

Ronaldo José de Almeida

**Síntese e caracterização de nanocristais de TiO_2 .
Avaliação de sua biocompatibilidade através de
implantes intraósseos.**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2011

Ronaldo José de Almeida

**Síntese e caracterização de nanocristais de TiO_2 .
Avaliação de sua biocompatibilidade através de
implantes intraósseos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa

Co-Orientador: Prof. Dr. Noélio Oliveira Dantas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Uberlândia, 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A447s Almeida, Ronaldo José de, 1978-
2011 Síntese e caracterização de nanocristais de TiO_2 : avaliação
de sua biocompatibilidade através de implantes intraósseos /
Ronaldo José de Almeida. -- 2011.
78 f. : il.
- Orientador: Cássio José Alves de Sousa.
Co-orientador: Noélio Oliveira Dantas
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
- Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Ossos - Enxerto - Teses. 3. Bio-
compatibilidade - Teses. 4. Materiais biomédicos - Teses. I.
Sousa, Cássio José Alves de. II. Dantas, Noélio Oliveira. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua-
ção em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Dedicatória

Toda Honra e toda Glória seja dada à Deus

Dedico este trabalho ao meu pai Djalma José de Almeida, Coronel da PMMG/QOR, Advogado, que tanto me incentivou em meus estudos e que foi meu primeiro paciente na implantodontia, e que é o meu exemplo de vida.

Dedico também, à minha mãe, Maria do Carmo R. de Almeida, Bel. em Matemática, Contadora, meu irmão Ricardo José de Almeida, Engenheiro Mecânico, meu irmão Raphael José de Almeida, futuro Advogado, minha irmã Rejane Rodrigues de Almeida, futura Nutricionista e a Núbia Silva de Melo, Dentista e minha futura esposa

Dedico aos meus amigos irmãos Ivo da Costa Junior e João Batista Angelo pelas insondáveis horas de conversas científicas sobre a possibilidade da realização desse trabalho.

Dedico esta obra também à minha avó, Rosa Pereira Leite, que com todo seu amor e carinho viveu a plenitude da sua vida. (1917 – 2011) -in memoriam-

A vocês, muito obrigado.

Agradecimentos

Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio Pv (9:9)

**Agradeço à Anielle por sua alegria e competência;
Agradeço à Mariana por seu incentivo, competência e amizade;
Agradeço à Adriana, Andrea e Patrícia pela amizade, e incentivo;
Agradeço aos meus colegas da especialização em implantodontia;
Agradeço aos meus colegas do mestrado;
Agradeço à todos que fizeram parte, direta ou indiretamente desse trabalho.**

Epígrafe

Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio. Pv (9:9)

Sumário

RESUMO.....	- 3 -
ABSTRACT	- 5 -
1. INTRODUÇÃO	- 7 -
2. REVISÃO DE LITERATURA	- 11 -
3. PROPOSIÇÃO	- 29 -
4. MATERIAL E MÉTODOS	- 31 -
5. RESULTADOS	- 43 -
6. DISCUSSÃO	- 53 -
7. CONCLUSÃO	- 61 -
REFERÊNCIAS *	- 63 -
OBRAS CONSULTADAS	- 72 -
ANEXOS	- 75 -

Resumo

Resumo

O sucesso dos enxertos ósseos como material aloplástico apresenta-se, ainda, limitado, devido à sua não capacidade de efetiva osseointegração. Neste estudo, sintetizamos nanocristais de TiO_2 com tamanho médio de 21 nanômetros através de uma via úmida, por co-precipitação. Verificamos suas propriedades físicas, quanto à estrutura, tamanho e grau de pureza, por espectroscopia micro Raman (RAMAN) e Difração de Raios X (DRX). Por microscopia ótica avaliamos a resposta inflamatória, através de implantes intra-ósseos em cobaias *guinea pigs*, (*cavia porcellus*), como recomendado pela Federação Dentária Internacional (FDI). Dez cobaias foram utilizadas nos períodos experimentais de quatro e doze semanas. Cada animal recebeu dois implantes. De cada implante foram confeccionados 24 lâminas com 144 cortes histológicos, corados com hematoxilina-eosina e analisadas as respostas inflamatórias, por dois observadores independentes. Verificaram respostas ausentes/suaves em ambos os períodos, devido à baixa variabilidade celular e aposição óssea direta e estrutural respeitando e contornando o material, sem apresentar uma superfície de separação visível, sem sinais de rejeição. Característica observada em todas as amostras. Por análise da nanotopografia, com Microscopia de Força Atômica (AFM), evidenciamos a integração entre o osso neoformado e o material implantado. Assim, através da metodologia empregada foi possível evidenciar os fenômenos da osseointegração e biocompatibilidade em um material aloplástico em escala nanométrica.

Abstract

Abstract

The success of alloplastic bone grafts is still limited because of inadequate osseointegration. In this study, TiO₂ nanocrystals (21 nanometers) were synthesized by wet-chemical co-precipitation. Their structure, size and purity were determined by Raman spectroscopy (RAMAN) and x-ray diffraction (XRD). Optical microscopy was used to evaluate inflammation arising from intraosseous implants in guinea pigs as recommended by the World Dental Federation (FDI). Ten guinea pigs were used receiving two implants each. Half of the guinea pigs were observed at four weeks and the rest at twelve weeks. 24 slides were prepared with 144 histological cuts, stained with hematoxylin-eosin and analyzed for inflammation response by two independent observers. It was determined that inflammation was absent/mild at both time periods due to low cellular variability and direct and structural bone apposition on and around the material without visible separation or signs of rejection. These characteristics were observed in all samples. Nanotopography analysis and Atomic Force Microscopy (AFM) showed integration between the new bone and the implanted material. Therefore, through the methodology used, it was possible to evidence osseointegration and biocompatibility in alloplastic material at the nanoscale.

Introdução

1. Introdução

O sucesso da terapia com implantes dentários resultou nos últimos anos em um grande avanço na qualidade de vida de milhares de pessoas em todo o mundo. Não apenas a odontologia, mas toda a ciência da reparação e regeneração óssea tem se beneficiado dos conceitos da osseointegração (Nickeng et al 2008; Kuboki et al 1999)

A partir da primeira evidência da osseointegração tem havido uma grande evolução na área das ciências dos materiais provenientes de experimentos com os mais diversos materiais e técnicas, visando o desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis que possam substituir o órgão e os tecidos dentários com maior previsibilidade e segurança. (Ring, 1985)

Pesquisadores em todo mundo têm se envolvido na busca de novas evidências para explicar o sucesso do titânio como material de eleição, por apresentar propriedades mecânicas e químicas compatíveis com o tecido ósseo. Através de técnicas de caracterizações estruturais tem-se mostrado que uma camada de óxido de titânio, anteriormente formada por oxidação passiva, permanece em contato íntimo e direto com o tecido conjuntivo ósseo vital, sem a interposição de tecido fibroso e com uma espessura da ordem nanométrica (Hench et al, 1984; Adell et al, 1981; Albrektsson, 1983.)

O primeiro cientista a reconhecer a eminente revolução científica devido à nanomanipulação foi o Americano Richard Feynman, ganhador de dois prêmios Nobel, que após sua palestra na American Physical Society, em 29 de dezembro de 1959, com o tema “Há bastante espaço vazio lá em baixo”, mostrou que não existem razões físicas que impeçam a fabricação de dispositivos através da manipulação de átomos individuais. Ele propôs que essa manipulação era possível e que atingiria todos os campos do conhecimento. (Feynman, 1960)

Entretanto, hoje sabemos que os nanomateriais não são uma exclusividade do século XX, pois o homem tem feito o uso de nanomateriais desde a antiguidade, quando os artífices se utilizavam de argila para confecção de utensílios domésticos ou em vidros para criar efeitos de vitrais coloridos. O

vaso de Licurgo é considerado como a primeira evidencia da nanotecnologia, datado do século IV depois de Cristo. (Freestone et al, 2007)

Os avanços na nanotecnologia que surgiu em 1959 não foram notados até o início da década de 80, devido à ausência de equipamentos que permitissem a nanomanipulação, como o microscópio de varredura por sonda (SPM) , por tunelamento (STM), de campo próximo (NFM) e o de força atômica (AFM) Esses equipamentos tem sido os olhos e dedos dos cientistas para o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica. Para entendermos o que significa nano tecnologia, precisamos saber que o prefixo nano é derivado de uma palavra grega (nános) que significa “anão”. Na ciência o termo técnico nano é usado para definir qualquer unidade de medida equivalente a um bilionésimo, nesse caso, de um metro, equivalente à distância ocupada por cerca de 5 a 10 atomos, de modo a formar uma linha reta. (Drexler 2006)

A palavra tecnologia também derivado do grego (téchne) que significa arte, ofício, prática e (lógos) também do grego, que significa conhecimento, estudo, ciência, que pode ser resumida em aplicação do método científico com objetivos práticos e comerciais. De forma clara, nanotecnologia pode ser conceituada como a habilidade de manipulação de átomos na escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, com objetivo de criar estruturas maiores, fundamentalmente com uma nova organização estrutural e, normalmente com fins comerciais. (ASTM E2456)

A nanotecnologia é uma ciência nova, multidisciplinar, que inclui conhecimentos da biologia, física, química, matemática, engenharia, computação e outros ramos da ciência. Uma vez que tenhamos o controle das características de tamanho, será também possível melhorar as propriedades dos materiais, além das propriedades já conhecidas. A redução controlada das dimensões dos materiais até a escala nanométrica, possibilitará que tenhamos novos materiais com propriedades únicas, como os nanotubos de carbono, e fios e pontos quânticos, filmes finos, estruturas baseadas nas moléculas de DNA, emissores de laser, entre outros. Essas novas formas de materiais e de dispositivos serão precursores de uma idade revolucionária para a ciência e

tecnologia, contanto que possamos descobrir e utilizar completamente essas novas propriedades dos nanomateriais. (Schoen et al 2003)

E para entendermos o que é um biomaterial precisamos saber que uma das definições correntes diz que Biomaterial é qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Helmus et al 1995) ou que pela definição clássica de Williams que diz que um biomaterial é parte de um sistema que trata, aumenta ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (Williams, 1987)

O trabalho em questão envolveu síntese e caracterização de um nanobiomaterial para enxerto ósseo aloplástico. Os métodos padronizados para a avaliação de suas propriedades biológicas são recomendados pela FDI (1980) e aceitos pela ANSI/ADA (1984). Para tanto, foram realizados testes de avaliações histológicas, por microscopia ótica em que evidenciamos sua biocompatibilidade. E por análise da nanotopografia por Microscopia de Força Atômica (AFM), demonstramos sua íntima relação com o tecido ósseo. Assim, através da metodologia empregada demonstramos o potencial dos nanocristais de Dióxido de Titânio como material a ser utilizado nas terapias ósseas reconstrutivas e do seu emprego concomitante aos implantes osseointegrados.

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

Achados arqueológicos comprovam a preocupação humana na busca de materiais que pudessem substituir ou reparar dentes e ossos. Os astecas, romanos e chineses já usavam o ouro por volta do ano 5. Implantes de ferro foram encontrados na Europa, e foram datados como sendo do ano 200. Outros achados arqueológicos evidenciam que no ano 600 três incisivos inferiores foram substituídos por conchas marinhas em uma mandíbula de uma pessoa viva. Essa mandíbula foi encontrada em uma escavação no Vale Ulloa, em Honduras, em 1931 e após a realização de exames radiográficos, os resultados comprovavam a formação de osso compacto em torno dos implantes. Essa mandíbula de origem Maya é considerada a primeira evidência dos implantes endósseos e pode ser encontrada no Peabody Museum of Archaeology and Ethnology Harvard University. (Ring, 1985)

Dressman, em 1892 quando utilizou gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$), conhecido como Gesso Paris para preenchimento de cavidades ósseas foi considerado o primeiro a utilizar um material cerâmico para o reparo e substituição do tecido ósseo perdido.

Urist e McLean, 1953 descrevem que sobre a osteogênese, tem se conhecido por séculos que a cicatrização de fraturas inicia-se pela proliferação de células do perióstio e do endóstio. Sabe-se que as reações do perióstio, na formação óssea, é tipicamente intramembranosa enquanto as reações do endóstio é classificada como tipicamente aposicional. Em ambos, a nova formação óssea é claramente originada de células descendentes dos osteoblastos. Entretanto, recentes investigações experimentais apresentam uma forte evidência da existência de outro mecanismo de osteogênese descrita como um processo de formação óssea por indução. Ressaltam ainda que a teoria da indução é como a solução de um mistério, de como o novo osso é guiado em direção às linhas de fratura, pois a osteogênese não ocorre em todas as direções, mas direcionado para o espaço da fratura. E concluem que a reparação óssea sempre ocorre pela formação preliminar de fibrose, sendo o

processo como um todo um exemplo dos diversos meios para um fim comum que é a união da fratura.

Nikulín e Ljubovic , em 1956 fizeram um estudo experimental que comparava a reparação do tecido ósseo sem e com o enxerto do biomaterial. Com os resultados eles afirmaram que não houve ganho em se utilizar o gesso como material de preenchimento, pois o mesmo não produziria nenhuma reação adicional às que normalmente ocorrem quando o osso é fraturado.

Spangberg, em 1969 introduziu um método conveniente e simples para a implantação na mandíbula de cobaias. O implante é colocado no triângulo ósseo formado entre os incisivos e a parte inferior da sínfise que une as duas metades da mandíbula. Esta área pode ser alcançada através de uma incisão extra-oral na pele e camada muscular submandibular. Quando a área é atingida, o perióstio é removido e uma cavidade é preparada em cada lado da sínfise. A cavidade deve ser preparada de maneira tal que seu tamanho final seja obtido através de brocas com diâmetros crescentes, começando com uma esférica menor, com rotação de 2000 a 3.000 rpm, e irrigação constante com solução salina esterilizada. A broca seguinte é espiral, à qual se segue uma broca de fissura de diâmetro equivalente ao do implante. O autor desenvolveu um veículo especial feito de Teflon[®], com ranhuras externas para retenção na cavidade óssea, a fim de carregar o material a ser estudado. O veículo tem a forma de um copo, com diâmetro externo de 2 mm, interno de 1,3 mm e comprimento de 2 mm. Ao preenchê-lo com o material, deve-se tomar cuidado para não contaminar a sua superfície externa, pois a mesma serve como controle negativo da técnica. Após o preparo da cavidade, a mesma é irrigada com solução salina e o copo com o material é inserido, tendo sua abertura direcionada para o osso. Quando a cavidade é feita apropriadamente, o copo se acomoda de maneira justa e as ranhuras se preenchem rapidamente com osso neoformado, mantendo-o em posição durante todo o experimento, independentemente das reações tissulares que possam ocorrer. Após a colocação dos implantes, os tecidos moles são recolocados em posição e suturados. O autor concluiu que, após a análise dos resultados, foi possível estabelecer uma classificação dos materiais em ordem crescente de toxicidade

e que os resultados mostraram que o quadro histológico variava largamente entre os diferentes materiais testados, enquanto que as variações entre implantes do mesmo material eram muito pequenas.

