

João Paulo dos Santos Tondela

Filmes Finos de Titânio-Zircónio Nanoestruturados para Osteointegração

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Prótese Fixa,
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra sob orientação
do Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra e da Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira

Agosto 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde,
ramo de Medicina Dentária, especialidade de Prótese Fixa.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina
e à forma desta tese (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108 & único).

Orientadores

Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra

Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira

AGRADECIMENTOS

Queremos aproveitar este momento para agradecer a todos os que sempre nos apoiaram, com a sua motivação, orientação e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra com quem temos tido o privilégio de colaborar ao longo de anos e que sempre nos incentivou na nossa progressão da carreira académica. Amigo de longa data, muito nos honrou ao aceitar a orientação deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira um agradecimento muito especial por ter aceite orientar este trabalho. Reconhecemos todos os conhecimentos científicos transmitidos, a força e o incentivo constante para com determinação executarmos o nosso trabalho.

Aos meus Professores por todos os ensinamentos com que me enriqueceram, em particular à D. Leonor Viegas e ao Professor Dr. António Faria Gomes os quais completaram o ciclo do meu percurso académico tornando-o mais entusiasmante, fantástico e apaixonante e por quem sentimos elevado Carinho e Amizade.

Aos nossos Colegas da Faculdade, atuais e ex-Colegas, particularmente aos Colegas da nossa Área, os quais nunca discutiram esforços para nos ajudar, agradecemos a amizade, espírito de camaradagem, disponibilidade e compreensão.

A todos os funcionários não docentes da nossa Área que durante todos estes anos têm feito desta viagem um percurso mais apazível e para o qual sempre disponibilizaram os seus esforços e colaboração.

A todos os Membros do CEMUC, em particular à Doutora Ana Paula Piedade, à Doutora Ana Sofia Ramos por toda a disponibilidade e colaboração mostradas. Aos restantes Membros do CEMUC pelo apoio prestado em todas as nossas ações desenvolvidas, em particular ao Engenheiro Sérgio Lourenço.

Aos nossos Amigos, porque sempre souberam estar presentes, agradecemos o apoio incondicional, sempre deram sem nada esperar receber.

À nossa Família agradecemos o Carinho, a Generosidade e Amizade com que nos presenteiam, e que verdadeiramente nos acaricia e nos une intensamente.

À minha Mãe, ao meu Irmão e ao meu Pai, expressamos gratidão pelo Amor insubstituível e infindável com que nos querem.

Aos meus filhos, razão de todas as razões porque existimos, agradeço todos os momentos que nos fazem sentir, que nos fazem ser, que nos fazem querer, que nos fazem dar e que nos dão.

À minha mulher, a Paula, agradeço o Amor com que me conforta co que está sempre ao meu lado, o apoio que me proporciona e que de forma inimaginavelmente grande e única me tem completado e complementado.

A imaginação cria os mundos que exploramos cavalgando o pensamento, carregados com as expectativas e fisicamente constrangidos, mas com olhar perscrutante veremos sempre mais além.

No final de mais uma jornada chegamos apenas a mais um ponto de partida. Assim foi, assim é e assim será, pois a meta é apenas uma miragem que nos inebria, encanta, extasia, entusiasma, enleva e arrebatava continuamente.

Sumário

Capítulo I. Introdução

1.1. Osteointegração

1.2. Biomaterial

1.3. Topografia

1.4. Molhabilidade

1.5. Tratamentos de superfície

1.6. Enquadramento da Problemática

Capítulo II. Materiais e técnicas experimentais

2.1. Materiais e Técnicas Experimentais

Capítulo III. Estudo Experimental

3.1. Introdução e Objetivos

3.2. Materiais e Métodos

3.3. Resultados

3.4. Discussão

3.5. Conclusões

Resumo

Abstract

Bibliografia

Anexos

Índice

Capítulo I. Introdução

O Cosmos...

As estrelas de Fevereiro. Um rasgo de luz atravessa o céu, qual faísca cósmica milhões, bilhões, trilhões de vezes repetida desde a “faísca” primordial 13,73 Ga atrás ($1 \text{ Ga} = 10^9 \text{ anos} = 1000 \text{ milhões anos} = 1 \text{ bilhão anos}$), numa explosão de matéria e energia inundando o céu com o Universo – o Big Bang (Hawking 2001).

