



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIENCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

Avaliação da Osseointegração de Implantes de Ti Nitretados em Plasma

Custódio Leopoldino de Brito Guerra Neto.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Clodomiro Alves Jr.

Natal, 25 de Maio de 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIENCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS

Avaliação da Osseointegração de Implantes de Ti
Nitretados em Plasma

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais do Centro de Ciência Exata e da Terra da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais.

Doutorando: Custódio L. de B. Guerra Neto

Orientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves Jr.

Natal, 25 de Maio de 2005.

Agradeço a Deus por ter concluído este trabalho, a minha família, minha esposa, meus filhos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do mesmo.

Agradecimentos

Ao professor Doutor Clodomiro Alves Júnior pela coragem de aceitar alunos com formação em outras áreas, por ter acreditado no meu sonho, pela amizade, pela dedicação na orientação do trabalho, pela paciência, pelo incentivo, por sempre estar presente e por ser o melhor professor que eu já tive. À sua família: Fátima, Manuella, Roberta e Nino sou grato pela amizade sincera e carinhosa.

A minha esposa, por na minha ausência conseguir de maneira brilhante manter nosso lar com muito amor, firme, tranquilo e no rumo certo.

Aos meus queridos filhos, Paulo Victor e Gustavo que entenderam as minhas desculpas e ausências, tornando tudo mais fácil.

Ao meu irmão Ângelo Roncalli de Oliveira Guerra por ter acreditado em mim e ter abraçado a minha causa como se fosse sua, sem medo de se expor.

A minha mãe Maria Dalka de Oliveira Guerra pelo amor, carinho e por ter sempre ficado do meu lado nas horas mais difíceis de minha vida.

Ao meu pai José Valmir Guerra minha gratidão por tudo que sou e tenho.

Ao companheiro de estudo e trabalho Marco Aurélio Medeiros da Silva pela amizade e pelas vitórias juntas alcançadas, que até ontem eram consideradas batalhas impossíveis. Agora tão possíveis e vencidas.

Aos amigos de laboratório Roseane e Kleber pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Ao colega dentista Gustavo Moraes, pelo esforço, dedicação, amizade e empenho. Aliado em todos os ensaios deste trabalho, não consigo palavras para agradecer o seu auxílio.

A todos os professores da Engenharia de Materiais pelo apoio, em especial ao professor Rubens Marimbondo amigo, competente e sempre prestativo.

A todos os colegas do LABPLASMA pela convivência fraterna e amigável durante todo o trabalho.

A minha amiga Ana Raquel pelo grande apoio e ensino durante o cumprimento das disciplinas.

Ao Amigo José Sandro pelo companheirismo e contribuição na primeira etapa deste trabalho.

A empresa nacional de implantes A.S.Technology (Titânium Fix) pelos implantes para coelho doados para a realização desta pesquisa.

Ao professor José Wilson do departamento de Física pela colaboração valiosa e carinhosa a este trabalho, disponibilizado o seu laboratório e seus equipamentos.

A Escola Agrícola Jundiaí pela grande colaboração doando os animais para a pesquisa.

A Professora Piedade e o funcionário Bira pela oportunidade, confiança, amizade e acreditar neste trabalho, meu muito obrigado.

As Doutoras Flávia e Uilma pela assistência veterinária e uso das instalações da clínica ASVET (Assistência Veterinária).

Ao professor Wilson Acchar pela força e incentivo no começo deste trabalho.

Aos funcionários da Física pela ajuda e colaboração.

Ao amigo João Maria pela ajuda na elaboração deste trabalho no computador.

Ao colega de laboratório Cristian pela ajuda com a torquímetro.

Sumário

1. Introdução.....	4
2. Aspectos teóricos.....	7
2.1. Aspectos Biológicos	7
2.1.1. Osseointegração.....	7
2.1.2. Titânio como biomaterial	10
2.1.3. Remoção por torque	18
2.1.4. Adesão celular	23
2.1.5. Cultura de células	25
2.2. Aspectos tecnológicos	29
2.2.1. Nitretação iônica.....	29
2.2.2. Plasma.....	29
2.2.3. Taxa de sputtering	30
2.2.4. Dissipação de calor.....	32
2.2.5. O processo de nitretação iônica.....	33
2.2.6. Nitretação em cátodo oco	34
2.2.7. Nitretação do titânio	35
2.3. Biocompatibilidade do nitreto de titânio	38
3. Metodologia Experimental	43
3.1. Ensaio in vitro.....	44
3.1.1. Preparação das Placas de Ti cp.....	44
3.1.2. Ensaio de molhabilidade.....	46
3.1.3. Ensaio de rugosidade	46
3.1.4. Caracterização de fases superficiais	46
3.1.5. Cultura de células	47
3.1.6. Curva de crescimento	47
3.1.7. Contagem de células em microscopia ótica de reflexão.....	48
3.1.8. Adesão celular nas placas	48
3.1.9. Proliferação celular.....	49
3.2. Ensaio in vivo	49
3.2.1. Preparação dos implantes	49
3.2.2. Protocolo cirúrgico	51

3.2.3. Radiografias.....	53
3.2.4. Obtenção dos espécimes e teste de remoção por torque.....	53
3.2.5. Preparação dos espécimes	54
3.2.6. Avaliação da Osseointegração.....	56
4. Resultados e discussão	58
4.1. Primeira parte: ensaios in vitro.....	58
4.1.1. Ensaio de molhabilidade das placas	58
4.1.2. Ensaio de rugosidade	59
4.1.3. Microscopia eletrônica de varredura	60
4.1.4. Fases superficiais	61
4.1.5. Cultura de células	62
4.1.6. Adesão Celular	64
4.2. Segunda parte: ensaios in vivo	66
4.2.1. Radiografias.....	66
4.2.2 Análise da osseointegração dos implantes após 15 dias.....	68
4.2.3 Análise da osseointegração dos implantes após 60 dias.....	70
4.2.4 Análise da osseointegração dos implantes após 90 dias.....	71
4.2.5 Perímetro da osseointegração	76
4.2.6 Molhabilidade.....	77
4.2.7. Textura.....	78
5. Conclusões.....	82
Sugestões para futuros trabalhos	83
Referências Bibliográficas.....	84

Lista de Figuras

Figura 2.1	Oxidação da superfície do implante, Kasemo 2002.	13
Figura 2.2	Hidratação da superfície do implante Kasemo 2002	15
Figura 2.3	Mecanismo da osseointegração. Kasemo 2002	17
Figura 2.4	Desenho esquemático de uma amostra na nitretação em cátodo oco.	35
Figura 3.1	Fluxograma de execução da primeira e segunda parte experimental deste trabalho.	43
Figura 3.2	O aparato experimental utilizado para a nitretação a plasma nas placas.	45
Figura 3.3	Cultura de Células	47
Figura 3.4	Implante nitretado em catodo oco	49
Figura 3.5	Localização dos implantes na tíbia dos coelhos	49
Figura 3.6	O aparato experimental utilizado para a nitretação a plasma para os implantes.	50
Figura 3.7	Seqüência de inserção cirúrgica dos implantes, abertura do leito cirúrgico (a), condução do implante ao leito (b) e implante posicionados na tíbia.	52
Figura 3.8	Torquímetro Digital TQ-8800	54
Figura 4.1	Seqüência de espalhamento da gota séssil aplicada sobre placas sem tratamento e em titânio nitretado.	58
Figura 4.2	Apresenta o resultado da molhabilidade das placas.	59
Figura 4.3	Rugosidade superficial das placas nitretadas e controle.	60
Figura 4.4	Fotomicrografias em MEV da superfície nitretada e controle.	61
Figura 4.5	Difratograma das placas nitretadas e sem tratamento.	62
Figura 4.6	Estágios evolutivos da proliferação celular, (a) a (f)	63
Figura 4.7	Curva da proliferação celular	64
Figura 4.8	Adesão celular na placa nitretada, (a) e (b)	65
Figura 4.9	Adesão celular na placa controle.	66
Figura 4.10	Radiografia da tíbia do coelho 3, com 45 dias.	67
Figura 4.11	Radiografia da tíbia do coelho 5, com 60 dias.	67
Figura 4.12	Radiografia da tíbia do coelho 1, com 90 dias.	68

Figura 4.13	(a) O único implante aproveitado do coelho 3 (b) Zoom do mesmo.	68
Figura 4.14	MEV do implante nitretado coelho 3 (a) e zoom da região apical (b).	69
Figura 4.15	MEV das roscas do implante nitretado 3 (a) e zoom da mesma (b).	70
Figura 4.16	Lâminas de formação óssea das roscas do implante do coelho 5, com 60 dias.	71
Figura 4.17	Lâmina vista em microscopia de luz transmitida, do implante nitretado, após 60 dias de cicatrização.	71
Figura 4.18	Fratura da tíbia do coelho 5.	73
Figura 4.19	Torque de 60,6 Ncm em implante nitretado	73
Figura 4.20	Curva comparativa da remoção por torque dos implantes da tíbia esquerda do coelho 1.	74
Figura 4.21	Os implantes do coelho 2, nitretado e sem tratamento removidos por torque visto em Microscópico óptico.	74
Figura 4.22	Implante nitretado do coelho 2, removidos por torque visto em MEV.	75
Figura 4.23	Implante sem tratamento do coelho 2, removido por torque visto em MEV.	75
Figura 4.24	Lâminas de um implante nitretado (a) e um sem tratamento (b).	76
Figura 4.25	Marcação do perímetro de uma rosca em um implante nitretado (a) e um implante sem tratamento (b).	77
Figura 4.26	Foto ilustrando a diferença de molhabilidade entre o implante nitretado e outro implante idêntico, sem tratamento.	78
Figura 4.27	Textura da superfície de um implante nitretado, mostrando regiões de oclusões.	79
Figura 4.28	Textura da superfície de um implante sem tratamento.	79

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Concentrações máximas permitidas para as impurezas em Ti cp (% em peso)	12
Tabela 3.1	Composição Química do Titânio Grau II	44
Tabela 3.2	Condição de trabalho das placas.	45
Tabela 3.3	Posicionamento dos implantes nos coelhos e tipos de análises realizadas	53
Tabela 4.1	Valores de torques de remoção realizados.	72
Tabela 4.2	Perímetro de osseointegração.	77

Lista de Abreviaturas e Símbolos

θ	Ângulo de contato
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Ti cp	Titânio comercialmente puro
ASTM	Sociedade Americana de Análise e Padronização de Materiais
K	Constante dielétrica
SLA	Jato de areia com granulação grande + ácido (HCl/H ₂ SO ₄)
TPS	Plasma spray de titânio
HA	Plasma de hidróxilapatita
E	Eletropolido
SL	jato de areia com granulação grande
(L	Tensão superficial líquido/ar
(s	Tensão superficial sólido/ar
(LV	Tensão superficial líquido/vapor
(SL	Tensão superficial sólido/líquido
CDV	Deposição química de vapor
PVD	Deposição física de vapor
XDR	Difratometria de Rx
RNA	Reação de análise nuclear
PIRAC	Powder immersion reaction assisted coating
Ra	Média aritmética dos picos de rugosidades
Q	Quantidade de calor perdida para o aquecimento do cátodo
Q _T	Calor total liberado
Q _C	Calor liberado por condução
Q _{CV}	Calor liberado por convecção
Q _R	Calor liberado por radiação
W	Potência fornecida pela descarga
0	Eficiência do aquecimento do cátodo
DEIV	Detergente enzimático
KY	Gel lubrificante
HCD	Descarga em Catodo oco

Resumo

Nos últimos anos tem-se observado um grande crescimento em tecnologias para modificação de superfícies de implantes que reduza, ou mesmo elimine, o tempo de espera pela cicatrização assim como possibilite seu uso com sucesso em áreas de baixa densidade óssea. Dentre as diferentes técnicas, a nitretação em plasma desponta como forte candidata, uma vez que a mesma já está sendo aplicada com excelentes resultados no titânio (Ti) e suas ligas e usadas na confecção de implantes de quadril, ombro e tornozelo. Entretanto, seu uso em implantes dentais é bastante limitado devido às altas temperaturas do processo (entre 700 e 800 °C) resultando em distorções nessas peças que possuem geometria complexa e alto grau de precisão. Com o objetivo de solucionar esse problema, um novo método a plasma, usando a configuração de descarga em cátodo oco, foi utilizado no presente trabalho. Nesse sentido, placas e implantes dentais de Ti grau II foram nitretados por descarga em cátodo oco com o objetivo de avaliar sua osseointegração. As amostras foram nitretadas em temperatura de 450°C, 150 Pa, durante 1 hora. Essa condição foi escolhida por apresentar os melhores resultados de molhabilidade em trabalhos anteriores onde sistematizou-se diferentes condições de pressão, temperatura e tempo. As placas foram colocadas em culturas de células para observar a adesão e proliferação celular. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos para verificar o torque de remoção e perímetro osseointegrado. Os resultados mostraram que a nitretação a plasma, utilizando a técnica de descarga em cátodo oco, produziu uma mudança significativa na textura superficial das placas e dos implantes, sem que houvesse distorção dos mesmos. Observou-se também, uma proliferação celular nas placas nitretadas 2,5 vezes superior àquelas das placas controles. O torque de remoção dos implantes nitretados foram em média 2 vezes superior aos torques para remoção dos implantes controles. Portanto conclui-se que a nitretação em catodo oco provou ser uma técnica eficiente para o tratamento de superfícies de biomateriais.

Palavras-chaves: Palavras-chave: Implantes Dentais, Nitretação em Plasma, Osseointegração, Biomateriais

Abstract

In most recent years there has been a noticeable increase on the number of efforts to develop new technologies capable of modifying implants' surfaces aiming either to reduce or even eradicate the healing waiting time and, likewise, trying to make it possible to be successfully used on low density bone regions. Among these several available techniques, the plasma nitriding process emerges as a strong candidate due to its outstanding performance when applied to titanium (Ti) and its based alloys reported on the manufacturing of implants such as hip, shoulder and ankle. However its use is very limited if applied to dental implants due to the high working temperatures (from 700 to 800 °C) that may cause distortions in some complex geometry parts requiring high precision and tight tolerances. In order to solve this problem a new approach is proposed in this paper in which nitriding under hollow cathode discharge method is used. Within this context, both Ti plates and dental implants of grade II were then submitted to nitriding under hollow cathode aiming to evaluate its osseointegration potential. The samples were treated on a temperature of 450°C, 150 Pa of pressure during one-hour time. This condition was chosen for presenting the best results of weatability and it was based on previous works in which different conditions of pressure, temperature and time were properly systematized. The plates were put cell culture in order to check the adhesion and cell proliferation results. The implants were inserted on rabbit's tibia in order to verify the torque effort used to remove them as well as their osseointegrated perimeter. The results showed that the plasma nitriding under hollow cathode discharge method helped to achieve a significant change in the surface texture of both treated plates and implants without producing distortions on them. Furthermore, it was observed a cellular proliferation 2.5 times higher than those achieved on untreated plates. The magnitudes of the torque efforts to remove the treated implants were found to be an average of 2 times higher than the untreated ones. Therefore, it can be concluded that the process of nitriding under hollow cathode discharge has proved to be an efficient technique to treat biomaterial's surfaces.

Keywords: Dental implants, Plasma Nitriding, Osseointegration, Biomaterials

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

A partir dos estudos fundamentais de Brånemark et al [BRANEMARK, 1969 e 1977] e Schroeder et al. [SCHROEDER, 1976 e 1978], os implantes osseointegrados acabaram por transformar-se em uma ferramenta previsível e confiável de reposição dental. Foram desenvolvidos para seguir um rígido protocolo cirúrgico que permite o tratamento dos desdentados parciais ou totais e continuam universalmente aceitos até os dias de hoje. Ainda que o método de implantes já tenha se consagrado como uma previsível possibilidade para a restauração das perdas dentais, a eventual confirmação de que determinadas superfícies possibilitam maior e mais rápido contato ósseo na fase de cicatrização e duradouro quando em função, poderá certamente contribuir para aperfeiçoar o procedimento. Estas características da superfície do titânio poderiam ainda, por exemplo, permitir a colocação dos implantes em função imediata em áreas até então contra-indicadas para o procedimento e ampliar a gama de aplicações existentes atualmente. A necessidade de definir-se uma superfície de implantes metálicos compatíveis com uma boa resposta óssea é imperativa na pesquisa básica de implantes, especialmente em busca de soluções para área de baixa densidade óssea [AMARANTE, 2001].

Qualquer implante, uma vez em contato com o meio biológico, é caracterizado por mudanças dinâmicas em suas propriedades superficiais envolvendo uma cascata de reações que ocorre entre o meio biológico e o biomaterial [HUGHES, 1997] formando um “filme de condicionamento” que modula as respostas celulares do hospedeiro [PULEO, 1999].

Segundo Rupp et al [RUPP, 2004] a molhabilidade e a energia superficial exercem um importante papel na adsorção de proteínas, aumentando a formação de adesões focais por osteoblastos [SCHNEIDER, 1994; MAC DONALD, 2002] na superfície do implante. Uma topografia de superfície hierárquica foi descrita por Rupp 2004, onde parâmetros espaciais e híbridos de rugosidade aumentaram a molhabilidade dinâmica da superfície. Considerando que a rugosidade e a molhabilidade, interferem com os processos de adsorção de proteínas, é possível que células sejam fortemente influenciadas por ambas, se chegarem à superfície do implante [RUPP, 2004].

Tem sido observado que uma osseointegração mais rápida pode ser alcançada pela texturização da superfície do implante [BRUNETTE, 1998; SYCARAS, 2000]. A explicação para essa constatação pode estar no mecanismo da osseointegração comprovado por Kasemo em 2002. Com base nesse mecanismo, o real precursor da osseointegração é a molhabilidade

da superfície pelo o líquido biológico e não a rugosidade, como se imaginava anteriormente [BRUNETTE, 1998]. As primeiras moléculas a chegarem à superfície do titânio são as de água. A molhabilidade superficial influencia proteínas, moléculas e células que chegam um pouco mais tarde [BRUNETTE, 1998; SYCARAS, 2000].

Na busca por superfícies que supram a necessidade de obter uma rápida osseointegração, várias pesquisas têm sido desenvolvidas, modificando estas superfícies pelos processos mais variados [SILVA, 2005] que envolvem métodos mecânicos, químicos e físicos de tratamento de superfície, obtendo assim, os mais variados graus de texturas [XUANYONG, 2004]. Nesse sentido é que se propôs o presente trabalho. Tenta-se aqui buscar uma superfície que atenda a essa necessidade. Escolheu-se a nitretação em plasma pelas excelentes propriedades mecânicas, estabilidade química e biocompatibilidade [PARK, 2003] quando aplicada ao titânio. Seu uso para implantes de quadril, joelho, ombro e tornozelo tem levado a uma crescente resistência à abrasão e colonização bacteriana reduzida, comparada a outras superfícies de implantes clinicamente utilizadas [BAIER, 1988]. Entretanto, uma limitação do uso da nitretação em implantes dentais está na alta temperatura do processo, entre 700 e 800 °C, podendo causar distorções no implante devido a sua geometria e precisão dimensional [MISHRA, 2003].

Uma alternativa para solucionar esse problema é o tratamento na configuração de cátodo oco. Este método consiste em nitretar a peça numa atmosfera altamente ionizada. Uma alta densidade de íons significará maior bombardeamento na superfície, ocasionando uma alta incidência energética [GROESSNER, 2003]. Esta configuração de eletrodos é utilizada quando se deseja aumentar o dano superficial e ter um gradiente térmico produzido pelo aumento da taxa de colisão e de ionização [GUERRA NETO, 2001]. Nesse trabalho, superfícies de Ti foram nitretadas por plasma usando a técnica de descarga por cátodo oco, visando seu uso em implantes dentais. Características importantes como molhabilidade, rugosidade, fases superficiais, biocompatibilidade, adesão celular, proliferação celular e osseointegração foram analisadas. O presente trabalho possui como objetivo geral o estudo da biocompatibilidade de superfícies de Ti nitretadas em plasma visando uma melhor osseointegração. Neste sentido, o presente trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

1. Estudo “*in vitro*” da adesão e proliferação celular, feito em placas de Ti comercialmente puro (Cp) nitretado em plasma;
2. Estudo “*in vivo*” com inserção de implantes em tíbia de coelhos para avaliação do torque de remoção e osseointegração na interface Osso/Implante.

Capítulo 2

Aspectos Teóricos

2. Aspectos Teóricos

2.1. Aspectos Biológicos

2.1.1. Osseointegração

A Bioengenharia tem avançado no sentido de proporcionar ao homem uma melhor qualidade de vida e conseqüente longevidade. A ciência busca recuperar órgãos devolvendo a função perdida em conseqüência do avanço da idade, doenças ou traumas com perdas precoces. A Odontologia passa então a interagir com outros ramos, percebendo que interdisciplinaridade é exigência necessária para evolução na área de biomateriais [KASEMO, 2002].

A aplicação dos biomateriais, para confecção de próteses, reporta épocas remotas. Descobertas antropológicas na Europa e na América Central indicam que o homem tentou, desde a muito, repor partes do corpo perdidas (dentes), usando materiais homólogos (dentes humanos e de animais), com propósito aparentemente estético [CESCHIN, 1984].

Na década de quarenta, surgiram vários tipos de implantes no mercado, os implantes subperiostais apresentado à comunidade científica na época, eram colocados sobre o tecido ósseo e sob o perióstio. A prótese era conectada imediatamente após a inserção do implante. Problemas periodontais severos tiraram a técnica do mercado. Anos mais tarde, surgiram os implantes laminados, sendo originalmente usados na sua fabricação ligas de cromo, níquel e vanádio e mais recentemente óxido de alumínio e ligas de titânio. Estes implantes estão associados a complicações no tecido mole e perda óssea acelerada, além do que, são de difícil remoção provocando danos significantes ao tecido ósseo adjacente [ERIKSSON, 1983].

Paralelamente a isto pesquisadores na Suécia iniciaram em 1952, um novo conceito de implantes dentais osseointegrados, com eficácia clínica comprovada através de inúmeros casos suportando próteses em plena função por longos períodos. O mesmo autor em estudos experimentais com implantes dentais em forma de parafuso foi o primeiro a relatar uma interface de contato direto osso-titânio, sem interposição de tecido mole [BRÅNEMARK, 1969].

O termo osseointegração foi usado pela primeira vez por Brånemark, em 1977 [BRÅNEMARK, 1977]. No decorrer dos anos setenta, este fenômeno chamado de osseointegração foi chamado de anquilose funcional [SCHROEDER, 1976]. Todavia o conceito de um contato direto entre o osso e os implantes metálicos, sem nenhum tecido mole interposto, descrito 1969 por Branemark era de alta controvérsia, nesta época e até o começo dos anos 80, não se sabia se o contato direto entre osso e implante era passível de ser alcançado. Contudo, os resultados clínicos positivos com os implantes ósseo-integrados, levaram os pesquisadores a acreditarem em uma ancoragem óssea direta e através de observações clínicas. Tornou-se evidente que os assim chamados implantes ósseo-integrados não são perdidos com o tempo, mas o contrário é o que parece ocorrer [ALBREKTSSON, 1990]. Outros estudos conduzidos paralelamente, estudos similares, abriram novos horizontes na implantodontia [SCHULTE, 1980].

Foi sugerida por autores uma nova definição, onde osseointegração é a conexão estrutural e funcional entre o tecido ósseo (ativo e organizado) e a superfície de um implante em função [BRÅNEMARK, 1985]. Esta definição foi criticada porque não define o nível de resolução, não inclui a quantidade mínima necessária de contato osso/implante para justificar a osseointegração [ALBREKTSSON, 1981]. Uma recente definição de osseointegração não tem melhorado os conceitos anteriores, mas tem usado muitas palavras necessárias para a definição: osseointegração é uma coexistência estrutural e funcional, possivelmente de forma simbiótica, entre tecido biológico diferenciado e adequadamente remodelado com componentes sintéticos duráveis, definido e controlados, com função clínica específica e sem rejeição mecânica [ALBREKTSSON, 1990]. Contudo, a osseointegração não deve ser considerada um critério único para avaliação do sucesso de implantes. Este resultado depende de forma segura da inter-relação entre vários componentes como uma técnica controlada, uso de brocas novas, perfuração seqüencial, uso de baixa rotação e irrigação constante [ALBREKTSSON, 1987]. Além deste tem-se a, biocompatibilidade do material, desenho do implante e manipulação durante a usinagem [HENRY, 1987; JOHANSSON, 1987].

Na microscopia óptica é possível demonstrar que implantes de Ti comercialmente puro (Ti cp) apresentam uma média de 90% ou mais de contato direto entre o osso cortical e o implante com pelo menos um ano de colocação. Em algumas áreas é observada uma linha branca entre o osso e o metal. Geralmente esta linha não apresenta tecido vivo, nem coloração e tem entre 1 e 10 μm de espessura sendo indicativo de ancoragem óssea [ALBREKTSSON, 1981]. Avaliando 2768 implantes colocados seguindo um rígido protocolo cirúrgico,

pesquisadores relataram índices de sucesso de 81% na maxila e 91% na mandíbula além do impacto positivo na situação psicológica e social dos pacientes [ADELL, 1981].

O desenvolvimento na área de implantes odontológicos deu origem a uma variedade de sistemas com diferentes geometrias, materiais e texturas. A caracterização dos biomateriais baseia-se fundamentalmente na avaliação de propriedades físicas e químicas como a composição do material, sua resistência à corrosão e suas propriedades mecânicas [MEFFERT, 1992; OLEINICK, 1993]. Há, contudo um aspecto importante que deve ser analisado e que diz respeito a sua biocompatibilidade, isto é, como o meio biológico responde aos estímulos induzidos pelo material estranho, e ao mesmo tempo, como esse material implantado responde química e fisicamente ao ambiente biológico [GROSS, 1988].

Para determinar a biocompatibilidade de um biomaterial é importante entender o fenômeno na interface entre o material e o sistema biológico onde este material está sendo implantado, como os constituintes moleculares do sistema biológico entram em contato e interagem com os constituintes moleculares da superfície do biomaterial [RATNER, 1987]. A biocompatibilidade como sendo a capacidade de um determinado material para desenvolver uma resposta apropriada do hospedeiro quando utilizado em uma aplicação específica [KASEMO, 2002]. Em 1993 pesquisadores definiram biocompatibilidade como sendo o aproveitamento que o material faz das proteínas e células do meio biológico. Neste caso, as proteínas na interface e o processo de reconhecimento celular são fundamentais no processo. Para isto, é necessário que as propriedades intrínsecas da superfície do biomaterial sejam biologicamente adequadas [RATNER, 1993]. Assim é de fundamental importância compreender que a superfície do material é a chave da biocompatibilidade em um sistema de implantes [RATNER, 1987].

A natureza da superfície pode ser descrita em termos de composição química, morfologia e energia superficial. Sabe-se que essas propriedades, em geral, governam a resposta biológica a um material implantado que, por sua vez, pode envolver também fatores físicos como forma, textura da superfície e movimentos interfaciais relativos também como fatores químicos associados com a composição e estrutura da superfície [BAIER, 1988]. Contudo os detalhes dessas interações não estão totalmente compreendidos [KASEMO, 2002]. Um estudo sobre adesão celular à superfície de biomateriais relatou que sua topografia e energia de superfície desempenham um papel essencial na adesão osteoblástica [ANSELME, 2000].

Pesquisadores estudaram carregamento mecânico variado em implantes dentais através de próteses com observação do impacto dessas forças na osseointegração. As forças transmitidas influenciam o periimplante. Excessivas forças mecânicas afetam a diferenciação do tecido ósseo. Os autores concluíram que é essencial controlar as forças para promover melhor a osseointegração [MURAT, 2004].

Estudo em 2004 usou implantes metálicos cobertos com HA em tíbias de coelhos e observados 08 semanas depois da colocação dos implantes a osseointegração. Foram administrados vários marcadores ósseos para através das diferentes cores proporcionadas por eles pode-se identificar a remodelação óssea. Segundo os autores a presença dos implantes revestidos com HA estimulou o crescimento ósseo na região medular, nenhum coelho mostrou qualquer evidência de inflamação na região implantada. O implante estava cercado de muito osso e pouco tecido fibroso [RIGOA, 2004].

Pesquisadores estudaram a interface osso-implante em cadáver para força de ancoragem em ortodontia. Os autores concluíram que na interface há remodelamento ósseo a 1 mm da superfície que suporta o implante servindo de ancora para movimentações ortodônticas. [SARANDEEP, 2004].

2.1.2. Titânio como Biomaterial

As grandes reservas de Titânio encontram-se no Canadá, Austrália e Estados Unidos. Do total de titânio extraído, a maior parte é transformada em pigmentos de dióxido de titânio para uso em tintas. Só 5% a 10% são utilizados na sua forma metálica [FRAKER, 1987; PAAR, 1985]. É um material reativo e existe usualmente, na natureza, em forma de um composto químico. Uma consequência importante dessa reatividade é que o titânio está coberto de uma camada de óxido [KASEMO, 1987]. O titânio existe como um elemento puro, registrado na tabela periódica com o número atômico 22 e um peso atômico de 47,9 representando o nono elemento mais abundante na natureza e o quarto elemento metálico estrutural mais abundante na camada externa da terra.

O titânio puro é mais propriamente um material mole não-magnético. É produzido em quantidade comerciais por aquecimento do minério rutilo (TiO_2) e ilmenita ($FeO-TiO_2$) na presença de carbono e cloro produzindo, dessa forma, o tetraclore de titânio e reduzindo o mesmo com metal magnésio em redor selado com atmosfera inerte, resultando numa esponja de titânio que é então fundida sob vácuo ou em atmosfera de gás argônio em lingotes do metal [FRAKER, 1987].