Langeland e Cotton, em 1980 recomendam três níveis de avaliação dos materiais utilizados na terapia intrarradicular: teste inicial *in vitro*, por meio de teste em cultura de células, teste secundário em animais de pequeno porte *in vivo*, subcutâneo ou intra-ósseo e o teste de uso em primatas subumanos e humanos. Publicado como o teste de biocompatibilidade recomendado pela Federação Dentária Internacional.

Adell et al, em 1981 relataram que a escolha do titânio como material para ser utilizado como implante se deu por suas propriedades mecânicas compatíveis ao tecido ósseo. E, em teoria, uma potencial capacidade de adesão, ligação química, entre o osso e a camada de óxido de titânio estaria presente em sua superfície. O titânio poderia ser considerado um material cerâmico e não propriamente um metal, devido a uma camada de óxido estável presente em toda a sua superfície. Nesse estudo longitudinal em humanos por 15 anos, com seu início em 1965, os pacientes se submeteram a um protocolo com acompanhamento até o ano de 1980. Foram instalados 2768 implantes dentários feitos em titânio em formato de parafusos cilíndricos, em 410 pacientes, e após o período de observação de 15 anos, mostrou um sucesso clínico de 89% nas maxilas e 100% em mandíbulas .

Albrektsson et al, em 1981, descreve seis requisitos para assegurar a osseointegração e que pela primeira vez é evidenciado o contato osso-implante através de imagens de microscopia de transmissão eletrônica. Seus achados reforçam as primeiras evidências da osseointegração e sugere que exista uma adesão química entre o osso e o óxido de titânio, agora ao nível da microscopia eletrônica.

O documento nº 41 da ANSI/ADA, publicado em 1982 aceita e aprova as normas da FDI sobre a padronização de técnica para se avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de materiais dentários.

Branemark et al, em 1983 descreveram o sucesso de 91% em acompanhamento de 5 a 9 anos de 3000 implantes instalados em mandíbulas edêntulas de 400 pacientes. Acredita-se que a principal razão para os resultados são o estabelecimento do selamento biológico pelo tecido gengival e a osseointegração que é definida pelo contato direto do osso vivo e o implante. E fizeram ainda análises de radiografias, microscopia de transmissão eletrônica (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) , evidenciando a ancoragem direta entre o implante de titânio e o tecido ósseo.

Albrektsson, em 1983 avaliaram o fenômeno da osseointegração através do acompanhamento clínico de 2895 implantes instalados em humanos, dos quais 38 implantes estáveis foram removidos e sua interface analisada através de exames de raios X, microscopia transmissão eletrônica e microscopia eletrônica de varredura . Através de imagens do MEV pode notar a relação estreita entre o osso e o titânio. Nas imagens do MET pode notar a relação direta entre o osso e o implante, ao nível da microscopia eletrônica, o que sugere que exista uma ligação química diretamente entre o osso e o titânio. Ressaltou ainda que a superfície do titânio se torna instantaneamente revestida com uma camada de óxido. Assim, não é o metal ou componentes metálicos que, diretamente, são expostos aos tecidos adjacentes em um implante de titânio, mas essa camada de óxido que é estável e com espessura de 100 angstroms, ou seja, 10 nanômetros, impedindo o contato direto entre o osso e o metal. E conclui que a importância desse fato para o estabelecimento da osseointegração duradoura não deveria ser desconsiderada, muito embora seja necessário que se tenha mais conhecimento a ser adquirido para se obter uma melhor compreensão da ligação química entre o titânio e o osso.

Parsegian, em 1983, afirma que após a imediata instalação do implante, a primeira camada de biomoléculas que se deposita em sua superfície são as moléculas de água. E ainda que as biomoléculas ligam-se às superfícies dos implantes num meio biológico através das interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes.

Kasemo, em 1983, relata que em meios fisiológicos a camada de óxido presente na superfície do implante é altamente protetora, prevenindo o contato

entre o meio e o metal titânio. Devido a essa característica é possível que não exista o contato direto entre o titânio e os tecidos, mas entre os tecidos e a camada de óxido anteriormente formada.

Thomas e Cook, em 1985, observaram que as condições iniciais da superfície do implante determinam, de forma decisiva, a natureza e as propriedades da camada de água e outras biomoléculas que geralmente são adsorvidas nela. E que esse fato influenciará o comportamento das células que alcançam a superfície do implante, pois acreditam que as propriedades químicas e físicas iniciais das camadas atômicas mais superficiais dos implantes sejam os fatores-chave nesse processo.

Parr et al, em 1985 ressaltaram que para se conseguir sucesso a longo prazo na cirurgia de instalação dos implantes de titânio é preciso que o material tenha como características fundamentais a biocompatibilidade, resistência ao desgaste, resistência à corrosão e resistência mecânica à fratura. Descreveu ainda que sobre as ligas de Ti, a mais comum contém 6% de alumínio e 4% de vanádio e é conhecida como $Ti_{60}Al_{40}V$ e apresenta o módulo de elasticidade de 114×10^3 GPa que é mais próximo do módulo de elasticidade do osso de 16.5×10^3 GPa que qualquer outro material utilizado na fabricação de implantes endosseos, com exceção do Ti cp cujo o módulo de elasticidade é de 103.4×10^3 GPa. Esta propriedade permite uma maior distribuição das forças na interface osso-implante.

Willians, em 1987 publicou uma definição de biomaterial como sendo a habilidade de um material desempenhar uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica. O termo biomaterial foi definido na Conferência do Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas realizada em Chester, Inglaterra, de 03 a 05 de março 1986.

Kasemo et al, em 1987 discorreram sobre o uso do titânio como um biomaterial para implante, que na natureza, devido a sua alta reatividade, sempre se encontra recoberto por uma camada de óxido.

Zitter e Jr, em 1987, afirmaram que a camada de TiO_2 é impermeável ao oxigênio, e por isso previne a troca de elétrons e qualquer reação redox em

sua superfície. Assim, os produtos da corrosão se apresentam na forma de óxidos e não como íons.

Fraker, em 1987 relata que o titânio, elemento químico Ti, registrado na tabela periódica, tem número atômico 22 e peso atômico 47,9, representando o nono elemento mais abundante na natureza e o quarto elemento metálico mais abundante na crosta terrestre. E que o titânio puro é considerado um material mole não-magnético e é produzido comercialmente aquecendo o minério rutilo (TiO_2) e ilmenita (FeO-TiO_2).

Gross, em 1988, faz uma ressalva acerca dos biomateriais, destacando um importante aspecto que deve ser analisado e que diz respeito à biocompatibilidade do titânio, e como o meio biológico responde aos estímulos induzidos pelo material estranho, e de forma concomitante, como esse material implantado responde física e quimicamente ao ambiente biológico.

Baier e Meyer, em 1988, destacam que a natureza da superfície do implante de titânio pode ser descrita avaliando sua composição química, morfologia e energia superficial. Relatam ainda que essas propriedades, de forma geral, determinam a resposta biológica de um material implantado, que por sua vez, pode também envolver fatores físicos como o formato, rugosidade da superfície e movimentos interfaciais relativos.

Kasemo e Lausamaa, em 1988, ressaltam que o conhecimento das propriedades químicas e físicas das superfícies dos implantes de titânio é de fundamental importância para avaliar a sua biocompatibilidade. Essa importância é devida a vários tipos de interações químicas, como as forças de Van-der-Waals, entre outras, que estão na dependência da microestrutura da superfície e em escala atômica.

Meffert em 1992, avalia que o desenvolvimento dos implantes odontológicos deu origem a uma diversidade de sistemas com diferentes geometrias, materiais e rugosidades.

Ollenick em 1993, considera que as propriedades físicas e químicas, como composição do material, sua resistência à corrosão e suas propriedades mecânicas é o que caracteriza o biomaterial.

Hench e Wilson, em 1993, relataram que quando se tem um material bioativo implantado no osso, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface do implante e do tecido ósseo. E essas reações geralmente resultam em uma interação nessa interface, sendo essa, uma ligação de natureza química e não física.

Meachim e Williams, em 1993, afirmam que o estudo das propriedades da superfície dos implantes de titânio assumem especial relevância para sua biocompatibilidade, uma vez que a mesma pode adsorver átomos e moléculas estranhas.

Kasemo e Lausmaa, em 1994 inferem que um material feito pelo homem e inserido no tecido humano por um procedimento cirúrgico é altamente perturbador para o organismo, pois o foco da resposta biológica e por consequência o foco de interesse científico é a interface entre o material estranho e os tecidos. Relatam que a interação primária ocorre em escala molecular e envolve a adsorção de proteínas e reações de biomoléculas como a água, íons, dissolução atômica, mudando sucessivamente e interferindo no processo de cicatrização permanentemente na superfície dos biomateriais. E concluem que a falta de compreensão dos processos primários é ainda um grande obstáculo para o desenvolvimento de melhores e novos biomateriais e que novas técnicas de caracterização e a combinação de técnicas em alta resolução permitirão interagir do mundo micrométrico ao mundo nanométrico.

Weingart et al, 1994 sugerem que as partículas finas podem ser transportadas pelos fagócitos para os linfonodos regionais, onde poderiam ser encontradas mas sem sinais de inflamação ou reação de tipo corpo estranho.

Cypher e Grossman, em 1996 descrevem que a cicatrização do enxerto ósseo é processo seqüencial que envolve inflamação, revascularização, osteogênese, remodelação e incorporação ao esqueleto para formar uma estrutura mecanicamente eficiente

Hall et al, em 1999 afirmam que não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o vidro bioativo e nenhum outro material de reparo em defeitos infra-ósseos ao redor de implantes na mandíbula de cães. E

encontraram que o DFDBA (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft) produziu melhor altura óssea do que o vidro bioativo.

Sousa, em 2000 relata que a compatibilidade biológica dos cimentos obturadores que têm sido conduzido, utilizando diversos métodos distintos na experimentação direta em dentes humanos e em animais. Todavia, em virtude das dificuldades na condução de um estudo histológico, bem como na avaliação comparativa da resposta dos tecidos perirradiculares em animais e humanos, fez-se necessário empregar uma metodologia padronizada na condução e avaliação dos testes secundários “in vivo”, em animais de pequeno porte, pois esses testes biológicos comparativos e padronizados assumiram uma importância fundamental na busca do material ideal.

Cooper et al, em 2000 concluíram que um aumento na rugosidade da superfície de implantes de titânio cp (comercialmente puro) melhora a integração do osso devido à quantidade de osso formado na interface, com aumento da osteocondução e da osteogênese. Superfícies usinada foram utilizados como controle.

Wheeler et al, em 2000 estudaram o tamanho crítico de defeitos ósseos tratados com vidros bioativos e encontraram que todos os defeitos enxertados apresentaram mais osso do que os defeitos controles que não foram preenchidos.

Griffon et al, em 2001 observaram que os defeitos ósseos em ovelhas preenchidos com misturas contendo de 50% a 100% de vidro bioativo contiam menos osso e mais tecido fibroso do que nos defeitos preenchidos com alloenxerto, autoenxerto ou alloenxerto combinado com 50% de biovidro.

Sul et al, em 2002a investigaram as propriedades da superfície oxidada formada pelo aumento da voltagem até a quebra do dielétrico dos implantes usinados de titânio comercialmente puro. Um total de 40 parafusos e 5 placas foram divididos em 5 grupos com voltagens de 100V, 200V, 280V, 380V e grupo controle. O ganho médio em espessura na camada de óxido de titânio foi de 200 a 1000nm. Concluíram que é possível alterar, por anodização a espessura da camada de óxido de titânio e sugerem que estudos futuros

podem ser realizados para obter uma resposta biológica em como o aumento na espessura da camada de TiO_2 poderá influenciar a resposta biológica.

Sul et al, em 2002b avaliaram diferentes espessura da camada de óxido de titânio sobre implantes Ticp (Titânio comercialmente puro) de 17 a 200 nm e sobre implantes teste de 600 a 1000nm. Investigações de rotina histológica da reação tecidual ao redor dos implantes e testes enzimáticos de atividade de fosfatase alcalina e ácida demonstraram resultados semelhantes em ambos, teste e controle. Entretanto, a osteocondutividade foi mais acentuada em volta dos implantes testes, o que permitiu inferir que parâmetros como espessura da camada de óxido, distribuição e tamanho dos poros e a cristalinidade podem representar fatores que indicariam resultados histomorfométricos mais fortes ao tecido ósseo quando a camada de óxido de titânio foi maior que 600 nanômetros.

Kasemo, em 2002, relata que a ciência das superfícies biológicas é uma ampla área interdisciplinar em que se investigam as propriedades e processos nas interfaces e se produz as superfícies biofuncionais. E que o desafio científico é mapear as estruturas, a adesão, a dinâmica e a cinética das biomoléculas na superfície, de forma similar ao que tem sido feito para as moléculas simples nas últimas três décadas. Afirma que as superfícies biofuncionais são chamadas de design avançado e são preparadas para serem reconhecidas pelos sistemas biológicos e isso, requer uma re-combinação química, física, topográfica, entre outras, para que seja possível interagir com proteínas em escala nanométrica e com células em escala micrométrica.

Andersson et al, em 2003 informam que a superfície nanoestruturada e o conhecimento de como as células in vivo interagem com o tamanho nanométrico das estruturas e objetos os levaram a estudar o impacto da nanotopografia na morfologia celular e na produção de citocinas. Seus achados sugerem que sobre três diferentes superfícies de mesma composição química, TiO_2 , a morfologia das células epiteliais e a produção de citocinas apresentaram-se dependentes de sua nanotopografia.

McAuliffe, em 2003 estima que 500.000 procedimentos de enxerto ósseo sejam realizados nos Estados Unidos a cada ano e no mundo todo esse

número pode ultrapassar 1 milhão de procedimentos. Informa ainda que os enxertos ósseos podem ser usados para fornecer suporte mecânico, preencher vazios ósseos após traumas ou ressecções cirúrgicas ou melhorar a cicatrização óssea em muitas circunstâncias clínicas e locais anatômicos.

Shirtliff e Hench, em 2003, afirmam que devido às limitações dos biomateriais, está surgindo uma terceira geração de biomateriais que tem como foco principal melhorar a capacidade de regeneração dos tecidos devido à estimulação de genes que desencadeiam uma resposta biológica de reparo do tecido doente ou danificado.