Algures, o lugar, tão improvável quanto a certeza de que largados neste Espaço estaríamos perto de coisa alguma numa probabilidade de 1×10^{33} , um bilhão de trilhão de trilhão, ainda que imersos em 10×10^{22} (10 bilhões de trilhões) de estrelas e planetas, um dos quais o nosso lar planetário - a Terra. Este pedaço de rocha e metal localiza-se na parte exterior da espiral distante da Via Láctea em estreita relação com uma dos 400 bilhões de estrelas desta galáxia, o Sol (Sagan 2013).

A Terra...

O planeta azul, tal como o conhecemos hoje, sofreu inúmeras modificações desde o início da sua formação há c. 4,56 Ga até à compatibilidade biológica, digo, ao aparecimento e desenvolvimento de formas de vida sustentáveis há c. de 3,5 Ga. Na origem do sistema solar há 4,6 Ga, resultante da explosão de uma ou mais supernovas, dentro da nuvem de poeira cósmica formada, pequenos planetesimais foram crescendo por colisão e atração gravitacional das partículas; os maiores deram origem ao núcleo dos planetas, entre os quais a proto-Terra. Por esta altura a sua dimensão não seria maior do que a nossa atual Lua, mas as contínuas colisões com outros proto-planetas e meteoritos foram-lhe adicionando massa e elementos, enquanto que condicionavam e modificavam a atmosfera envolvente: essencialmente Ferro (Fe), Magnésio (Mg) e silicatos envoltos numa atmosfera de vapor de água, Hidrogénio (H), dióxido de carbono, dióxido de enxofre, amónia e metano. Estes impactos terão continuado, primeiro e ainda muito frequentes e com os corpos de grandes dimensões, para depois, e na medida em que a maior parte da massa se encontraria já distribuída por diferentes planetas, serem menos frequentes e com os corpos de menores dimensões, atuando como um grenalhamento para modificar e modelar a superfície.

Algo único e determinante para a formação da Terra terá ocorrido c. 4,5 Ga: o impacto de um proto-planeta de dimensões semelhantes a Marte (10% da massa da Terra - algumas vezes designado por Theia) com a proto-Terra (já com 95% da sua massa aproximadamente). A densa e espessa proto-atmosfera foi rasgada, a enorme energia do impacto absorvida provocou a fusão de todo o planeta, alterou a sua inclinação e adicionou rotação, grandes massas foram retidas e outras ejetadas. A atmosfera tornou-se fina, mais oxidante

e facilitou a rápida dissipação térmica, a superfície solidificou rapidamente dando origem à crosta terrestre com retenção de um núcleo líquido e formação do campo magnético permanente. A superfície e atmosfera criadas foram preservadas dos ventos solares pelo campo magnético gerado, pelo equilíbrio térmico facilitado pela transferência energética entre polos e equador e pela alternância de estações proporcionados pela inclinação do eixo e rotação. Grande parte da massa ejetada terá ficado na esfera gravitacional da maior massa – a Terra - e terá originado a Lua, assim eternamente ligada à Mãe Terra. (Rothschild 2003)

A Vida...

Bem vindos à Terra! A superfície e o meio (atmosfera) estão preparados para receber Vida! Como? Uma superfície sólida, atmosfera (meio) oxidante, energia, elementos nutrientes e água! As referências para a primeira forma de vida na Terra – o último ancestral comum – apontam para c. 4,0+/- 0,3 Ga atrás – bactérias hipertermófilas. As evidências geológicas de Isua, Gronelândia Oeste datadas de 3,8-3,7 Ga atrás referem já a existência de vida planctônica mesotermófila. As condições em que terão proliferado seriam contudo muito deficitárias: atmosfera de dióxido de carbono e elevadas temperaturas. As modificações e melhorias na atmosfera, mais oxidante, e na superfície, diminuição da temperatura, permitiram o desenvolvimento de novas formas de vida e mais sustentadas. Rochas com 3,6-3,5 Ga de Pilbara na Austrália Ocidental e Barbeton na África do Sul, são a primeira evidência da vida fotossintética na Terra. A diversidade e o sucesso da Vida estão garantidos desde então!

O Homem...