O titânio é um metal resistente e aproximadamente 50% mais leve que o aço. O titânio puro sofre uma mudança cristalográfica quando aquecido a 882°C. Esse tipo de transformação ocorre em muitos materiais e produz propriedades significativamente diferentes das de seu estado original. O elemento titânio dissolve alguns outros materiais para formar ligas de titânio, entre os quais estão: a prata, alumínio, arsênico, cobre, ferro, gálio, urânio. Vanádio e zinco. A adição de quantidades em traços de elementos como carbono, oxigênio, nitrogênio e ferro podem melhorar significativamente as propriedades mecânicas do titânio puro. A maioria dos produtos de titânio comercialmente puro contém traços alguns desses elementos [ALBREKTSSON, 1983; FRAKER, 1987].

Para que se consiga um sucesso em longo prazo dos implantes é preciso que o material possua características fundamentais como: biocompatibilidade, resistência ao desgaste, resistência à corrosão e resistência à fratura [PARR, 1985].

Os sistemas de implantes odontológicos fabricados atualmente são confeccionados de titânio comercialmente puro (Ti cp) ou uma de suas ligas de interesse da odontologia, como Ti-Al e Ti-V. Estes elementos atuam como estabilizadores de fases alfa (α), beta (β) e alfa-beta ($\alpha\beta$). O alumínio adicionado aumenta a resistência mecânica e diminui o peso da liga estabilizando a fase alfa (α); já o vanádio estabiliza a fase beta (β). As ligas são tratadas termicamente para aumentar sua resistência mecânica produzindo soluções sólidas contínuas e os elementos incorporados, atuam como estabilizadores da condição de fase [FRAKER, 1987].

Dessas ligas de Ti, a mais comum contém 6% de alumínio e 4% de vanádio e é conhecida como Ti₆Al₄V. Elas são leves, fortes e altamente resistentes à fadiga e corrosão, embora sejam mais duras que o osso. Seu módulo de elasticidade é 114x10³ GPa e é mais próximo do módulo de elasticidade do osso de 16.5 x 10³ 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 x 10³ GPa Esta propriedade permite uma maior distribuição das forças na interface osso-implante [PARR, 1985].

A produção comercial do titânio é rigidamente controlada pela sociedade americana para análise e padronização de materiais (ASTM), que estabelece normas específicas para os graus de contaminação do titânio e para suas ligas de Ti6Al4V, utilizada na fabricação de implante de uso cirúrgico [ASTM, 2000]. A Tabela 1 apresenta as diferentes concentrações dos elementos nitrogênio, carbono, hidrogênio, ferro, oxigênio e titânio, assim como suas propriedades mecânicas, que selecionam os diferentes graus do Ti.

Tabela 2.1. Concentrações máximas permitidas para as impurezas em Ti cp e ligas (% em peso)

Liga	Elemento (% de impureza)							
	N	C	H	Fe	O	Al	V	Ti
Ti grau I	0,03	0,10	0,015	0,02	0,18	-	-	Balanço
Ti grau II	0,03	0,10	0,015	0,03	0,25	-	-	Balanço
Ti grau III	0,05	0,10	0,015	0,03	0,35	-	-	Balanço
Ti grau IV	0,05	0,10	0,015	0,05	0,40	-	-	Balanço
Ti6Al4V	0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,5 – 6,5	3,5 – 4,5	Balanço

O conhecimento das propriedades físicas e químicas da superfície é de fundamental importância para se poder discutir a biocompatibilidade. A importância se deve a vários tipos de interações como forças de Van-der Waals, fortes uniões químicas e outras que estão na dependência da microestrutura de superfície em escala atômica [KASEMO, 1988].

As propriedades de uma superfície são de fundamental relevância para a tendência da mesma adsorver átomos ou moléculas estranhas. Diferentes superfícies têm diferentes propriedades de adsorção, e estas diferenças estão intimamente relacionadas com aspectos químicos de biocompatibilidade [MEACHIM, 1993].

Quando usinado, o Ti cp está sendo exposto de forma repentina a uma atmosfera constituída de ar e substâncias lubrificantes e resfriadoras, ficando o mesmo susceptível à dissociação das moléculas de oxigênio no ar, resultando numa formação extremamente rápida de óxido na superfície [KASEMO, 1987].

Primeiramente ocorre uma adsorção de moléculas de oxigênio que se dissociam imediatamente para átomos (Figura 2.1). Após 10 nanossegundos forma-se a primeira camada monoatômica de oxigênio, aproximadamente dentro de um milissegundo, uma camada de óxido de 1 nm (10 Å) cuja espessura pode crescer na superfície em poucos segundos, o crescimento de óxido pode-se completar virtualmente para uma espessura de poucos nanômetros; e dentro de 1 minuto, a espessura de óxido estará na ordem de 50 a 100 Å. A espessura, composição química e microestrutura do óxido nesta fase, dependerão de alguns fatores tais como: pressão e velocidade de usinagem, que determina a temperatura da superfície, desta forma pode-se esperar variações consideráveis da superfície de óxido com diferentes condições de usinagem [KASEMO, 2002].

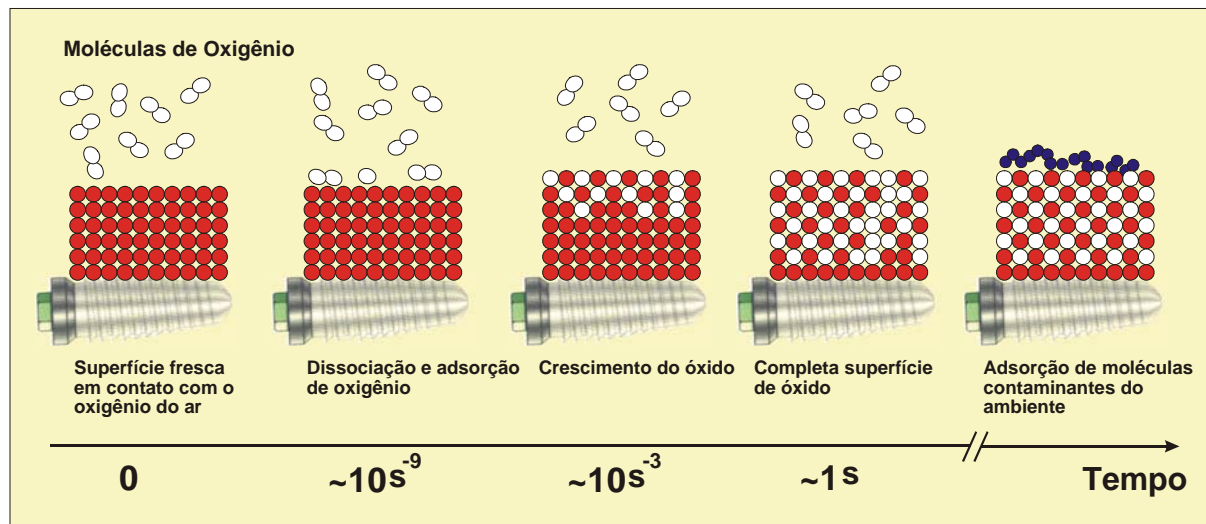


Figura 2.1. Oxidação da superfície do implante, Kasemo 2002.

No Ti cp existem vários óxidos, sendo que mais próximo do metal, há uma predominância de TiO e adjacente ao tecido encontramos o TiO₂ [ALBREKTSSON, 1983]. A camada de TiO₂ é impermeável ao oxigênio e previne a troca de elétrons e qualquer reação redox na superfície. Desta forma, os produtos de corrosão nos tecidos não estão em forma de íon e sim como óxidos estáveis [ZITTER, 1987]. Em meios fisiológicos a camada de óxido é altamente protetora prevenindo o contato entre o meio e o metal base. Isso significa que possivelmente não existe o contato direto entre o metal e seus tecidos hospedeiros, mas certamente entre o tecido e a superfície do óxido formado [KASEMO, 1983].

Parece que a primeira camada de biomoléculas que se deposita na superfície do implante após sua imediata implantação é as de água. Existem alguns tipos de ligações através

das quais as biomoléculas podem unir-se a superfície do implante num meio biológico. São elas: Van der Waals, covalentes, iônicas e ligações de hidrogênio [PARSEGIAN, 1983].

Além das ligações fortes, um terceiro tipo de ligação importante na interação biomolecular está representado pelas ligações de hidrogênio, o ambiente biológico é aquoso, isto é, a molécula mais abundante é de água e podem participar das ligações de hidrogênio além de modificar, em alguns momentos, as ligações iônicas de forma que os íons serão hidratados, isto é, rodeados de uma camada de água [KASEMO, 1987; HEALY, 1992]. Com relação a esse aspecto, pode-se concluir que a superfície de óxido de titânio oferece uma grande extensão para os diferentes tipos de uniões quais sejam as forças de união e as uniões de tipo químico. Em vista do largo espectro de biomoléculas expostas à superfície, é provável que algumas dessas ligações sejam estabelecidas: algumas representando uniões irreversíveis, e outras caracterizadas por um contínuo intercâmbio de moléculas, ou seja, um equilíbrio dinâmico [PARSEGIAN, 1983].

Embora a camada de óxido seja, termodinamicamente, muito estável, reações com o fluido ou meio biológico podem ocorrer. Espécies contendo titânio são liberadas nos tecidos adjacentes e, ao mesmo tempo, espécies contendo oxigênio nos fluidos biológicos são adsorvidos levando ao aumento na espessura da camada de óxido [HEALY, 1992]. Outras mudanças têm sido observadas nas superfícies de óxido implantadas como uma incorporação de espécie de cálcio e fosfato e adsorção de proteínas [HEALY, 1990]. Existe a possibilidade de dissolução da camada protetora de óxido. O processo químico, chamado de corrosão, representa um problema sério para alguns materiais de implantes, parece ser um processo muito lento com titânio, provavelmente devido à alta estabilidade de seus óxidos [WILLIAMS, 1981].

Outros processos químicos na superfície do óxido são: a adsorção e a dessorção de moléculas. A força da ligação entre a biomolécula e a superfície determina se haverá ou não dessorção ou substituição das biomoléculas. A hidratação do óxido é um outro processo que provavelmente ocorre e que pode ser muito importante para o estabelecimento de um ambiente químico apropriado para as biomoléculas Figura 2.2. [PARSEGIAN, 1983].

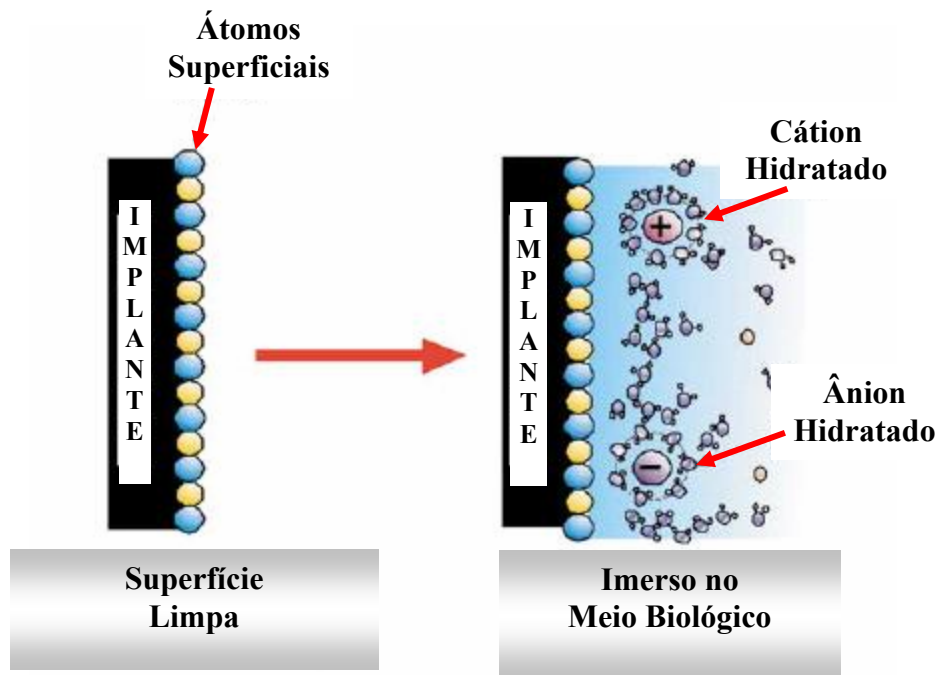


Figura 2.2. Hidratação da superfície do implante Kasemo 2002

É clara a influência da superfície do implante no ambiente biológico e nos processos biológicos na interface que determinarão o sucesso ou falha da implantação. É de importância que o implante não tenha um efeito de desnaturação das proteínas na superfície. Se a desnaturação ocorrer, dependerá do tipo e resistência da união entre a proteína em questão e a superfície. Se as uniões internas que determinam a conformação da proteína são influenciadas de forma muito forte, ocorrerá a desnaturação; se, pelo contrário, forem levemente afetadas, a proteínas permaneceram na sua conformação original. Uma forma de prevenir a desnaturação das proteínas é através de uma adsorção seletiva de biomoléculas pelas superfícies que formam uma camada de separação entre as superfícies do implante e as proteínas [KASEMO, 2002].

Nesse contexto, é interessante especular como a área da interface se desenvolve nas primeiras frações de segundo, a superfície hidratada contém várias macromoléculas absorvíveis bem como células potencialmente adesivas. Algumas dessas biomoléculas se unirão através de ligações descritas acima, e muitas outras eventualmente serão substituídas por moléculas mais eficientes. A superfície do material é transformada, imediatamente, pela adsorção instantânea de filmes predominante protéicos. Esses filmes condicionadores deverão forma-se em uma espessura significativa de frações de 1 μ m, antes de uma colonização bem sucedida de células de qualquer tipo [BAIER, 1988].

Existem diferentes escalas de extensão de interesses na interface implante-tecido. O nível macroscópico visível a olho nú e o nível molecular onde o implante de titânio é o coberto por uma superfície de óxido de aproximadamente 2 a 5 nm de espessura [KASEMO, 1987; KASEMO, 1988]. Moléculas protéicas unem-se à superfície de óxido, e a natureza da interação entre a superfície mais externa de átomos do implante e as proteínas (e/ou outras biomoléculas) é crucial para a resposta do sistema biológico ao implante. Ambas, a microarquitetura (microgeometria, rugosidade) da superfície e sua composição química são importantes pelas seguintes razões:

1. Uma superfície lisa e uma superfície curva ou rugosa respectivamente causa diferentes áreas de contato com biomoléculas e células. As diferentes áreas de contato produzem diferentes tipos de uniões de unidades biológicas que podem influenciar sua conformação e função;
2. Variações na composição química das superfícies produzem diferentes tipos de união às biomoléculas as quais podem. Então, afetar suas propriedades. A composição da superfície química determina amplamente a estabilidade química e reatividade do material do implante.

Um fator essencial, nesse contexto, é como a superfície do material interage com a água. Se a superfície se ligar fortemente com a água, ou seja, se for uma superfície hidrofílica, a proteína com sua cápsula de água considerarão a superfície como similar à água. Essa proteína provavelmente interagirá com o material indiretamente, através da intermediação de uma camada de água, e permanecerá em seu estado conformacional normal. Se, ao contrário, a superfície repelir ou tiver uma ligação frágil com a água, ou seja, se a superfície for hidrofóbica, a proteína estará mais próxima a formar ligações diretamente com os átomos da superfície, os quais poderão causar então mudanças conformacionais ou sua desnaturação. Essa é mais uma combinação da microarquitetura e de composição química da superfície que, espera-se, determine completamente a interação mútua entre o implante e o sistema biológico. Outros fatores são também importantes, como posicionamento do implante procedimento cirúrgico, condições cicatriciais [KASEMO, 2002].

A interação a nível molecular entre a superfície do implante e o tecido, é de primeira importância. As células interagem com a camada de biomoléculas e água que estão ligadas à superfície, e a natureza e propriedades das biomoléculas estão determinadas primariamente pela superfície. A natureza da camada de biomoléculas na superfície determinará como as

células respondem a ela. Conseqüentemente há uma interação célula/superfície mediada pela intervenção das camadas de biomoléculas mais água [KASEMO, 2002].

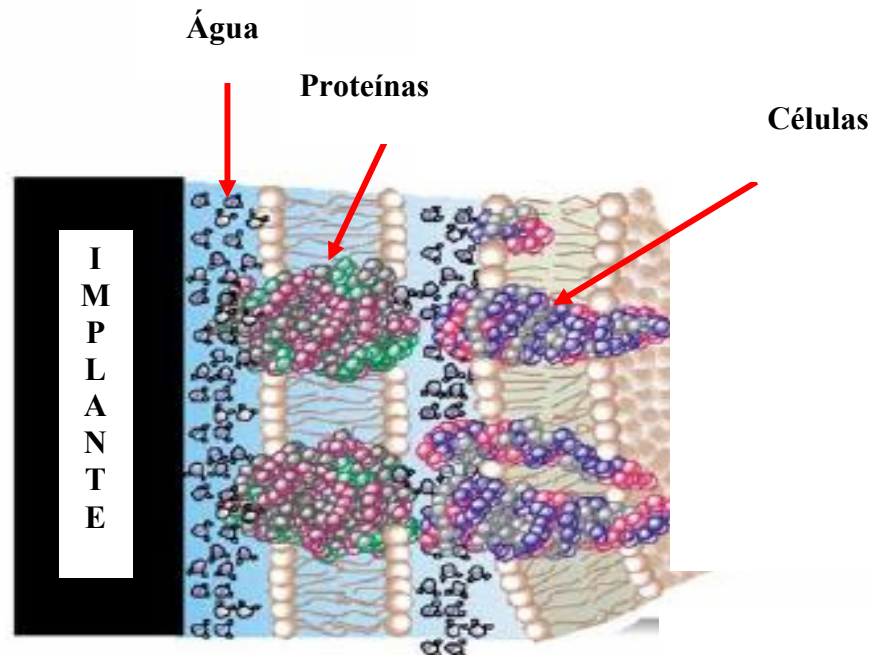


Figura 2.3. Mecanismo da osseointegração. Kasemo 2002

No período inicial após a implantação, haverá essencialmente, água, íons dissolvidos e biomoléculas livres na região mais próxima da superfície, a composição do biolíquido mudará continuamente, conforme o processo inflamatório de cicatrização progrida, o que provavelmente causará mudanças na composição da camada de biomoléculas adsorvidas na superfície do implante durante os primeiros minutos, horas, dias e semanas. Eventualmente células e tecido se aproximaram da superfície e, dependendo da natureza das camadas adsorvidas, respondem de forma específica, podendo ainda modificá-la. Com o tempo, os tipos de células mais próximas às superfícies e suas atividades poderão mudar, dependendo do tipo de interação inicial, assim o resultado final poderá ser a formação de uma cápsula fibrosa ou a osseointegração [KASEMO, 2002]. As propriedades iniciais da superfície do implante determinam de uma forma decisiva, a natureza e as propriedades da camada de água e biomoléculas que eventualmente são adsorvidas nela. Isso influenciará o comportamento das células, quando elas alcançarem a superfície.

Parece que as propriedades físicas e químicas iniciais das camadas atômicas mais superficiais são fatores-chave no processo [THOMAS, 1985]. Os eventos cicatriciais que ocorrem na interface entre o tecido ósseo e o implante e seguem uma seqüência de eventos importantes [HOBBO, 1997]. No início, o corte do tecido ósseo é preenchido por sangue que se

organiza em coágulo. Para que esse coágulo ocorra adequadamente são importantes os aspectos de energia superficial, na distribuição do sangue na superfície do metal, e formação de óxido, pela influência que esta camada externa pode exercer na conformação destas estruturas. A microrrugosidade tem o papel de conduzir a migração de células por sobre a superfície do material biocompatível. Segundo o processo de cicatrização o coágulo sanguíneo é transformado pelas células fagocitárias, como os leucócitos polimorfonucleares, células linfóides e macrófagos. A atividade fagocitária atinge o nível máximo durante o tempo entre o primeiro e o terceiro dia após a cirurgia. Durante este período ocorre a formação do pré-calo, contendo fibroblastos, tecidos fibrosos e fagócitos. O pré-calo se transforma em tecido conjuntivo denso, e células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e fibroblastos. O tecido conjuntivo é chamado de calo, incluindo osteoblastos que aparecem na superfície do implante. Fibras osteogênicas, formadas por osteoblastos, têm um potencial de calcificação. O tecido conjuntivo denso forma então, um calo fibrocartilaginoso, entre o implante e o osso. O osso neoformado penetra e a nova matriz óssea é chamada de calo ósseo. O novo osso amadurece, aumentando em densidade e dureza. Nessa fase, a prótese pode ser apoiada nos implantes, e, sob estímulo, ocorre a remodelação óssea. O osso haversiano calcifica, tornando-se denso e homogêneo [HOBO, 1997]. Os esforços oclusais estimulam o osso circundante a se remodelar, e os implantes osseointegrados podem resistir às funções mastigatórias [BRÅNEMARK, 1985].

2.1.3. Remoção por Torque

Entre os testes que se podem realizar com os implantes colocados no tecido ósseo, situa-se o teste de torque, que consiste em desenroscar um implante com formato de parafuso para medir a força necessária para ocorrer à ruptura da ligação osso-metal. Esse teste, apesar de estar sujeito a variações como a qualidade do tecido ósseo em que o material encontra-se implantado e o módulo de elasticidade do material, proporciona uma avaliação da capacidade mecânica do implante em resistir às forças mastigatórias que serão impingidas ao conjunto implante/prótese dental. Através da avaliação da resistência ao desenroscamento, pode-se ter uma idéia bastante aproximada, não apenas da quantidade de contato osso-metal, mas também da própria resistência do osso hospedeiro às forças mecânicas, em uma simulação do que ocorre durante os esforços mastigatórios [EDUARDO, 2003].

Pesquisadores estudaram o grau de contato ósseo com a superfície do implante e a área óssea dentro da rosca do implante foram medidas em 12 roscas, 6 de cada lado do implante. O número de osteócitos na primeira ou segunda rosca também foi contado. Os torques de remoção dos implantes colocados nas articulações aumentaram com o tempo, enquanto que para os implantes colocados nas tíbias foi quase o mesmo nos três períodos. O torque foi maior para o grupo de implantes colocados nas tíbias, mas a diferença estatisticamente significativa só foi observada no período de 6 semanas.

O torque de remoção para o grupo observado no período de 12 meses foi $35,6 \pm 8,3$ Ncm. Para todos os intervalos de tempo, foi encontrado mais osso e um maior grau de contato ósseo nas roscas dos implantes intra-articulares. Houve diferença estatisticamente significativa nos períodos de 6 semanas e 6 meses, quando comparados os locais de implantação (tíbia e articulação) e entre 3 e 6 meses quando comparou área óssea dentro das roscas. Quando se comparou a área e o contato de osso nas duas roscas situadas na cortical (tíbia) e na subcondral (articulação) foi observado significativamente mais osso nos implantes das tíbias nos períodos de 6 semanas e 3 meses, mas não com 6 meses.

Não foi observada diferença no parâmetro contato ósseo. Foi calculado um quociente para descrever a relação entre dados morfométricos e os valores de torque de remoção. Com relação ao desenvolvimento do torque de remoção (com o tempo), uma melhor correlação encontrada foi com o total de área óssea, do que com o total de osso em contato com o implante. O quociente de remoção por torque e o total da área óssea foi aproximadamente. Os autores concluíram que: (1) não se pode excluir o fato de que as propriedades estruturais e mecânicas na interface diferem quando em contato com o osso cortical e medular, (2) a quantidade e o tipo do osso que circunda o implante influencia o torque de remoção [BREUNER, 1982].

Estudos feitos em 1985 também avaliaram a interface entre osso e implante. Para tanto, implantes cilíndricos de titânio puro foram implantados na tíbia de coelhos, deixados por 3 a 4 semanas e então removidos com trefina, mantendo o osso em volta das fixações. As peças foram desmineralizadas com EDTA e processadas para análise em histologia ótica e eletrônica.

De acordo com os autores, pôde-se identificar uma superfície de metal quase plana e sem sinais de separação com o osso, ao mesmo tempo em que a superfície plástica do material de inclusão não mostrou rachaduras ou defeitos [LINDER, 1985].

Com o objetivo de avaliar o torque necessário para remover implantes ósseos em animais e relacionar os valores de torque ao grau de contato osso-implante, pesquisadores inseriram um total de 50 parafusos de Ti cp fabricados e preparados identicamente ao protocolo usado para implante Brånemark na metáfise tibial de 25 coelhos adultos divididos em 5 grupos de 5 animais, que foram sacrificados nos períodos de 3 semanas, 1, 3, 6 e 12 meses após a colocação dos implantes.

Para estes períodos foram encontrados respectivamente, os valores médios de torque de remoção de 10; 16,8; 68; 77,6 e 88 Ncm. Morfologicamente, os autores encontraram que no período de 3 semanas, o quadro geral era de uma interface fibrosa entre o Ti e o osso, sendo que apenas 20% no máximo de contato ósseo foi encontrado após um mês. Nos períodos de 3, 6, e 12 meses, as porcentagens médias de superfície de metal em contato com o osso foram de 50%, 65% e 85% respectivamente, sendo que apenas as 4 melhores roscas consecutivas foram consideradas. Seus resultados indicaram haver correlação entre as forças crescentes de remoção com crescentes porcentagens de osseointegração dos parafusos ao longo do tempo [JOHANSSON, 1987].

Estudos em 1988 observaram a resistência ao torque de remoção de implantes de Ti cp em forma de parafusos, inseriam em fêmur e na articulação de 5 coelhos um total de 20 implantes. Após 6 semanas da cirurgia os animais foram sacrificados e não havia sinais macroscópicos de reação tecidual adversa em volta do implante. O torque de remoção médio para os implantes rugosos foi de 26,4 Ncm, enquanto que para os polidos este valor foi de 17,2 Ncm. A histologia revelou que cerca de 60% das roscas em ambos os grupos de implantes, estavam em contato direto com o osso, sem tecido mole na interface. Em media a quantidade de osso nas roscas foi de 72%. Havia geralmente, uma interface fibrosa no topo dos implantes, provavelmente devido ao uso excessivo das brocas. Na microscopia óptica não houve diferença clara entre implantes rugosos e polidos com relação ao grau de osseointegração. Os autores concluíram que a rugosidade da superfície do implante é importante na aposição óssea adequada do osso. Implantes com superfícies polidas foram significativamente menos estáveis no osso do que quando foram usados implante com superfície rugosa. Quando se fabrica implantes ósseos, se deve ter um grande cuidado em criar uma superfície adequada, uma estabilidade inicial, para não alterar a osseointegração. [CARLSSON, 1988].

Com a finalidade de estudar o grau de contato ósseo pesquisadores inseriram um total de 104 implantes de Ti cp em tíbias ou fêmur de coelhos (26 animais). Os animais foram sacrificados com 21, 30, 90, 180 e 360 dias após a inserção. Nas datas previstas, os animais foram anestesiados e escolhidos um implante para o teste de torque de remoção e o outro implante foi removido com o tecido circunvizinho para análise morfométrica, com uma broca trefina. Após 21 dias a média do torque necessário para remoção foi de 11 Ncm para tibia e 29 Ncm para o fêmur. 30 dias a inserção dos implantes o valor médio para a tibia foi de 17 Ncm e para fêmur, 31 Ncm. Com 90 dias e média do torque de remoção para tibia era de 68 Ncm e 61 Ncm para fêmur. 180 dias após a inserção dos implantes o valor médio foi de 78 Ncm para tibia e 47 Ncm para fêmur. Para grupo sacrificado com 360 dias após a implantação a média do torque de remoção para tibia foi 88 Ncm. No fêmur a média necessária para torque de remoção foi de 85 Ncm. A microscopia óptica mostrou presença de tecido mole na interface, após 21 dias de inserção. Com 30 dias se observou um pobre contato ósseo com implante. Com 90 dias quantidade média de contato osso/implante foi maior na tibia do que no fêmur. Os Implantes com 180 dias de inserção apresentaram mais osso do que aqueles com 90 dias. Com 360 dias, a tibia e o fêmur apresentaram mais de 90% de contato direto entre osso e implante. Os autores concluíram que, seguramente, o aumento na força necessária para remoção em função do tempo poderia ser explicado pelo aumento na quantidade de osso na interface, isto é, uma explicação qualitativa. Não se pode excluir a possibilidade de uma alteração qualitativa na interface com desenvolvimento gradual de forças físico-químicas entre oxido de Ti e osso [JOHANSSON, 1988].

Pesquisadores se propuserem a estudar o torque de remoção de implante osseointegrados craniofaciais usando parafusos de Ti cp fabricados da mesma forma que os implantes Nobelpharma. Foram inseridos em 10 pacientes 2 implantes no osso temporal. Um implante foi usado para prótese auricular, enquanto o outro foi usado para referido trabalho, no momento da segunda fase cirúrgica (3 a 4 meses após a implantação). Em um paciente o parafuso foi removido com broca trefina para avaliação histológica. A medição do torque foi feita com um torquímetro capaz de medir diretamente a força necessária (em Ncm) para remoção do implante durante a segunda fase cirúrgica. Todos os 20 implantes encontravam-se estáveis quando verificados manualmente com um fórceps. Não havia evidencia de reação tecidual adversa. O torque médio de remoção foi de 42,7 Ncm. A análise histológica revelou um contato direto entre osso e implante.

Não havia evidencia de reação inflamatória no tecido ósseo. Os autores observaram que quando se comparou à média do torque de remoção deste trabalho com outros feitos em animais, havia uma diferença e que o alto torque encontrado em estudos com animais (coelhos) se dá devido ao crescimento ósseo mais rápido que em humanos, e que o osso da tíbia é mais osteogênico que o temporal [TJELLSTRÖM, 1988].