Sousa et al. (2004) realizaram um experimento para avaliar as propriedades biológicas de três materiais dentários utilizados em cirurgia apical. O estudo seguiu os critérios adotados pela FDI e ADA. Foram realizados implantes intra-ósseos em 30 guinea pigs, sendo 10 cobaias para cada material testado. Após a cirurgia ser realizada e esperados os tempos de observação de 4 e 12 semanas, os animais foram sacrificados, tiveram suas mandíbulas dissecadas e preparadas para análises histológicas. A lateral do copo de teflon serviu como controle negativo. Após as análises qualitativas da intensidade de resposta inflamatória classificaram-na em ausência de reação, ou reação suave, reação moderada e reação severa, segundo os critérios mencionados para classificar o material como biocompatível para estar em contato com os tecidos vivos.

Cancian et al, em 2004 encontraram reparação total de defeitos criados em mandíbulas de macacos em íntimo contato com partículas remanescentes de vidro bioativo em 180 dias.

Liu et al, em 2004 relatam a descoberta do titânio, em 1790, na Inglaterra pelo químico William Gregor ao analisar uma amostra de areia da região do vale de Manaccan na Cornualha, e que possui ainda variedades alotrópicas e é encontrado sob mais de uma forma, à temperatura ambiente. Quimicamente, o titânio é um elemento de transição pertencente ao grupo 4B da tabela periódica. Possui a camada de valência incompleta, o que confere a sua alta reatividade. Devido a essa alta reatividade, quando exposto, o titânio reage com o oxigênio formando espontaneamente um filme uniforme de óxido

sobre a sua superfície (passivação espontânea). Geralmente, o óxido mais estável é o TiO_2 .

Karageorgiou e Kaplan, em 2005 descreveram que a porosidade e o tamanho dos poros dos arcabólços (scaffolds) para crescimento de tecido ósseo, desempenham um papel fundamental na formação óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo*. E sugerem que exista um tamanho de poro que possa ser seletivo na formação óssea. Acreditam que 100 μm seja um diâmetro crítico, devido ao diâmetro dos sistemas de harvers.

Giannoudis et al, em 2005 apresenta uma atualização sobre os enxertos ósseos disponíveis para aplicações clínicas. Afirmam que o autoenxerto ainda é considerado a melhor fonte para a substituição de tecido ósseo, por apresentar características como fatores de crescimento, células osteogênicas e um arcabouço que promove a condução da cicatrização óssea, no entanto, limitações como o aumento da morbidade, dificuldades de áreas disponíveis continuam sendo os seus maiores impedimentos, além disso, banco de ossos ainda possuem riscos de transmissão de doenças. Nesse sentido, faltam, ainda, substitutos ósseos sintéticos que promovam a proliferação e diferenciação celular para uma efetiva osteogênese.

Moreira-Gonzalez et al, em 2005 concluíram que o uso de grânulos do biovidro (bioglass) para grandes reparos e defeitos craniofaciais não são aconselháveis, baseando-se no estudo do tamanho crítico de reparo em defeitos na calvária de coelhos.

Goto et al, em 2005 avaliaram um cimento ósseo contendo nanopartículas de TiO_2 que foi preparado em três proporções, utilizando o Poli metil metacrilato (PMMA), e suas propriedades mecânicas e osteocondutividade foram avaliadas. Os cimentos foram inseridos em tíbias de ratos e avaliados após 6 e 12 semana. As tíbias foram removidas para avaliação de osteocondutividade por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi observado aposição óssea diretamente sobre o material.

Sousa et al. (2006) realizaram um estudo para avaliar as propriedades biológicas de cimentos obturadores endodônticos seguindo os critérios estabelecidos pela FDI para implantes intra-ósseos. Para o experimento, foram utilizadas 30 cobaias de *guinea pig* divididas em três grupos, sendo 10 animais para cada um dos cimentos. O experimento foi observado por períodos de 4 a 12 dias, logo após as cobaias foram sacrificadas e o processamento histológico realizado. O critério de avaliação adotado foi uma análise qualitativa em que se examinava a intensidade da resposta inflamatória e a classificava em ausência de reação ou reação leve, reação moderada e reação severa. O teste permitiu classificar os materiais segundo sua biocompatibilidade.

Choi, em 2006 afirma que todos os implantes de titânio têm uma camada oxidada. Em seu trabalho, preparou camadas de óxidos de titânio com diferentes espessuras, geralmente conseguido com tratamento térmico ou com o implante colocado como um ânodo em uma célula galvânica com um eletrólito apropriado. Após a passagem de corrente através da galvanização, o óxido de superfície vai crescer a partir do estado nativo de alguns nm de espessura de 1 a 5 milímetro ou mais. Uma correlação positiva foi encontrada entre o aumento da altura e incorporação do implante quando investigaram Implantes oxidados em diferentes voltagens. A microscopia eletônica de varredura e interferometria óptica foram utilizados para caracterizar a topografia. A rugosidade média (Ra) foi o único parâmetro avaliado. Implantes oxidados com 500 volts tiveram uma Ra de 5,2 milímetros, com 550 volts apresentaram uma Ra de 3,8 mm, e implantes com 400 volts tiveram uma Ra de 0,8 mm e 300V teve um Ra de 1,7 mm. Eles concluíram que oxidados através de corrente galvânica com uma voltagem de 500 e 550 volts aumenta o torque de remoção e o contato do osso ao implante, em comparação com 300 e 400 volts.

Precheur, em 2007 discorreu sobre a fisiologia da substituição óssea e argumentou que a formação óssea ocorre quando os osteoblastos secretam moléculas de colágeno e substância fundamental. As moléculas de colágeno polimerizam e formam fibras colágenas e os sais de cálcio precipitam em volta da substância fundamental e ao longo

das fibras colágenas formando assim um material osteóide. Quando os osteoblastos tornam-se presos no material osteóide e são chamados de osteócitos. Relatou a classificação da formação óssea no enxerto em três tipos de crescimento ósseo: Osteogênese; osteoindução e Osteocondução. A osteogênese é a formação de novo osso pelos osteoblastos derivados do material do próprio enxerto. Osteoindução é a capacidade de um material de induzir a formação de osteoblastos do tecido circundante ao local de acolhimento do enxerto que resulta em crescimento ósseo. E a osteocondução é a capacidade de um material suportar o crescimento do osso sobre uma superfície. E uma característica adicional que muito embora, não seja diretamente responsável pela formação óssea, mas que seria extremamente desejável aos enxertos seria a osseointegração, que é a capacidade de se ligar quimicamente ao osso, como auxílio na incorporação do enxerto. Conclui que existe uma enorme quantidade de produtos para serem utilizados na substituição ou como enxertos e a compreensão de todo o processo bioquímico ainda amadurece entre os pesquisadores, e que há uma grande esperança no desenvolvimento de um material ideal para o enxerto e substituição de osso autógeno.

Le Gue'hennec et al, em 2007 concluíram que os tratamentos de superfície de rugosidade faz aumentar a osseointegração. Muito embora o papel exato da química e topografia nos eventos iniciais da osseointegração ainda sejam mal compreendidos. É conhecido que não apenas a formação óssea pode ser estimulada por um aumento da rugosidade superficial, mas a reabsorção óssea também pode ser prevenida.

Kokubo et al, em 2007 afirmaram que os materiais bioativos utilizados clinicamente são à base de silicato ou fosfato. Entretanto, recentemente, vários tipos de materiais bioativos com diferentes propriedades mecânicas estão sendo desenvolvidos com base titânio. Um material bioativo com propriedades mecânicas semelhantes às de osso cortical humano foi obtido através da dispersão de nanopartículas na fase anatase. Essas nanopartículas foram

misturadas com polimetilmetacrilato (PMMA) e foi obtido um material bioativo com propriedades de auto organização.

Mendes et al, em 2007 investigaram a influência de nanocristais de fosfato de cálcio na capacidade de ligação ao tecido ósseo. Implantes com duplo ataque ácidos TiCP e $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ e implante sem tratamentos de superfície foram inseridos em ratos. Os implantes de liga demonstraram maior força de tração do que o TiCP , e os implantes revestidos com fosfato de cálcio apresentaram maior força de tração do que os implantes não-revestidos. MEV foi o único método para investigar as diferentes topografias de superfície. Embora a química e topografia possam ter contribuído para o resultado, nenhuma prova da ligação química foi encontrada. Os autores concluíram que as estruturas nanométricas tiveram um efeito positivo sobre o osso neoformado.

Meirelles et al, em 2008 modificaram implantes cilíndricos, com deposição de partículas nanométricas de CaP e de TiO_2 . Para diferenciar a influência da estrutura nanométrica e de sua influência química sobre a interface osso/implante foi utilizado um modelo animal e constataram que houve a formação de um novo osso evidenciado tanto para implantes modificados com partículas nanométricas de CaP quanto para partículas nanométricas de TiO_2 .

Kang et al, em 2009 ressaltam que as modificações químicas nas superfícies dos implantes tem sido uma estratégia para o desenvolvimento dos implantes dentários. Investigaram a morfologia e a composição química de diferentes marcas de implantes e demonstraram que a diferença nos processos de fabricação altera as propriedades químicas da superfície dos implantes. Em suas análises foram detectadas incorporações de íons de fósforo e íons de flúor modificando a camada de TiO_2 .

Chiang et al, em 2009 mostraram que uma multicamada de TiO_2 pode ser rapidamente produzida sobre a superfície do titânio, usando um tratamento de anodização eletroquímica simples. E esta nanorede de camada de óxido de titânio tem uma boa interação com proteínas em nanoescala favorecendo uma diferenciação em direção à linhagem osteogênica *in vitro* e *in vivo*.

Ann Wenneber e Thomas Albrektsson, em 2009 afirmam em uma revisão sistemática que existe um número crescente de modificações na superfície dos implantes. Eles são introduzidos apesar de uma maioria de estudos comparar superfície usinada “lisa” com as novas superfícies rugosas, mas não é claro se, em geral, uma modificação da superfície torna uma superfície melhor que outra. Para aumentar a confusão, não é apenas a topografia da superfície que é alterada mas também sua superfície química, pois geralmente uma alteração na topografia resulta em uma mudança na estrutura química e vice-versa. Em uma revisão sistemática perceberam que um grande número de investigações experimentais demonstraram que a resposta do osso é influenciada pela topografia da superfície devido à rugosidade superficial média (S_a) do implante. Superfícies lisas ($S_a < 0.5 \text{ mm}$) e minimamente rugosas ($0,5 < S_a < 1 \text{ mm}$) mostraram superfícies ósseas inferiores às superfícies mais rugosas. E contrariamente, superfícies moderadamente rugosa ($S_a > 1-2 \text{ mm}$) apresentaram uma resposta óssea, em alguns estudos, mais intensa do que em superfície rugosa ($S_a > 2 \text{ mm}$).

Kokubo et al, em 2009 relatam que todos os materiais bioativos desenvolvidos até 1990 foram baseados em fosfato de cálcio. Posteriormente, foi revelado que materiais que apresetam adesão ao tecido ósseo vivo, o faz com formação de apatita, iduzida por vários grupos funcionais na superfície desses materiais. Com base nesses resultados, materiais bioativos foram preparados quimicamente, formando titanato de sódio na superfície do titânio através de tratamentos com NaOH. O metal titânio, poroso, foi capaz de exibir osteocondutividade e osteoindutividade.

Hanawa, em 2010 afirma que a biofuncionalização de uma superfície é um processo que muda a composição, estrutura e a morfologia do material. A modificação na superfície da camada de óxido de titânio pode influenciar a adsorção de proteínas e adesão de células, plaquetas e bactérias. E essa maior mobilização de biomoléculas promove maior formação óssea e aderência aos tecidos.

Shimono et al, em 2010 fizeram uma revisão sistemática sobre os potenciais benefícios dos fatores de crescimento para o aumento ósseo e

posterior instalação de implantes dentários. Diferentes níveis e qualidades de evidências foram verificadas e avaliadas, revelando que os fatores de crescimento rhBMP-2, rhPDGF e PRGF podem estimular o aumento ósseo local em diversas condições, no entanto, o potencial de rhBMP-2 tem encontrado maior suporte científico, embora o número de investigações e o baixo número de tratamentos relatados na literatura possibilita afirmar que a generalização desta abordagem ainda é limitada neste atual momento.

Makihira et al, em 2010 sugere que os íons Ti são em parte responsáveis pela infiltração de monócitos na cavidade oral, elevando a sensibilidade de células epiteliais da gengiva para os microorganismos. Em conjunto, estes dados indicam que os íons Ti podem estar envolvidos na citotoxicidade e inflamação nas interfaces de implantes dentários e do tecido gengival.

Ehrenfest et al, em 2010 informam que desde a apresentação do conceito da osseointegração, as características da interface entre o osso e o implante e de suas possíveis formas de melhorá-las tem sido de grande interesse científico. Entretanto, formas não padronizadas de análises são um grande empecilho para que se possa ter uma análise comparativa entre os diversos trabalhos. Apresentam diversas técnicas de caracterização de modo a esclarecer e identificar as diversas superfícies dos implantes e as características da osseointegração, desde a composição química quanto à aspectos topográficos como rugosidade e porosidade, tanto em escala micrométrica quanto em escala nanométrica.

Tapash et al, em 2011 comprovam que íons metálicos são liberados a partir do implante e têm sido detectados nos tecidos próximos aos implantes de titânio. A liberação constante desses elementos, mesmo em pequenas quantidades, pode causar irritação local dos tecidos ao redor do implante.

Branemark, em 2011 ressalta que a osseointegração deve ser definida em vários pontos de vista e com relação as escalas do interesse científico. Do ponto de vista do paciente, deve perceber uma união fixa, estável, sem dor, inflamação ou afrouxamento, entre o implante endósseo e seu componente protético. Do ponto de vista da biologia macroscópica e microscópica deve ser

percebido como uma íntima aposição óssea de osso neoformado e reformado em congruência com as fixações, incluindo as irregularidades de sua superfície, de tal forma que a análise por microscopia ótica não evidencia a interposição de tecido conjuntivo fibroso e que propicie uma conexão estrutural, funcional e direta, capaz de suportar cargas funcionais normais sem iniciar um mecanismo de rejeição. Do ponto de vista biomecânico macroscópico não deve haver movimento relativo progressivo entre a fixação e o osso vivo por toda a vida do paciente. Também é necessário que as deformações sejam da mesma magnitude, comparativamente ao osso. Do ponto de vista biofísico microscópico, implica que na microscopia ótica e eletrônica, os componentes identificáveis do tecido em uma fina zona ao redor da superfície da fixação sejam identificados como componentes ósseos e medulares normais. Isso implica que o tecido mineralizado em contato com a superfície do implante esteja na ordem nanométrica, de forma que não exista material colágeno de forma significativa entre essa interface. Uma definição alternativa sobre a osseointegração, ainda segundo Branemark é que seja uma conexão estrutural e funcional, direta, entre o osso vivo, organizado, e a superfície de um implante submetido a carga, dependendo de sua capacidade de reparo e remodelação. A osseointegração significa a incorporação de um componente não biológico no esqueleto humano, com capacidade de suportar carga funcional ilimitada, internas e externas da estrutura e função. A osseointegração bem sucedida exige que o tecido ósseo aceite a presença da ancoragem protética e se adapte à transferência de carga funcional, mas não reaja à presença do componente não biológico, iniciando fenômenos de rejeição, mesmo que a longo prazo.

