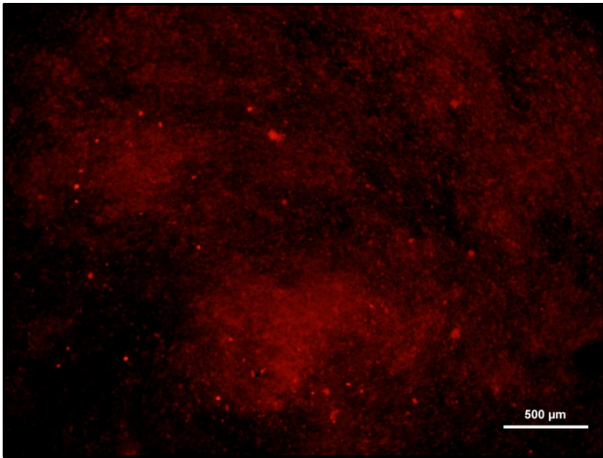
GRUPO 04



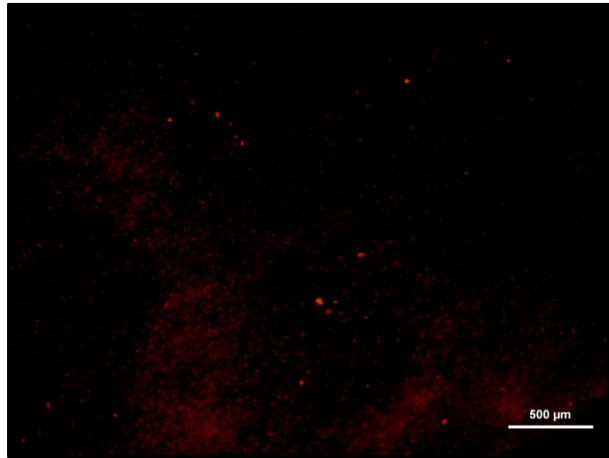
GRUPO 05



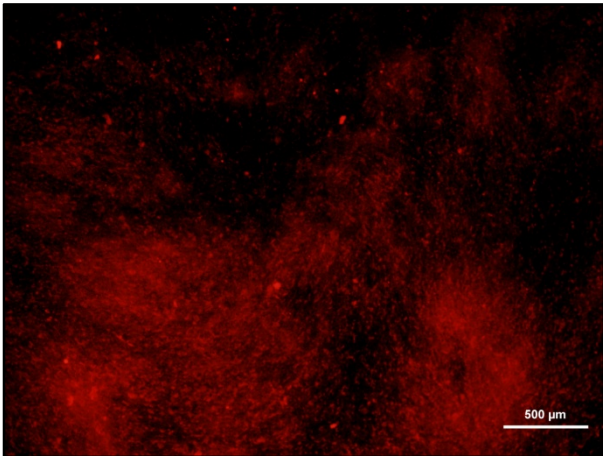
GRUPO 06



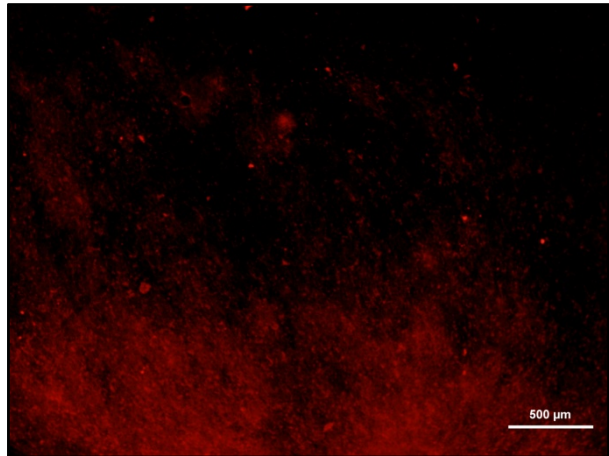
GRUPO 07