Pesquisadores realizaram 1989 estudos com o objetivo de comparar implantes de Ti cp tratados convencionalmente e com plasma de titânio. Para isto, 84 implantes em forma de parafuso foram inseridos na tíbia e fêmur de 21 coelhos adultos. Em uma das pernas foram inseridos implantes com plasma em Ti, enquanto a outra perna com implantes convencionais serviu como controle. Após 6 semanas os animais foram sacrificados e os implantes foram removidos usando um torquímetro. Os resultados foram muitos semelhantes entre as duas superfícies. Os autores concluíram que o tratamento convencional descrito é suficiente para dar condições superficiais com respostas de cicatrização inicial semelhantes às aquelas observadas nos implantes com plasma de Ti [CARLSSON, 1989].

A relação entre torque de inserção e torque de remoção foi estudado em 1991 por pesquisadores que usaram na primeira parte do estudo 2 ossos temporais obtidos de cadáver fresco. A área cirúrgica foi separada em duas partes, sendo um bicortical e outra unicortical. Foram então inseridos implantes de latão, pois a proposta do estudo foi de observar às características das roscas com ósseas. Os implantes foram inseridos com torques que variam entre 20, 30, 40, 50, 60 e 70 Ncm; imediatamente após a inserção o implante foi desparafusado e o torque de remoção foi medido com o mesmo torquímetro. Na segunda parte do estudo, 3 implantes foram colocados nos processos mastóides de humanos de cadáveres, os quais foram removidos junto com ao implantes e analisados histologicamente. O torque de inserção foi medido no aperto final do implante e o torque de remoção foi medido enquanto a mesma fixação era desparafusada. Os autores observaram que o torque de inserção máximo sem causar fratura nas roscas ósseas foi de 70 Ncm no osso bicortical e 50 Ncm no osso unicortical. O torque de remoção foi sempre menor que o de inserção em todas as medidas, porém houve entre eles correlação positiva. Entretanto, o ponto de fratura nas roscas ósseas foi em média de 77 Ncm em osso bicortical e 57,7 Ncm em osso unicortical. As microfraturas foram observadas principalmente nas roscas da base. Os autores concluíram que se o cirurgião exerce pressão exagerada sobre o implante, uma compressão contínua é adicionada ao osso circundante e especialmente sobre as roscas [UEDA, 1991].

Foram feitos estudos comparativos de torques em 2003 entre superfície jateada com óxido de alumínio e superfície tratada com laser de alta e baixa intensidade. A osseointegração era determinada medindo o torque de remoção nas experiências com coelhos. Segundo os autores o jateamento com óxido de alumínio aumentou ligeiramente o torque de remoção, mas o tratamento a laser aumentou o torque mais significativamente mostrando a influência da morfologia de superfície na osseointegração [KARACSA, 2003]

Ainda em 2003 outro estudo comparou superfícies com ataque ácido (HF, HCl, H₂SO₄) com superfície plasma spray e superfície sem tratamento. Utilizou 40 coelhos, um implante de cada grupo foi inserido em cada metáfise proximal da tíbia por 90 dias. O objetivo do estudo era avaliar diferenças entre os quatro tratamentos através de análises histomorfométricas e remoção por torque. Segundo o autor, embora os implantes de Ti cp sejam recomendados por muitos anos estudos mais recentes recomendam implantes tratados, pois vários testes foram feitos e os implantes tratados mostraram-se melhor ancorado no osso. A aspereza da topografia melhora a osseointegração. Doze semanas depois da colocação dos implantes, a média de torque de remoção era 18,5 Ncm para sem tratamento e 64,7 Ncm o valor maior para implantes tratados [SUNG-AM CHO, 2003].

2.1.4. Adesão celular

A interação osteoblasto (Células ósseas novas) e um biomaterial dependem da topografia, composição química e estrutura da superfície dos materiais. Estas características de superfície determinam como as moléculas biológicas vão adsorver a superfície e, mais particularmente, determinam a orientação das moléculas adsorvidas. Elas também determinam o comportamento celular no contato. Células em contato com uma superfície primeiramente se ligarão, aderem e se espalham. A primeira fase depende das proteínas de adesão, depois a qualidade desta adesão influenciará na sua morfologia, e sua capacidade para proliferação e diferenciação. A comparação do comportamento de diferentes tipos de células mostra que elas reagem diferentemente de acordo com a rugosidade das superfícies. Exame microscópico de células ósseas em materiais com várias rugosidades de superfície em geral demonstraram que o espalhamento das células e formação de camadas de células contínuas era melhor em superfícies lisas comparadas com as rugosas. Isso confirma que não basta à superfície ser rugosa, mas precisa também ser organizada e uniforme [Kasemo, 2002].

Características hidrofóbicas e hidrofílicas de um material são de grande importância para a adesão celular. A adesão celular é geralmente melhor em superfícies hidrofílicas. As células não reagem com o material nem *in vitro* nem *in vivo*. Quando inserido no meio biológico, o material é condicionado pelos componentes do fluido biológico. O pH, composição iônica, energia de ligação, temperatura, grupo funcional de proteínas são fatores determinantes para adsorção protéica. A energia da superfície pode influenciar a adsorção protéica e o arranjo estrutural das proteínas no material. O papel principal das proteínas ósseas é atrair as células ósseas. Quando ocorrem mudanças conformacionais destas devido a superfícies hidrofóbicas e/ou baixa energia superficial, sua afinidade com o receptor da superfície celular das células ósseas é diminuída, atraindo fibroblastos e formando tecido fibroso em torno do material [ANSELME, 2000].

Em estudo feito com osteoblastos humanos cultivados em ligas de Ti com vários graus de rugosidades, observou-se que a adesão ocorria através de contatos focais, deixando clara a importância da composição química da superfície. Comparando a adesão celular entre superfícies rugosas e lisas, os resultados desse trabalho mostraram que nas superfícies lisas os contatos focais foram distribuídos uniformemente em toda a superfície da membrana em contato com o substrato, apesar de ter uma baixa energia de ligação entre os dois. Em superfícies rugosas contatos focais foram visíveis nas extremidades das extensões das células onde a membrana celular estava em contato com o substrato. A formação de numerosas fibras de stress emitida na periferia da célula foi vista em contato com o substrato mostrando uma maior energia de ligação entre a célula e a superfície rugosa e uniforme [ANSELME, 2000].

Pesquisadores avaliaram a aderência celular sobre superfícies de Ti com vários graus de rugosidade. Fibroblastos de ligamento periodontal humano ou osteoblastos da calvária de ratos em meio apropriado foram incubados sobre várias superfícies de Ti por mais de 2 horas. O número de células que não aderiram foi quantificado e a porcentagem de células aderidas foi então calculada. Cultura de tecido em plástico foi usada como controle para aderência celular (CA). Com 15 minutos a CA e os fibroblastos do ligamento periodontal apresentaram índices maiores sobre as superfícies lisas (41%) e menores nas superfícies rugosas (28%). Com 2 horas, a CA foi aproximadamente à mesma para as duas superfícies e o controle (80%). Já para os osteoblastos a resposta foi diferente. Inicialmente, aos 15 minutos, a CA foi à mesma para superfícies lisas ou rugosas (30%). Contudo após 2 horas, a CA para superfícies rugosas (63%) e para o controle (64%) foi significativamente maior do que sobre a superfície lisa. Este trabalho sugeriu que diferentes células do tecido conjuntivo apresentaram respostas

variadas à rugosidade superficial, a qual pode, portanto, influenciar a resposta biológica aos implantes [MICHAELS, 1989].

Estudos avaliaram os aspectos morfológicos da interface osso/metal, usando discos de Ti cp polidos, lavados e passivados por 1 hora em ácido nítrico. Os discos foram colocados em meio de cultura contendo células da medula óssea de ratos adultos jovens. Este trabalho foi realizado para confirmar a possibilidade de estudar os mecanismos de cicatrização da interface em cultura e, de acordo com os autores, os resultados demonstraram claramente que tecido semelhante ao osso pode crescer sobre discos de Ti cp [DAVIES, 1990].

No início dos anos 90 pesquisadores estudaram a influência da rugosidade superficial de superfícies de titânio com relação à aderência de células osteoblásticas. Discos de Ti c foram preparados de maneira a produzir superfícies regular e irregular. Os espécimes com morfologia irregular foram polidos usando papel metalográfico de granulação 600 e a seguir jateados com Al_2O_3 em partículas de 50 μm ou condicionai por ataque ácido com HF 3,5%/HNO₃ 25% por 1, 5 ou 10 minutos. As superfícies com morfologias regulares foram produzidas usando papel metalográfico de granulação 60 ou 120. O grupo controle foi polido usando papel de granulação 600 para fazer a medida da rugosidade no perfilômetro. Todos os espécimes foram limpos com solvente, lavados em água destilada, passivados com ácido nítrico e submetidos à lavagem final com água destilada, para então serem secos a vácuo. A partir daí foram esterilizados pela exposição à luz ultravioleta por 30 minutos. Para obtenção dos dados foram usados perfilômetro para avaliar a rugosidade superficial, meio de cultura com células da calvária de ratos para verificar a adesão células e SEM para determinar as características morfológicas das células em função das várias superfícies e intervalos de tempo. Os resultados sugeriram que o tipo de rugosidade produzida sobre superfície de Ti cp afeta a resposta biológica inicial tal como a aderência celular. A superfície irregular produzida pelo jateamento pareceu ser mais condutiva para a aderência celular do que a superfície rugosa produzida pelo polimento/lixamento ou ataque ácido. Níveis significativamente mais altos e aderência celular foram encontrados nestas superfícies jateadas [BOWERS, 1992].

2.1.5. Cultura de Células

O advento da osseointegração, fenômeno descrito por Brånemark no final dos anos 60, refletiu em avanços notáveis na reabilitação de pacientes com perdas dentárias. Ao descrever

a possibilidade de integração entre um material metálico e o tecido ósseo, o pesquisador sueco lançou as bases de uma das áreas mais estudadas pela comunidade odontológica.

Dentre os fatores importantes para a obtenção de sucesso na osseointegração, as superfícies do implante têm sido relatadas com destaque sobre as demais. Superfícies com textura são conhecidas por acelerar a fase de cicatrização inicial, devido a maior adsorção de proteínas, acúmulo e ativação de plaquetas e retenção de fibras, promovendo aposição óssea em menores períodos de tempo [KASEMO, 2002].

À medida que algumas publicações passaram a acusar fracassos significativos dos implantes com superfícies lisas, quando instalados em maxila com pouca altura de rebordo alveolar e com baixa densidade óssea (osso tipo IV), incrementou-se a pesquisa e o desenvolvimento das superfícies texturizadas. Propriedades de superfície significam propriedades físicas e químicas como: composição química, grau de contaminação, energia de superfície, resistência à corrosão, rugosidade, e tendência a desnaturar proteínas. Alterações nas propriedades de superfície dos implantes afetam significativamente seu desempenho in vivo [KASEMO, 1988].

A compreensão da relação existente entre os fatores mecânicos e biológicos relacionados à osseointegração é determinante do sucesso clínico no tratamento com implantes osseointegrados. Estudos histológicos e histomorfométricos demonstram que implantes com superfícies rugosas apresentam maior percentual de contato ósseo, em períodos mais curtos de tempo, quando comparados aos implantes de titânio com superfície lisa ou usinada [CORDIOLI, 2000].

O desenvolvimento de novas superfícies por meio de técnicas de adição ou subtração é hoje um ponto fundamental no desenvolvimento de materiais, notadamente do titânio, com a finalidade de obter melhores resultados clínicos [SILVA, 2005].

Dentre as etapas pré-clínicas da criação de uma nova superfície, os ensaios com cultura de células proporcionam um ambiente semelhante ao fisiológico com as vantagens de se poder controlar fatores bioquímicos, determinar a citotoxicidade do material e a expressão fenotípica do tipo celular investigado. A osteogênese induzida por osteoblastos é caracterizada por uma seqüência de eventos envolvendo adesão celular, proliferação de células acompanhadas por expressão do fenótipo do osteoblasto evidenciado pela atividade de fosfatase alcalina, deposição de proteínas ósseas e formação de osso mineralizado [DELIGIANNI, 2001].

Investigação sobre a biocompatibilidade do Ti cp submetido a diferentes superfícies utilizando culturas primárias de osteoblastos de fêmur de ratos em 2003 foi avaliada. A adesão celular foi avaliada em períodos de 4 e 24h após o plaqueamento das células enquanto a proliferação foi observada após 7, 14 e 21 dias de cultivo. A confirmação do fenótipo celular foi descrita em termos de atividade de fosfatase alcalina, deposição de tecido ósseo e expressão de proteínas ósseas. A análise da superfície à microscopia eletrônica de varredura revelou diferentes topografias embora à rugosidade média não tenha apresentado diferenças significativas. As células mantiveram um padrão morfológico em todas as superfícies, seguindo a orientação da topografia. A proliferação celular foi maior em 21 dias com diferença significativa na primeira semana, sugerindo que a proliferação seja mais intensa na fase inicial do processo, independente do tipo de superfície [XAVIER, 2003].

Pesquisas avaliaram o efeito da topografia de implantes de hidroxiapatita na resposta de osteoblastos de ratos. A adesão celular foi avaliada em cinco amostras de cada grupo duas horas após o plaqueamento enquanto a proliferação foi investigada após sete e quatorze dias. Todas as amostras apresentaram micro porosidades menores que $5\mu\text{m}$. A adesão celular não sofreu influência da superfície embora a proliferação tenha sido maior na primeira semana do experimento. A atividade de fosfatase alcalina, formação de nódulos ósseos e a deposição de proteínas ósseas foi maior para implantes com HA sugerindo que esses eventos sejam favorecidos por superfícies com topografias mais regulares como a presente na hidroxiapatita com 15% ou menos de microporosidade. [ROSA, 2003].

Estudos em 2003 observaram o efeito da rugosidade de superfície de Ti cp jateados com partículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) de 25, 75 e 250 μm , na resposta de células de osteoblastos humanos. Foram utilizados discos de titânio de 12 mm de diâmetro por 4mm de altura. O jateamento originou superfícies com rugosidade média de 1.69, 1.83 e 1.91 μm respectivamente demonstrando uma clara relação entre rugosidade e tamanho da partícula de Al_2O_3 . A adesão celular e a deposição de nódulo mineralizado não foram afetadas pelo tipo de superfície enquanto a proliferação e quantidade de proteínas foram dependentes da rugosidade da superfície. Os resultados obtidos sugerem que superfícies mais rugosas interferem em parâmetros de células mais diferenciados tais como aumento na fosfatase alcalina e redução na proliferação celular [ROSA, 2003].

Pesquisadores investigaram *in vitro*, o efeito da passivação com ácido nítrico na biocompatibilidade do titânio. A passivação teoricamente produz uma superfície mais inerte pelo aumento na espessura da camada de óxido. Foram avaliados discos de Ti cp e TiAl_6V_4

polidos com lixas de SiC de granulações crescentes de 280 a 2400. As superfícies foram passivadas em solução de HNO₃ a 34%. As amostras foram cultivadas em osteoblastos de ratos. Os resultados demonstraram a passivação não apresentou nenhum efeito nos parâmetros de biocompatibilidade avaliados [FARIA, 2003].

Estudos em 2003 compararam o efeito da composição química e da rugosidade superficial de diferentes superfícies de Ti cp e TiAl₆V₄, na resposta de osteoblastos de ratos. As amostras foram jateadas com partículas de óxido de alumínio (Al₂O₃) de 25, 75 e 250µm ou lixadas com SiC de 280 a 1200. Os resultados demonstram que partículas de diferentes tamanhos produzem superfícies com diferentes rugosidades. A Rm aumentou gradualmente da superfície polida para a superfície jateada embora não tenha havido diferença entre o Ti cp e liga para o mesmo tipo de tratamento. A proliferação celular sofreu influência da composição química da superfície sendo o Ti cp mais favorável à proliferação celular. Os estudos realizados demonstram que os materiais investigados, independentes das rugosidades superficiais, permitiram a adesão e proliferação celular assim como a diferenciação dos osteoblastos. Os resultados foram capazes de identificar comportamentos semelhantes em relação à morfologia da célula que parece não sofrer influência direta da superfície embora tenha seu crescimento orientado pela topografia além de confirmar a biocompatibilidade favorável do titânio como material para uso biomédico [ROSA, 2003].

Em um estudo investigativo a relação entre superfícies de Ti cp e TiAl₆V₄ e a adesão de osteoblastos de ratos foi avaliada. O estudo estabeleceu a correlação entre a rugosidade de superfície com a adesão celular em amostras de Ti cp e TiAl₆V₄ revestidas com polímeros. As amostras foram tratadas com jateamento, lixamento e jateamento com ataque ácido. Observou-se que o ataque ácido reduz o efeito dimensional da rugosidade em ambas as superfícies embora o Ti cp seja menos reativo enquanto a liga é mais resistente ao jateamento. A profilometria indica um efeito maior do ataque ácido sobre o Ti cp, aparentemente por exibir uma distribuição de defeitos microporosos por uma extensão maior da superfície. A adição do revestimento alterou a topografia original da superfície à exceção do hidrogel de alginato de sódio que preservou adequadamente a rugosidade. A adesão foi homogênea em superfícies com ataque ácido enquanto houve diminuição nas superfícies revestidas. Os autores concluíram que a adesão não depende da natureza do substrato, mas do quanto o revestimento pode manter a topografia original, ao menos em parte [BAGNO, 2004].

2.2. Aspectos Tecnológicos

2.2.1. Nitretação Iônica

Nos últimos anos tem-se observado um grande crescimento de técnicas de tratamento de superfícies que são ambientalmente limpas. Dentre elas está a nitretação iônica, que consiste na nitretação de superfícies metálicas quando inseridas em plasma de nitrogênio. Além dos fatores ambientais, várias são as vantagens desta técnica sobre as convencionais. As mais importantes são: baixa temperatura de tratamento, melhor controle da espessura da camada, tempo de tratamento inferior, uniformidade na espessura da camada, nitretação de partes da peça, mais economia [ALVES Jr, 1985].

Para um melhor entendimento do processo de nitretação iônica, serão abordados conceitos importantes relacionados com o plasma, meio no qual é realizada a nitretação iônica.

2.2.2. Plasma

O termo “plasma” se aplica a um gás contendo espécies neutras e eletricamente carregadas como elétrons, íons positivos, íons negativos, átomos e moléculas [ROSSNAGEL, 1989]. Na média, um plasma é eletricamente neutro porque qualquer desbalanceamento de carga resultará em campos elétricos que tendem a mover as cargas de modo a restabelecer o equilíbrio. Como resultado disso, a densidade de elétrons mais a densidade de íons negativos, deve ser igual à densidade de íons positivos. As cargas livres no plasma podem mover-se em resposta a qualquer campo elétrico e neutraliza-lo. Se uma carga qualquer é inserida num plasma ou um campo é imposto, produzindo um potencial V_0 , as cargas livres, compostas de elétrons na grande maioria, se moverão formando uma blindagem elétrica, denominada blindagem de Debye [ALVES Jr, 1985].

Em laboratório ele pode ser produzido através da aplicação de uma diferença de potencial entre dois eletrodos. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre dois eletrodos, contidos num sistema hermeticamente fechado e a uma pressão suficientemente baixa, elétrons e íons são acelerados pelo campo elétrico, colidindo com outras partículas e produzindo assim mais íons e elétrons através da seguinte combinação [HOWATSON, 1965]:



Onde G^0 é o átomo ou molécula do gás no estado fundamental e G^{+} representa um íon deste gás. Devido a essa produção de cargas, uma corrente elétrica é gerada que varia com a diferença de potencial entre eletrodos. O cátodo é a região mais importante no estudo da nitretação iônica porque é nele onde se desenvolve a maioria dos eventos responsáveis pelas características da camada nitretada. Dentre estes eventos, destaca-se o Sputtering da superfície, a dissipação de calor pelo bombardeio das partículas, criação de defeitos na rede cristalina do cátodo (peça), deposição de nitretos, adsorção e a difusão de nitrogênio [CHAPMAN, 1980], [EDENHOFER, 1974]. Quando um íon energético colide com a superfície do cátodo, ele produzirá Sputtering dos átomos contaminantes ou da superfície do cátodo. Ele pode também ser refletido pela superfície como íon de alta energia (colisão elástica) ou como uma partícula neutra.

2.2.3. Taxa de Sputtering

O Sputtering é definido como um processo de desarranjo e ejeção de átomos da superfície de um sólido devido à troca de momento associado com o bombardeamento da superfície por partículas energéticas [HUDIS, 1973]. Para haver Sputtering na superfície de um material, é necessário que a espécie incidente possua uma energia maior ou igual à energia de ligação do átomo na superfície (energia de sublimação). O número de átomos ejetados por íon incidente é definido como a taxa de Sputtering, $Y(E)$. Várias tentativas foram feitas no sentido de prever a taxa de Sputtering teoricamente, mas, devido a grande dependência da mesma com o estado em que se encontra a superfície bombardeada (orientação cristalográfica, contaminação, topografia, etc), torna-se difícil tal previsão. O modelo de Sigmund é hoje o que mais se ajusta aos dados experimentais para superfícies monoelementares, livre de contaminação e com incidência normal das espécies incidentes. De acordo com Sigmund, a taxa de Sputtering para íons com energias inferiores a 1 keV é dada por [AHMED, 1987]:

$$Y(E) = \frac{3\alpha'}{4\pi^2} \frac{4M_i M_t}{(M_i + M_t)} \frac{E}{U_0} \quad (3)$$

Onde M_i é massa do íon incidente; M_t é a massa do átomo do alvo; E , a energia do íon incidente; U_0 é a energia de ligação dos átomos da superfície e α' uma constante de proporcionalidade.

Esta expressão para $Y(E)$ prediz que a taxa de Sputtering aumenta linearmente com a energia do íon incidente. Em termos gerais, a taxa de Sputtering depende das massas relativas dos átomos dos projéteis e do alvo (catodo), da energia das partículas incidentes, da estrutura e orientação cristalográfica do alvo, do material do alvo, do ângulo de incidência das partículas, da morfologia da superfície e da pressão do gás de trabalho.

Para bombardeamento entre sólidos multielementares e não-metals e/ou bombardeamento com íons que reagem quimicamente com os átomos da superfície bombardeada, o Sputtering é influenciado por vários processos [BETZ, 1983]. Para superfícies com diferentes elementos químicos, observa-se um Sputtering preferencial, isto é, a taxa de Sputtering parcial das diferentes espécies não é proporcional à sua concentração atômica na superfície. Como consequência disto, a concentração na superfície de um alvo virgem é modificada durante o bombardeamento até que uma concentração de equilíbrio seja estabelecida, com taxas de Sputtering proporcionais às concentrações atômicas relativas. Vários processos podem contribuir para o Sputtering preferencial. Em colisões elásticas em cascata, a energia não é distribuída igualmente entre as diferentes massas atômicas do sólido. Os átomos mais leves são preferencialmente arrancados em relação aos átomos mais pesados. Também o Sputtering preferencial é influenciado pelas diferenças nas energias de ligação dos diferentes átomos da superfície. Vários trabalhos enfatizam este efeito, assim como os parâmetros que o influenciam para diferentes ligas e compostos [BETZ, 1983], [HARPER, 1992] e também alguns modelamentos matemáticos já foram testados na tentativa de prever a concentração final das espécies na superfície do alvo [HAFF, 1976; WINTERS, 1969]. O estudo do Sputtering de alvos multielementares é de grande importância em todos os processos de deposição por plasma, uma vez que é através dele que se pode obter um filme uniforme ou mesmo selecionar alguns materiais de interesse durante a deposição.

Para o caso de não-metals, a taxa de Sputtering é normalmente diferente daquela esperada utilizando a teoria da colisão. Enquanto a taxa para óxidos pode ser menor ou ligeiramente maior que a esperada, para cristais iônicos, gases condensados ou materiais como enxofre a taxa experimental é consideravelmente maior [KELLY, 1989]. Neste caso, além da energia transferida para o alvo por colisões elásticas, também a energia é transferida para os elétrons produzindo excitação e ionização que podem contribuir para o deslocamento atômico. Dependendo do material e de sua temperatura, estados de excitação podem ter uma vida média suficiente para transferir sua energia para o movimento atômico e causar o Sputtering na superfície.

O Sputtering químico envolve a reação de uma espécie neutra excitada ou ionizada do gás com a superfície para formar compostos voláteis [BEHRISCH, 1983]. Quando alvos contendo ânions reativos como Cl^- e F^- são submetidos ao Sputtering, alguns destes anions são arrancados como íons secundários e são acelerados para o substrato onde uma reação química pode ocorrer.

Geralmente a remoção de átomos de uma superfície por Sputtering não ocorre uniformemente sob a área bombardeada. Assim, durante o Sputtering, a superfície desenvolverá uma topografia que é totalmente diferente daquela do estado original.

Numa superfície lisa monocristalina, pequenos traços de impurezas ou defeitos da superfície podem causar diferenças locais na taxa de erosão. Para uma superfície policristalina, as diferentes taxas de Sputtering devidas aos componentes e orientações cristalográficas dos grãos fazem com que a topografia original da superfície também seja modificada [BEHRISCH, 1983].

2.2.4. Dissipação de Calor

Quando partículas bombardeiam uma superfície, uma grande parte da energia destas partículas é transferida em forma de calor. Noventa por cento da energia das partículas incidentes, é perdida sob forma de calor para o aquecimento do alvo [AHMED, 1987]. Parte dessa energia é absorvida para aquecer o catodo enquanto outra parte é dissipada por radiação, convecção ou condução para as paredes e o meio de reação. O calor total liberado, Q_t , pelas espécies neutras ou ionizadas, para a superfície do catodo, é dado por [RUSSET, 1991]:

$$Q_t = mc\Delta T + Q_c + Q_{cv} + Q_r \quad (4)$$

onde a primeira parcela do lado direito da equação é o calor necessário para aquecer o catodo. As demais parcelas são devido à dissipação de calor para as paredes da câmara e o meio de reação, por condução, convecção e radiação, respectivamente. A eficiência do aquecimento do catodo é dada por [PETITJEAN, 1982]:

$$\eta = \frac{Q}{W} \quad (5)$$

onde Q é a quantidade de calor perdida para o aquecimento do catodo e W é a potência fornecida pela descarga. A potência fornecida é dada pelo produto da voltagem aplicada entre os eletrodos e a corrente que passa através dos mesmos. Ela dependerá da pressão total dos gases, da pressão parcial, do tipo de gás e do alvo (cátodo).

2.2.5. O Processo de Nitretação Iônica

O processo conhecido como nitretação iônica (ion-nitriding), nitretação em descarga luminosa (glow discharge nitring) OU NITRETAÇÃO POR PLASMA (PLASMA NITRING), FOI PATENTEADO EM 1931 POR J.J Egan nos EUA e em 1932 por Berghaus na Alemanha, mas somente em 1960 teve início o seu uso comercial [SANTOS, 1987], [KURNEY, 1986]. No Brasil a técnica ainda não é muito conhecida tanto no meio empresarial como também entre metalurgistas e engenheiros de materiais, ficando sua divulgação restrita aos resultados de pesquisas desenvolvidas em universidades.

As Universidades pioneiras no Brasil, nesta área, iniciaram suas pesquisas entre 1985 a 1986. Enquanto que a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) dedicaram-se mais a pesquisa aplicada como o aspecto microestrutural e mecânico da camada formada, a Universidade Federal de Santa Catarina preocupou-se mais com o aspecto teórico como o diagnóstico do plasma e a influência das espécies sobre o mecanismo da nitretação. Mais recentemente, em 1991, construiu-se e instalou-se na Universidade Federal de São Carlos um equipamento para nitretação iônica com plasma pulsado.

Um equipamento típico de nitretação iônica é constituído basicamente de um sistema de vácuo, uma fonte de potência e um reator. O esquema de vácuo deve ser capaz de atingir em torno de 10^{-2} torr de pressão e possuir válvulas para controlar a vazão dos gases introduzidos para o tratamento. A fonte de potência possui uma saída CC, com voltagem máxima de aproximadamente 1500V, e uma corrente capaz de fornecer energia à peça para que ela seja aquecida a uma temperatura entre 300 e 700° C [ALVES Jr 1995], [ALVES Jr 1991]. No reator estão dois eletrodos onde o catodo é também o porta amostra. Ainda no reator devem existir saídas para medida da pressão, temperatura e outras variáveis desejadas para o melhor controle do processo. Devem ter ainda entradas para a atmosfera nitretante, bomba de vácuo e outros acessórios que sejam necessários para a nitretação da amostra.

O processo consiste em expor superfícies metálicas a um plasma nitretante, o qual é gerado devido a uma diferença de potencial entre dois eletrodos. Esses eletrodos estão contidos num reator hermeticamente fechado, onde é introduzida a atmosfera nitretante (tipicamente uma mistura de N_2 20%- H_2) a uma pressão entre 1 e 10 mbar. Os íons criados devido a essa diferença de potencial, em torno de 600V bombardeiam a superfície da peça presa ao cátodo, aquecendo-a até a temperatura de trabalho.

Para pressões baixas, a descarga possui um brilho de cor rósea de pequena intensidade que é característico do material do cátodo (geralmente aço) e do gás. À medida que se aumenta mais a pressão, este brilho vai ficando mais intenso e mais localizado em torno do cátodo, até que se atinge uma condição de descarga propícia para a nitretação.