Proposição

3. Proposição

A presente pesquisa teve como objetivo:

Avaliar a biocompatibilidade de nanocristais de dióxido de titânio, seguindo parâmetros definidos pela FDI, ANSI/ADA verificando a resposta inflamatória provocada pelo íntimo contato do nano material testado com o tecido ósseo e a nanotopografia da interface dos nanocristais de TiO_2 com osso neoformado através da Microscopia de Força Atômica.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Síntese de nanocristais de óxido de titânio (TiO₂)

O método Pechini tem se destacado com um processo alternativo e eficiente para a obtenção de nanopós de alta pureza e homogeneidade química, em que se pode controlar o tamanho das partículas além de não precisar de uma aparelhagem sofisticada e apresentar baixo custo

Os reagentes utilizados para a síntese de TiO₂ foram isopropóxido de titânio IV (Ti[OCH(CH₃)₂]₄) 97% PA (Aldrich), ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇.H₂O) 99,5% PA (Nuclear) e etileno glicol (C₂H₆O₂) 99,5% PA (Vetec).

Para a síntese do pó de TiO₂, inicialmente foi obtido o citrato de titânio por meio da reação de ácido cítrico com o isopropóxido de titânio, com relação 3:1 em mol. Posteriormente, o sistema foi aquecido a 70 °C, resultando em uma solução límpida e estável. Após a síntese do citrato, foi adicionado o etileno glicol para promover a polimerização pela reação de poliesterificação entre o citrato de titânio e o etileno glicol. A relação molar entre o ácido cítrico e o etileno glicol foi fixada em 60:40%, em massa. Após a polimerização a 120 °C formou-se uma resina límpida e bastante viscosa. A resina foi levada à mufla a uma temperatura de 400 °C por 1 h onde ocorreu a formação do “puff” (polímero pirolisado) e a liberação de parte da matéria orgânica. Após esta etapa, o material foi desaglomerado por moagem em almofariz de ágata e peneirado em malha 200 (74 µm). O material foi novamente calcinado a 500 °C por 24 horas para completa eliminação da matéria orgânica e oxidação do cátion metálico, para a formação dos nanocristais de TiO₂

4.2 Caracterização do nanocristal de óxido de titânio (TiO₂)

As caracterizações foram feitas por micro-Raman e Difração de Raios-X. O espectro de micro-Raman foi obtido, utilizando como fonte de excitação a linha 514,5 nm de um laser de argônio. O difratogramas de raios-X (DRX) foi registrado com um XRD-6000 SHIMADZU, usando radiação monocromática Cu-Ka1 ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), para confirmar a formação dos NCs de TiO_2 , bem como a estrutura cristalina e tamanho médio. Todas as caracterizações foram feitas à temperatura ambiente. A (Fig. 1) mostra o espectro micro-Raman de nanocristais de TiO_2 . Observa-se neste espectro modos Raman ativos típicos somente de nanocristais de TiO_2 nas fases anatase e rutilo, em que certifica a não existência de outros tipos de nanoestruturas. Os modos Raman ativos em torno de 144, 197, 399, 513, 519 e 639 cm^{-1} correspondem aos nanocristais de TiO_2 de fase anatase. Já os modos Raman ativos em torno de 448 e 608 cm^{-1} correspondem aos nanocristais de TiO_2 de fase rutilo. Diante destas observações, confirmou-se a existência de nanocristais nas fases anatase e rutilo. Pode-se, também, afirmar que não existem outras nanoestruturas, garantindo, desta forma, alto grau de pureza dos nanocristais de TiO_2 . O espectro micro-Raman da (Fig. 1) foi obtido à temperatura ambiente, 27°C , utilizando como fonte de excitação a linha 514,5 nm de um laser de argônio.

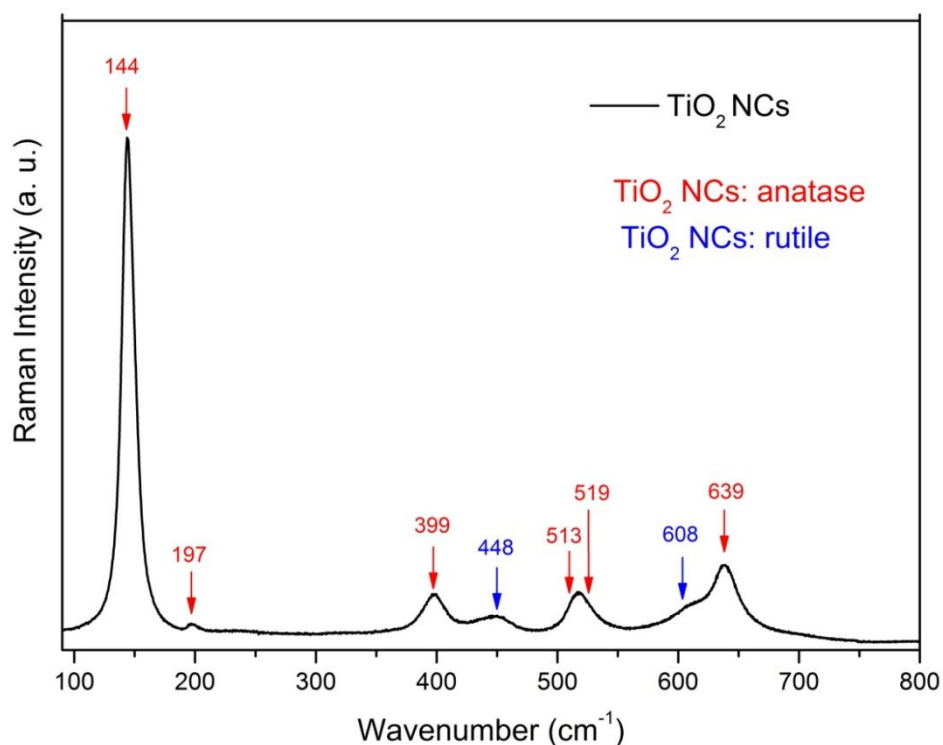


Figura 01- Espectros micro Raman de nanocristais de TiO₂

A (fig. 02) mostra o Difratoograma de Raio X - DRX de nanocristais -NCs de TiO₂ empregados nesta pesquisa. Observa-se neste difratograma a presença somente de nanocristais de TiO₂ nas fases anatase e rutile. Os picos de difração de Bragg em torno de 27.5, 36.1, 38.7, 41.3, 44.1, 53.9, 56.7 são típicos de cristais de óxido de titânio, com estrutura tetragonal de fase rutile (JCPDS: 1:21-1276). Já os picos de difração em torno de 25.3, 37, 37.9, 38.6, 48.1, 54.5, 55.2 são típicos de cristais de óxido de titânio, com estrutura tetragonal de fase anatase (JCPDS: 1:21-1272). Pode-se observar, também, que não existe evidência de pico extra de difração de Bragg. Estes fatos dão fortes evidências de que as nanopartículas de TiO₂, além de apresentar uma estrutura tetragonal com duas fases. O tamanho médio dos NCs de TiO₂ foi determinado pela formula de Scherrer $\tau = (K\lambda/\beta\cos\theta)$, onde K é o fator de forma, λ é o comprimento de onda de raios-X, β é a largura da meia altura da intensidade máxima de um pico de difração de Bragg, dada em radianos, e θ é ângulo de Bragg. Portanto, tomando como base o pico de difração de Bragg (100) do difratograma da (fig. 01) localizado em torno de $2\theta=25,4^\circ$, o cálculo

do tamanho médio foi realizado considerando os grãos esféricos ($K = 0.9$), calculando o valor de β a partir de um ajuste gaussiano, sendo $\theta = 12,7^\circ$, e utilizando $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, obtém-se um diâmetro τ em torno de 21 nm, para esses NCs de TiO_2 . Não foi detectado nos difratogramas nenhum tipo de impureza, ou seja, observou-se apenas os padrões de difração característicos do TiO_2 de estrutura tetragonal com duas fases.

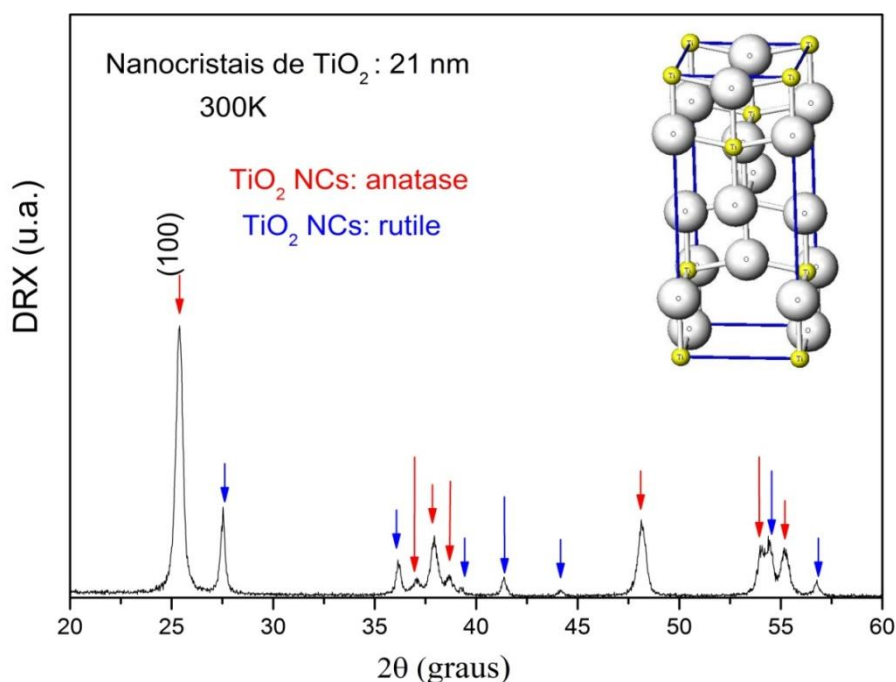


Figura 02- Difratograma de Raios dos nanocristais de TiO_2

4.3 Obtenção do composto de nanocristais de TiO_2

O composto foi obtido pela manipulação dos nanocristais de TiO_2 com soro estéril (solução fisiológica a 0,9% de cloreto de sódio, (Equipex - Brasil) em uma placa de vidro e cuidadosamente inserido em um copo de teflon® (Politetrafluoretileno; DuPont, HABIA, Knivsta, Sweden), com dimensão interna de 1,3 mm de diâmetro com aproximadamente $0,9 \text{ mm}^3$ de volume interno, evitando-se a entrada de ar e formação de bolhas no material inserido.

4.4 Teste de Biocompatibilidade

O teste de biocompatibilidade foi conduzido por meio da realização de implantes intra-ósseos em mandíbula de coabias (*guinea pigs*), de acordo com os critérios estabelecidos pela Federação Dentária Internacional e a Associação Dentária Americana (Fig. 3). Para tanto, foram utilizados 10 animais pesando aproximadamente 800g, mantidos em gaiolas durante o experimento, em ambiente de temperatura controlada (22 °C), com controle de luz em ciclos de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*. Trabalho previamente aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética na Utilização de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia - Nº 101/10.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com 0,6 ml de solução anestésica contendo cloridrato de quetamina (100mg/ml) (Francotar® -Brasil) e cloridrato de xilazina à 2% (0,5mg/ml) (Dorcipec® -Brasil), na proporção 2:1 respectivamente. Realizou-se a tricotomia e desinfecção da área com iodopolividona à 10% (Riodeine®-Brasil), (Fig. 3A) e a injeção de aproximadamente 0,3 ml de cloridrato de lidocaína à 2% com epinefrina (1:100.000) (Lidocaina100® -Brasil) na mucosa sinfisária, próxima a área dos implantes, para evitar o desconforto local (Fig. 3B). O osso da sínfise mandibular foi exposto cirurgicamente em condições de assepsia, fazendo-se uma incisão reta, envolvendo pele, músculo e periósteo, no plano mediano com aproximadamente 10,0 mm de extensão. Com o osso exposto, procedeu-se a confecção de duas cavidades cilíndricas com dimensões padronizadas de 2,0 mm de diâmetro por 2,0 mm de profundidade, em ângulo de 90° em relação a superfície óssea, e de forma simétrica à rafe mandibular, sob irrigação de soro fisiológico estéril. Copos de teflon® preenchidos com a pasta de TiO₂ foram introduzidas nas cavidades ósseas de forma a deixar a abertura do copo em contato direto com o tecido ósseo. Cada animal recebeu dois implantes localizados próximo a região sinfisária, um de cada lado desta (Figs. 3C e D). As perfurações foram realizadas com brocas de haste longa, em peça reta, cilíndricas picotadas com 2,0 mm de diâmetro, com limitadores de profundidade

(Fig. 3E), utilizadas em um motor cirúrgico elétrico em baixa rotação (2.000 rpm). Em seguida, o retalho mucoperiosteal foi reposicionado e suturado com monofilamento estéril de nylon 5-0 (Shalon® -Brasil).