Tal como a formação da Terra, a origem do Homem encontra-se uns milhões de anos atrás e passaram milhões de milhões de anos desde a primeira forma de vida até que o Homem se erguesse na Terra. A primeira pegada do Homem, o *Homo Habilis*, há cerca de 2,4 milhões de anos, foi o primeiro passo de uma longa caminhada na exploração da superfície terrestre, de aproveitamento dos elementos disponíveis num meio hostil e difícil, e desenvolvimento de aptidões e técnicas que melhorassem a capacidade de sobrevivência. Passaram mais de 2 milhões de anos até o Homem conquistar toda a superfície terrestre; há c. 200 mil anos o *Homo Sapiens* tinha expandido a sua presença a diferentes lugares da Terra, cada vez mais adaptado a condições rigorosas, e começou também a adaptar o meio que ocupava com marcas indeléveis da sua passagem. No século XX do nosso tempo, o Homem Moderno, o *Homo Sapiens Sapiens*, deixa a primeira pegada fora da Terra: às 2:56 UTC de 21 de Julho de 1969 o Homem pisa a Lua pela primeira vez, “um grande passo para o Homem, um passo gigante para a Humanidade” (Neil Alden Armstrong). Terá este sido o primeiro passo para a expansão da Vida?... De uma Vida que se tem tornado mais longa com o aumento da esperança média de vida. A consciencialização que a Terra é pequena para tanta Vida, pequena para o Homem, pequena no Universo? Ou o regresso ao Início? “A superfície da Terra é a costa do oceano cósmico. Dele nós aprendemos muito do que sabemos. [...] O oceano chama. Uma parte do nosso ser sabe que é de onde viemos. Nós esperamos regressar.” (Carl Sagan 2013).

A Humanidade...

Entre ciclos de destruição massiva e renascimento, o Homem tem evoluído continuamente em saltos gigantes, impelido por um pensamento dedutivo (Descartes – Método Cartesiano em “Discurso sobre o Método”, 1637) e arguto (Albert Einstein – Teoria da Relatividade, 1915), suportado pelo conhecimento e descobertas (Isaac Newton – Lei da Gravidade, 1687; Watson e Crick – estrutura do DNA, código da vida, 1953; Alexander Fleming – a Penicilina, 1929), motivado pelos avanços técnicos (Christiaan Barnard – transplante

cardíaco, 1967; Per Ingvar Branemark – osteointegração, 1977; Werner Arber, Daniel Nathans, e Hamilton O. Smith – engenharia genética, 1978; Ian Wilmut – clonagem de mamífero, 1997) e tecnológicos (Vinton Cerf, Yongel Dalal e Carl Sunshine - Internet, protocolo TCP/IP, 1974; Tim Berners-Lee – World Wide Web, 1991; Jack Kilby – circuito integrado, 1958). Em tudo o que aprendeu, em todo o conhecimento que desenvolveu, em tudo o que construiu, resultado da interação e modelação do meio, procurou incessantemente esgotar todo o seu esforço para melhorar a sua integração e garantir o sucesso da vida e uma mais longa sobrevivência.

Atualmente a esperança média de vida global é de 70 anos (Portugal: 80 anos). A melhoria das condições higiénico-sanitárias das populações, o mais rápido e fácil acesso a cuidados de saúde, o aumento da investigação, os desenvolvimentos tecnológicos, os melhores cuidados de saúde e a facilidade de acesso à informação contribuíram decisivamente para isso (world health organization 2013). O Homem vive e quer viver mais tempo e melhor, num bem estar físico, mental e social e não apenas na ausência de doença ou enfermidade. A população mundial está a envelhecer; a população atual com >60 anos representa 11% da população global (>20% nos países desenvolvidos) e pode esperar viver, em média, mais 20 anos. Será necessário promover um envelhecimento ativo, não no sentido de “ir para a faculdade, arranjar emprego e reforma aos 60 anos” e apenas aumentar a esperança de vida mas “esticar” a vida no meio (world health organization 2013; world health organization 2012). As doenças crónicas, mais prevalentes e debilitantes nestas populações, como a diabetes, doenças cardiovasculares, cancro, doenças orais e doença pulmonar crónica obstrutivas, partilham fatores de risco, estão muitas vezes inter-relacionadas e contribuem determinantemente para a diminuição da qualidade de vida. As doenças orais são as mais prevalentes e algumas delas estão fortemente inter-relacionadas com outras doenças crónicas, como é o caso da doença periodontal e diabetes. A doença periodontal atinge >20% da população entre os 35-44 anos, e, conjuntamente com a cárie dentária, é a principal causa de perda de dentes. O edentulismo afecta 30% da população mais idosa (65-74 anos) com uma distribuição geográfica global (Petersen & Yamamoto 2005; Petersen & Ogawa 2005; Hobdell et al. 2003; Sheiham 2005). No futuro, as doenças crónicas terão que ser contrapostas por terapêuticas e terapias mais eficazes, com elevadas taxas de sucesso e sobrevivência e que realmente proporcionem uma melhoria da qualidade de vida.