Nestas condições, o plasma já está revestindo completamente o cátodo e a peça a ser nitretada. Os íons deste plasma estão sendo acelerados para a superfície do cátodo onde diversos efeitos ocorrem, dentre eles o aquecimento da peça devido ao bombardeamento pelos íons [EDENHOFER, 1974]. A partir daí, é contado o tempo de duração do processo. Após este tempo, a fonte é desligada e a peça é deixada resfriar naturalmente.

2.2.6. Nitretação em Cátodo Oco

Uma extensão do processo de nitretação iônica é a nitretação em cátodo oco (HCD). Este método consiste em nitretar a peça numa atmosfera altamente ionizada. A alta ionização é conseguida porque os elétrons no plasma são obrigados a refletirem sucessivamente entre duas superfícies catódicas [ALVES JR, 2005]. A Figura 5 ilustra esta situação. Elétrons são repelidos pelo cátodo central que pode ser a peça que se deseja nitretar em direção aos cátodos externos. Ao se aproximarem destes, são também repelidos realizando, assim, um movimento de zig-zag que aumentará a taxa de ionização da região em questão.

Uma alta densidade de íons significará maior bombardeamento na superfície, ocasionando uma alta incidência energética. Esta configuração de eletrodos é utilizada quando se deseja aumentar o dano superficial, ou seja, para uma mesma temperatura de processo, produzem-se mais defeitos na superfície que na nitretação iônica convencional.

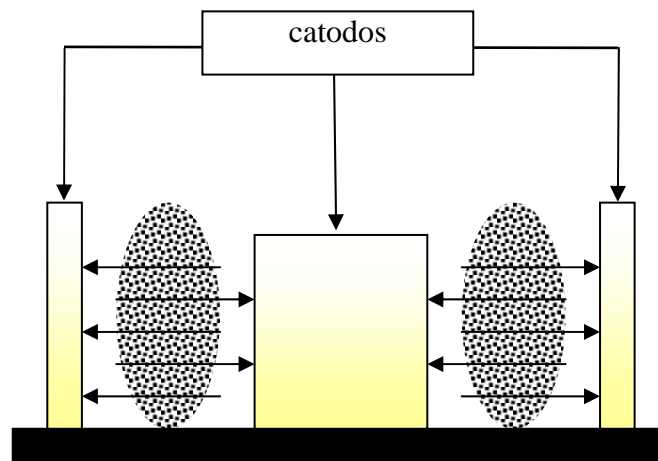


Figura 2.4. Desenho esquemático de uma amostra na nitretação em cátodo oco.

2.2.7. Nitretação do Titânio

Os nitretos de titânio caracterizam-se pela combinação de algumas propriedades das cerâmicas: alto ponto de fusão (3160-3250°C), alta dureza (2500-3000 HV), estabilidade térmica e química, resistência ao desgaste e à corrosão, com algumas propriedades metálicas tais como baixo coeficiente de atrito e alta condutividade térmica e elétrica [FOUILLAND, 1998], [MEZGER, 1992]. Há vários nitretos de titânio, sendo que a literatura refere com mais frequência o TiN e o Ti₂N.

Suas propriedades são exploradas na produção de componentes mecânicos, no aumento da vida útil de ferramentas de corte e na tecnologia da micro-eletrônica. Sua semelhança em cor com o ouro amarelo é considerada uma qualidade importante já explorada em relojoaria e tendo seu uso sugerido no revestimento de superfícies metálicas de próteses odontológicas. O interesse da comunidade acadêmica é crescente em relação a estes compostos. Nos últimos 10 anos, a odontologia, ortopedia e cardiologia têm investigado suas propriedades de resistência superficial e biocompatibilidade. A nitretação em plasma não é a única maneira de obtenção de nitretos de titânio. Revestimento de nitreto de titânio em especial TiN podem ser introduzidos sobre superfície do titânio ou aço inox com outros métodos como CDV e PDV.

Pesquisas sobre técnicas relatam que a nitretação em plasma e a carbonitretação são as técnicas de difusão com plasma mais usadas nas indústrias para o tratamento superficial de peças mecânicas. O conceito básico no uso da implantação iônica para melhorar as propriedades superficiais de uma liga de titânio é fundamentado na possibilidade de formar nitretos ou carbeto abaixo da superfície da liga. Os nitretos e carbeto de titânio são materiais

duros que melhoram as propriedades tribológicas da superfície, ou seja: aumentam a resistência ao desgaste e a dureza superficial [YILBAS, 1996].

O interesse pela aplicação de técnicas de modificação de superfície, especialmente a superfície do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V pela medicina remonta à década de 1980. A liga Ti-6Al-4V é extensamente utilizada em prótese de joelho e fêmur desde a década de 1970. Ao longo dos anos 80 houve a constatação da falha em condições assépticas, de próteses de joelho e fêmur após longo período de uso. A inspeção dos tecidos que circundavam estas próteses que falharam mostrou-os com uma coloração enegrecida. Este fenômeno foi creditado ao desgaste superficial do titânio e do polietileno que compõem a prótese. O atrito entre os componentes devido ao uso desgastou a superfície dos mesmos e danificaram a camada protetora superficial de óxidos do titânio, fazendo com que partículas dos três componentes da liga e do polietileno se dispersassem nos tecidos. Embora não tenha sido ligado nenhum efeito tóxico sistêmico frente à presença destes elementos enegrecidos, sua presença levou à mobilização de células inflamatórias especialmente macrófagos que geraram a osteólise e perda asséptica dos implantes. Houve um consenso no sentido da necessidade de um tratamento superficial que reduzisse a baixa resistência ao atrito desta liga, preservando suas qualidades [JOHANSSON, 1993], [WANG, 1996], [SOVAK, 2000].

Vários métodos capazes de gerar nitretos de titânio na superfície do mesmo e de suas ligas foram então investigados. Observou-se na literatura disponível que o modelo de pesquisa predominante compara as propriedades tribológicas do Ti cp titânio c.p. e a liga Ti-6Al-4V com e sem tratamento superficial. Vários métodos sofisticados de análises são amiúde encontrados nestes estudos, com a difratometria de raios-X (XDR) e reação de análise nuclear (NRA).

Investigaram as propriedades tribológicas e mecânicas de amostras de Ti-6Al-4V submetidas ao processo de nitretação em plasma nas seguintes condições: temperatura de 450 °C a 520 °C, tempo 15 a 20 horas, voltagem 400 V a 700 V em pressão 3,4 a 3,9 torr, mistura gasosa H₂-N₂ (1:8). Foi realizado um teste de pino-sobre-disco para verificar a resistência ao desgaste, bola-sobre-disco para avaliar o coeficiente de fricção. Foram realizados testes de micro-dureza e as fases criadas na zona nitretada bem como avaliadas através MEV e XDR. As conclusões foram as seguintes: a concentração atômica de nitrogênio diminui com o aumento da distância relativa à superfície, mas aumenta com a temperatura, já que o raio de difusão do nitrogênio aumenta quando a temperatura da superfície e do substrato aumenta. A nitretação em plasma diminui o coeficiente de fricção, mas este aumenta abruptamente quando se rompe a resistência ao desgaste superficial.

A micro-dureza mostrou variação similar no processo de nitretação, ou seja, ao aumentar a temperatura durante o processo há aumento conseqüente na micro-dureza. Os autores referem que após um pequeno tempo de nitretação a superfície é levemente amarelada, aumentando-se o tempo este se torna dourada e com longo tempo de nitretação como 30 horas a superfície da amostra tornou-se escura. Nos difratogramas os picos de nitrogênio são mais evidentes em temperaturas mais altas [YILBAS, 1996].

Nitretaram amostras de Ti-6Al-4V e Ti-5Al-2,5Fe com o objetivo de incrementar as pobres características de resistência à abrasão e dureza superficial destas ligas. Os parâmetros operacionais foram: tempo de nitretação de 14 horas, temperatura de 700°C, 800°C, e 900°C, voltagem de 550 V, 350V e 650 V, pressão de 6000 Pa, 100 Pa e 350 Pa. Com o objetivo de aumentar a camada externa de TiN às amostras foram recobertas com TiN através de PDV após a nitretação. As camadas obtidas foram caracterizadas em termos de microestrutura, composição das camadas, dureza e verificação do perfil de distribuição do nitrogênio na superfície, produziu um arranjo de camadas junto à superfície das ligas compostos por TiN, Ti₂N, Ti₂AlN e uma fase de nitrogênio nas duas ligas. A espessura das camadas de TiN e Ti₂N (aumentou) com temperatura, voltagem e a pressão do gás. O uso de PDV após a nitretação incrementou esta camada superficial em 2.1 micros. A resistência à corrosão das amostras tratadas foi similar as não tratadas. Os autores referem que a alta resistência à corrosão das ligas de titânio é creditada a camada de óxido que se forma espontaneamente em presença de oxigênio. No entanto, esta camada pode ser destruída pela corrosão devido aos micro-movimentos entre o implante e os tecidos, levando à formação de tecidos de granulação. Constatando com as ligas não tratadas, a alta resistência à corrosão do TiN combinada com a alta resistência à abrasão previne este tipo de dano [RIE, 1995].

Em estudos referente ao processo de CDV para a obtenção industrial de coberturas de TiN é usado há mais de 20 anos, porém a alta temperatura exigida no processo (1000°C) não é adequada às ligas odontológicas. Já a obtenção de TiN através de PVD exige o aquecimento do substrato a temperaturas que variam entre 200 e 500°C, tornando possível seu uso em Odontologia. A coloração da cobertura é dependente da quantidade de gás Nitrogênio presente durante o processo [MEZGER, 1992].

Testaram a nitretação em plasma na superfície de espátulas de inserção de resinas tentando solucionar o problema de aderência do material restaurador à mesma quando está sendo inserido na cavidade. O resultado do trabalho mostrou o aumento da resistência superficial das espátulas, mas não impediu a aderência de resina [STEELE, 1991].

2.3. Biocompatibilidade do Nitreto de Titânio

Foi demonstrado que os fatores que afetam a resposta celular e tecidual frente aos biomateriais utilizados em implantes dentais são classificados como fatores temporais e espaciais. Os primeiros referem-se à seqüência de acontecimentos após a colocação de um implante que envolve a adesão, migração e diferenciação celular. Em termos espaciais um implante deve propiciar a formação de uma interface entre o tecido ósseo e os tecidos moles que permita o desenvolvimento e manutenção da estabilidade biomecânica e um selamento que impeça a infecção microbiana que pode levar a periimplantite. Esse autor relata que a superfície do material a ser implantado é tão importante para a biocompatibilidade que está levando ao surgimento de uma nova engenharia denominada “de tecidos” (sic), especialidade dedicada à pesquisa de formas de tratamentos superficiais que aperfeiçoem as respostas celulares e teciduais frente ao contato com um dado material [KELLER, 1988].

Foram discutidas as mudanças que ocorrem em termos da definição de biocompatibilidade e exigências a um material biocompatível. Antigamente, no passado recente, era fundamental que o material a ser implantado fosse quimicamente puro, conseqüentemente “inerte”, e tivesse boas características físico-mecânicas. O termo biocompatível era aplicado a um material que preenchesse principalmente essas características. Atualmente temos que considerar que há papéis de extremo dinamismo a serem cumpridos pelos novos materiais de alta tecnologia. Há necessidade de uma controlada reatividade com o meio biológico e a superfície (considerada como uma camada de alguns microns) não precisa exibir as mesmas características do núcleo de um aparato implantado. Segundo estes autores biocompatibilidade é mais bem definida como “uma coleção de fenômenos associados às interações entre os biomateriais e o ambiente fisiológico que permita a coexistência de ambos”. Os termos às vezes são utilizados com um sentido muito restrito e preciso e em outras vezes é colocado de forma excessivamente abrangente [WILLIAMS, 1981].

O Ti cp tem a sua biocompatibilidade creditada à camada de óxidos que se forma em sua superfície em contato com o ar. As alterações superficiais causadas pela formação de nitretos de titânio, através do uso de técnicas como CDV, PDV implantação iônica e nitretação em plasma têm levado ao desenvolvimento recente e progressivo de pesquisas que investigam suas propriedades biológicas.

O nitreto de titânio é considerado pela Food and Drugs Administration, como um material biologicamente inerte e adequado ao uso em implantes de titânio e suas ligas [SOVAK, 2000].

Estudos foram realizados comparando a reação do tecido ósseo de coelhos frente à colocação de implantes de Ti c.p. e da liga Ti-6Al-4V e destes materiais após a modificação superficial por implantação iônica de nitrogênio. O estudo mostrou que a área de contato de tecido ósseo com os implantes não apresentou diferenças entre as amostras tratadas e não tratadas, e a área total de tecido ósseo formado em torno dos implantes também não apresentou diferenças. Os autores ressaltam que o tratamento dado aos implantes antes de sua colocação pode interferir em estudos que avaliam biocompatibilidade. Neste caso os implantes foram autoclavados previamente à cirurgia. Segundo estes autores implantes de Ti c.p. e Ti-6Al-4V tratados sem implantação iônica de nitrogênio cicatrizam de maneira similar às amostras não tratadas. Adicionalmente foi realizada a caracterização superficial das amostras que avaliadas sem MEV mostraram-se similares [JOHANSSON, 1993].

A capacidade de síntese protéica e a expansão fenotípica de osteoblastos e fibroblastos são fundamentais em um processo de osseointegração. As alterações destas características fornecem informações importantes a respeito da biocompatibilidade de um material a ser implantado. Avaliaram estas características em amostras de Ti6Al-4V e Ti-15Al-2,5Fe nitrados em plasma. Os autores consideram que o metabolismo celular e a síntese protéica mantiveram-se preservados. Houve uma pequena diminuição na viabilidade e na população celular nas amostras tratadas. O fenótipo dos osteoblastos foi mantido e os fibroblastos em amostras tratadas mostraram grande quantidade de colágeno intracelular [RIE, 1995].

Pesquisas sobre nitretação relatam que o Titânio e a liga Ti-6Al-4V são limitados em relação ao desgaste superficial por abrasão e adesão quando comparados às ligas de Co-Cr-Mo. Os autores também comentam algumas limitações dos métodos de nitretação, especialmente do PVD, que teria limitada adesão ao substrato e espessura muito pequena. Os autores desenvolveram um método de modificação de superfícies denominado de powder immersion reaction assisted coating (PIRAC) através do qual é possível a formação de TiN com maior espessura e aderência do mesmo ao substrato. Adicionalmente o método é adequado ao uso em componentes de formato complexo. Neste estudo foi avaliada a capacidade de osseointegração de implantes de titânio c.p. e da liga Ti-6Al-4V tratados pelo método PIRAC quando inseridos em fêmures de ratos. O estudo avaliou o percentual de tecido ósseo formado junto aos implantes tratados de (85%), a mineralização do tecido ósseo

junto aos implantes foi avaliada pela fluorescência da oxitetraciclina e indicou forte atividade de mineralização, histoquimicamente foi avaliada a atividade da fosfatase-alcalina e a reação foram consideradas positivas. O tecido ósseo formado junto aos implantes estava em íntimo contato com os mesmos, sem qualquer tipo de tecido fibroso interposto. Finalmente os autores concluem que o método de modificação de superfícies PIRAC forma um filme de TiN com biocompatibilidade e capacidade de osseointegração, comparáveis às do Ti c.p. e da liga 6Al-4V [SOVAK, 2000]. O TiN é conhecido por possuir excelentes propriedades mecânicas, estabilidade química e biocompatibilidade [PARK, 2003]. Seu uso para implantes de quadril, joelho, ombro e tornozelo tem levado a uma crescente resistência a abrasão e colonização bacteriana reduzida comparada a outras superfícies de implantes clinicamente utilizadas [B. GROESSNER, 2003]. Vários trabalhos mostraram o sucesso do uso do plasma na nitretação de amostras de titânio a temperaturas cerca de 700 a 800°C [MISHRA, 2003].

Capítulo 3

Metodologia Experimental

3. Metodologia Experimental

O presente trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte foi realizado ensaio *in vitro* para análise comparativa entre placas de Ti cp nitretadas por descarga em cátodo oco (HCD) e o Ti sem tratamento (controle). Na segunda parte foi realizado ensaio *in vivo* com implantes de Ti nitretados, comparados com os implantes sem tratamento (controle) inseridos em tíbias de coelho. O trabalho foi executado obedecendo às etapas mostradas no fluxograma Figura 3.1.

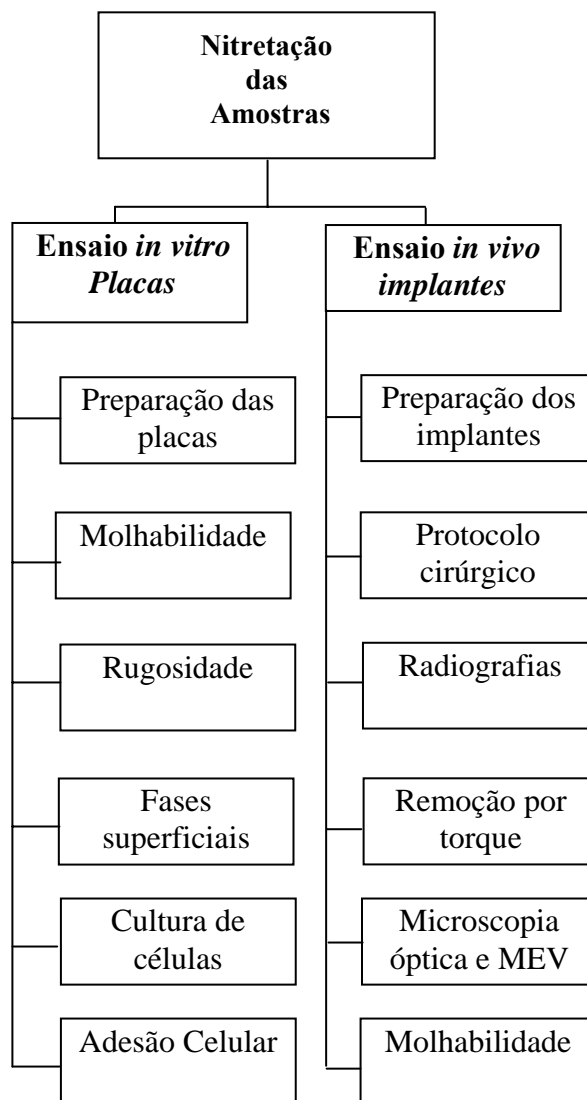


Figura 3.1. Fluxograma de execução da primeira e segunda parte experimental deste trabalho.

3.1. Ensaio *in vitro*

Neste trabalho foram utilizadas 12 placas de Ti cp (grau II), Tabela 3.1., medindo 15 mm x 15 mm x 1 mm (altura x largura x espessura) que foram divididas em dois grupos: 06 placas para tratamento com nitretação em plasma em descarga de cátodo oco (HCD) e 06 placas sem tratamento (controle), todas usadas para observação *in vitro* da adesão celular na primeira parte deste trabalho.

Tabela 3.1. Composição Química do Titânio Grau II

Elementos	N	C	H	Fe	O	Ti
Ti grau II	0,03	0,10	0,015	0,03	0,25	Balanço

3.1.1. Preparação das Placas de Ti cp

As placas foram embutidas em resina poliéster e foram lixadas numa seqüência de lixas d'água com 220#, 360#, 400# e 600# e tiveram suas superfícies polidas (politriz AROTEC, modelo APL-2 e série 212560) com alumina 1 μm até que uma rugosidade, Ra média de 0,2 μm . Em seguida, as placas foram desembutidas e limpas em banho com éter de petróleo e acetona por 20 minutos em cada solvente em ultra-som com objetivo de remover contaminantes que poderiam interferir no processo de nitretação iônica. A seguir foram colocadas no sistema de nitretação em plasma.

O aparato experimental utilizado para a nitretação em plasma, consiste de uma câmara hermeticamente fechada contendo um ânodo na parte superior e uma base catodicamente polarizada (figura 4). Sobre essa base foi posicionada a peça a ser nitretada. Em torno dessa peça foi colocada a configuração em cátodo oco, consistindo de um anel nas laterais da mesma, com uma tampa na parte superior. Todas as partes metálicas foram confeccionadas de aço inoxidável, sendo as paredes internas do cátodo oco revestidas com Ti para evitar contaminação da peça. Fixou-se à distância entre a superfície da amostra e a tampa superior, aqui denominada distância entre cátodos (d_c), em 9 mm.

As placas foram tratadas numa pressão de 150 Pa, 450°C e 1 hora, Tabela 3.1. A temperatura foi medida por um termopar cromel-alumel em contato com o porta-amostra e controlada pela variação contínua da tensão e da corrente entre eletrodos.

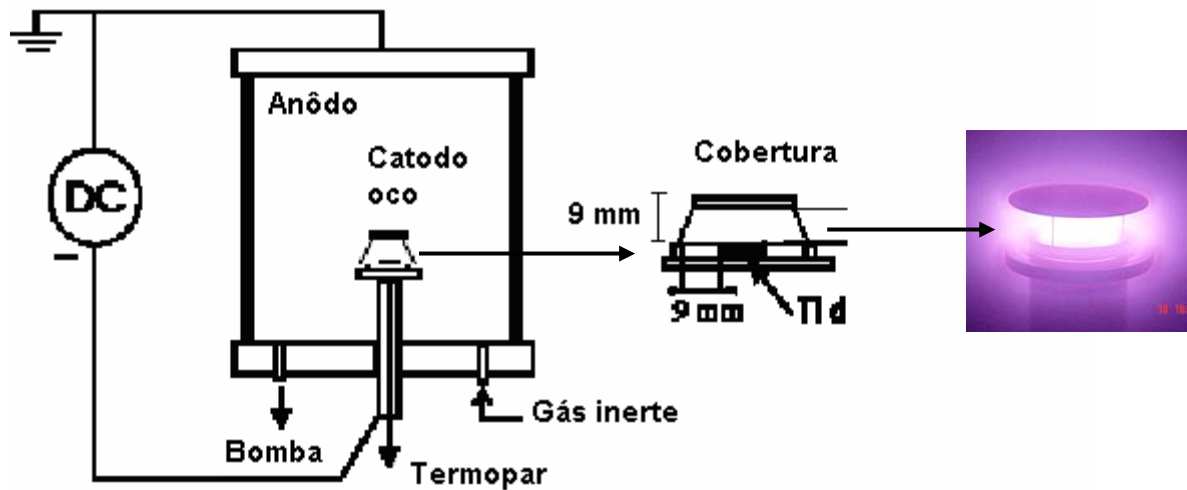


Figura 3.2. O aparato experimental utilizado para a nitretação em plasma nas placas.

As placas foram nitretadas na condição (tabela 3.1) que resultou no melhor resultado obtido em trabalho anterior feito no laboratório de processamento de materiais por plasma (Labplasma UFRN) (GUERRA, 2001), levando em consideração o aspecto visual e a aderência da camada. O processo de nitretação em plasma foi realizado nas seguintes condições:

Tabela 3.2. Condição de trabalho das placas.

	PRESSÃO (Pa)	TEMPO (h)	TEMPERATURA (°C)	ATMOSFERA
Grupo1	150	1	450	(20%N ₂ :80%H ₂)

Depois de terminado o tratamento de superfície, as placas foram sequencialmente submetidas a ensaio de caracterização superficial.

3.1.2. Ensaio de Molhabilidade

Após o tratamento a plasma, todas as amostras foram submetidas a um rígido protocolo de limpeza para remoção de gorduras, proteínas e carboidratos feitos com uma solução de DEIV 3E (Detergente enzimático) em proporção de 2,5ml/500ml de água bidestilada, em ultra-som, durante 10 minutos. Lavagem em álcool absoluto, sendo submetido por 10 minutos em ultra-som. Outra lavagem, agora em água destilada, permanecendo por 10 minutos em ultra-som. Cada etapa foi repetida duas vezes. As amostras foram secadas com secador por um minuto e acondicionadas em embalagens apropriadas para esterilização com plasma de peróxido de hidrogênio.

A técnica utilizada foi à determinação do ângulo de contato estático ou técnica da gota sêssil para cada uma das amostras e mensurada por dois observadores. As amostras foram colocadas em uma superfície plana e utilizando uma micropipeta digital de volume ajustável funcionando com uma solução de glicose 3,57% (EURO-COLINS), glicerina na proporção de 60% e corante, posicionada de forma perpendicular e muito próxima à superfície depositando 0,25ml da solução sobre a superfície das placas. De forma a padronizar o teste e por serem gotas muito pequenas, foram feitos acompanhamento da mudança do ângulo por 01 segundo, 30 segundos e 60 segundos.

3.1.3. Ensaio de Rugosidade

Para análise da rugosidade foi mensurado o parâmetro Ra, utilizando um rugosímetro modelo SURTRATONIC 3, Robson Taylor com cut-off igual a 0.25. As medidas foram tomadas em três direções diferentes, em ângulos de aproximadamente 120⁰ com dispersão nestas três direções diferentes inferior a 10%.

3.1.4. Caracterização de Fases Superficiais

Para análise das fases superficiais foi utilizado um difratômetro de raios-X, Shimadzu modelo XRD-6000. As amostras foram analisadas com ângulos de varredura entre 30 e 80⁰, passos de 0,002⁰ e tempo de 3 s por passo numa velocidade de 1⁰/min.

3.1.5. Cultura de Células

Para este estudo foi utilizada a linhagem celular Osteo-1, cedidas pelo departamento de patologia oral da faculdade de odontologia da USP, São Paulo, Brasil. As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram incubadas em ambiente úmido (estufa) com o objetivo de favorecer o seu crescimento, a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. A monitoração foi realizada a cada 24 horas utilizando-se um microscópio invertido de fase. O meio de cultura foi trocado diariamente devido às mesmas consumirem os nutrientes do meio à medida que elas crescem. O meio de cultura foi colocado na câmara de Neubauer para contagem das células utilizando método da exclusão de células coradas pelo azul de trypan. Com a quantidade de células definidas e preparada à cultura, as amostras nitretadas e controle foram colocadas em placas para cultura de tecidos com 12 poços de 25 mm de diâmetro para a esterilização. Todas as amostras foram esterilizadas utilizando radiação gama. A dose total de radiação por amostra foi de 25 kGy, liberada a uma dose média de 1,334 kGy/h (18h 36minutos a uma distância de 50mm). Para os experimentos de adesão e proliferação celular, foram plaqueadas 1×10^4 células Osteo-1 por poço, sobre todas as placas em poços de 25 mm de diâmetro.



Figura 3.3. Cultura de Células.

3.1.6. Curva de Crescimento

Doze poços foram contados por 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. O número de células viáveis colhidos de cada Flask (recipiente onde se guardam as células) foi obtido pela contagem de células viáveis através do uso de hemocitômetro ou câmara de Neubauer e o

método da exclusão de células coradas pelo azul de trypan (identificador de células mortas) [FRESHNEY, 2000]. O número total de células originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células contadas x diluição x 10^4 / número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem. Finalmente, o percentual de viabilidade da população celular foi obtido dividindo-se o número total de células viáveis pelo número total de células e o resultado, multiplicado por 100 (Equação abaixo).

$$Co = \frac{Cc.d.10^4}{n_h} \quad (6)$$

$$Pc = \frac{Cv}{Co} \times 100 \quad (7)$$

3.1.7. Contagem de Células em Microscopia Ótica de Reflexão

Todas as amostras avaliadas com MEV também foram investigadas por microscopia ótica de luz refletida, com o objetivo de aferir a reprodutibilidade dos resultados encontrados. Utilizou-se para isso um microscópio óptico Olympus BX 60M - Japan acoplado a um software Image-Pro Plus version 4.5.1.22 for Windows (serial number 41N41000-29998) Copyright 1993-2002 Media Cybernetics, Inc. Analisador de imagem, com o qual foram contadas as células.

As células foram contadas em nove áreas na amostra, correspondendo aos campos de visão das extremidades direita, esquerda e média obtidos nas linhas superior, inferior e média.

Foi realizada uma média aritmética das contagens obtidas nas diferentes áreas e seu resultado apresentado com o desvio padrão da média.

3.1.8. Adesão Celular nas Placas

Para análise da adesão celular foram utilizados os dados obtidos das contagens de células aderidas às placas, dos dois grupos experimentais, em duplicatas, um dia após o plaqueamento.

3.1.9. Proliferação Celular

A proliferação celular foi analisada através das contagens do número de células aderidas às amostras, nos diferentes tempos experimentais (1, 2 e 3 dias) dos dois grupos, em duplicatas. Estes dados foram utilizados para a obtenção das curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais. A contagem das células foi feita no microscópio óptico onde cada placa foi dividida em 09 partes iguais e feita à média. Em cada quadrado a contagens celular corresponderá à média por grupo contado pelo software Image Pro Plus.

3.2. Ensaio *in vivo*

3.2.1. Preparação dos implantes

Na segunda parte do trabalho, foram usados 24 implantes de Ti cp grau II, medindo 6,25 mm de comprimento e 3,2 mm de diâmetro, fornecidos pela empresa A.S. Technology (Titanium Fix, São Paulo, Brasil), depois de nitretar Figura 3.4.



Figura 3.4. Implante nitretado em catodo oco.

Os implantes foram inseridos em aproximadamente 7 mm na metáfise proximal das tíbias, Figura 3.5, de 06 coelhos machos, albinos, adultos, raça Nova Zelândia, pesando entre 2,0 e 2,5 Kg.