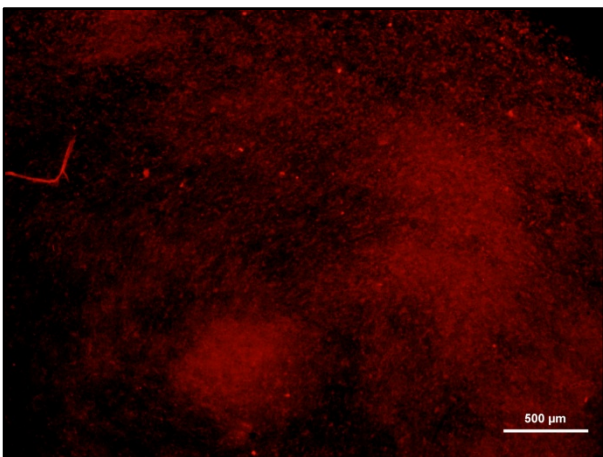
GRUPO 08



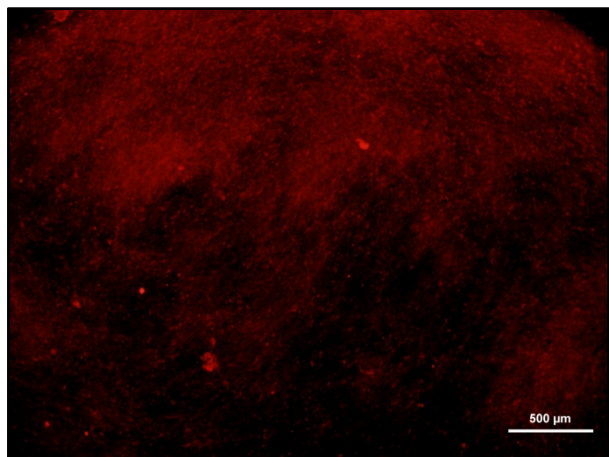
GRUPO 09



GRUPO 10

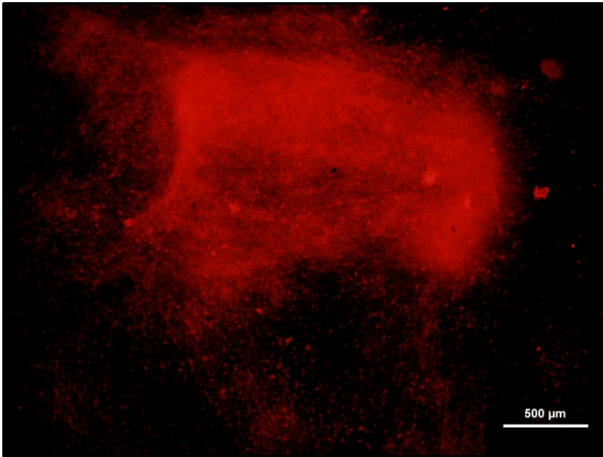


GRUPO 11

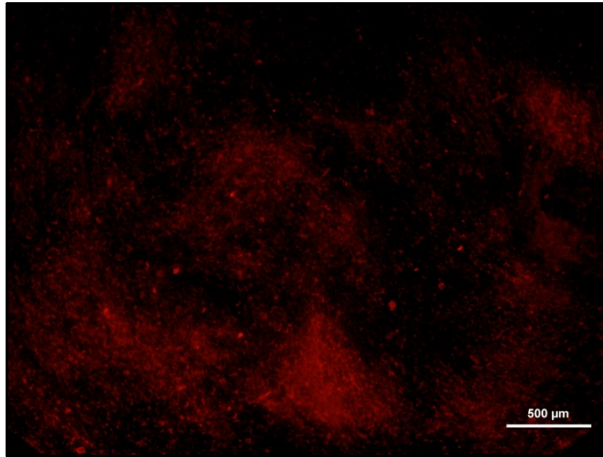


GRUPO 12