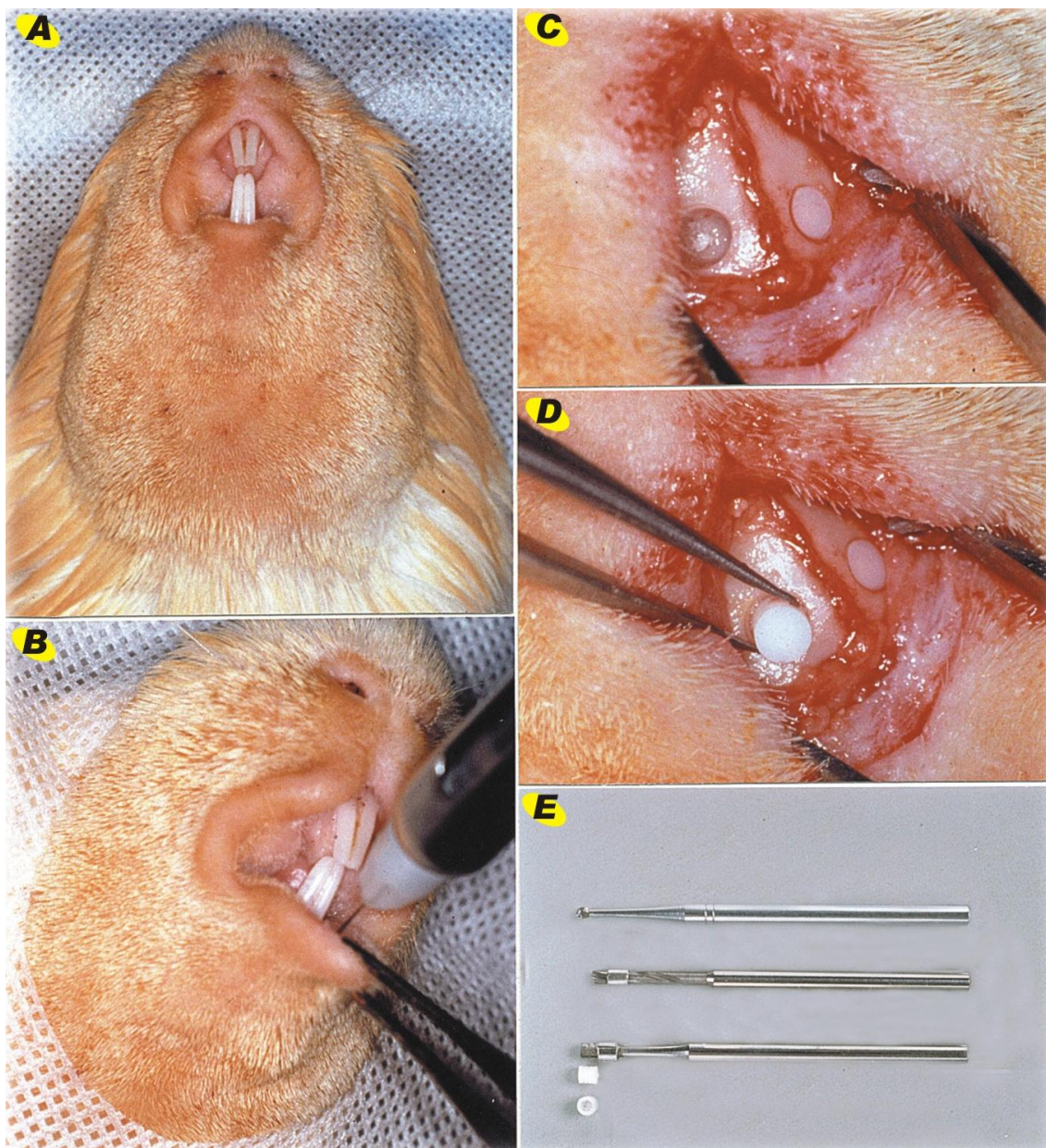


Fig. 3. Metodologia de implantes intra-ósseos, onde se observa: A- tricotomia e desinfecção com álcool iodado, B- Instalação de campo cirúrgico fenestrado e anestesia infiltrativa, C e D- Lojas ósseas e posicionamento dos implantes, E- Brocas especiais e copos de teflon®

4.5 Avaliação da resposta inflamatória

A avaliação da resposta tecidual foi baseada na observação qualitativa e semiquantitativa de fenômenos celulares e teciduais relacionados ao processo inflamatório e reparos encontrados no tecido imediatamente situados na interface com o material implantado e a distância deste. Foram designados dois avaliadores independentes para verificarem a intensidade de:

- 1) Neutrófilos;
- 2) Macrófagos;
- 3) Linfócitos;
- 4) Plasmócitos;
- 5) Células Gigantes de Corpo Estranho;
- 6) Material Disperso;
- 7) Cápsula;
- 8) Neoformação Óssea;
- 9) Necrose tecidual;
- 10) Reabsorção Óssea.

Todos os elementos teciduais citados anteriormente foram avaliados por meio de escores de intensidade caracterizados como:

- (+) ausente ou suave;
- (++) moderado;
- (+++) intenso.

4.6 Procedimentos laboratoriais

4.6.1 Preparo Histológico

As reações teciduais ao material implantado foram realizadas nos períodos de 04 e 12 semanas pós-implantação do material. Para tanto, as cobaias foram eutanasiadas com aprofundamento anestésico. As mandíbulas foram dissecadas e o osso adjacente a área dos implantes foi seccionado em blocos de 10,0 mm. Estes blocos foram imersos em solução formol tamponado (10%) por um período não inferior a 72 horas para sua fixação. Em seguida, o material foi desmineralizado com a utilização de solução de ácido nítrico 5,0%. Os fragmentos foram desidratados mergulhando os espécimes em solução de álcool etílico, em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e absoluto., diafanizados e processados para inclusão em parafina. Secções histológicas semi-seriadas com espessura de 5,0 µm, em número de 144, em 24 lâminas, foram obtidas com a utilização de micrótomo (Lupe® modelo MRP 03 –Brasil) desparafinada, processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E) para realização da leitura qualitativa e semiquantitativa dos fenômenos teciduais.

4.6.2 Critérios histológicos

As lâminas foram coradas com eosina e hematoxilina em cortes, escolhidos em intervalos regulares nas 24 lâminas totalizando 144 cortes para cada modelo animal. A interface na abertura do copo, entre o material que está sendo testado e o osso foi a área avaliada. Como controle, foram observadas as interfaces laterais entre o copo de teflon e o osso contíguo, pois esta área reflete o trauma causado pelo procedimento cirúrgico durante a inserção deste copo, sendo este material considerado inerte.

Foram anotadas as seguintes observações:

- 1- A presença ou ausência de necrose;
- 2- A frequência e intensidade de células inflamatórias agudas e crônicas –

neutrófilos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e células gigantes de corpo estranho;

3- A possível reabsorção do material e o preenchimento do copo por osso;

4- Atividade osteolítica, osteoclástica ou osteoblástica;

5- Degeneração e desintegração de células inflamatórias;

6- Transporte do material à distância em vasos e células;

7- Alterações em vasos e nervos.

As reações inflamatórias foram classificadas em suave, moderada e severa.

-Reação inflamatória suave: A designação de inflamação suave foi dada aos espécimes que mostraram poucas células inflamatórias, na maioria linfócitos e plasmócitos e o tecido ósseo com características histológicas identificáveis;

-Reação inflamatória moderada: A designação de inflamação moderada foi dada aos espécimes que mostraram acúmulo focal de células inflamatórias, mas sem tecido necrótico. Entretanto, poderia haver desarranjo das características histológicas do tecido ósseo;

-Reação inflamatória severa: Esta designação foi dada aos espécimes que mostraram substituição do tecido ósseo por tecido inflamatório. Foram, também, avaliados a extensão e o tipo necrótico, por exemplo, liquefação ou coagulação.

4.6.3 Requisitos histológicos

O plano de corte histológico deve passar pela abertura do copo, incluindo toda a interface entre o material e o osso. Os cortes histológicos não devem conter artefatos histológicos que prejudiquem a avaliação. Experimentos, testes ou controles que resultaram em cortes que não preencheram estes requisitos foram repostos.

4.6.3.1 Critério de avaliação

A severidade da resposta celular decidiu a aceitabilidade ou não dos materiais. Esta foi alcançada através do registro dos achados, de acordo com o critério FDI e ANSI/ADA a seguir:

a)- Reação inflamatória suave:

Aos 30 dias após a realização do implante há ausência ou mínima inflamação presente. O tecido ósseo está organizado, com inflamação na área de abertura do copo, comparável com aquela ao longo das paredes externas do copo. Ausência de reabsorção óssea. Aos 90 dias a reação tecidual, na abertura do copo, é comparável àquela ao longo de sua periferia. O tecido está bem organizado com total regeneração óssea, ausência completa de inflamação e, possivelmente presença de algumas células de corpo estranho.

b)- Reação inflamatória moderada:

Aos 30 dias de implante, há alguma inflamação na entrada do copo e nenhuma ou mínima, na sua periferia. O tecido adjacente ao material testado terá mantido sua estrutura, contendo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho, mas sem acúmulo de neutrófilo. Reabsorção óssea suave poderá estar presente. Aos 90 dias há a presença de algumas células inflamatórias, linfócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho na entrada do copo. O tecido está bem organizado, com total regeneração óssea e linfócitos, plasmócitos e células gigantes de corpo estranho espalhadas, mas sem reabsorção do osso.

c)- Reação inflamatória intensa:

Aos 30 dias há uma reação inflamatória distinta na abertura do copo, quando comparada com sua periferia. O tecido está pobremente organizado e contém acúmulo de neutrófilos. Reabsorção óssea poderá estar presente. Aos 90 dias há uma reação inflamatória distinta na abertura do copo, com osso regenerado e tecido fibroso ao longo de sua periferia. O tecido, na abertura do copo, está organizado, mas contém acúmulo de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (inflamação crônica). Reabsorção óssea poderá estar presente.

4.6.3.2 Interpretação

A interpretação dos resultados foi realizada através da análise dos dados obtidos demonstrando a aceitação ou rejeição do material, baseando-se no seguinte:

- Nenhuma ou suave reação inflamatória nos dois períodos: **aceitável**.
- Reação moderada aos 30 dias, que diminui aos 90 dias: **aceitável**.
- Nenhuma ou suave reação inflamatória aos 30 dias, que aumente no período subsequente para moderada ou severa: **não aceitável**.
- Reação moderada aos 30 e 90 dias: **não aceitável**.
- Reações severas em qualquer período: **não aceitável**.

Resultados

5. Resultados

5.1 Avaliação de biocompatibilidade dos nanocristais de TiO_2

O número de implantes intra-ósseo e a avaliação da reação tecidual encontram-se expressos nas Tabelas 1 e 2, considerando os dois períodos de observação (30 e 90 Dias).

Material	Período	Número de implantes
	Experimental (Dias)	
TiO_2	30	10
	90	10
Controle	30	10
	90	10

Tabela 1- Período Experimental e Número de Implantes Intraósseos

Critério Histológico	Implantes NCs TiO ₂		Controle	
	30 Dias	90 Dias	30 Dias	90 Dias
Neutrófilos	+	+	+	+
Macrófagos	+	+	+	+
Linfócitos	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+
Células Gigantes	++	+	+	+
Material Disperso	++	++	+	+
Cápsula	+	+	+	+
Tecido Ósseo Remodelado	+++	+++	+	+
Tecido Necrosado	+	+	+	+
Reabsorção	+	+	+	+
Reação Inflamatória	+	+	+	+

+ Ausente/Suavet; ++ Moderado; +++ Intenso.

Tabela 2- Avaliação Reação Inflamatória após 30 e 90 dias

5.2 Controle Negativo – Zona de teflon® avaliado em 30 e 90 dias

Considera-se que a resposta biológica provocada pela interface do copo de teflon®, não adjacente ao material estudado, como uma reação inflamatória de baixa agressividade, sendo então, padronizada como controle negativo para essa metodologia. Nessa interface, tecido ósseo-teflon®, observou-se uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho), expressa pela presença de uma delicada camada de células gigantes multinucleadas, tipo corpo estranho e eventuais macrófagos mononucleares, em toda a superfície externa do copo. Esta reação caracteriza-se como uma evolução dinâmica do processo de reparo de 30 para 90 dias, mostrado na tabela 2, evidenciado pelo tecido conjuntivo denso com moderado número de

fibroblastos, onde podemos observar ainda uma baixa densidade de vasos sanguíneos hiperêmicos e discreto edema. O tecido ósseo adjacente apresentou-se com características de normalidade, estável, sem sinais de reabsorção ou necrose, que segundo os critérios de observação FDI ANSI/ADA é classificado como resposta inflamatória ausente ou suave. Estes achados foram observados em ambos os períodos de observação, sendo uma constante para todos os animais avaliados.

5.3 Nanocristais de dióxido de titânio após 30 dias

As classificações das respostas inflamatórias observadas aos 30 dias estão apresentadas na Tabela 2, onde estas apresentaram, em sua totalidade, como resposta inflamatória ausente/suave.

A Figura 4 mostra a interface entre o material estudado e o tecido ósseo em diversos aumentos caracterizado pela presença de uma faixa delicada de tecido conjuntivo denso em dimensões similares à faixa de tecido adjacente ao teflon®. Neste período, como observado na figura (4A e B), o tecido foi composto por discreta deposição de fibras, e maior riqueza de fibroblastos, vasos sanguíneos hiperêmicos e edema. A resposta inflamatória, quando presente, foi unanimemente discreta. Todavia, foram observadas variações quanto a constituição celular. Em todos os espécimes pode-se perceber a presença de baixa reação inflamatória crônica granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho). Evidenciaram-se, áreas condensadas de matriz osteogênica (osteóide) ou osso neoformado, com características organizacionais de osso maduro, com evidentes inclusões celulares. Nas figuras (4C e D) observa-se, tanto na matriz osteóide como no osso neoformado, células inclusas que apresentam característico halo perinuclear claro, e presença, em quantidades e frequências variadas, de material particulado apresentando a coloração negra na imagem histológica, dado a sua densidade óptica. Além disto, foi também observado na figura (4C) presença de material em espaços medulares, distantes da interface tecidual com o implante, dispersos em seu interior, em granulação variada, mas sem estar acompanhada de resposta inflamatória

aparente. Pode-se também perceber na figura (4B) elementos de conjuntivo (fibroblastos, macrófagos mono e multinucleados e vasos sanguíneos) no interior do copo, à distância do tecido ósseo, em densidade variável, associado a matriz hialina, tanto contornando o TiO_2 quanto em sua intimidade. Nestas áreas também foi notória a presença de material osteóide, organizado e em organização, e áreas com característica de tecido ósseo maduro, e em processo de maturação. Digno de nota, que encontramos diferenças histológicas quando o material osteóide está em contato com o TiO_2 ou separado deste por delicada faixa de material fibrilar ou mesmo de células gigantes multinucleadas entre a borda do copo de teflon® como evidenciado na Figura (4E). A figura (4F) mostra a área circulada em (E) em maior aumento, evidenciando osteócitos aprisionados na matriz osteóide com aspecto de normalidade onde também percebemos fragmentos do material em seu interior e com crescimento ósseo na intimidade do material, respeitando suas irregularidades. Segundo os critérios de observação FDI ANSI/ADA, a classificação da resposta inflamatória é ausente ou suave. Este período de observação se refere a todos os espécimes de todos os animais. Não foi encontrando resultados discrepantes, todavia, histologicamente semelhantes.