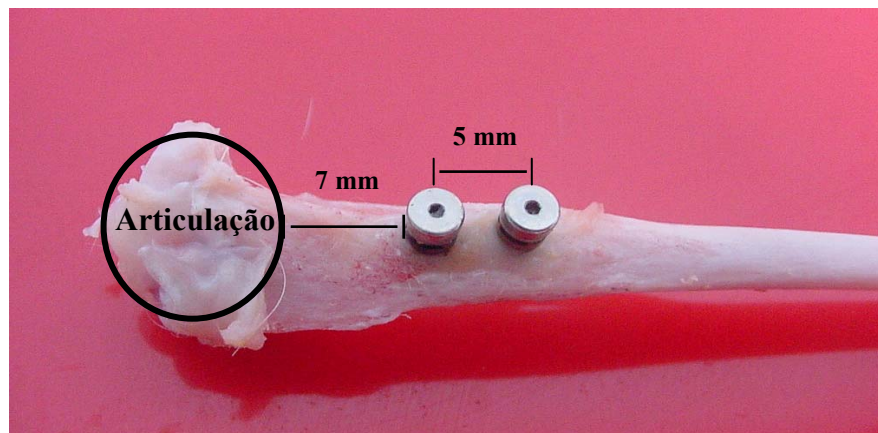


Figura 3.5. Localização dos implantes na tíbia dos coelhos.

Desses 24 implantes colocados, Tabela 3.3, 15 foram nitretados em plasma por HCD, nas mesmas condições das placas utilizadas na primeira etapa e 09 permaneceram sem tratamento (controle). Essas condições de nitretação foram escolhidas com base em estudos anteriores, onde um estudo sistemático variando a pressão, tempo de tratamento e temperatura foi realizado em amostras de Ti cp [GUERRA, 2001].

Para a nitretação dos implantes, foi necessária uma limpeza anterior dos implantes que foi realizada da seguinte forma: foram colocadas em Éter de Petróleo no ultra-som por 20 min, em seguida foram novamente colocadas no ultra-som, agora com acetona por 20 min, continuando, secou-se e conduziu-se para o porta amostra.

O aparato experimental utilizado para a nitretação a plasma consiste de uma câmara de vácuo contendo um anodo e um cátodo oco (todas as partes metálicas feitas de aço inoxidável revestida internamente por Ti cp), no qual os implantes eram colocados e centralizados. As condições para o catodo oco (HCD) eram satisfeitas no espaço entre a parede interna da blindagem e os implantes, todos estando sob o mesmo potencial negativo. À distância dos implantes para a superfície da parede interna do cátodo era de 9 mm. O fluxo da mistura gasosa foi mantido constante a 11 sccm para todos os experimentos. A pressão foi estabilizada a 150 Pa e a temperatura das amostras foi mantida constante a 450°C. A temperatura foi medida por um termopar cromel-alumel inserido no porta-amostra, e controlada pela variação contínua entre eletrodos.

Os implantes dentais foram nitretados após se determinar as condições ótimas de pressão/temperatura, enquanto que os outros parâmetros foram mantidos como relatados acima, como mostrado na Figura 3.6.

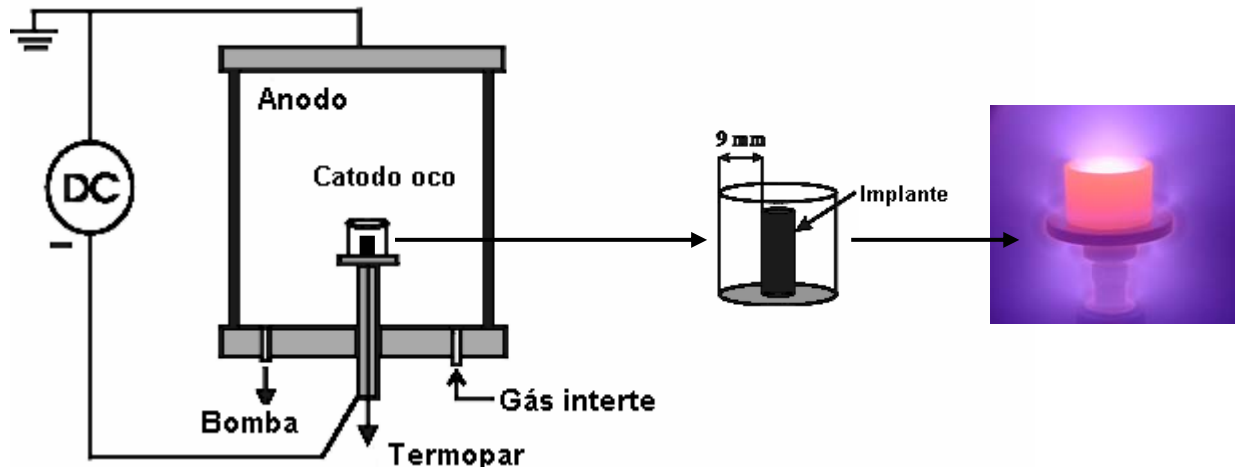


Figura 3.6. O aparato experimental utilizado para a nitretação a plasma para os implantes.

Após o tratamento, tanto os implantes nitretados como os implantes sem tratamento foram limpos obedecendo ao seguinte protocolo:

1. Remoção de gordura foi feita com uma solução de DEIV 3E (detergente enzimático) em proporção de 2,5ml/500ml de água bidestilada, em ultra-som, durante 10 minutos. O procedimento foi realizado por 02 (duas) vezes;
2. Lavagem em álcool absoluto, sendo submetido por 10 minutos em ultra-som. O procedimento foi realizado também por 02 (duas) vezes;
3. Outra lavagem, agora com água destilada, deixando em ultra-som por 10 minutos, sendo repetida a operação; Secagem com um secador (marca Arno) por 01 (um) minuto;
4. Esterilização em plasma de peróxido de hidrogênio.

3.2.2. Protocolo Cirúrgico

Foram empregados 06 coelhos brancos, adultos, do sexo masculino da raça Nova Zelândia pesando entre 1,8 e 2,5 Kg. As cirurgias foram realizadas sob rígido protocolo cirúrgico e os animais foram selecionados para a cirurgia e tratados conforme o protocolo e normas de emprego de animais em pesquisas.

Os animais foram sedados, com Sulfato de Atropina 0,5mg/ml um anticolinérgico, na dose de 0,1mg/kg por via subcutânea (SC) com o intuito de reduzir a salivação e bradicardia provocada pela xylasina. Após 10 minutos o Dorsipece 20mg/ml (Xylazina) sedativo e analgésico neuroléptico na dose de 3mg/kg. por via intramuscular (IM) no músculo semitendinoso.

Quando sedados os animais tiveram a região da tíbia tricotomizada, em seguida foi feita antissepsia com PVPI (Povidine). Os animais foram então induzidos na anestesia geral através do uso de Vetanarcol 50mg/ml (Cloridrato Ketamina) anestésico dissociativo na dose de 30mg/kg (IM), levados ao plano cirúrgico com aplicação endovenosa (EV) de Vetanarcol na dose de 7,5mg/kg, associado na mesma seringa com Compaz 0,5mg/ml (Diasepam) um benzodiazepínico, com objetivo de favorecer o relaxamento muscular, na dose de 0,1mg/kg. Foi feito um jejum prévio de 6 h. A anestesia local (SC) foi então realizada utilizando-se aproximadamente 0,9 ml de lidocaina 2% na face medial de cada tíbia onde foi feita a incisão.

Após a incisão foi feita a divulsão do tecido subcutâneo com pinça hemostática de Kelly até conseguir acesso total à tíbia. A partir daí, iniciou-se a preparação do leito do implante, com irrigação externa com soro fisiológico com seringa de 20 ml. Motor Driller BLM 600 PLUS com 1900rpm e 45 Ncm de torque. A seqüência de brocas obedeceu a um escalonamento existente na literatura. A Broca Lança foi utilizada para perfurar a cortical, em seguida, o alargamento progressivo com a Broca 2.0 mm, Broca 2.8 mm, Broca Piloto 2/3 mm. Neste momento colocamos os implantes no monta, no leito com auxílio da catraca e colocação do tapa implante.

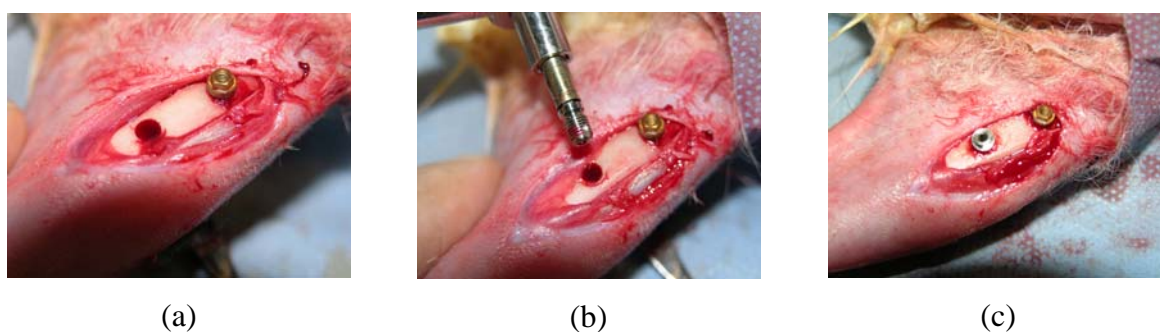


Figura 3.7. Seqüência de inserção cirúrgica dos implantes (a) abertura do leito cirúrgico, (b) condução do implante ao leito e (c) posicionamento dos implantes na tíbia.

No mesmo momento, suturou-se com fio cat gut 3.0 para redução da musculatura e sutura de pele com nylon 2.0. Finalizando identifico-se os coelhos com bisturi elétrico e administrado medicação pós operatória, Banamine 10 mg - 0,25 ml por 3 dias (antiinflamatório) e Flotril 2,5% - usar 0,4 ml durante 10 dias (antibiótico). O procedimento

foi repetido de forma idêntica para todos os coelhos, cada cirurgia foi feita em um tempo médio de 40 minutos. Todas as cirurgias foram realizadas no mesmo dia no Centro cirúrgico da clinica Assistência Veterinária (ASVET). Na Tabela 3.3 são apresentados os implantes escolhidos para remoção por torque e para análise histomorfométrica.

Tabela 3.3. Posicionamento dos implantes nos coelhos e tipos de análises realizadas.

Coelhos	Tíbia direita	Tíbia esquerda	Próximo da Articulação	Remoção por torque	Análises histomorfométrica
1	1 N e 1 S/T	1 S/T e 1 N	1 N - TD 1S/T - TE	Sim (90 dias)	MEV e MO
2	1 N e 1 S/T	2 N	1 N - TD 1S/T - TE	Sim, TD (90 dias)	TD e TE MEV e MO
3	1 S/T e 1 N	2 N	1 S/T – TD 1 N - TE	Não	MEV (15 dias)
4	1 N e 1 S/T	1 S/T e 1 N	1 N - TD 1S/T - TE	Sim, TD (60 dias)	TD e TE MEV e MO
5	1 N e 1 S/T	2 N	1 S/T – TD 1 N - TE	Sim (90 dias)	TD e TE MEV e MO
6	1 N e 1 S/T	1 S/T e 1 N	1 N - TD 1S/T – TE	Não	TD e TE MEV e MO (90 dias)

N - Implante nitretado; S/T – Implante sem tratamento; TD – Tíbia direita; TE – Tíbia esquerda; MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura; MO – Microscópio Óptico.

3.2.3. Radiografias

Foi feito um controle radiográfico com 45,60 e 90 dias com o aparelho de Rx Espetro x da Dabi Atlante, São Paulo, Brasil. As películas radiográficas foram colocadas por trás da tíbia com o feixe de raios x incidindo perpendicularmente as mesmas, recebendo radiação por 5 segundos. Todas as películas foram reveladas por reveladores Kodak.

3.2.4. Obtenção dos Espécimes e Teste de Remoção por Torque

Após os períodos pré-estabelecidos de 15, 60 e 90 dias, os animais foram sacrificados por sobredosagem medicamentosa e novas incisões foram feitas com o intuito de exporem-se os implantes.

Com duas semanas completadas o coelho 03 fraturou as tíbias no local da colocação dos implantes em acidente na sua gaiola. Conseguiu-se resgatar um implante que imediatamente foi destinado à observação em MEV da cicatrização óssea. O coelho 4 foi escolhido para o sacrifício com 60 dias de forma aleatória pois o mesmo estava bem de saúde. Os outros coelhos foram sacrificados com 90 dias. As remoções por torque foram feitas com o Torquímetro Digital TQ-8800, Figura 3.8, com faixa de leitura entre 0,1 a 147,1 Ncm e resolução de 0,1 Ncm.



Figura 3.8. Torquímetro Digital TQ-8800.

3.2.5. Preparação dos Espécimes

Os implantes e tecido circundantes foram removidos em blocos identificados, fotografados e seguindo o protocolo de Jose-Iñaki Alava et al 2005 e foram colocados em formaldeído (4%) por 24 horas. Foi feito radiografias para identificar a posição relativa dos implantes no osso em todas as amostras. Elas foram então retiradas do formaldeído (4%) e secadas com papel, lavadas com solução de álcool a 60% e colocadas em recipientes de vidro estéreis.

1) Fixação

Para fixação colocaram-se as amostras em Etanol a 70% por (03) três dias a 4° C. A partir daí as amostras foram para desidratação seguindo uma seqüência crescente de álcoois.

2) Desidratação

As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de etanol de 60% a 100%. A solução de acetona foi preparada usando 50% de acetona e 50% de etanol (98%), e o xileno foi usado puro. As amostras colocadas em recipientes de vidros individuais foram banhadas passando de recipiente em recipiente como se segue: Etanol/água 60% (2 horas), Etanol/água 80% (4 horas), Etanol/água 90% (12 horas), Etanol absoluto (24 horas), Acetona/etanol 50% (6 horas), Xileno 100% (2 horas).

Após o último banho as amostras foram retiradas dos recipientes de vidros, escoadas e secadas a vácuo por 10 horas. Em seguida as amostras foram impregnadas e embutidas em vácuo com resina epóxi (Triofix-2) de polimerização rápida.

3) Microtomia

As amostras embutidas e polimerizadas foram cuidadosamente lixadas à mão com lixa de papel de carbetto de sílcio 500# até que a primeira rosca do parafuso aparecesse. O lixamento fino continuou com lixas de papel de carbetto de sílica 1200# e 2400# até que os vales aparecessem. Neste estágio da preparação as fotografias foram feitas no MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura). A superfície fina lixada da amostra foi montada e colada com cola Araldite 10 minutos numa lâmina de vidro (50x25 mm). A lâmina com a amostra foi colocada sob um peso para secar sobre pressão por 10 horas.

A amostra foi presa junto com a lâmina a um suporte a vácuo no microtomo de precisão (Ingram-Ward Petrographic Thin Section Cut-off Saw Models 135 and 137U), o corte começou da cabeça do implante usando um disco fino de diamante. Feitos os cortes as amostras foram lixadas com lixas de papel de carbetto de sílcio 500#, 1200# e 2400# a uma espessura de 40 µm. A espessura da secção foi checada em intervalos regulares com um espécímetro.

4) Coloração:

A lâmina passa por um processo de desidratação pela seqüência decrescente de álcoois com diferentes concentrações que consiste de: Xylol 1 (10 minutos); Xylol 2 (5 minutos); Álcool absoluto (5 minutos); Álcool a 90% (5 minutos); Álcool a 80% (5 minutos); Álcool a 70% (5 minutos);

As amostras foram coradas com solução concentrada de azul de toluidina rotineiramente utilizada por ser uma técnica prática e rápida. A composição da solução é de 0,1% da seguinte forma:

Solução 1- 17,9g de Fosfato de Na Dibásico $12\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$) em 500 ml de água destilada.

Solução 2- 13,8g de Fosfato de Na Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$) em 1000 ml de água destilada. Juntar 267 ml da Solução 1 com 733 ml da Solução 2. Coloca-se 1g de Azul de Toluidina (Toluidine Blue O - Sigma $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}\text{Cl}$), esta mistura deverá ser agitada overnight e filtrada.

As lâminas foram coradas por cerca de 10 minutos no Azul de Toluidina, foram secadas cuidadosamente com lenço de papel; passadas no Álcool Butílico (n-Butanol; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$); clareadas no tolueno e montadas. Com o objetivo de proteger o material corado a superfície da amostra foi coberta com uma lamínula microscópica e guardada num local escuro para preservar o corante. Em seguida foram levadas para o microscópio óptico de transmissão para análise.

3.2.6. Avaliação da Osseointegração

A quantificação da porcentagem de integração óssea foi conduzida pelo cálculo das medidas das áreas osseointegradas, dividida pelo perímetro total da rosca do implante multiplicado por cem, depois feito à média e o desvio padrão. Todas as medidas foram feitas no software Image Pro Plus.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Primeira Parte: Ensaios *In Vitro*

4.1.1. Ensaio de Molhabilidade das Placas

A tensão superficial é de extrema importância para a osseointegração, pois permite uma maior ou uma menor quantidade de líquido sobre as superfícies metálicas. Como o sangue tem na sua composição 90% de água, esta capacidade de adsorção de água pela superfície conhecida como molhabilidade é fundamental para o sucesso na adesão celular e consequentemente osseointegração [KASEMO 2002]. No nosso trabalho observou-se que as amostras nitretadas apresentaram resultados de molhabilidade superior às amostras não nitretadas. Verificou-se que para as amostras nitretadas, houve um rápido espalhamento da gota séssil após os primeiros 30 s o que não ocorreu com a molhabilidade da placa sem tratamento, a gota não se acomodou na superfície satisfatoriamente (figura 4.1).

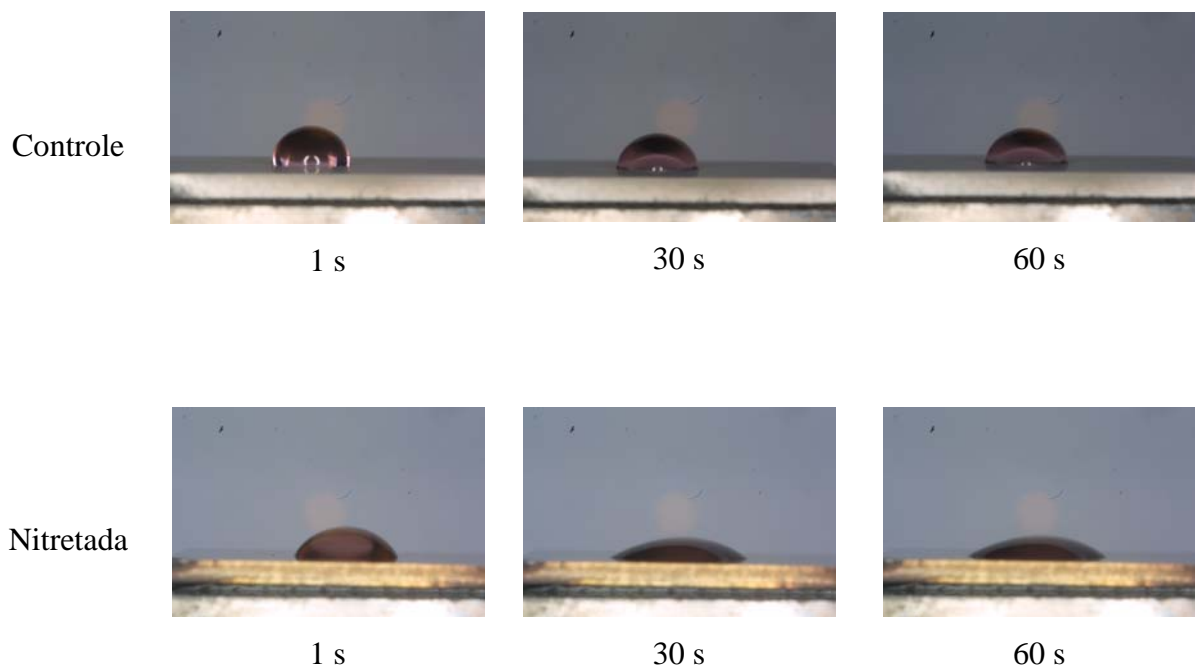


Figura 4.1. Sequência de espalhamento da gota séssil aplicada sobre placas de titânio sem tratamento e titânio nitretado

Medidas do ângulo de contato para as amostras nitretadas e não nitretadas revelaram uma grande diferença de valores, como mostrado no gráfico da figura 4.2. Verificou-se que após 60 s, a gota séssil na superfície não nitretada apresentava um ângulo de contato de 45° enquanto na superfície nitretada esse valor foi de apenas 19° .

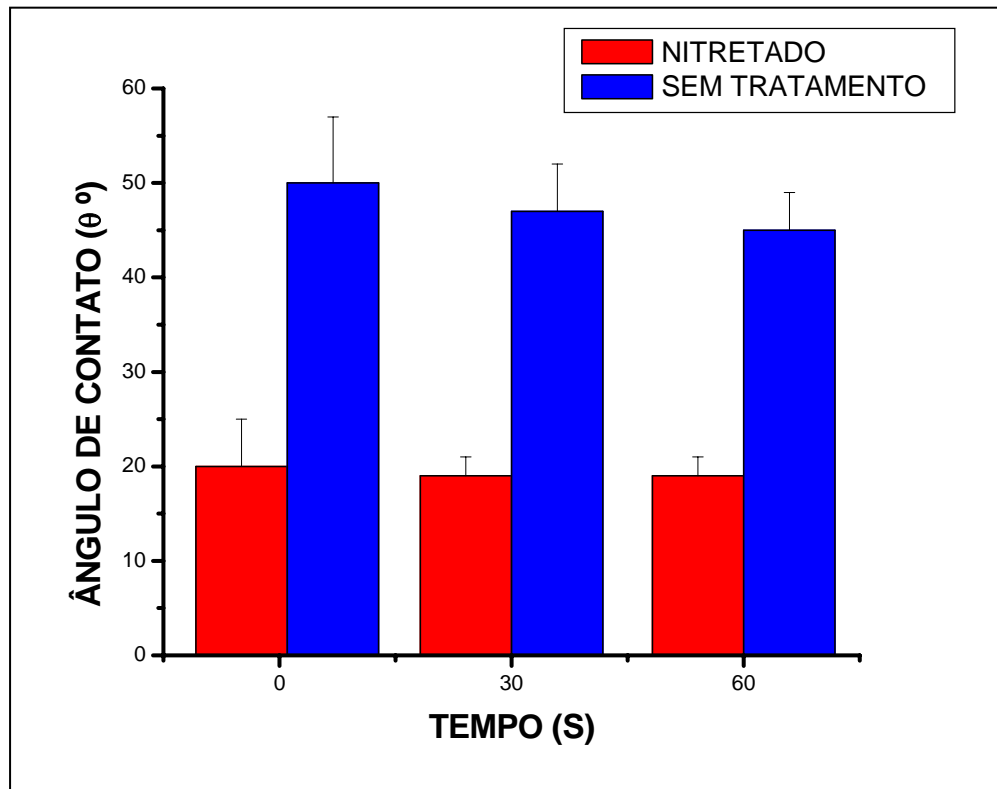


Figura 4.2. Apresenta o resultado da molhabilidade das placas.

4.1.2. Ensaio de Rugosidade

Outra grandeza importante a ser analisada numa superfície para fins de osseointegração é a rugosidade. Verificou-se que o processo a plasma produz grandes modificações na superfície, apesar da rugosidade encontrada neste trabalho ser inferior aos valores de rugosidade encontrado na literatura. Nas placas nitretadas em catodo oco, a rugosidade encontrada foi de $0,45 \mu\text{m}$, enquanto que nas placas sem tratamento a rugosidade foi de $0,20 \mu\text{m}$. O gráfico da (figura 4.3) mostra estes valores.

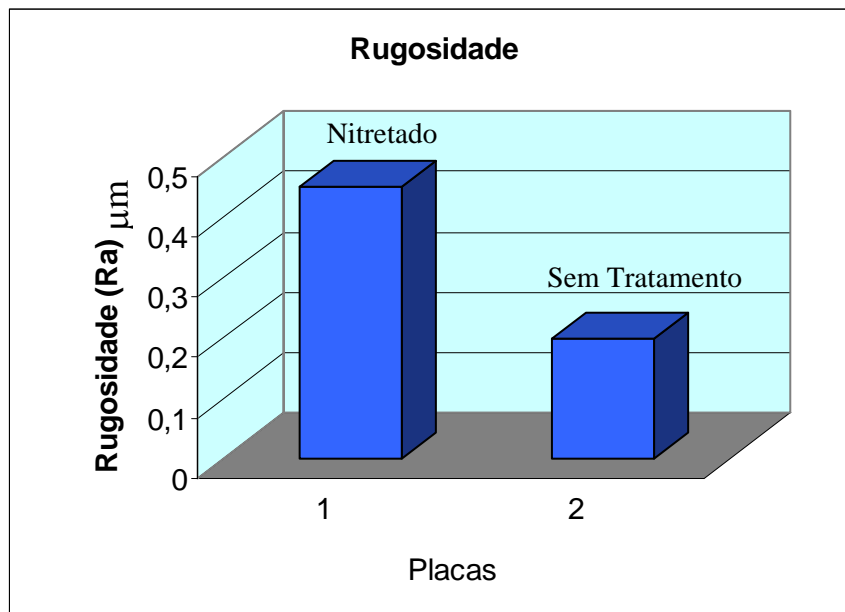


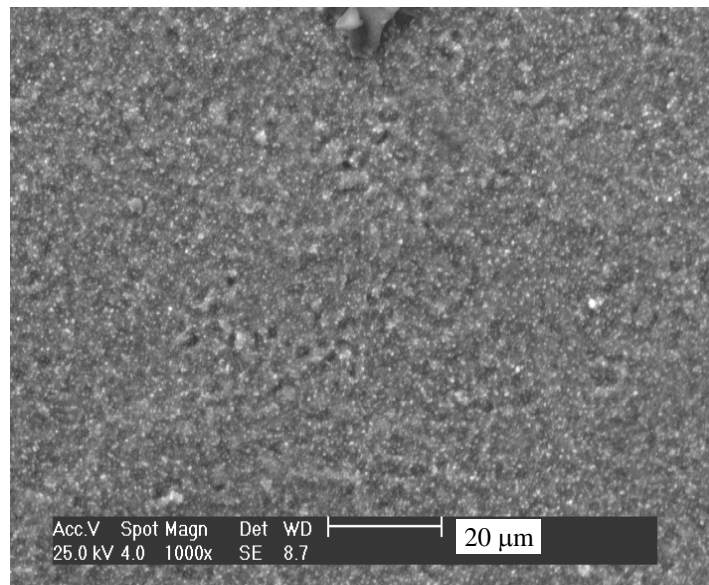
Figura 4.3. Rugosidade superficial das placas nitretadas e controle.

Comparando os resultados da molhabilidade com os da rugosidade, observa-se uma relação direta entre essas grandezas, embora outros trabalhos produzidos em laboratório tenham mostrado que nem sempre existe essa concordância [ALVES JR, 2005]. Verificou-se que amostras tratadas em plasma com catodo oco apresentaram uma rugosidade mediana comparando com outros trabalhos publicados na literatura, no entanto, sua molhabilidade é muito superior a qualquer outra superfície tratada [GUERRA NETO, 2001]. Esse fato sugere que o conceito de rugosidade para o caso deve ser reavaliado ou que a composição da superfície tenha efeito maior que a área superficial sobre a molhabilidade.

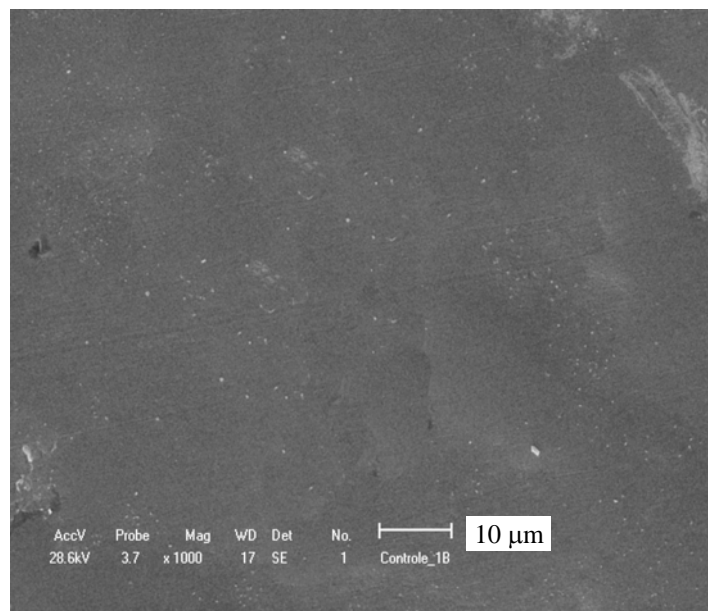
4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A superfície de titânio nitretada em plasma, quando observada por MEV, apresentou uma textura rugosa, com precipitados (pontos brancos) finamente dispersos e com um livre caminho médio entre eles de 5 μm (figura 4.4). A existência desses precipitados, assim como a sua distribuição, talvez seja um fator importante na avaliação da molhabilidade e de sua relação com a rugosidade. Comparando o resultado encontrado em nosso trabalho com resultados publicados na literatura, existem coincidências. Na literatura vários trabalhos foram publicados afirmando que superfícies rugosas, porém uniformes, foram mais influentes na adesão celular osteoblástica aos biomateriais [ANSELME, 200], [KASEMO, 2002]. A

superfície criada neste trabalho apresenta-se rugosa de forma uniforme o que favoreceria o processo da adesão.



(a)



(b)

Figura 4.4. Fotomicrografias em MEV da superfície, (a) nitretada e (b) Controle.