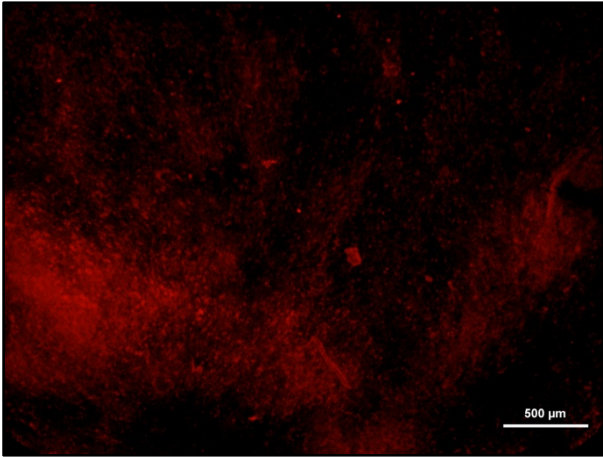




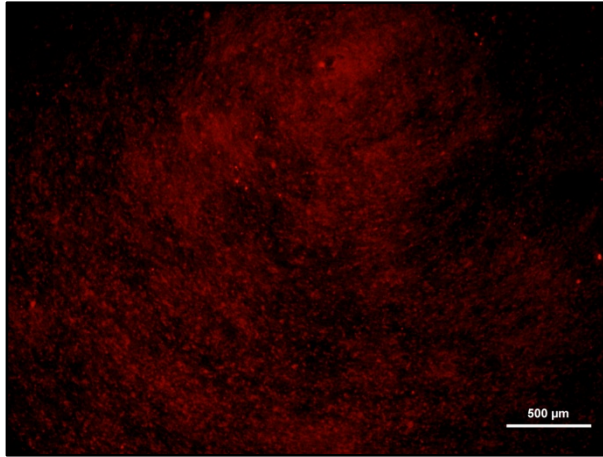
GRUPO 13



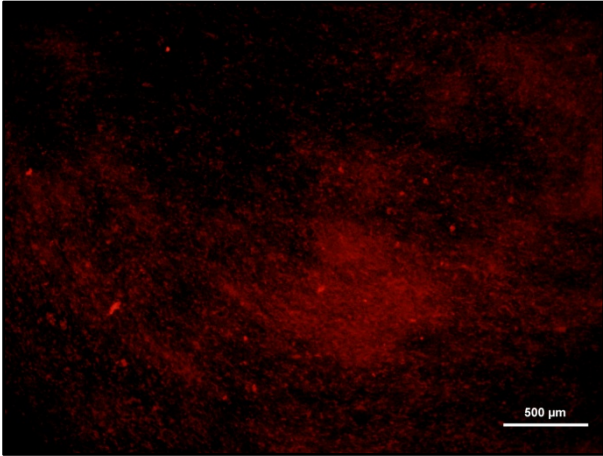
GRUPO 14



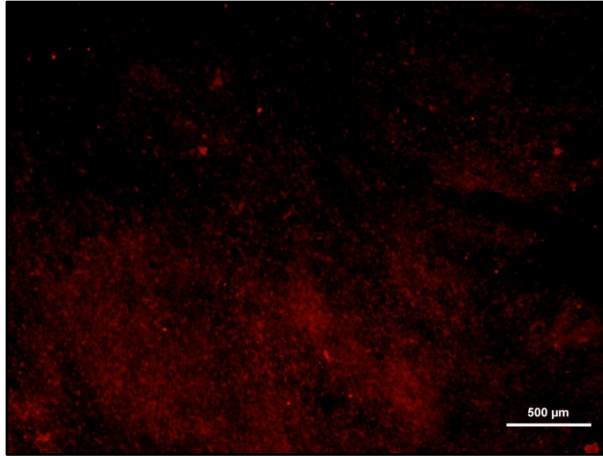
GRUPO 15



GRUPO 16



GRUPO 17



GRUPO 18