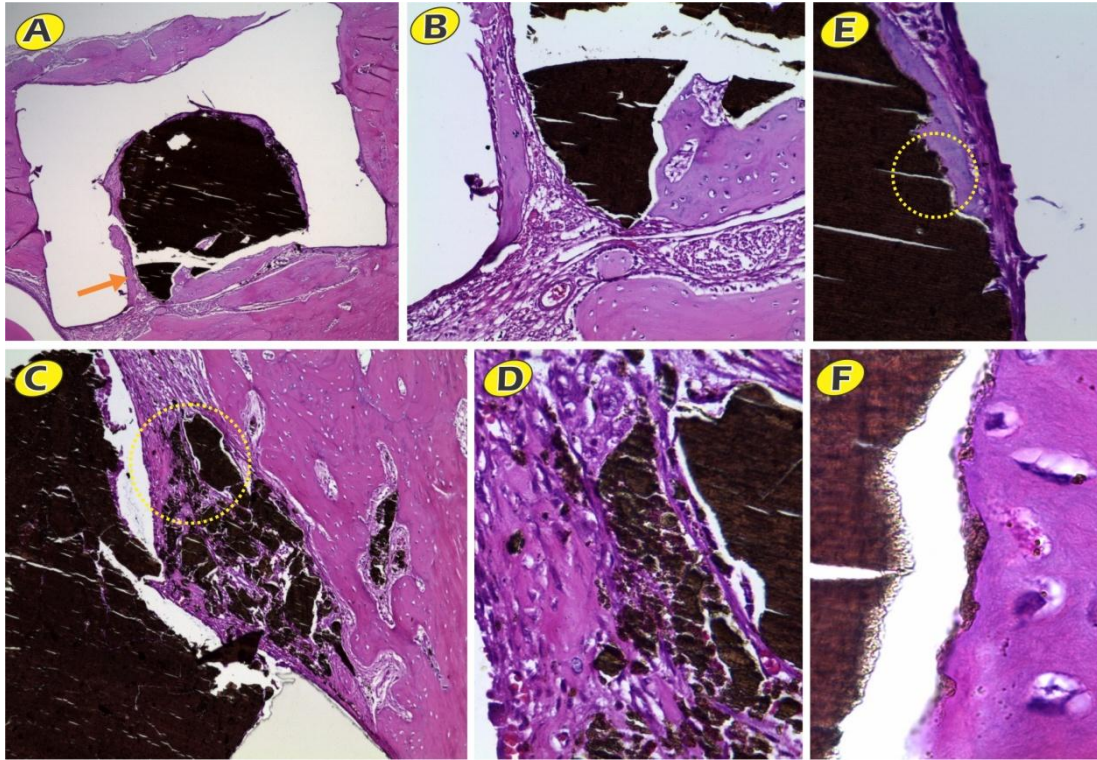
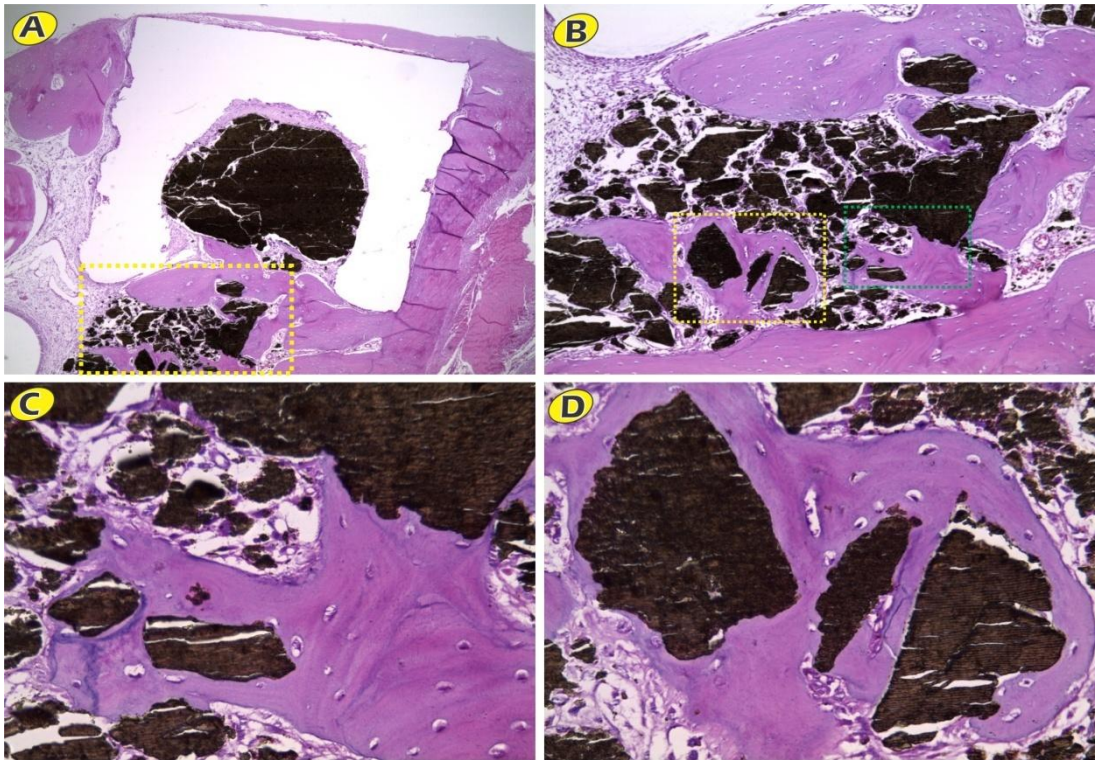


Fig. 4. TiO_2 04 semanas . (A) Visão geral da área do implante (H&E Magnificação original 40x). (B) Delicada camada de células gigantes multinucleadas e eventuais macrófagos mononucleares entre o material teste e o copo de teflon® (H&E Magnificação original 100x). evidenciado com maiores detalhes em (D). (C) O círculo amarelo evidencia um infiltrado celular com baixa variabilidade e discreto edema, com moderado número de fibroblastos e tecido conjuntivo denso não modelado e evidencia de organização osteóide lamelar (H&E Magnificação original 200x). (D) Nota-se os limites de contorno e crescimento ósseo, onde se evidencia o tecido osteóide em intimo contato com o material teste, e uma fina camada de células gigantes multinucleadas, tipo corpo estranho em contato com a parte interna da parede lateral do copo de teflon® (H&E Magnificação original 400x). (E) Presença de tecido conjuntivo com áreas condensadas de matriz osteogênica ou osso neoformado, apresentando morfologia organizacional em forma lamelar com inclusões celulares (Magnificação original 400x). (F) Detalhe em maior aumento de E (círculo amarelo), mostrando parte de material intimamente aderido à superfície óssea, após destacamento deste pelo processamento histológico. (H&E Magnificação original 1000x).

5.4 Nanocristais de dióxido de titânio após doze semanas

As características histologicamente identificadas são semelhantes às descritas no período de observação de quatro semanas, Tabela 2, entretanto, evidencia-se um processo progressivo de reparo do tecido conjuntivo ósseo com uma clara dinâmica de organização lamelar mais definida, como mostra a (fig 5). Pode-se evidenciar na interface do implante, a presença de uma faixa de tecido conjuntivo, de espessura variada, apresentando características de tecido conjuntivo, não modelado, com deposição maior de fibras que se deu focalmente, ou em toda a extensão da interface. Nestas áreas, houve uma redução aparente de fibroblastos. Ainda permaneceu, todavia, um número discreto e moderado de vasos hiperêmicos e edema. Foi possível identificar uma predominância de reação inflamatória crônica granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho) com a presença de macrófagos mono e multinucleares. Estas células, em geral, dispunham-se linearmente ao longo do material. Em algumas áreas, contudo, o tecido conjuntivo também contornou e invadiu o interior do copo de teflon®, observado em (Fig 5A). Neste período, foi possível reconhecer a deposição de tecido ósseo neoformado, com células osteoblásticas e osteócitos presentes no interior da matriz óssea com aspecto de maturação progressiva, com as mesmas características já observadas em quatro semanas, mas mais objetivamente definida na figura (5C). Um achado frequente foi a incorporação do TiO_2 na matriz óssea, primariamente na área celular, figura (5C e D). Em vários pontos, foi possível observar claramente um padrão de neoformação óssea aposicional que invadia o interior do copo de teflon®, à distância do leito receptor com total remodelamento do tecido ósseo, que cresce e se desenvolve na intimidade do material, com uma aposição direta de tecido ósseo, sem a interposição de tecido conjuntivo fibroso entre o material e o osso neoformado vistos nas figuras (5A e B). Nestas áreas, a neoformação óssea respeitou as irregularidades superficiais, se amoldando a elas, contornado-as intimamente. Este tecido neoformado, não apresentou evidências de células clásticas ou necrose, evidenciado pelas figuras (5C e D).

A classificação da resposta inflamatória também se caracteriza por ser ausente ou suave, histologicamente semelhantes em todos espécimes avaliados.



A Fig. 5. mostra um plano histológico de um mesmo espécime após 12 semanas em diversos aumentos em microscopia ótica (MO). Em A observa-se uma visão geral do implante inserido no tecido ósseo (H&E Magnificação original 40x). Em B nota-se a fragmentação do material com invasão de tecido conjuntivo e com baixa variabilidade de células inflamatórias (H&E Magnificação original 100x). Em C percebe-se o material sendo incorporado pelo tecido ósseo, com presença característica de osteócitos em seu interior e crescimento ósseo na intimidade do material, respeitando suas irregularidades microscópicas (H&E Magnificação original 200x). Em D evidencia a deposição aposicional de osso neoformado na intimidade do material implantado, sem apresentar uma superfície de separação visível entre eles e sem sinais de rejeição.

5.5 Caracterização da interface entre os nanocristais e o osso neoformado por meio de microscopia de força atômica

As imagens de AFM foram registradas em temperatura ambiente, 27°C, utilizando o modo contato de um Atomic Force Microscope SHIMADZU SPM-9600 (Scanning Probe Microscope).

A figura (6A) mostra a imagem de AFM correspondente a uma área de (4 x 4) μm sobre uma lâmina histológica após 12 semanas posicionada na interface dos nanocristais de TiO_2 (esquerda) com o osso neoformado (direita). Observa-se, na (Fig. 6A), o indício do fenômeno da osseointegração na interface entre as superfícies dos nanocristais de TiO_2 com o osso neoformado. A (Fig. 6B) mostra a nanotopografia correspondente a figura (6A), evidenciando fortemente o fenômeno da osseointegração, uma vez que não existiu uma descontinuidade nas linhas de perfil analisadas. E essa análise nos sugere que ocorreu deposição e crescimento de tecido ósseo neoformado na intimidade do material testado. Percebemos ainda que a máxima diferença de altura entre as duas superfícies é 570 nm, correspondendo ao grau de empacotamento e organização dos nanocristais de TiO_2 sendo maior do que do tecido ósseo neoformado. As figuras (6C e D) mostram, respectivamente, imagens de AFM em 2-D e 3-D em uma área de (40 x 40) nm da região à esquerda da interface como mostra a figura (6A), onde observamos a existência de nanocristais de TiO_2 e a confirmação referente ao tamanho médio de 21 nm que foi determinado anteriormente no difratograma de Raios-X.

Diante dessas observações e com base nas imagens de AFM, principalmente em sua interface, além das observações nas imagens de microscopia óptica (MO), podemos afirmar que temos uma forte evidência do fenômeno da osseointegração entre as superfícies dos nanocristais de TiO_2 com a superfície do osso neoformado.

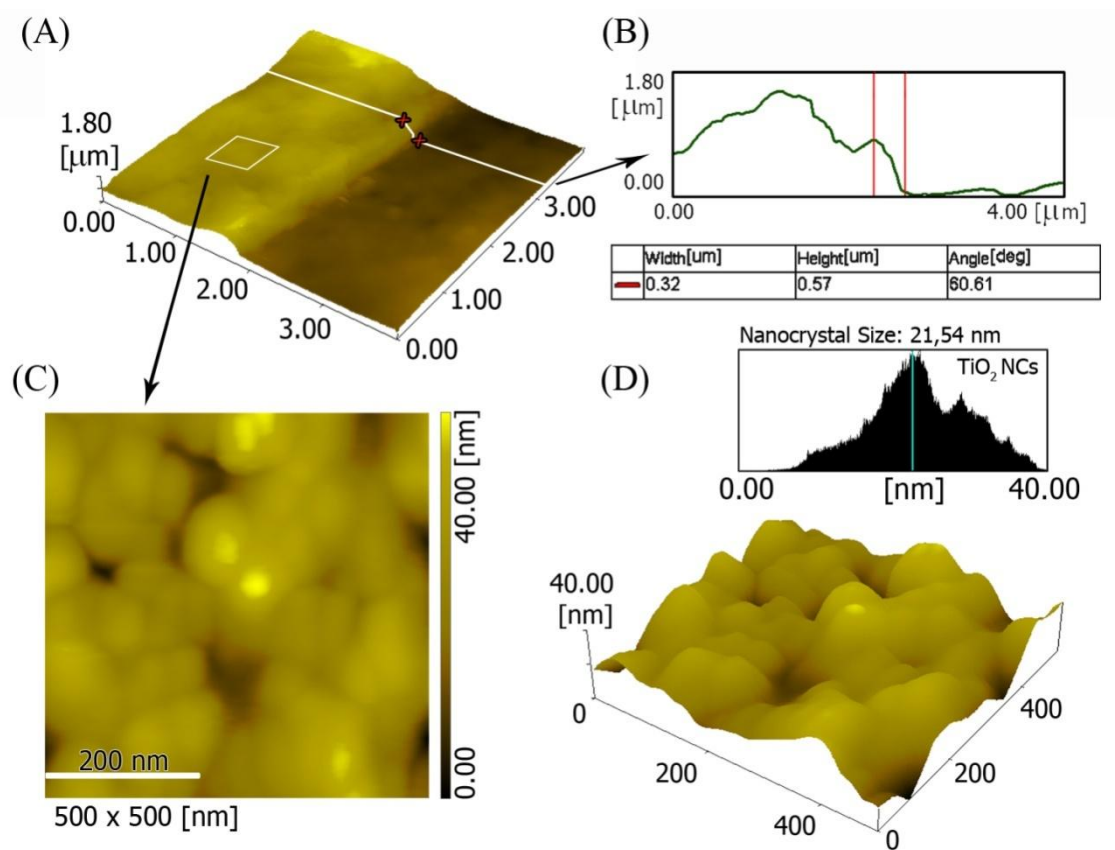


Fig. 6. (A) Imagem de AFM 3-D sobre a interface dos nanocristais de TiO₂ com o osso neoformado. (B) nanotopografia correspondente a imagem de AFM em (A). (C) e (D) imagens de AFM 2-D e 3-D das superfícies de nanocristais de TiO₂.

Discussão

6. Discussão

A necessidade de um material para a substituição dos tecidos ósseos é tão grande quanto à necessidade de substituição de um elemento dentário.

Em nosso estudo propusemos a síntese de nanocristais de dióxido de titânio e sua avaliação pelo teste de biocompatibilidade, que mostrou ser biocompatível nos dois períodos de avaliação e mais, que a presença do óxido de titânio favoreceu o crescimento ósseo para o interior do copo de teflon®, demonstrando uma alta seletividade celular e uma forte evidência de osteogênese e ainda, uma característica até então não presenciada nos materiais aloplásticos que é a osseointegração, caracterizada tanto ao nível da microscopia ótica quanto ao nível da microscopia de força atômica. Nossos resultados conflitam com alguns conceitos sobre sua passividade, entenda-se material bioinerte, mas ao contrário, nossas evidências apontam fortemente para uma intensa atividade fisicoquímica e celular entre os nanocristais de óxido de titânio e o tecido ósseo neoformado.