4.1.4. Fases Superficiais

Na figura 4.5 é apresentado o difratograma do titânio nitretado e sem tratamento. A amostra nitretada apresenta deslocamento de picos referentes à difração dos diferentes planos

crystalográficos do Ti cp. Esse deslocamento está associado à presença do nitrogênio em solução sólida, na rede do Ti, como elemento intersticial. Fazendo a difração em ângulo rasante de 5° é observada a fase TiN, a qual é também observada a partir das análises feitas por MEV onde precipitados finos e dispersos foram observados.

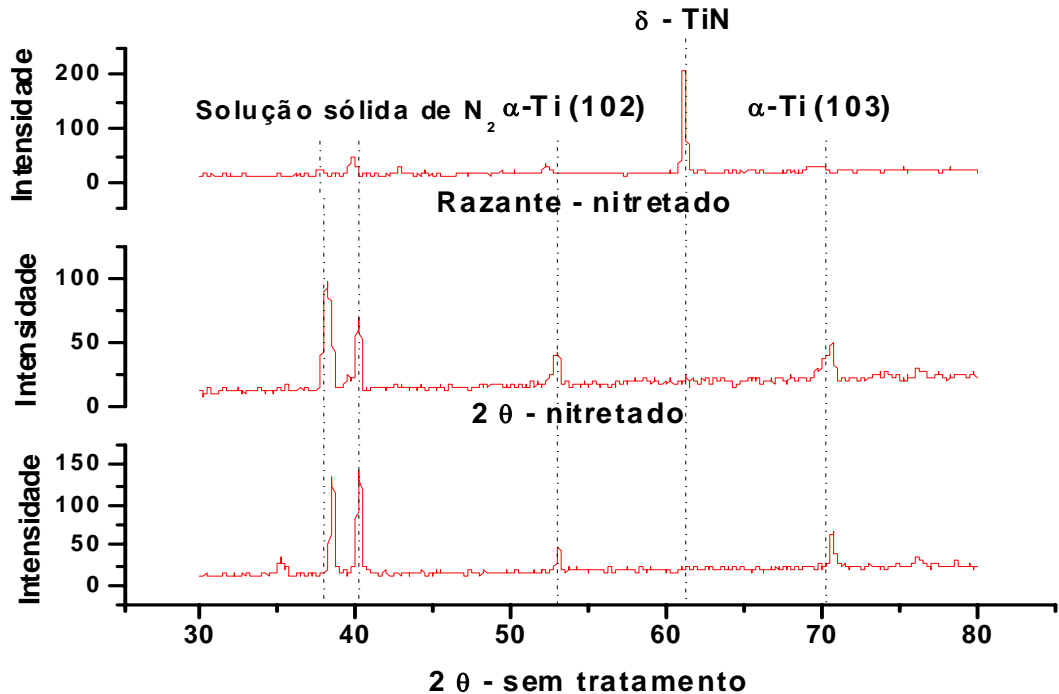


Figura 4.5. Difratoograma das placas nitretadas e sem tratamento.

4.1.5. Cultura de Células

Na figura 4.6 é apresentado o estágio evolutivo da proliferação celular para os três primeiros dias de cultura sobre superfícies nitretadas e sem tratamento.

A primeira evidência desses resultados é que a superfície nitretada é biocompatível, pois ocorreu adesão e proliferação celular. Nota-se no primeiro dia de cultura, um discreto aumento no número de células na placa nitretada quando comparada ao controle. No segundo dia, a evidência de uma maior proliferação celular sobre a placa nitretada foi observada, além de um leve estiramento celular em busca de uma melhor acomodação das mesmas na superfície da placa. No terceiro dia a proliferação foi bem superior na placa nitretada que na placa controle, formando uma espécie de tapete com completa ocupação da placa. Já a controle observam-se alguns espaços a preencher.

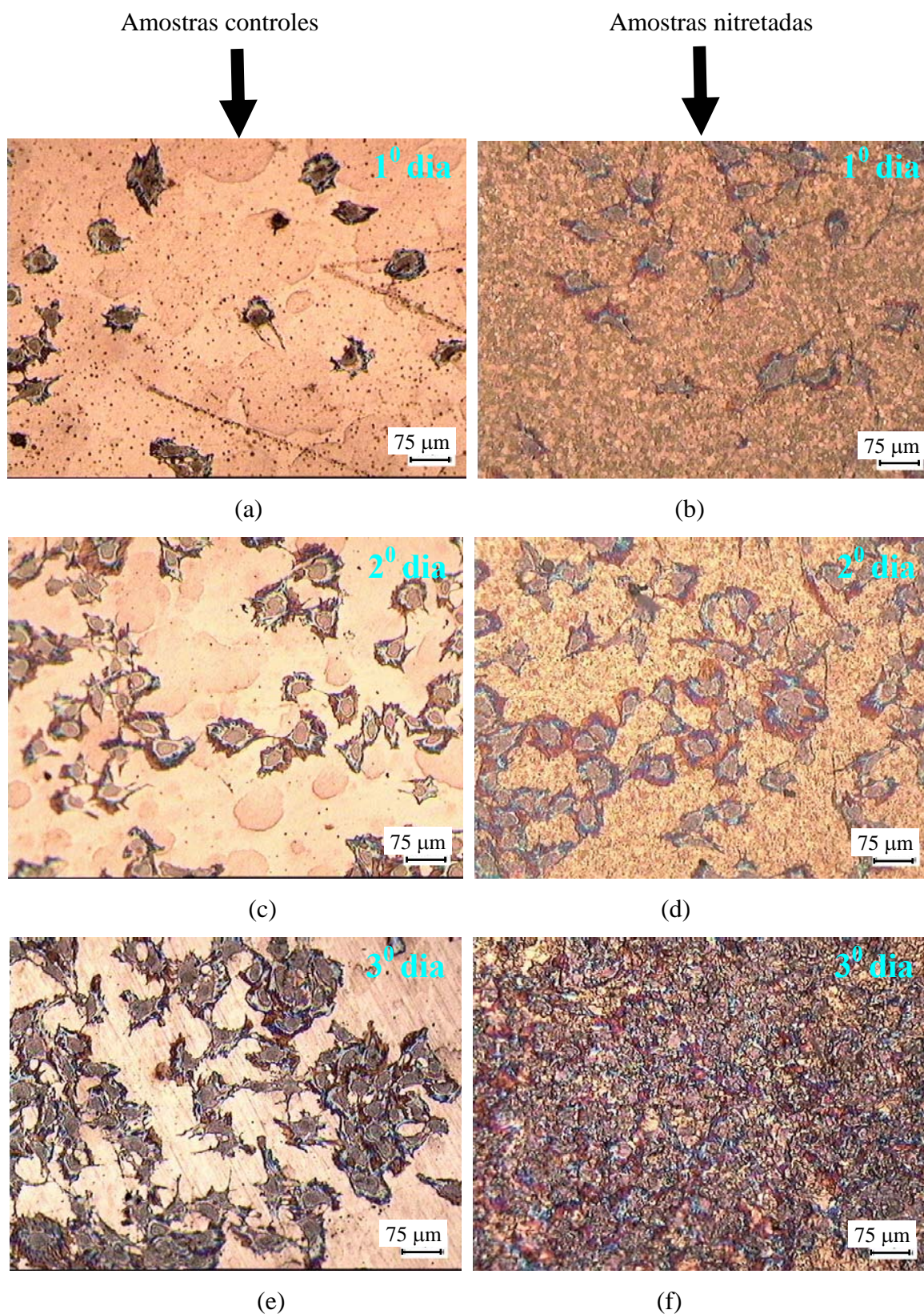


Figura 4.6. Estágios evolutivos da proliferação celular, de (a) a (f).

Com relação à contagem de células, figura 4.7 mostra uma proliferação celular tímida no primeiro dia e mais acentuada a partir do segundo dia, ocorrendo um crescimento bem superior em torno de mil células a mais na placa nitretada quando comparada a sem tratamento.

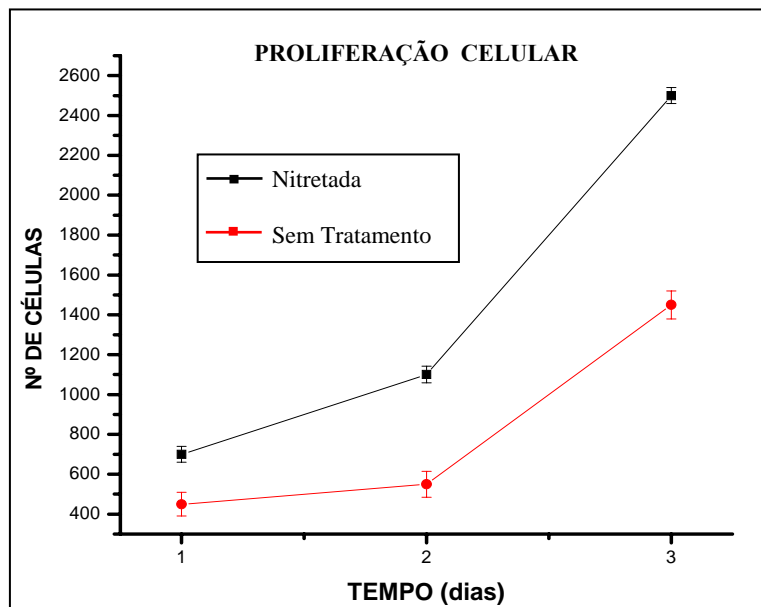


Figura 4.7. Curva da proliferação celular

4.1.6. Adesão Celular

Vários pesquisadores publicaram seus trabalhos afirmando que a interação osteoblasto com um biomaterial depende da topografia, composição química e estrutura da superfície dos materiais [KASEMO 2002].

Foi publicado em 2000, que características de superfície determinam como as moléculas biológicas vão adsorver a superfície e, mais particularmente, determinam a orientação das moléculas adsorvidas. Elas também determinam o comportamento celular no contato. Células em contato com uma superfície primeiramente se ligarão, aderem e se espalham. A primeira fase depende das proteínas de adesão, depois a qualidade desta adesão influenciará na sua morfologia, e sua capacidade para proliferação e diferenciação [ANSELME, 2000].

A comparação do comportamento de diferentes tipos de células mostra que elas reagem diferentemente de acordo com a rugosidade das superfícies [KASEMO, 2002]. Um outro trabalho discorda e diz que as células cultivadas em superfícies rugosas não sofreram

nenhuma modificação em relação à morfologia, a célula parece não sofrer influência direta da superfície embora tenha seu crescimento orientado pela topografia [ROSA, 2003].

A compreensão da relação existente entre os fatores mecânicos e biológicos relacionados a osseointegração é determinante para o sucesso da mesma. Existem estudos histológicos e histomorfométricos demonstrando que implantes com superfícies rugosas apresentam maior percentual de contato ósseo, em períodos mais curtos de tempo, quando comparados aos implantes de titânio com superfície lisa ou usinada [CORDIOLI, 2000].

O impasse mostra que muito temos a estudar sobre superfícies rugosas. Um fato é consenso na literatura, superfície rugosa é melhor que superfície lisa. No nosso trabalho a adesão celular da placa nitretada ocorreu como boa desenvoltura. Observaram-se numerosas fibras de stress na periferia da célula que asseguram a sua adesão focal. As irregularidades na superfície parecem guiar de maneira diferenciadas à fixação da célula à mesma. Observaram-se células de forma arredondadas e ou alongadas, volumosas, espalhando-se e interagindo com as irregularidades da superfície (Figura 4.8).

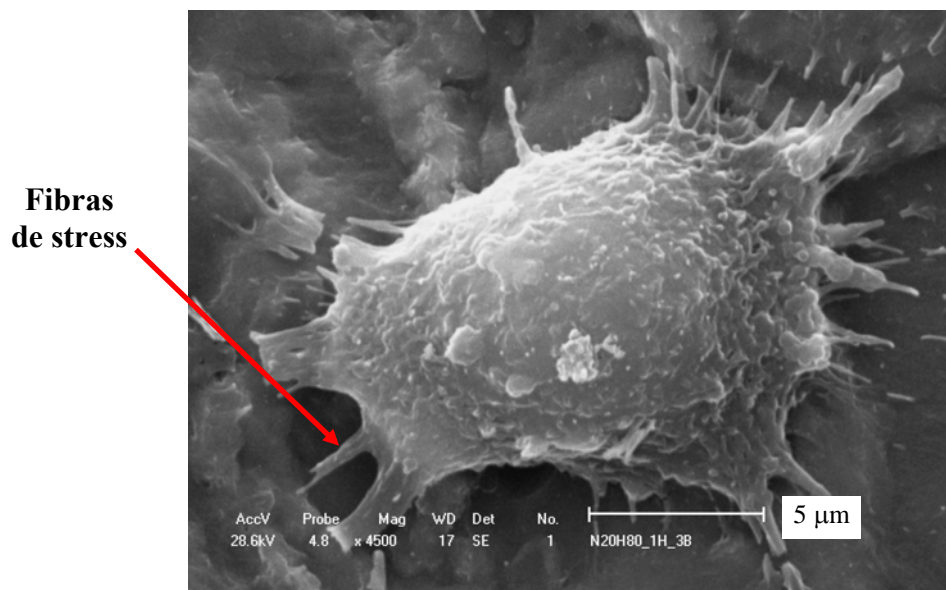


Figura 4.8. Adesão celular na placa nitretada.

Na placa sem tratamento, a célula (Figura 4.9) espalha-se sobre a superfície com uma forma alongada, não se vê emissão de fibras estressadas, apenas um estiramento buscando uma maior ocupação da placa. Portanto, quando comparadas, a placa nitretada apresenta uma célula mais aderida com uma adesão focal mais alta e sem alteração de forma.

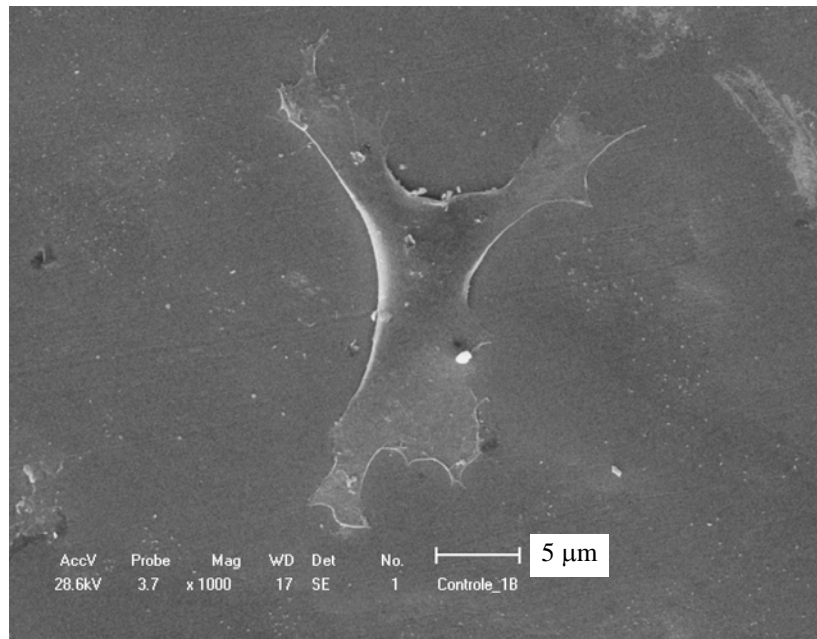


Figura 4.9. Adesão celular na placa controle.

4.2. Segunda Parte: Ensaios In Vivo

Foram empregados 06 coelhos brancos, adultos, do sexo masculino da raça Nova Zelândia pesando entre 1,8 e 2,5 Kg. Os animais foram selecionados para a cirurgia e tratados conforme o protocolo e normas de emprego de animais em pesquisas. As cirurgias foram realizadas no dia 05 de dezembro de 2004, na Clínica de Assistência Veterinária (ASVET) sob rígido protocolo cirúrgico com a duração de cada cirurgia de 40 min. Os implantes foram posicionados conforme tabela 3.2. Todos os animais recuperaram-se bem após o procedimento cirúrgico. O Planejamento foi seguido com o sacrifício dos animais com 15, 60 e 90 dias e reabertura das tíbias.

4.2.1. Radiografias

As radiografias servem para comparar implantes em uma mesma tíbia, pois as radiografias são de coelhos diferentes. Radiograficamente observa-se que com 45 dias, o implante nitretado é circundado por uma radiopacidade maior, enquanto que no implante sem tratamento existem áreas radiolúcidas no ápice e na cervical do mesmo. No (Figura 4.10). Dar para sugerir áreas de neoformação óssea no ápice e na cervical do implante nitretado.

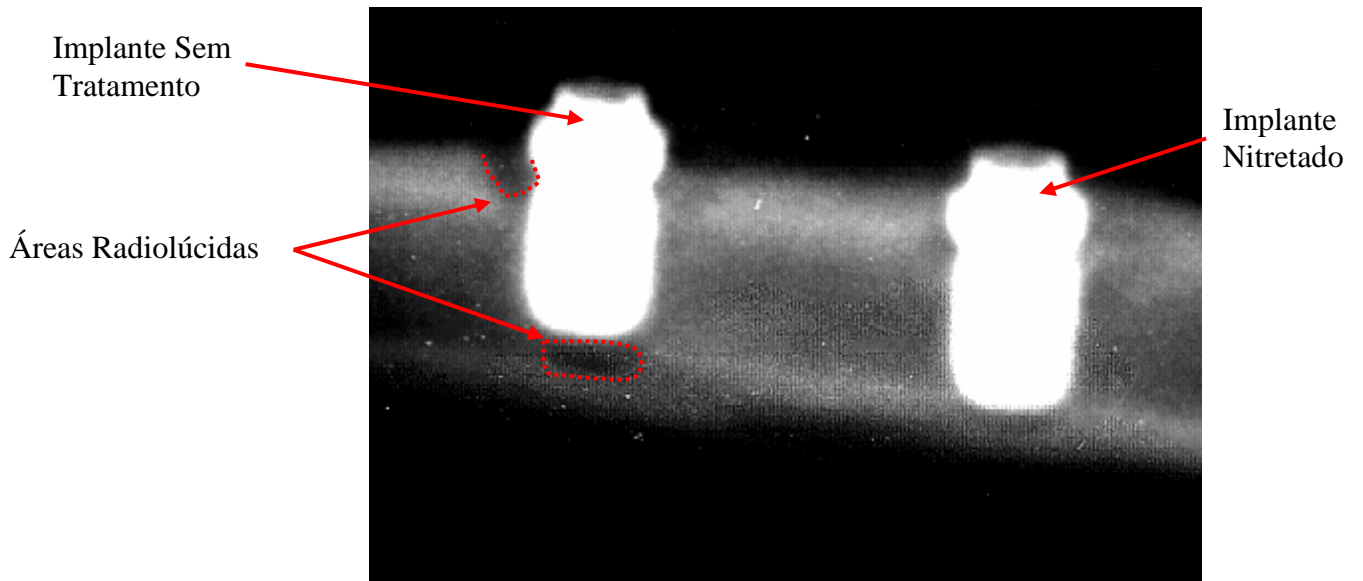


Figura 4.10. Radiografia da tíbia do coelho 3 com 45 dias.

Radiografia feita em outro coelho, este com 60 dias, as diferenças são mais discretas, parece que um processo inflamatório decorrente de uma fratura acidental do animal no local dos implantes no pós-operatório interferiu no processo de osseointegração. Mesmo assim observa-se ainda, tanto na cervical como na região apical do implante sem tratamento um halo radiolúcido que existe no implante nitretado, porém no contraste do Rx nota-se mais suave sugerindo formação de osso novo na área, Figura 4.11.

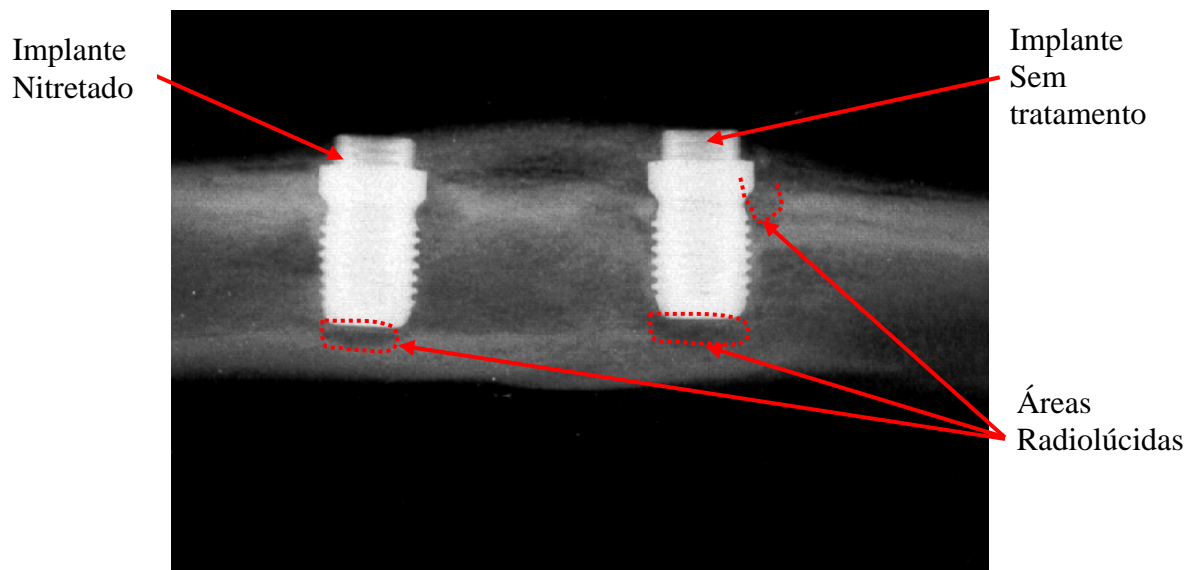


Figura 4.11. Radiografia da tíbia do coelho 5 com 60 dias.

O Rx dos implantes de um coelho com 90 dias não apresentaram nenhuma diferença significativa, tanto o nitretado como o sem tratamento, observou-se em sua volta ausência de áreas radiolúcidas apresentando aspecto radiográfico normal sugestivo de osseointegração, um estreito halo radiopaco é visto em torno do implante nitretado que nos faz acreditar que o alto torque aplicado neste implante fica justificado apesar do mesmo não ser bicortical, Figura 4.12.

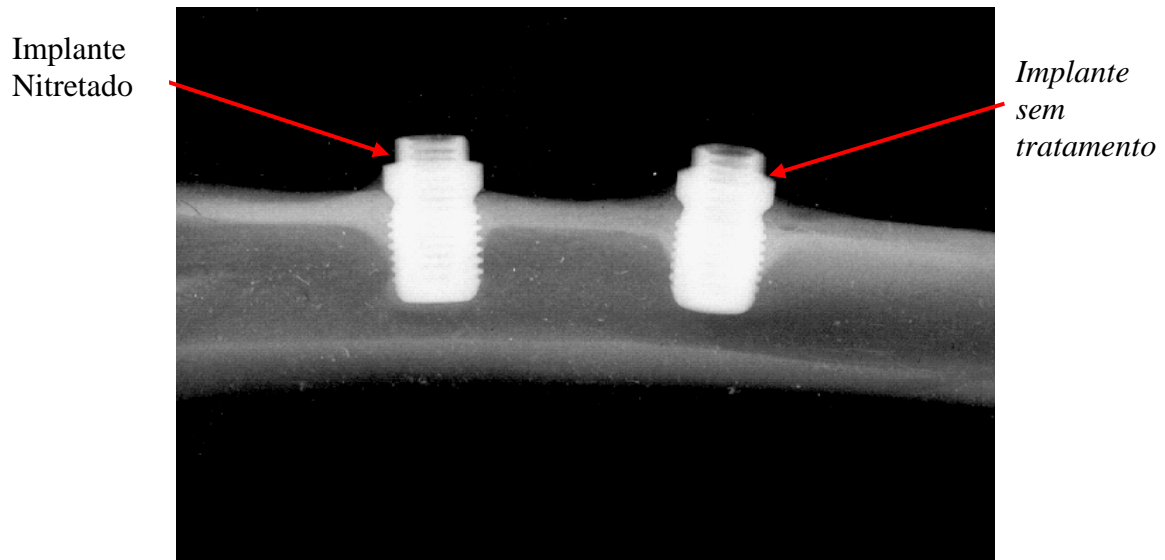


Figura 4.12. Radiografia da tíbia do coelho 1, com 90 dias.

4.2.2 Análise da Osseointegração nos Implantes Após 15 dias

O coelho 3 com uma fratura na tíbia, Figura 4.13, três implantes dos quatro inseridos foram perdidos. Apenas um implante nitretado ficou aderido ao osso na tíbia direita, foi localizada zona de possíveis osseointegrações. Nesta tíbia foi feito apenas MEV.

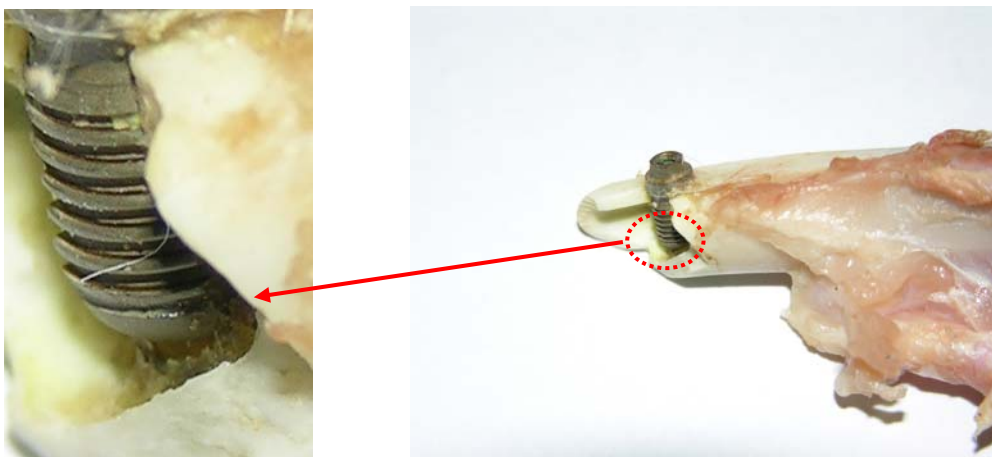


Figura 4.13. (a) O único implante aproveitado do coelho 3 (b) Zoom do mesmo.

Observa-se nas imagens feitas no MEV (Figura 4.14), na zona mostrada da figura 4.13, existe uma íntima relação entre o osso formado e o implante nitretado apesar do pouco tempo de cicatrização. Percebe-se uma união onde não dá para identificar onde começa o osso e onde termina o implante. O contorno ósseo envolvendo o implante parece está ligado fortemente ao implante tratado, mostrando já finalizada em alguns pontos a osseointegração, apesar da literatura citar que a osseointegração inicia-se somente após três semanas. Na figura 4.15 a rosca e o vale estão preenchidos e contornados sem existência de qualquer espaço entre eles mostrando o íntimo contato entre o implante e o osso. Comparando este resultado com o trabalho de Johansson 1988 onde encontraram que no período de 3 semanas, um quadro geral de uma interface fibrosa entre o Ti e o osso, fica claro que esta superfície parece osseointegrar-se em um tempo inferior a quinze dias.

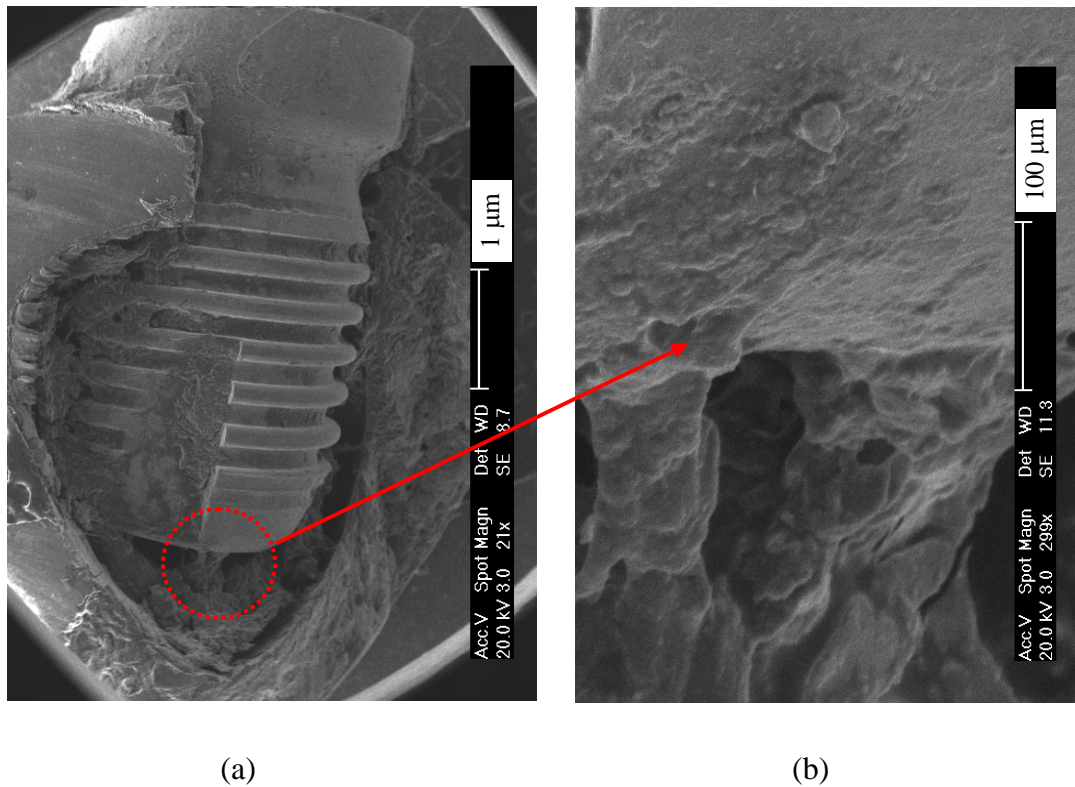


Figura 4.14. MEV do implante nitretado coelho 3 (a) e zoom da região apical (b).