Historicamente, sabemos que diversos pesquisadores se atentaram para o tema, após os primeiros resultados obtidos por Dressman, em 1892, quando se fez uso de conhecido gesso paris na tentativa de substituir tecido ósseo perdido em casos de infecção, mas que posteriormente foi desaconselhado por Nikilin et al, em 1956, que experimentalmente constatou que quando se deixava a ferida cirúrgica cicatrizar com o material de enxerto ou somente com o coágulo sanguíneo os resultados eram semelhantes. Logo, não traria nenhum benefício a adição de gesso paris, sulfato de cálcio hidratado, nas deficiências ósseas.

Durante séculos, estudiosos do tema da cicatrização óssea, segundo Urist et al, em 1953, conheciam os processos de osteogênese por aposição óssea ou por substituição, mas o fato de misteriosamente o osso crescer de forma direcionada e orientada sempre os intrigavam. Foi quando então surgiu uma teoria com base experimental que evidenciava fortemente que o tecido ósseo poderia ser induzido a crescer por alguns fatores internos, induzindo as

células osteoblásticas a secretarem matriz óssea. E atualmente tem se discutido ainda as influências dos fatores de crescimento ósseo como forma alternativa que induziria o tecido ósseo a se reparar favoravelmente, mas apesar da rhBMP-2 (recombinant human Bone Morphogenic Protein-2) os melhores resultados experimentais, entre os fatores de crescimento, generalizações sobre o tema não são recomendadas, segundo Shiono et al 2010.

A importância dos substitutos ósseo no mundo deve ao enorme número de procedimentos cirúrgicos que são realizados. Cerca de um milhão de procedimentos de enxertos ósseos são realizados em todo o mundo, segundo McAuliffe, em 2003, mas segundo Giannoudis et al, em 2005, o enxerto ósseo autógeno continua sendo o padrão ouro dos enxertos, devido às baixas taxas de insucesso, por rejeição, mas são cirurgias, que às vezes muito invasivas e com uma limitada quantidade de material e sítios cirúrgicos disponíveis, além de aumentar a morbidade do paciente e custos operatórios. Alternativas, como bancos de ossos ainda encontram resistência devido à possibilidade de transmissão de doenças. E substitutos ósseos aloplásticos, sintéticos, surgem como uma alternativa mais desejável, muito embora vários materiais disponíveis atualmente ainda encontrem posições divergentes, entre os pesquisadores, quanto à sua indicação.

Hall et al, em 1999, utilizando vidro bioativo, em defeitos infra-ósseos em mandíbulas de cães, não encontrou diferença ao redor dos implantes, quando da sua utilização. Wheeler et al, em 2000, trabalhando com coelhos, encontrou mais tecido ósseo neoformado em defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo do que nos sítios de controle. Griffon et al, em 2001, trabalhando com ovelhas, conclui que o vidro bioativo teve o pior desempenho que enxerto autógeno ou alógeno. Cancian et al, em 2004, observou a reparação total dos defeitos ósseos preenchidos com vidro bioativo em macacos. Moreira-Gonzalez et al, em 2005 em estudo do tamanho crítico de defeitos ósseos em calvária de coelhos preenchidos com vidro bioativo, não aconselha o seu uso. Essa diversidade de opinião, em parte se deve a falta de padronização do modelo experimental. Esses pesquisadores trabalharam com cães, ovelhas,

macacos e coelhos, sendo que os que trabalharam com coelhos, um utilizou a calvária, o outro o fêmur, o que reflete claramente uma mudança nos padrões experimentais com respostas divergentes e sem a possibilidade de qualquer comparação entre os seus resultados.

Para que se evitasse a inutilização de um trabalho científico, quando da utilização de um modelo animal, Spangberg, em 1969, propôs que os testes biológicos secundários, *in vivo*, pudessem ser padronizados em um único modelo animal, para que fossem minimizadas as variantes não delineadas nos estudos, e que principalmente, os testes servissem de comparação, qualquer que fosse o período de avaliação ou o material testado. Langeland et al, em 1980 elaborou as recomendações da Federação Dentária Internacional em que propôs um protocolo a ser cumprido pelo pesquisador, baseado nos trabalhos de Spangberg, em 1969, e publicou o *Technical Report* nº 9, passando então a ser as normativas internacionais para testes secundários em modelo animal. E em 1982 a Associação Dentaria Americana e o Instituto Nacional do Padrão Americano ADA/ANSI publicou o *Document* nº 41, confirmando a padronização dos testes e a metodologia aprovada pela FDI.

Sousa, em 2000, relata a dificuldade de se conduzir um experimento de compatibilidade biológica em modelo animal, fazendo-se então necessário que se empreguem metodologias padronizadas para que se torne possível o modelo experimental de comparação, pois na busca de um material ideal, é de fundamental importância seguir critérios padronizados, e aceitos internacionalmente, haja vista que Sousa et al, em 2004 e 2006 publicaram testes de biocompatibilidade, com metodologia padronizada segundo FDI ANSI/ADA o que possibilita empregar o modelo de comparação entre os resultados obtidos e em novos trabalhos.

Entretanto, a falta de padronização nos trabalhos científicos não é um privilégio exclusivo dos estudos de biocompatibilidade, outrossim, tem sido evidente nos trabalhos que avaliam os critérios de sucesso na implantodontia. Ann Wenneber et al, em 2009 publicaram uma revisão sistemática sobre os efeitos da topografia da superfície dos implantes de titânio na osseointegração e que entre outras conclusões, uma em especial mereceu bastante atenção,

que devido à falta de padronização nas caracterizações das superfícies, em que parâmetros como rugosidade média (Ra) e rugosidade superficial média (Sa) não puderam ser equacionadas, pois em alguns trabalhos uma superfície era classificada como rugosa e em outros como lisa, além de uso inadequado de técnica de caracterização, como somente a microscopia eletrônica de varredura, sem parâmetros de perfilometria para classificar em liso ou rugoso, mas a partir desse consenso, foram padronizados critérios de rugosidade para que haja a possibilidade de comparação entre os trabalhos científicos, o que foi fortemente evidenciado no trabalho de Ehresnfest et al, em 2010, que sugerem como devem ser futuros trabalhos com o intuito de melhorar as publicações e aumentar significativamente o conhecimento científico, para isso formas padronizadas de análises e técnicas de caracterizações tornaram-se imprescindíveis na identificação das superfícies, composição química, porosidade tanto em escala micrométrica quanto em escala nanométrica.

Sobre os critérios de sucesso da implantodontia de Albrektsson et al, em 1981, dois deles merecerão nossas considerações. Sendo eles, a biocompatibilidade, e a superfície do implante. É indiscutível o sucesso da implantodontia moderna proposta por Per Ingvar Branemark como nas publicações de Adell et al, em 1981 em que mostra que a escolha do metal titânio, se deveu às suas propriedades mecânicas compatíveis com o tecido ósseo, como demonstrado por Parr et al, em 1985 em que mostrou que o módulo de elasticidade do titânio é compatível com o módulo de elasticidade do tecido ósseo. Entretanto Adell et al, em 1981 fez algumas considerações à composição do implante de titânio, que por ser revestido por uma camada de óxido de titânio, sendo esse considerado um material cerâmico, supôs que não ocorreria o contato do metal com o osso, mas sim com a camada de óxido e ainda observou uma potencial capacidade de adesão e ligação química entre a superfície e o tecido ósseo. O que também foi observado por Albrektsson et al, em 1981; Branemark et al, em 1983; Albrektsson em 1983.

Sobre o óxido de titânio, Kasemo, em 1983, afirma que possivelmente não exista o contato direto entre o titânio, metal, e os tecidos, mas sim entre os tecidos e a camada de óxido, anteriormente formada. E reforçando a

importância da superfície, Parsegian, em 1983, ressalta sua importância bioquímica no meio biológico, uma vez promove adsorção de proteínas, biomoléculas, e interações fisicoquímicas, como ligações de hidrogênio, iônicas e covalentes e interação de Van der Waals, reforçado ainda pelos trabalhos de Thomas et al em 1985 que ressalta que a natureza do biomaterial e suas condições iniciais de energia de superfície e morfologia determinariam a resposta biológica segundo Baier et al, em 1988; Gross, em 1988; Kasemo et al, em 1988

De acordo com Zitter et al, em 1987; Fraker, em 1987; Kasemo et al, em 1988; o titânio é um biomaterial, que na natureza, devido sua alta reatividade química, sempre se encontra recoberto por uma camada de óxido e que o produto de sua corrosão sempre forma óxido e não íons, formando uma camada protetora, passivada sobre a superfície do implante. E quando esse implante é colocado em contato com o tecido ósseo ocorre uma série de reações bioquímicas e biofísicas em sua interface, o que sugere, segundo Hench et al, em 1993, que a natureza da ligação do implante é química e não física, também suportado por Ollenick, em 1993. E Kasemo, em 1994 ressalta que a instalação de um implante é um evento altamente perturbador para o organismo, provocando uma série de reações bioquímicas que irão alterar o meio em que se encontra o implante, permitindo que as reações aconteçam em sua superfície, com adsorção de proteínas, biomoléculas, dissolução iônica, entre outros, mudando de forma sucessiva e permanentemente o processo de cicatrização com interferências em escalas micrométricas e nanométricas. Tão intensa e permanente é a interação com a superfície do implante que ao contrário do que se previa, a camada de óxido de titânio não tão estável, a ponto de não sofrer o processo de corrosão, fato esse observado no trabalho de Weingart et al, em 1994 em que sugere que partículas finas de TiO_2 sejam transportadas por fagócitos para linfonodos regionais, mas sem sinais de inflamação ou contrário do trabalho de Makira et al, em 2010 que mostra que íons titânio liberados constantemente pelo implante eleva a sensibilidade das células epiteliais da gengiva, sendo citotóxico e causando inflamação no tecido gengival, e esclarece que o óxido é tolerado pelo organismo, mas o íon de

titânio, liberado em uma condição de ausência de oxigênio ou baixa tensão, ou causado por trincas e rachaduras na superfície do implante metálico de titânio pode ser nocivo a longo prazo, também comprovado por Tapash et al, em 2011 que mostra que íons metálicos de Ti causam irritação local e periimplantite.

A preocupação em alterar a superfície dos implantes ainda tem sido uma constante entre os pesquisadores. E essa preocupação os tem tentado aumentar a camada de óxido de titânio sobre os implantes de titânio, demonstrando que seria possível com a quebra do dielétrico dos implantes de titânio, e formar uma camada maior de óxido sobre a superfície e que resulta no aumento da quantidade de tecido ósseo em volta dos implantes. Tem se percebido que as alterações químicas, com incorporação de íons, nanopartículas de fosfato de cálcio e anodização tem aumentado a resposta óssea e a segurança de se oferecer um tratamento que não irá causar o mal ao paciente (Sul et al, em 2002a,b; Choi em 2006; Meireles et al em 2008; Kang et al em 2009; Chiang et al, em 2009; Kobubo et al em 2009)

Vemos que a nanotecnologia tem contribuído fortemente para o desenvolvimento de novos materiais, com novas propriedades, e essa nova classe de materiais tem interferido em genes, proteínas, moléculas e células em escala nanométrica até a escala micrométrica, considerada como a terceira geração de materiais, tem se mostrado um campo fértil para novas investigações, uma vez que podemos interagir com a construção de materiais biofuncionais que terão uma função específica, mas que em alguns casos apenas a mudança do tamanho da partícula, do tamanho de um poro de um arcabouço, *scaffolds*, ou da topografia da superfície de micro para nano, tem mostrado alterações em padrões e respostas celulares (Kasemo, em 2002; Andersson et al, em 2003; Shirtliff et al 2003; Karageorgiou et al 2005; Goto et al, 2005).

Nosso objetivo com esse trabalho foi demonstrar que o princípio da osseointegração, que é interação entre o óxido de titânio e o tecido ósseo, pode ser transportado aos materiais de enxerto ósseo, pois nossa premissa é utilizar apenas os nanocristais de dióxido de titânio na terapia óssea

reconstrutiva e uso concomitante com os implantes dentários. Uma vez que tenhamos o seu mesmo constituinte, o dióxido de titânio, tanto como material de preenchimento quanto na superfície dos implantes, deslumbramos interações de natureza química que unir-se-ão em um bloco único e integrado, implante e enxerto, possibilitando com que novas terapias, ósseas regenerativas e reabilitadoras possam ser oferecidas aos pacientes. Nossas idéias encontram consonância com os trabalhos de Precheur em 2007, que deslumbra que no desenvolvimento de novos materiais para enxerto ósseo a osseointegração seja uma qualidade desejável para um material ideal.

Conclusão

7. Conclusão

Nos limites da metodologia empregada, concluimos que do ponto de vista biológico não foi observado potencial de agressividade, quando em contato com o tecido ósseo vital, e de acordo com nossos resultados, os nanocristais de TiO_2 podem ser classificados como um Biomaterial. Evidenciamos o fenômeno da osseointegração com nanocristais de Dióxido de Titânio, tanto ao nível da Microscopia Ótica (MO) quanto ao nível da Microscopia de Força Atômica (AFM).

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- pelo apoio financeiro através do processo Nº: APQ-02561-10

Referências

Referências *

- 1- Ring, M.E.. Dentistry: An illustrated history. New York: Abrams; St Luis: C.V. (1985) Mosby
- 2- Dressmann H.: Veber Knochemplomberung. **Beitr Klin Chir** (1892) 9:804-810 apud Peltier LF, The use of plaster of Paris to fill defects in bone. **Clin Orthop** (1961) 21:1-31
- 3- Nikulin A, Ljubovic E.: Der Gipsstift in der experimentellen Knochenregeneration . **Act Med iugosl** (1956) 10:1-6,
- 4- Spangberg LS. - Biologic effects of root canal filling materials. **Odontol. Rev**, (1969) 20:123-132.
- 5- Technical Report nº 9 F.D.I. Langeland, K.; Cotton, W.R. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **International Dentistry Journal**. 1980; 30(2): 140-88.
- 6- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-years study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International Journal of Oral Surgery** (1981) 10: 387-416.
- 7- Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HÅ, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man **Acta orthop, scan**. (1981) 52: 155-170.
- 8- American Dental Association/ American National Standards Institute. Document nº 41 for recommend standard practices for biologic evaluation of dental materials. **Council of Dental Materials and Devices**, 1982

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

- 9- Branemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness **Biomaterials** (1983) 4:25-28
- 10- Albrektsson, T. Direct bone anchorage of dental implants. **Journal of Prosthetic Dentistry** (1983); 50: 255-261
- 11- Parsegian VA. Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. **J. prosth. Dent.** (1983) 49:(6) 838-842.
- 12- Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. **J. prosth. Dent.** (1983) 49:6:832-837.
- 13- Thomas KA, Cook SDN. A evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. **J. Biomed Mat.** (1985) 19:875-901
- 14- Parr GR, Gardner LK, Toth RW. Titanium: the mystery metal of implants dentistry; dental materials aspects. **J. prosth. Dent.** (1985) 54:3:410- 414
- 15- Williams DF. Definitions in biomaterials: proceeding of a consensus conference of the european society for biomaterials. Chester. **Progress in biomedical engineering.** 1987 Elsevier, Amsterdam.
- 16- Kasemo B, Lausama J. Metal selection and surface characteristics. In Branemark P-I, Zarb G, Albrektsson T. Integrated prostheses osseointegration in clinical dentistry Chicago, **Quintessenz.** (1987) 4:99-116.
- 17- Zitter H, JR H. *The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility.* **J. Biomed. Mater.** (1987) 21:7:881-96.
- 18- Fraker AO. *Corrosion of metallic implants and prosthetic devices.* In American Society for Test and Metals. **Metals handbook (1987)** 13:1324-1335

- 19- Gross UM. Biocompatibility – The interaction of biomaterials and host response. **J. dent. Educ.** (1988) 52:12:798-803
- 20- Baier RE, Meyer AE. Implant surface preparation. **Int J Oral Maxillofacial and Implants.** (1988) 3: 9-20.
- 21- Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. **Int J Oral Maxillofacial and Implants.** (1988) 3:247-259.
- 22- Meffert RM, Langer B, Fritz ME. *Dental implants: a review*, **J. Periodont.** (1992) 63:11:859-870.
- 23- Oleinick AJ. *Osseointegration versus micro-osseointegration: Review of endosseous dental implant systems.* **Gen. Dent.** (1993) 41:5:406-408
- 24- Hench LL, Wilson J. *An Introduction to Bioceramics.*, World Scientific implant applications, **Dent.Clin.North Am** (1993) 36:(1);19-26.
- 25- Meachim G, Williams DF. *Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants.* **J. Biomed. Mater. Res.** (1993) 7: 555-572
- 26- Kasemo B, Lausmaa J. Surface properties and processes of the biomaterial-tissue interface. **Materials Science and Engineering** (1994) C1:115-119
- 27- Weingart D, Steinemann S, Schilli W, Strub JR, Hellerich U, Assenmacher J, Simpson J. Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, (1994) 23:(6);450-452.
- 28- Cypher TJ, Grossman JP, Biological Principles of Bone Graft Healing. **Journal of Foot and Ankle Surgery** (1996) 35(5):413-417

29- Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. **J Periodontol** (1999) 70(5):526-35.

30- Sousa, CJA. **Avaliação histológica da biocompatibilidade de materiais indicados para retro-obturações em cirurgias pararendodômicas, através de implantes intra-ósseos em “Guinea Pig”, segundo critérios estabelecidos pela FDI.** [tese] Riberão Preto: FORP/USP; 2000

31- Cooper, L.F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. **Journal of Prosthetic Dentistry** (2000) 84: 522-534.

32- Wheeler DL, Eschbach EJ, Hoellrich RG, Montfort J, Chamberland DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. **J Orthop Res** (2000) 18(1):140-8.

33- Griffon DJ, Dunlop DG, Howie CR, Gilchrist T, Salter DM, Healy DM. Early dissolution of a morsellised impacted silicate-free bioactive glass in metaphyseal defects. **J Biomed Mater Res** (2001) 58(6):638-44.

34- Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Ann Wennerberg A, et al Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition **Biomaterials** (2002) 23:491-501

35- Sul YT, Johansson CB, Roser K, Tomas Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants **Biomaterials** (2002) 23:1809-1817

- 36- Kasemo, B. Biological Surface Science; **Surface Science** (2002) 500:656-677
- 37- Andersson AS, Backhed F, Euler AV, Richter-Dahlfors A, Sutherland D, Kasemo B. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production **Biomaterials** (2003) 24:3427-3436
- 38- McAuliffe JA, **Bone Graft Substitutes Journal of Hand Therapy** (2003) 16:180-187
- 39- Shirtliff VJ, Hench LL., Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair", **Journal of Materials Science** (2003) 38:(23);4697-4707.
- 40- Sousa CJA, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JCG, Oliveira RP e Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. **International Endodontic Journal**. 2004;37:738-748
- 41- Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Júnior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in Cebus apella monkeys. **Int J Oral Maxillofac Implants** (2004) 19(1):73-9.
- 42- Liu XY, Chu PK, Ding CX. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, **Materials Science & Engineering R-Reports**, (2004) 47:(3-4); 49-121.
- 43- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials** (2005) 26 :5474–5491
- 44- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update **Injury, Int. J. Care Injured** (2005) 365:520-527

- 45- Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, et al. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. **J Craniofac Surg** (2005) 16(1):63–70.
- 46- Goto K, Tamura J, Shinzato S, Fujibayashi S, Hashimoto M, Kawashita M, et al. Bioactive bone cements containing nano-sized titania particles for use as bone substitutes **Biomaterials** (2005) 26:6496–6505.
- 47- Sousa CJA, Montes CRM, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. **Journal of Endodontics**. 2006; 32: 656-662.
- 48- Choi JW, Heo SJ, Koak JY, Kim, SK, Lim YJ, Kim SH. et al. Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages. **Journal of Oral Rehabilitation** (2006) 33: 889–97.
- 49- Precheur HV, Bone Graft Materials **Dent Clin N Am** (2007) 51:729–746
- 50- Le Gue'hennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials** (2007) 23: 844–854.
- 51- Kokubo T, Matsushita T, Takadama H. Titania-based bioactive materials **Journal of the European Ceramic Society** (2007) 27:1553-1558.
- 52- Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. **Biomaterials** (2007) 28:4748–4755.
- 53- Meirelles L, Melin L, Peltola T, Kjellin P, Kangasniemi I, Currie F, Andersson, M, Albrektsson T, Wennerberg A. Effect of hydroxyapatite and

Titania nanostructures on Early in vivo bone response. **Clinical Implant Dentistry & Related Research** (2008) 10: 245–254.

54- Kang BS, Sul YT, Oh SJ, Lee HJ, Albrektsson T. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. **Acta Biomaterialia** (2009) 5:2222-2229

55- Chiang CY, Chiou SH, Yang WE, Hsu ML, Yung MC, Tsai ML, et al. Formation of TiO₂ nano-network on titanium surface increases the human cell growth. **Dental Materials** (2009) 25: 1022-1029

56- Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin. Oral Impl. Res.** (2009) 20:(4);172–184.

57- Kokubo T, Matsushita T, Takadama H, Kizuki T Development of bioactive materials based on surface chemistry **Journal of the European Ceramic Society** (2009) 29:1267–1274

58- Hanawa T. **Japanese Dental Science Review** (2010) 46:93-101

59- Shimono K, Oshima M, Arakawa H, Kimura A, Nawachi K, Kuboki T. The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement: A systematic review **Japanese Dental Science Review** (2010) 46:43-53

60- Makihiro S, Mine Y, Nikawa H, Shuto T, Iwata S, Hosokawa R, et al. Titanium ion induces necrosis and sensitivity to lipopolysaccharide in gingival epithelial-like cells **Toxicology in Vitro** (2010) 24:(7);1905-1910

61- Ehrenfest DMD, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography **Trends in Biotechnology** (2010) 28:(4);198-206

62- Tapash R, Rautray R, Narayanan, Kyo-Han Kim Ion implantation of titanium based biomaterials **Progres in Materials Science** (2011) 56:8:1137-1177

63- Acesso 09/06/11 e disponível através da URL:
<http://www.branemark.org.br/template.php?pagina=dynamic.php&PAGE=8&CONTENT=25>

Obras consultadas

Obras consultadas

- 1- Nickeng HJ, Wichmann M, Andreas SK, Eitner S. Oral health related quality of life in partially edentulous patients: Assessments before and after implant therapy **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery** (2008) 36: 477-480
- 2- Kuboki T, Okamoto S, Suzuki H, Kanyama M, Arakawa H, Sonoyama W. & Yashita, A. Quality of life assessment of bone-anchored fixed partial denture patients with unilateral mandibular distal-extension edentulism. **Journal of Prosthetic Dentistry** (1999) 82:182-187.
- 3- Ring ME. Dentistry: An illustrated history. New York: Abrams; St Luis: C.V. Mosby (1985)
- 4- Acesso em 09/06/11 e Disponível através da URL: <http://140.247.102.177/col/longDisplay.cfm?ObjectKey=671492>
- 4- Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. **Science** (1984);226:4675:630-636
- 6- Feynman RP, There's Plenty of room at the bottom. **Engineering and Science** 23: 22-36 1960
- 7- Acesso em 09/06/11 e disponível em http://www.britishmuseum.org/explore/highlights/highlight_objects/pe_mla/t/the_lycurgus_cup.aspx
- 8- Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup - A Roman Nanotechnology. **World Gold Council**, (2007) 40:4.. 270-277.
- 9- Drexler KE, Engines of Creation 2.0 The Coming Era of Nanotechnology 2006
- 10- **BSI** – British Standards International. Publicly available specification, PAS 71:2005 – Vocabulary- Nanoparticles, 2005.
- 11- **ASTM** – American Society for Testing and Materials. ASTM E2456 - 06 - Standard Terminology Relating to Nanotechnology, disponível em: <http://www.astm.org/Standards/E2456.htm>, acesso em: 09/06/2011.
- 12- RATNER, B.D., 2004, A History of Biomaterials. In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. **Int Dent J**, (1980) 30:140-188

13- Schoen, F.J., Lemos, J.E. Biomaterials Science: An Introduction to Seeman N. C. DNA nanotechnology. **Materials Today** (2003) 24- 29.

14- Helmus MN, Tweden K. Materials Selection, In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**,(1995) 1:27-59.

15- Dantas NO, Damigo L, Qu F, Cunha JFR, Silva RS, Miranda KL, et al. Raman investigation of ZnO and $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}$ nanocrystals synthesized by precipitation method. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 2008;354: 4827-4829

16- Pechini MP, Adams N. Method of Preparing lead and alkaline earth titanates and niobates and coating method using the same to form a capacitor. **United States Patent Office**,1967.

Anexos

Anexos



APOIO PARA PROJETOS DE PESQUISA

Processo Nº: **APQ-02561-10**

Natureza da Solicitação: **Demanda Universal**

Identificação do Coordenador

Nome Completo

ADRIANO MOTA LOYOLA

Data de Nascimento

31/10/1960

Telefone de Contato

Telefone Celular

(34)9807-9317

Endereço Residencial

Rua Marciano Santos, 301/302

Bairro

Jardim Finotti

Maior Titulação

Doutor

Instituição

Universidade de São Paulo

Banco

001 - BANCO DO BRASIL S A

Agência

4889-5

Endereço eletrônico do Currículo Lattes

<http://lattes.cnpq.br/5412665384225553>

Dados do Coordenador

Instituição de Trabalho Atual

Universidade Federal de Uberlândia

Data de Admissão

30/12/1988

Área de Conhecimento

ODONTOLOGIA

Dados do Auxílio e Projeto

Título do Projeto

"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOCOMPÓSITOS À BASE DE ZnO, TiO₂ e HIDROXIAPATITA PARA

Duração

24

Palavra-Chave 1

nanomaterials

Palavra-Chave 3

citocinas próinflamatórias

Palavra-Chave 5
propriedades biológicas

Expectativa de Proteção Intelectual
Sim

Instituições do Projeto

Instituição Executora / Proponente
Universidade Federal de Uberlândia

Instituição Gestora
Fundação de Apoio Universitário

Resumo do Projeto

Nanocompósitos a base de óxido de zinco, dióxido de titânio e hidroxiapatita tem sido objeto de estudo no Laboratório de Nanomateriais do Ins precipitação, por via úmida, e várias técnicas experimentais tais como Absorção Óptica (AO), Fotoluminescência (PL), Difração de Raios-X (DRX) sua aplicação clínica, especialmente em endodontia e ciências afins. Neste sentido, esta avaliação se dará inicialmente a partir de estudos de cll serão realizados em mandíbulas e subcutâneo de animais de experimentação (Guinea pig e camundongos C57BL/6), obtendo-se, no mínimo, 10 inflamatórias, bem como mediadores da inflamação como prostaglandinas e leucotrienos por células em contato com os nanopós, ensaios de vii complementaridade das metodologias, haja vista que estamos vinculando os experimentos de síntese e caracterização dos nanocompósitos a av

Produtos Finais Pretendidos

Produto
APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS
ARTIGOS EM REVISTAS ESPECIALIZADAS
BOLSA BIC
OUTROS
TESES DE DOUTORADO

Pesquisadores Integrantes do Projeto

Nome	CPF
CÁSSIO JOSÉ ALVES DE SOUSA	
CLAUDIO VIEIRA DA SILVA	
NOELIO DE OLIVEIRA DANTAS	
RONALDO JOSÉ DE ALMEIDA	

Apoio Solicitado à FAPEMIG

Tipo de Dispendio: DESPESAS OPERACIONAIS
Descrição: administração do convênio
Valor Unitário: R\$ 2.499,00
Justificativa: Despesas obrigatórias vinculadas a FAPEMIG

Tipo de Dispêndio: MATERIAL DE CONSUMO - NACIONAL

Descrição: Reagentes e vidrarias

Valor Unitário: R\$ 49.980,08

Justificativa: Os materiais ora solicitados compõem um conjunto de reagentes como descrito acima, incluindo especialmente os anticorpos cultura de células, ou seja, todos os insumos necessários ao desenvolvimento dos objetivos propostos.

Tipo de Dispêndio
DESPESAS OPERACIONAIS
MATERIAL DE CONSUMO - NACIONAL

Total Solicitado: R\$ 52.479,08

Recursos Solicitados a Outras Fontes / Contrapartida da Instituição

Entidade	Quantia	Data do Pedido	Data Prevista de Resposta	
Universidade Federal de Uberlândia	R\$ 300.000,00	-----	-----	Laboratório de Novos Materiais Isolante pesquisa.

Locais de Realização da Pesquisa

Estado	Município
MINAS GERAIS	UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS	UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS	UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS	UBERLÂNDIA

Anexos do Projeto

Projeto: [APQ-02561-10-Proj1.pdf](#)

Plano de Trabalho do Bolsista: [APQ-02561-10-Bol1.doc](#)

Plano de Trabalho do Bolsista2: [APQ-02561-10-Bol2.doc](#)

Plano de Trabalho do Bolsista: [APQ-02561-10-Out1.doc](#)

Plano de Trabalho do Bolsista2: [APQ-02561-10-Out2.doc](#)

Plano de Trabalho do Bolsista3: [APQ-02561-10-Out3.doc](#)

Plano de Trabalho do Bolsista4: [APQ-02561-10-Out4.doc](#)



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 101/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 026/10**

Projeto Pesquisa: "Síntese e caracterizações de nanocompósitos à base de ZnO, TiO₂ e hidroxiapatita para aplicações como nanobiomateriais em odontologia".

Pesquisador Responsável: Adriano Mota Loyola

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 23 de junho de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente do CEUA/UFU