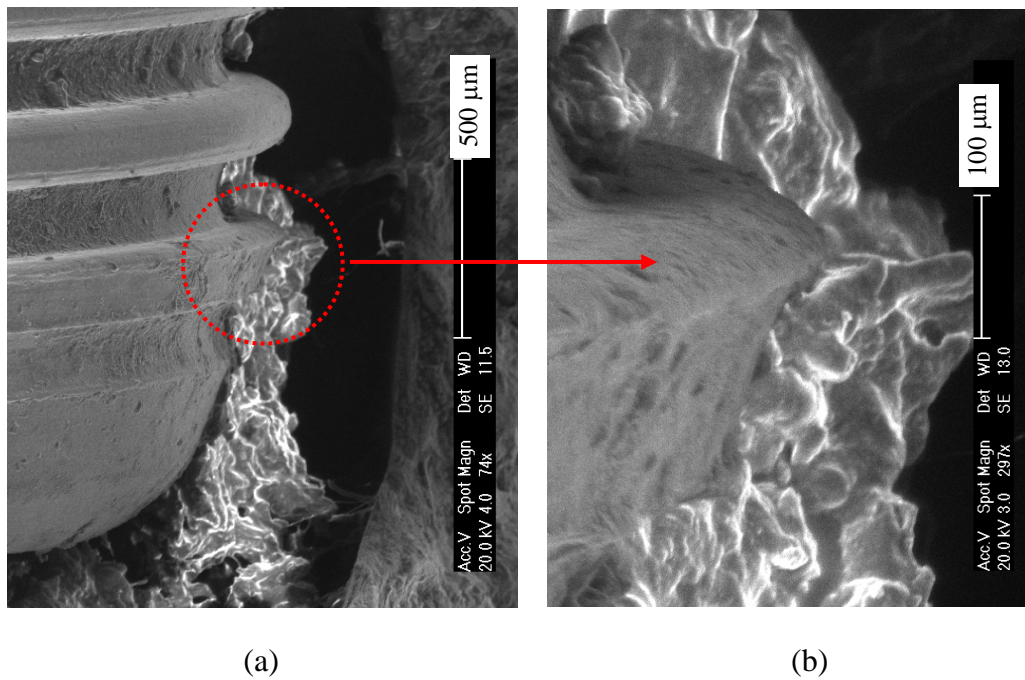


Figura 4.15. MEV das roscas do implante nitretado 3 (a) e zoom da mesma (b).

4.2.3 Análise da Osseointegração dos Implantes após 60 dias

Após 60 dias, seguindo o planejamento, sacrificou-se o coelho 4. Neste coelho, na tíbia direita, foram feitas as remoções por torque e obtiveram-se os seguintes valores: 30,95 Ncm para o implante nitretado e para o implante sem tratamento o torque foi de 13,75 Ncm. Observou-se que o valor obtido foi maior que 50% do valor obtido pelo implante sem tratamento.

Na tíbia esquerda os implantes foram cortados no micrótomo, visto em microscópio óptico e depois da captação da imagem foram feitas lâminas dos dois implantes, para visualização em microscópio de transmissão.

Observou-se em microscopia óptica de luz refletida, como mostra a Figura 4.16, uma faixa de osso neoformado contornando toda a superfície do implante, mostrando perfeitamente as três estruturas, implante, osso neoformado e osso maduro. Percebe-se também a camada nitretada que é uma faixa escura contornando toda a superfície.

Em microscópio de transmissão percebe-se também osso neoformado através do azul de tuloidina (corante) e do marcador ósseo (Calceína) administrado ao coelho, seis dias antes de sacrificá-lo. Na lâmina, visto no microscópio óptico de transmissão observou-se osso novo

na superfície, osso maduro mais afastado mostrando uma boa evolução da osseointegração (Figura 4.17).

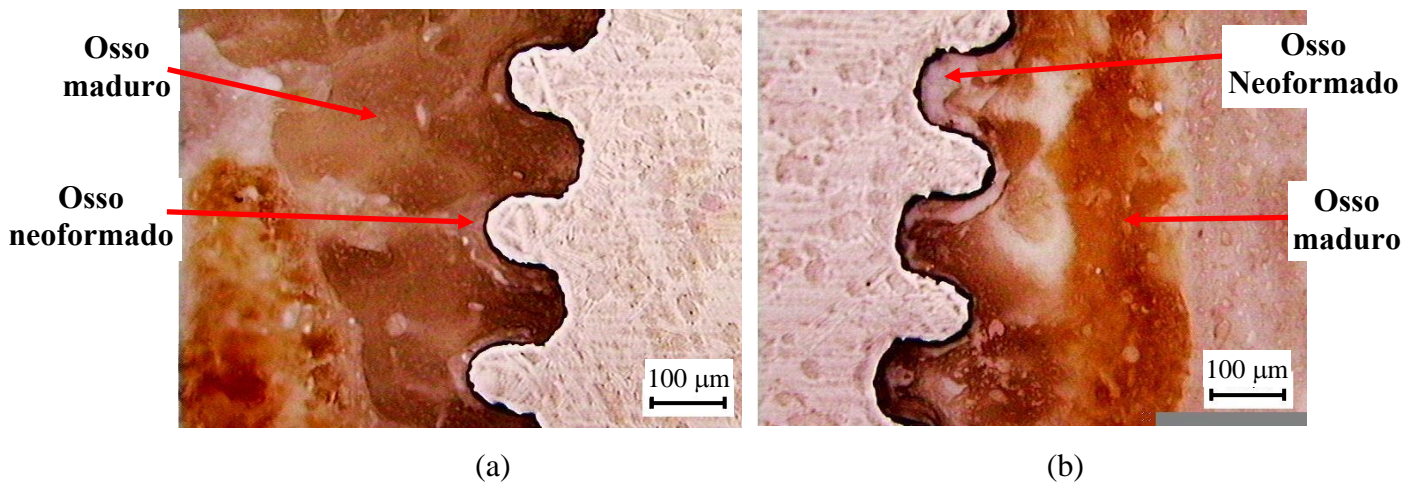


Figura 4.16. Lâminas neoformação óssea no implante nitretado do coelho 5 com 60 dias.

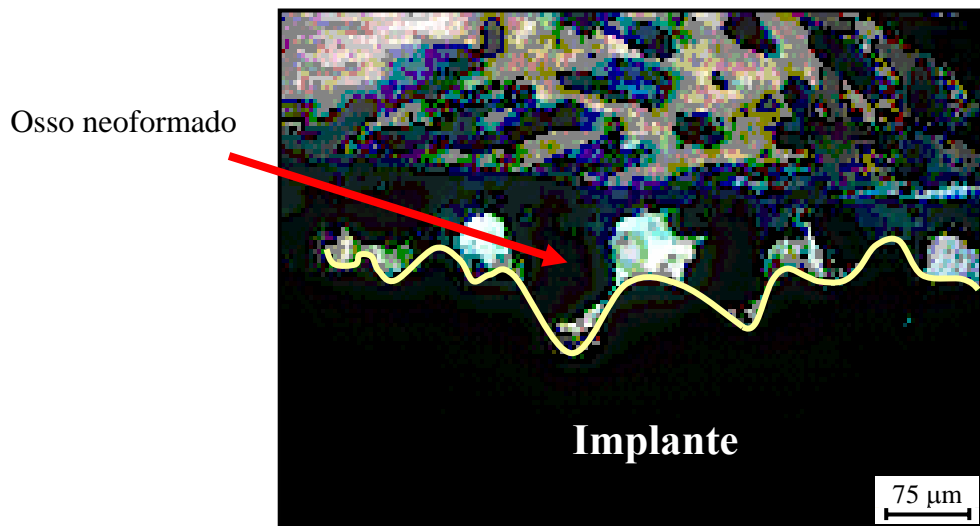


Figura 4.17 - Lâmina vista em microscopia de luz transmitida do implante nitretado, após 60.

4.2.4 Análise da Osseointegração dos Implantes após 90 dias.

Os resultados de remoção por torque dos diferentes implantes feitos nos coelhos com 90 dias mostraram uma média de 53.2 Ncm para os implantes nitretados e 31,2 Ncm para os sem tratamentos. Quando comparamos com o trabalho de Johansson em 1988, a média encontrada foi igual às publicadas por ele para 90 dias. Comparando com o trabalho de Sung-am cho, 2003 o resultado dele foi um pouco maior, porem o seus implantes foram inseridos bicortical diferente dos implantes nitretados deste trabalho que foi inserido em

apenas uma cortical, mostrando que mesmo inserido em uma cortical a osseointegração do nitretado foi maior que a do implante com tratamento ácido. Se compararmos com o trabalho de Karacsá, 2003 o torque de remoção dos implantes nitretados foi superior as superfícies tratadas com ácidos e a tratadas a laser.

Os implantes nitretados tiveram seus valores de torque superiores em relação aos implantes sem tratamento (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. valores de torques de remoção realizados.

Remoção por torque	Condição	Valores do torque (Ncm)
60 dias	Nitretada	30,95 TD coelho 4
	Sem tratamento	13,75 TD coelho 4
90 dias	Nitretada	56,3 TD coelho 1
		60,6 TE coelho 1
		51,4 TD coelho 2
		52,8 TD coelho 5
	Sem tratamento	48,8 TE coelho 5
		49,3 TE coelho 5
		35,3 TD coelho 1
		30,0 TE coelho 1
		31,4 TD coelho 2
		28,2 TD coelho 5

TD: Tíbia direita; TE: Tíbia esquerda

A exceção foi o coelho 5, onde verificou-se valores de torque inferior a 50 Ncm nos implantes nitretados na tíbia esquerda comparado com o nitretado da tíbia direita, devido a uma linha de fratura ocorrida na tíbia esquerda, Figura 4.18, no momento da manipulação do

animal, isto fez diminuir a resistência ao torque nesta tíbia quando comparado ao torque da tíbia direita.



Figura 4.18. Fratura da tíbia do coelho 5

No coelho 1 os implantes nitretado obtiveram torques superiores a 50 Ncm e sua tíbia esquerda apresentou o maior torque de remoção, 60,6 Ncm ilustrado na Figura 4.19.



Figura 4.19. Torque de 60,6 Ncm em implante nitretado

No gráfico (Figura 4.20) é comparado os valores de torque do implante nitretado com o implante sem tratamento, valores estes registrados no torquímetro. Para o implante nitretado

observa-se um crescimento na curva a desde a primeira medição até atingir o pico máximo de 60.6 Ncm. Para o implante sem tratamento só foi possível fazer vinte medição para observar o rompimento da interface osso/implante valor este de 30Ncm.

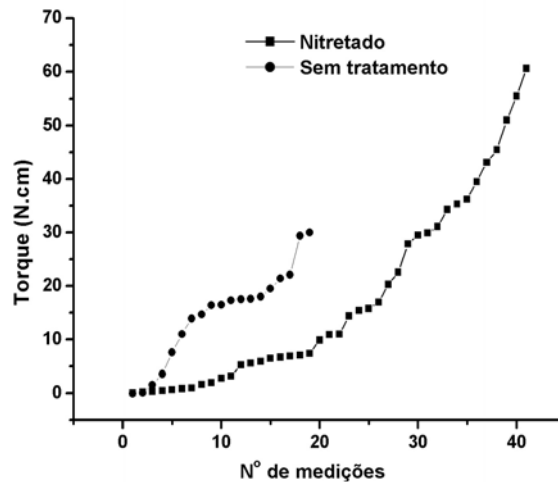


Figura 4.20. Curva comparativa da remoção por torque dos implantes da tíbia esquerda do coelho 1.

Os implantes do coelho 2 nitretado e sem tratamento removidos por torque, foram observados no Microscópico Óptico e no MEV. Na observação destes no microscópico óptico foi encontrado tecido ósseo aderido firmemente e em boa quantidade mostrando uma boa biocompatibilidade da superfície nitretada, em quantidade bem inferior aderiram aos sem tratamento (Figura 4.21).

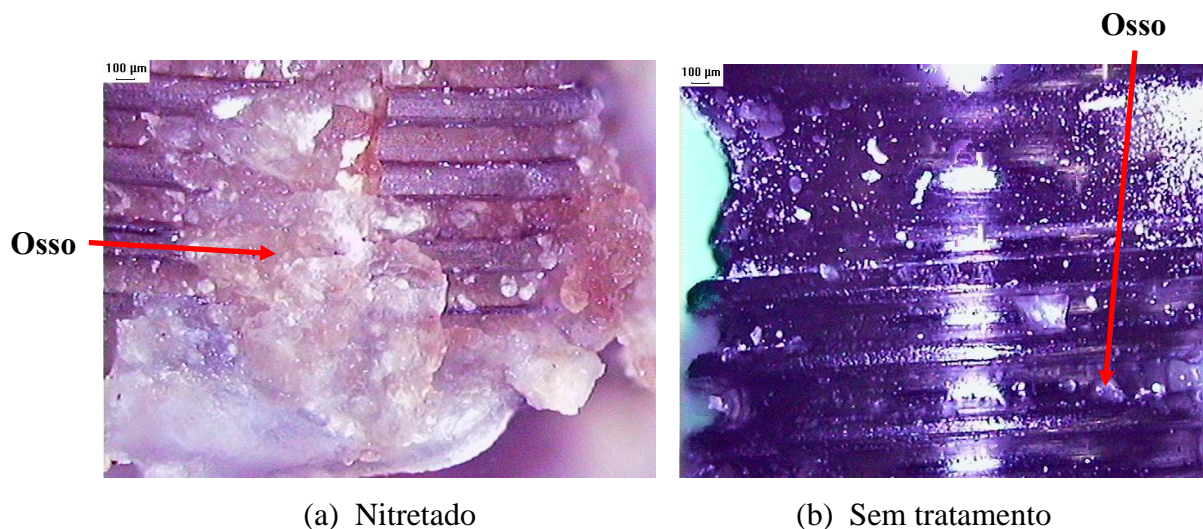


Figura 4.21. Os implantes do coelho 2, nitretado e sem tratamento removidos por torque visto em Microscópico óptico.

No Mev mostra um recobrimento completo das roscas com preenchimento dos vales. É mostrado um alto índice de contato osso implante bem superior ao sem tratamento (Figura 4.22).

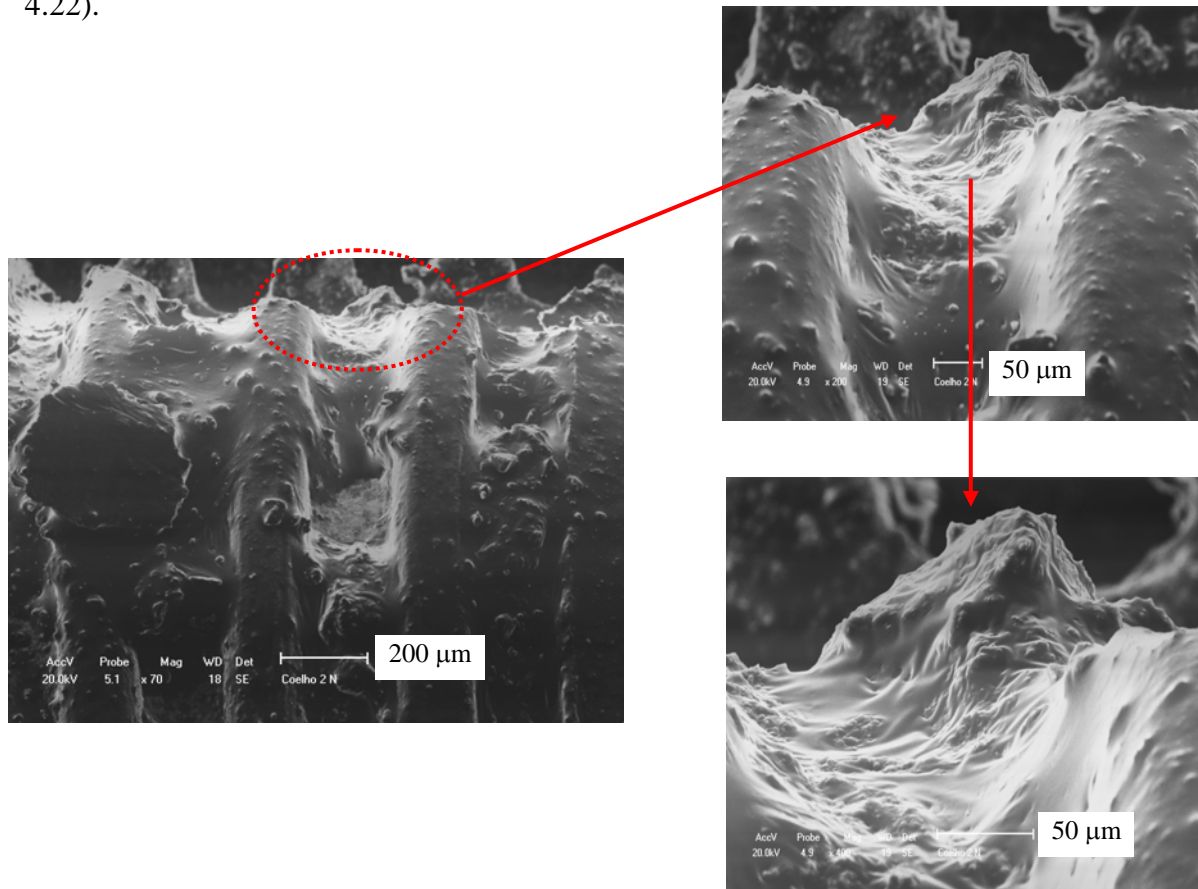


Figura 4.22. Implante nitretado do coelho 2, removidos por torque visto em MEV.

Os implantes sem tratamento mostram pouca quantidade de osso aderido e os que estão em contato apresentam fissuras e poucos pontos de contato osso implante como visto na Figura 4.23.

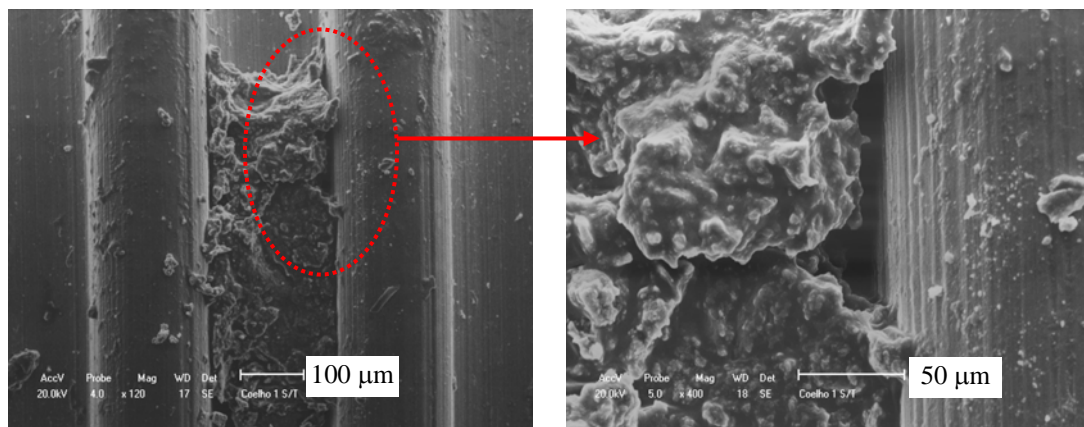


Figura 4.23. Implante sem tratamento do coelho 2, removido por torque visto em MEV.

A lâmina observada em microscopia óptica para o implante nitretado, mostrou uma camada escura contornando todo o implante. As roscas estão todas preenchidas com tecido ósseo neoformado. No implante sem tratamento, falhas ósseas são observadas justificando seu menor torque de remoção (Figura 4.24).

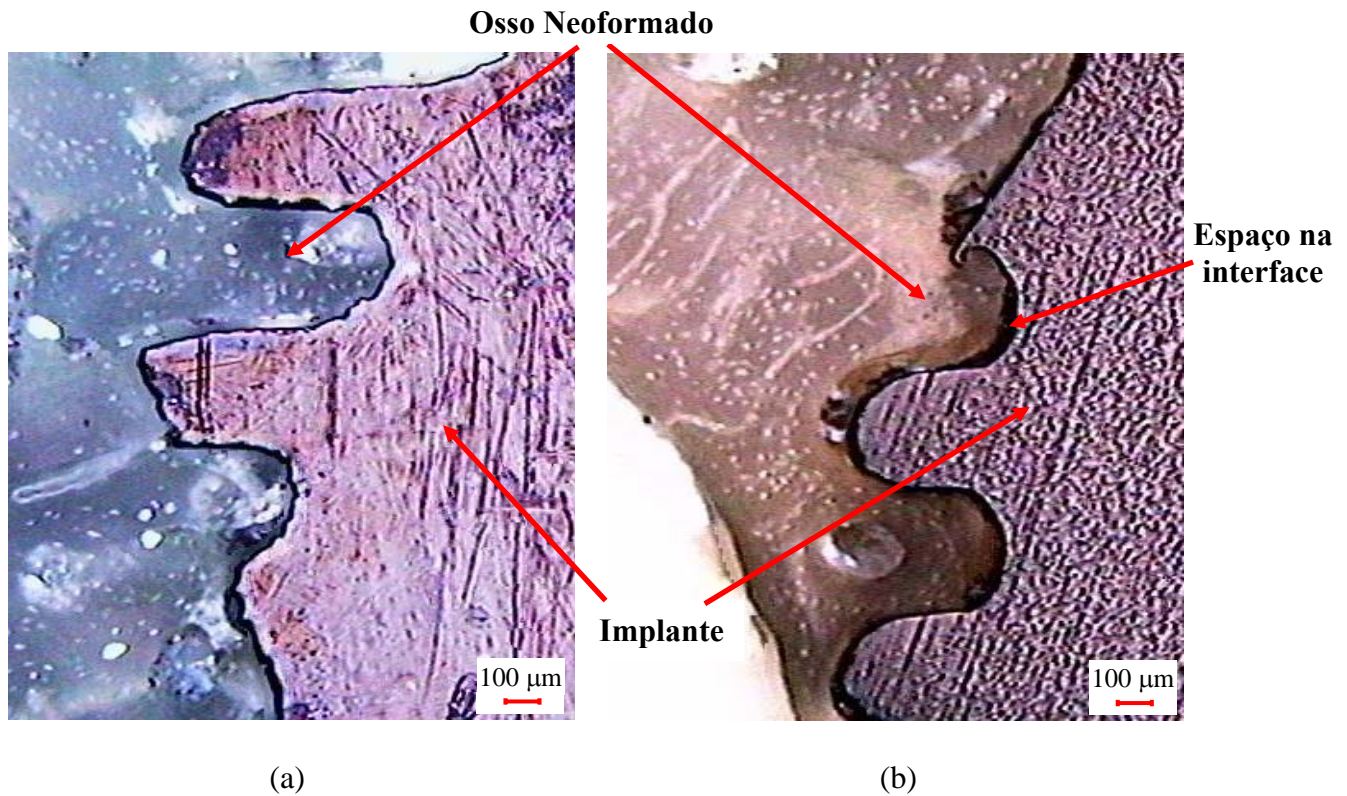


Figura 4.24. Lâminas do implante nitretado (a) e do sem tratamento (b).

4.2.5 Perímetro da Osseointegração

Com o software image pro plus foi feita uma medida da área com contato ósseo e dividiu-se pelo valor do perímetro total medido no implante (Tabela 4.2), nove pontos foram medidos obtendo-se uma média de 85,89% de índice de contato osso/implante no implante nitretado. Para o implante sem tratamento o valor encontrado foi de 32,2 %. Observou-se comparando os resultados que o implante nitretado foi o dobro do sem tratamento, mostrando uma relação direta entre remoção por torque e percentual de contato osso/implante. Comparando com o trabalho de Johansson 1988 que achou um perímetro de osseointegração de 65% para implantes com 90 dias, nos faz concluir que a superfície nitretada melhorou a osseointegração.

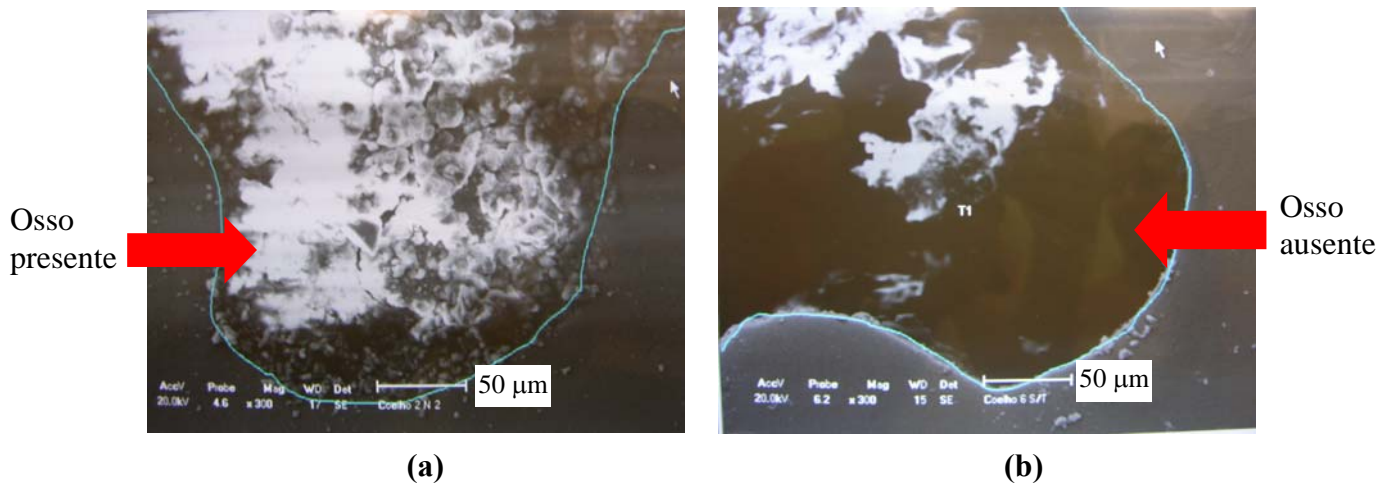


Figura 4.25. Marcação do perímetro de uma rosca em um implante nitretado (a) e um implante sem tratamento (b).

Tabela 4.2. Perímetro de Osseointegração.

Medida (N°)	Perímetro (µm)		% de osseointegração	
	C/Tratamento	S/Tratamento	C/Tratamento	S/Tratamento
1	0,56	0,28	56,47	27,85
2	1	0,78	100	77,86
3	1	0,61	100	61,17
4	1	0	100	0
5	1	0	100	0
6	1	0,43	100	42,74
7	0,87	0,07	87,21	7,07
8	0,56	0,44	56,39	43,93
9	0,73	0,29	72,95	29,35
Média	-	-	85,89	32,21

4.2.6 Molhabilidade

O implante nitretado apresentou uma molhabilidade bem superior à superfície do Ti sem tratamento. A Figura 4.26 ilustra o molhamento de uma gota sobre um implante nitretado, 1 s e 60 s após sua colocação. Verifica-se uma completa acomodação da gota sobre o implante. Comparando-se com um implante sem tratamento, mas com o mesmo desenho que o implante anterior, nota-se a superioridade do primeiro.

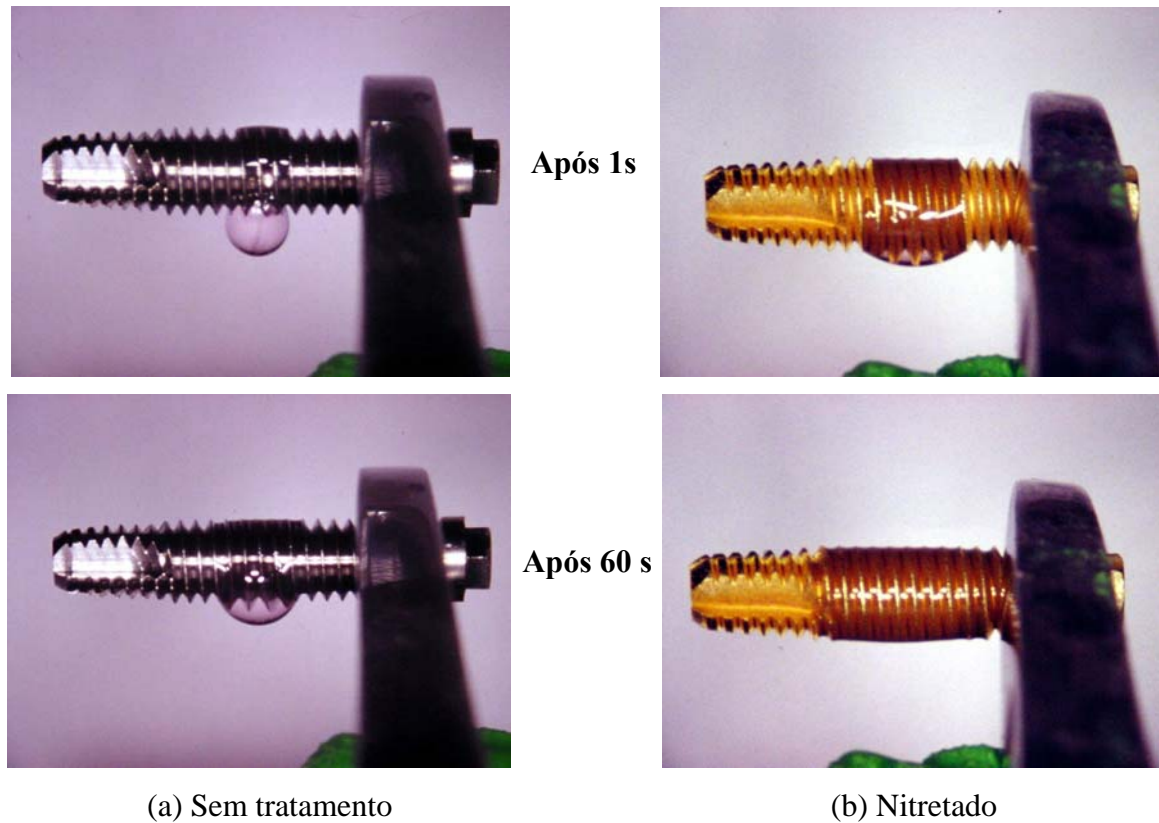


Figura 4.26. Diferença de molhabilidade entre o implante nitretado e outro implante idêntico, sem tratamento.

Esta alta molhabilidade foi observada logo no primeiro contato da gota com a superfície do implante, após os primeiros 60 s, todo o líquido da gota revestia completamente a sua superfície. Para este parâmetro fica clara a superioridade do implante nitretado quando comparado com o sem tratamento.

4.2.7. Textura

Uma grandeza muito importante para se avaliar o desempenho no contato entre duas superfícies é a textura superficial. Se duas superfícies possuem as mesmas características químicas, significa que a tensão entre duas superfícies também será maior. Também, região de oclusões onde a formação de meniscos seja possível favorece ao aumento do contato entre duas superfícies. A observação, por microscopia eletrônica de varredura, da superfície dos implantes nitretados indicam uma textura adequada para uma boa molhabilidade. A Figura 4.27 mostra um implante nitretado.

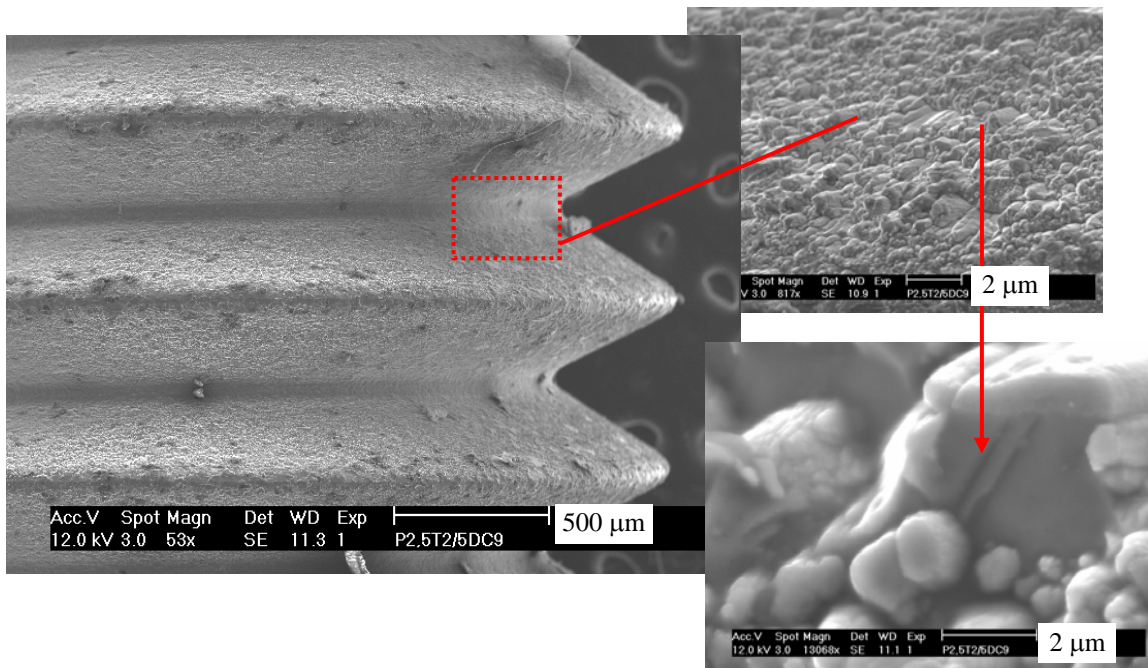


Figura 4.27. Textura da superfície de um implante nitretado, mostrando regiões de oclusões.

Observa-se uma textura uniforme em toda extensão do implante nitretado. Para ampliações de 860 X, verificava-se uma microestrutura como mostrada no quadro central e para um aumento de 13000X (quadro superior direito), observa-se regiões com oclusões.

Comparando-se com uma superfície de um implante sem tratamento observa-se que a mesma não é lisa como visto na literatura, possui uma superfície heterogênea com microfissuras e defeitos provenientes da usinagem.

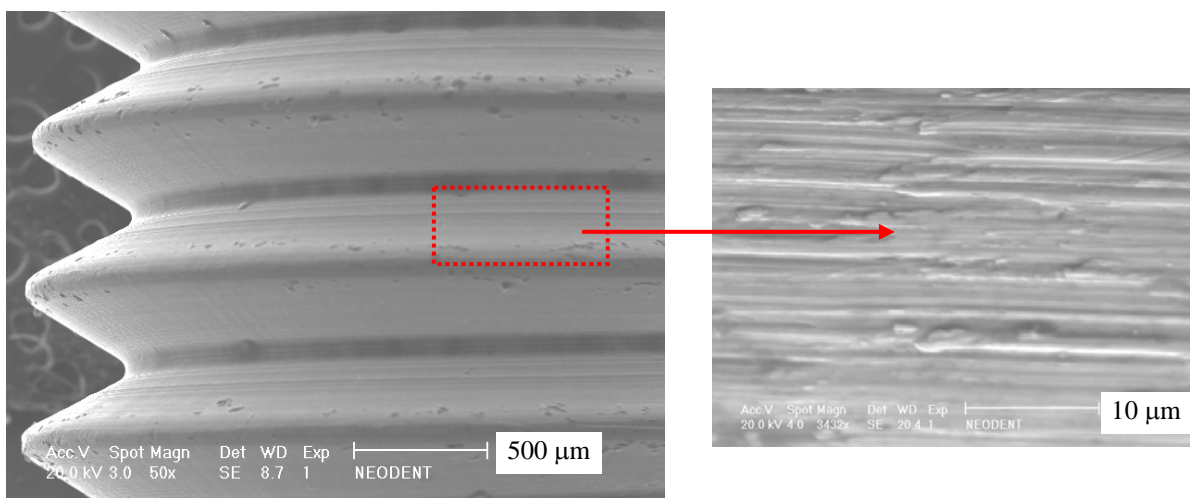


Figura 4.28. Textura da superfície de um implante sem tratamento.

O trabalho comprovou que as superfícies nitretadas não são tóxicas, são biocompatíveis e adequadas para uso em implantes dentais. Nas placas nitretadas houve adesão e proliferação celular de forma superior às placas sem tratamento. As células aderiram bem à superfície nitretada mostrando boa adesão focal através de emissão de fibras de stress nas extremidades da membrana citoplasmática. O torque de remoção foi maior nos implantes nitretados que nos sem tratamentos, mostrando uma ancoragem óssea boa. Comparados com a literatura os torques ficaram equivalentes aos da literatura e em alguns casos superior. Mesmo após a remoção, os implantes nitretados apresentaram-se com estrutura óssea com íntimo contato entre suas roscas mostrando que estavam osseointegrados. Com 15 dias após cirurgia, o coelho 3 fratura as tíbias, apenas uma foi aproveitada. Imediatamente foi encaminhada a microscopia eletrônica de varredura, mostrou um íntimo contato osso/implante contrariando o que se vê na literatura. O coelho 4 com 60 dias apresentou osso neoformado em suas roscas comprovando sua superioridade no torque de remoção em relação ao sem tratamento. A molhabilidade precursora da osseointegração [KASEMO, 2002] foi muito superior tanto para as placas como para os implantes quando comparados aos sem tratamentos. A rugosidade na superfície nitretada tem valores medianos quando comparadas às superfícies com outros tratamentos, porém mostra-se boa e uniforme parecendo ter influência direta no resultado de adesão e molhabilidade.

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

Baseado no que foi proposto e realizado pela avaliação do desempenho de implante nitretados em plasma: Estudo em coelhos pode-se concluir que:

1. A superfície das placas e implantes nitretadas em plasma por descarga em cátodo oco não é tóxica, é biocompatível e adequadas para uso em biomaterial.
2. Tanto a adesão como a proliferação celular nas placas nitretadas foram superiores as placas sem tratamento.
3. O perímetro osseointegrado dos implantes nitretados em plasma foi maior que o perímetro dos implantes sem tratamento.
4. A Remoção por torque dos implantes nitretados foi o dobro da remoção dos implantes sem tratamento.
5. A superfície nitretada apresentou melhores resultados no que se refere a molhabilidade e rugosidade que os implantes sem tratamento.

Sugestões para futuros trabalhos

O presente estudo deu origem a discussões que poderão, num futuro bem próximo, incentivar pesquisadores a aplicar estes implantes nitretados em outros animais. Neste sentido, sugerem-se os seguintes pontos temáticos para futuros trabalhos:

1. Ensaio *in vivo* do implante nitretado em catodo oco em outras espécies de animais;
2. Ensaio mecânico *in vitro* que simulem uma mandíbula para observar o desempenho dos implantes em função;
3. Estudo do comportamento mecânico *in vivo* dos implantes nitretados em mandíbulas de cães visando estudar o desempenho dos implantes com cargas mastigatórias;
4. Estudo comparativo com superfícies de implantes nitretados com implantes importados;
5. Adicionar células tronco na superfície nitretada visando aumentar o perímetro osseointegrado;
6. Desenvolver tecnologias visando produção em escala industrial.

Referências Bibliográficas

ADELL, R et al. A 15 – Year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* 10 (1991) 387-416.

AHMED, N.A.G. *Ion plating technology*. New York, Wiley. (1987) 171.

ALBREKTSSON, T. et al. *Osseo integrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to implants anchorage in man. Acta Orthop. Scand.* 52 (1981)155-170.

ALBREKTSSON, T. et al. *The Interface zone of inorganic implants n vivo titanium implants in bone. Ann. Biomed.*, 11 (1983) 1-27. Apud RATNER B JOHSTON, A 13, LENK T J 110 p. 60.

ALBREKTSSON, T. et al *Osseointegration of bone implants. A review of on alternative mode of fixation. Acta Orthop. Scand.*, 58 (1987) 657- 677.

ALBREKTSSON, T. et al *Direct bone anchorage of oral implants:clinical and experimetal considerations of the concept of osseointegration. Int. J. Prosth.* 3 (1) (1990) 30-41.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. *Quantified bone tissue reactions to various metallic materials with reference to the so-called osseointegration concept*. In: DAVIES, J.E. *The bone-biomaterial interface*, Buffalo, University of Toronto Press, 1991, Cap.32, p. 357-66.

ALVES JR, C. *Nitretação em plasma pulsado: equipamento, preparação e caracterização da camadas nitretadas*. 1995, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Paulo.

ALVES JR., C; RODRIGUES, J. A. *Nitretação de aços assistidas por plasma – variabilidade de uso para as indústrias nacionais*. Metalurgica – ABM, 1991.

ALVES JR, C.; GUERRA NETO, C. L. B.; MORAIS, G. H. S.; SILVA, C.F. ; HAJEK, V. *Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge*. Surface and Coatings Technology, 194 (2) (2005) 196-202.

AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. de. *Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual*. Pesqui Odonto Bras. 15 (2) (2001) 166-173.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAS *Standard recommended practice for surface preparation and marking of metallic surgical implants*. Philadelphia, ASTM. 2000 (ASTM Standard F 67 - 95).

ANSELME, K. *Review Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials 21 (2000) 667-681.

BAGNO, A.; GENOVESE, M.; LUCHINI, A. et al. *Contact profilometry and correspondence analysis to correlate surface properties and cell adhesion in vitro of uncoated and coated Ti and Ti6Al4V disks*. Biomaterials. (25) (2004) 2437-2455.

BAIER, R. E.; MEYER, A. E. *Implant surface preparation*. Int J Oral Maxillofacial and Implants. 3 (1988) 9-20.

BARBOSA, D. Z.; CATAI, R. E. *Desenvolvimento de um torquímetro de precisão para o estudo do desempenho de implantes osseointegrados*. METALURGIA & MATERIAIS (2003) 20-29.

BEHRISCH, R. *Introduction and Overview*. In: *Sputtering by bombardment II*. Berlin, Springer Verlag, 52 (1983) 1-10 (Topics in Applied Physics,).

BETZ, G.; WEHNER, K. *Sputtering of multicomponent materials* In: BEHRISCH, R., ed. *Sputtering by bombardment II*. Berlin, Springer Verlag. 52 1983 11-20. (Topics in Applied Physics,).

B. GROESSNER; SCHREIBER, A. NEUBERT, W.D. MULLER, M. HOPP, M. GRIEPENTROG, K.P. LANGE, J. *Biomed. Mater. Res.* 64 (4) (2003) 591.

BOWERS. K. T et al. *Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. Int. J. Oral Maxillofacial and Implants.* 7 (3) (1992) 302-310.

BRANEMARK P. I. et al. *Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 3 (1969) 81-100.

BRANEMARK, P. I. et al. *Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period.* Stockholm, Almqvist & Wilsell International, 1977.

BRANEMARK, P.I.; HANSON, B. O.; ADELL, R. et al. *Osseo-integrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. Scand J. Plast Reconstr Surg* 2 (1977) 122-132.

BRANEMARK, P.I. *Introduction to Osseointegrated tissue integrated. Prostheses, Branemark, P.I, Zarb, G. A. Albrektsson.T. Chicago, Quintessence.* (1985) 11-76.

BRUNETTE, D. M. *The effects of implants surface topography on the behavior of cells. Int J Oral Maxillofacial and Implants.* 3 (1988) 231-246.

CARLSSON, L. V.; et al. *Removal torque for polished and rough titanium implants. Int. J. oral Maxillofacial and Implants.* 3 (1) (1988) 21- 24.

CARLSSON, L.V.; ALBREKTSSON, T; BERMAN, C. *Bone response to plasma cleaned titanium implants: Int. J. Oral Maxillofacial and Implants.* 4 (3) (1989)199-204.

CHAPMAN, B. *Glow discharge processes – Sputtering and plasma etching.* New York, Wiley International, p. 406 ,1980.

CESCHIN, J. R. *O Implante na Reabilitação Oral,* Ed. Panamed, p. 63-117, São Paulo, 1984.

CORDIOLI, G.; MAJZOUN, Z.; PIATELLI, A.; SCARANO, A. *Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. Int J Oral Maxillofacial and Implants.*; 15 (5) (2000) 668-674.

DAVIES, J. E.; LOWENBERG, B.; SHIGA, A. *The bone-titanium interface in vitro. J. Biomed. Mater.* 24 (10) (1990)1289-306.

DELIGIANNI, D. D.; KATSALA, N.; LADAS, S.; SOTIROPOULOU, D.; AMEDEE, J.; MISSIRLIS, Y. F. *Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. Biomaterials*; 22 (11)(2001) 1241-1251.

DONATH, K.; BREUNER, G. *A Method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue: the Säege-Schliff sawing and grinding technique. J. oral Path.* 11, (4) (1982) 318 - 326.

ERIKSSON, A.R.; ALBREKTSSON, T. *Temperature threshold levels for heat- induced bone tissue injury: a Vital microscopic study the rabbit. J. Prosth. Dent.* 50 (1) 1983.

EDENHOFER, B. *Physical and metallurgical aspects of ionnitriding. Heat Treatment of Metals.* 1 (1) (1974) 23-28.

FARIA, A. C. L.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. *Nitric acid passivation dos not affect in vitro biocompatibility of titanium. Int J Oral Maxillofacial and Implants.* 18 (2003) 820-825.

FOUILLAND, L. et al. *Composition and tribological characterization of chemically vapour-deposited TiN layer. Surf Coat Technol.* 100 (1-3) (1998) 146-148.

FRAKER, A. O. *Corrosion of metallic implants and prosthetic devices.* In AMERICAN SOCIETY FOR TEST AND METALS. *Metals handbook* 9 ed Ohio. ASTM. v 13. p 1324-35 1987.

FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells – A manual of basic technique* 4 ed. New York: A John Wiley & Sons. p.577 (2000).

GROESSNER-SCHREIBER, B. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A (4) (2003) 591.

GUERRA NETO, C. L. B, *MSc. Thesis, Department of Physics, Universidade Federal do Rio Grande do Norte* (2001) Natal – Brazil.

GROSS, U. M. et al. *Biocompatibility – The interacion of biomateriales and host reponse.* J. dent. Educ. 52 (12) (1988) 798-803.

HAFF, P.K.; SWITKOWSKI, Z.E. *On the Sputtering of binary compounds.* Applied Physics Letters., v. 29, n.9, p. 549-51, 1976.

HARPER, J.M.E. et al. *Enhanced Sputtering of one species in the processing of multielement thin films.* Journal of Vacuum Science and Technology. 10 (4) (1999)1765-71.

HEALY, K. E. *Na Interfacial approach to the mechanisms of passive dissolution of titanium in biological environments.* Philadelphia Dissertation, (Ph. D) – University of Pennsylvania, apud HEALY, K. E.; DUCHYNE P. 56 p. 319 1990.

HEALY, K. E.; DUCHYNE P. *The mechanism of passive dissolution of titanium in a model physiological environment.* J. Blomed. Mater. 26 (3) (1992) 19-38.

HENRY, P.J. *Comparative surface analysis of two osseointegrated implant system.* Int. J. Oral Maxillofacial and. Implants.2 (1) (1987) 23-27.

HOBO, S.; ICHIDA, E.; GARCIA, L. *Osseointegração e Reabilitação Oral.* 1º ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, p. 40 1997.

HOWATSON, A.M. *Descargas electricas en gases.* Madrid, Urmo, p.198 (1965).

HUDIS, M. *Study of ion-nitriding.* Journal of Applied Physics. 44 (4) (1993) 1489-1496.

HUGHES WASSELL D.T; EMBERY, G. *Adsorption of chondroitin-4-sulphate and heparin onto titanium: effect of bovine serum albumin.* Biomaterials 18 (1997) 1121–11 26.

JAHANSSON, C.B.; SENNERBY, L.; ALBREKTSSON, T. *A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and vitalium implants.* Int. J. Oral Maxillofacial and Implants. 6 (4) (1991) 437-441.

JANSEY, J. A. et al. *Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants.* J. Biomed Mater. 25 (8) (1991) 973-989.

JOHANSSON, C.B.; ALBREKTSSON, T. *Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants.* Int. J. oral Maxillofacial and Implants. 2 (2) (1987) 69-75.

JOHANSSON, C.; JACOBSSON, M.; ALBREKTSSON, T. *Removal force for osseointegrated titanium implants.* Advanc. Biomat. 8 (1988) 87-92.

JOHANSSON, C.B.; SENNERBY, L.; ALBREKTSSON, T. *A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and vitallium implants.* Int. J. oral Maxillofacial and Implants 6 (4) (1991) 437-41.

JOHANSSON, C.B.; ALBREKTSSON, T. *Removal torques of commercially pure titanium and vitallium implants in rabbit bone.* In: LANEY, W.R.; TOLMAN, D.E. *Tissue integration in oral, orthopedic, and maxillofacial reconstruction.* Illinois, Quintessence, 1992. Cap. IV, p.227.

JOHANSSON, C. et al. *Commercially pure titanium and Ti6Al4V implants with and without nitrogen-ion implantation: surface characterization and quantitative studies in rabbit cortical bone.* J Mater Se Mater Med. 4 (2) (1993) 132-141.

KASEMO, B. *Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects.* J. prosth. Dent. 49 (6) (1983) 832-837.

KASEMO, B.; LAUSMAA, J. *Metal selection and surface characteristics.* In BRANEMARK. P -I ZARB G A, ALBREKTSSQN, *1 Tissue - integrated prostheses osseointegration in clinical dentistry* Chicago, Quintessenz. Cap 4, p. 99-116 1987.

KANSEMO, B.; LAUSMAA, J. *Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach*. Int J Oral Maxillofacial and Implants. 3 (1988) 247-259.

KASEMO, B. *Surface Science*. 500 (2002) 656.

KARACSA, A.; JOOB FANCSALYB, A.; DIVINYIB, T. G.; PETO, A.; KOVACHA, G. *Morphological and animal study of titanium dental implant surface induced by blasting and high intensity pulsed Nd-glass laser* Materials Science and Engineering C 23 (2003) 431–435.

KELLER, J. C.; GROTENDORST, G.R.; DOUGHERTY, W.J. *In vitro cell attachment to Ti surfaces*. J. dent. Res., v. 67, p. 314, 1988. Special Issue./ Abstract n. 1611.

KELLY, R. *Bombardment-induced compositional change with alloys, oxides, oxysalts and halides*. In: ROSSNAGEL, S.M.; CUOMO, J.J.; WESTWOOD, W.D *Handbook of plasma processing – technology - Fundamentals, etching, deposition and surface interactions*. New Jersey, Noyes, P. 91-137 1989.

KURNEY, A.S.W.; MOHAN, R.M.; MALLYAN, R.M. *Nitriding of steels – na overview*. In GUPTON, P.S., ed. *The heat treating source book, Metals Park*, ASM,. p. 127-33 1986.

LINDER, L. *High- resolution microscopy of the implant- tissue interface*. Acta Orthop. Scand. 56 (1985) 269-272.

MACDONALD, D. E.; DEO, N.; MARKOVIC, B.; STRANICK, M.; SOMASUNDARAN, P. *Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles*. Biomaterials 2002;23:1269–79.

MEACHIM, G.; WILLIAMS D.F. *Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants*. J. Biomed. Mater. Res. V. 7, p. 555-72, 1993 apud MERRIT, K.P.; MARGEVICIOUS, R.W.; BROWN, S.A. 95 p. 1512.

MEFFERT, R.M.; LANGER, B.; FRITZ, M.E. *Dental implants: a review*, J. Periodont., v. 63 (11) (1992) 859-70.

MEZGER, P. R.; CREUGERS, N. H. J. *Titanium nitride coatings in clinical dentistry*. J. Dent. 20 (1992) 342-344.

MICHAELS, C. M. et ai. *In vitro connective tissue ceii attachment to cp Ti*. J. dent. Res v 68. p. 276. 1989 Special Issue. /Abstract n. 759.

MISHRA, S.C; NAYAK B.B.; MOHANTY B.C; MILLS, B. J. Mater. Process. Technol. 132 (2003) 143.

MURAT, C. E.; SAIME, S.A.; KÝVANC, A. *A Role of mechanical environment and implant design on bone tissue differentiation: current knowledge and future contexts* Journal of Dentistry (2004) 32, 123–132.

OLEINICK, A. J. *Osseointegration versus ficro-osseointegration: Review of endosseous dental implant systems*. Gen. Dent., v. 41, n. 5, p. 406-8, Sept. / Oct. 1993.

PARK, J. ; KIM, D. J.; KIM, Y. K.; LEE, KEUN H.; LEE, KI -H.; LEE, H. AND AHN, S. *Thin Solid Films*.102 (2003) 435.

PARR, G. R.; GARDNER, L. K.; TOTH, R.W. *Titanium: the mystery metal of implants dentistry; dental materials aspects*. J. prosth. Dent. 54 (3) (1985) 410- 414.

PARSEGIAN, V. A. *Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates*. J. prosth. Dent.49 (6) (1983) 838-842.

PETITJEAN, L. *Estude d'une decharge electrique dans un melange azote-hydrogene pour la nitruration de surfaces metalliques*. Orsay, Universidad Paris – Sud, 1982. 153p. (Rapport L.P. 1983.

PULEO, D. A.; NANJI, A. *Understanding and controlling the bone-implant interface*. Biomaterials 20 (1999) 2311-2321.

RATNER, B. D.; JOHNSTON, A. B.; LENK, T. J. *Biomaterial surfaces*. J. Biomed. Mater. Res.: Applied Biomaterials. 21 (A1) (1987) 59-90.

RATNER, B.D. *New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials*. J. Biomed. Mater. 27 (7) (1993) 837-850.

RIE, K. et al. *Plasma surface treatment and PACVD in Ti alloys for surgical implants* Surf Coat Technol. 74-75 (1-3) (1995) 973-980.

RIGOA, E.C.S.; BOSCHIA, A.O.; YOSHIMOTO, M.; ALLEGRINI JR. B, S.; KONIG JR.B, B. And CARONARIC, M.J. *Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants* Materials Science and Engineering. 24 (2004) 647-651.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M.; NOORT, R.; HATTON, P.V.; DEVLIN, A. J. *Surface topography of hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response*. Implantodontia.16 (3) (2002) 209-215.

ROSA A. L.; BELOTI, M. M. *Effect of cp Ti surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation*. Braz Dent J.14 (1) (2003) 16-21.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. *Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness*. Clin Oral Impl. 14 (2003) 43-48.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M.; VAN NOORT, R. *Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography*. Dent Mat. 19 (2003) 768-772.

ROSSNAGEL, S.M.; CUOMO, J.J.; WESTWOOD, W.D. *Handbook of plasma processing technology – fundamentals, etching, deposition and surface interactions*. New Jersey, 1989.

RUPP, F.; SCHEIDELER, L.; REHBEIN, D. et al. *Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications*. *Biomaterials*. 25 (2004) 1429-38.

RUSET, C. *The influence of pressures on temperature uniformity on the plasma nitriding process*. *Heat Treatment of Metals*. 3 (1991) 81-4.

SANTOS, C.A. *Composição superficial e propriedades mecânicas e tribológicas de aços – carbono implantado com nitrogênio*. Porto Alegre, 1987. Tese (Doutorado) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SARANDEEP S. HUJA AND W. EUGENE ROBERTS, *Mechanism of Osseointegration: Characterization of Supporting Bone with Indentation Testing and Backscattered Imaging*, *Semin Orthod*. 10 (2004) 162-173.

SCHROEDER, A.; POHLER, O.; SUTTER, F. *Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplant mit Titan Spritzschichtoberfläche*. *Schweiz Mschr Zahnheilk*. 86 (7) (1976) 713-727.

SCHULTE, W. *Anleitung für das Frialit ® - Dentalimplantat*, Tübingen. Mannheim, Friedrichsfeld AG. 1980.

SCHNEIDER, G.; BURRIDGE, K. *Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata*. *Exp Cell Res*. 214 (1994) 264–269.

SCHROEDER, A.; POHLER, O.; SUTTER, F. *Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche*. *Schweiz Mschr Zahnheilk*. 86 (7) (1976) 713-727.

SCHROEDER, A.; STICH, H.; STRAUMANN, F. et al. *Über die anlagerung von osteozement an eien belasteten implantatk örper*. *Schweiz Mschr Zahnheilk*. 88 (10) (1978) 1051-1058.

SENNERBY, L.; THOMSEN, P.; ERICSON, L.E. *A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone.* Int. J. oral Maxillofac. Implants. 7 (1) (1992) 62-71.

SILVA, M. A. M.; MARTINELLI, A. E.; ALVES JR, C.; NASCIMENTO, R. M.; TÁVORA, M. P.; VILAR, C. D.. *Surface modification of Ti implants by plasma oxidation in hollow cathode discharge* Surface & Coatings Technology 20 (2005) 612 – 620.

SOVAK G.; WEISS A.; GOTMAN I. *Journal of Bone and Joint Surgery – Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method* Series B, Volume 82, Issue 2, 2000.

STEELE, J.; McCABE J.; BARNES, I. *Properties of a titanium nitride coating for dental instruments.* J Dent. 19 (4) (1991) 226-229.

SUNG-AM CHO, KYUNG-TAE PARK. *The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching.* Biomaterials 24 (2003) 3611–3617.

SYCARAS, N.; IACOPINO A. AND MARKER, V. A. *Int. J. Oral Maxillofacial and Implants.* 15 (5) (2000) 675.

TANAKA, M. et al. *Effects of bone tapping on osseointegration of screw dental implants.* Int. J. oral Maxillofac. Implants.9 (5) (1994) 541-547.

THOMAS, K. A.; COOK, S. D. N. *A evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition.* J. Biomed Mat.19 (1985) 875-901.

TJELLSTROM, A.; JACOBSSON, M.; ALBREKTSSON, T. *removal torque of osseointegrated craniofacial implants: a clinical study.* Int. J. oral Maxillofac. Implants.3 (4) (1988) 287-298.

WANG, R.; FENTON, A. *Titanium for prosthodontic applications: A review of the literature.* Quint Int, v. 27, n.6, June 1996.

WILLIAMS, D.F. *Fundamental aspects of biocompatibility*. Boca Raton, C.R.C, Press, 1981. v. 1 e 2 apud PARR, G. R.; GARDNER, L.K.; TOTH, R. W. 104 p. 412.

WINTERS, H.F.; RAIMONDI, D.L.; HORNE, D.E. *Proposed model for the composition of sputtered multicomponent thin films*. Journal of Applied Physics, v. 40, n.7, p. 2996-3006, 1969.

XAVIER, S. P.; CARVALHO, P. S. P.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. *Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments*. J Dent. 31 (2003) 173-80.

XUANYONG L.; PAUL K. C.; CHUANXIAN D. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering. 47 (2004) 49–121.

YILBAS, B. et al. *Plasma nitriding of Ti-6Al-4V alloy to improve some tribological properties*. Surf Coat Technol, v. 80, p. 287-292, 1996.

ZITTER, H.; JR. H. *The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility*. J. Biomed. Mater. 21 (7) (1987) 881-96.

UEDA, M. et al. *The Relationship between insertion torque and removal torque analyzed in fresh temporal bone*. Int j.oral maxillofac. Implants.6 (1991) 442-447.