Uma equipa de arqueólogos franceses relatou em 1998 o que pode ter sido o primeiro implante dentário. O achado, que se refere a um “dispositivo” feito de ferro forjado com a forma de um dente (prémolar) e inserido dentro do osso maxilar de um crânio de um homem com cerca de 30 anos de idade, foi encontrado num túmulo Galo-Romano, em Chantambre - França, do final do século I AD ou início do século II AD (Crubézy et al. 1998). Entre ficcionismo, cepticismo e críticas levantadas a este relato, como a outros que o antecederam, pela falta de elementos descritivos e incoerências, terá sido este o primeiro implante dentário? Numa era em que a prática da Medicina Dentária estava praticamente limitada a “extrações” e à substituição por fixação dos dentes perdidos aos dentes adjacentes com fio de ouro para fins estéticos, as “próteses” dos Etruscos, numa era em que a capacidade técnica e os conhecimentos eram rudimentares, a probabilidade que isso tivesse acontecido é infinitesimal, tanto quanto a certeza de que largados no Espaço estaríamos perto de coisa alguma numa probabilidade de 1×10^{33} (Becker 1999; sagan 2013). Um “dispositivo” com estas características, que teria sido inserido por pressão e perfeitamente adaptado a um alvéolo dentário sem sinais de lesões ósseas, e que teria estado em função pelo menos um ano antes da morte do indivíduo, reclamaria para si o advento dos implantes e da osteointegração (Crubézy et al. 1998; Albrektsson & Sennerby 1990; Salvi & Lang 2001). É certo que o tecido ósseo tem uma capacidade regenerativa única, capaz de cicatrização/regeneração integral e recuperação morfo-funcional original, por isso sem formação de cicatrizes – *restitutio ad integrum* (Davies 2003; Detsch & Boccaccini 2014; Davies 2007). Seria essa capacidade, por ventura, que justificaria a ocorrência de tão extraordinário processo, o qual, a ter ocorrido, ter-se-ia verificado sob condições limite extremas.

I.1. Osteointegração

O osso é um tecido conjuntivo, vascularizado, vivo, dinâmico e em constante transformação. A evolução do tecido ósseo pode ser localizada há c. 543-248 milhões de anos, Era Paleozoica média, na evolução dos *Agnata* que apresentavam grandes placas espinho-ósseas; entre os *Ostracodermos*, que dariam origem aos peixes ósseos e aos *tetrapodes*, os *conodontes* teriam já desenvolvido dentina e osso (Davies 2003; Davies 2007; Rothschild 2003). O Homem, chegado à Terra c. 4.5 milhões de anos mais tarde, herdou um tecido especializado, desenvolvido e aperfeiçoado que, para além de proteção e suporte locomotor, funciona como reservatório dinâmico de proteínas e minerais. A remodelação constante que envolve permanentemente 3-5% do volume do esqueleto, proporciona os mecanismos para o equilíbrio iónico (Ca^{2+} e fosfatos) nos fluidos corporais e a reparação óssea sem cicatrizes do tecido ósseo danificado (Davies 2003; Davies 2007; Detsch & Boccaccini 2014). O conhecimento destes processos tão diferenciados e especializados da formação e cicatrização óssea (Figura I.1), - evocados também durante a cicatrização óssea peri-implantar – tem uma importância fundamental para a compreensão da interação celular com a superfície do implantes e para o desenvolvimento de superfícies com características que encontrem as melhores respostas da cicatrização óssea (Kasemo & Lausmaa 1988; Puleo & Nanci 1999; Donos et al. 2011; Tomisa et al. 2011; Braddock et al. 2001).

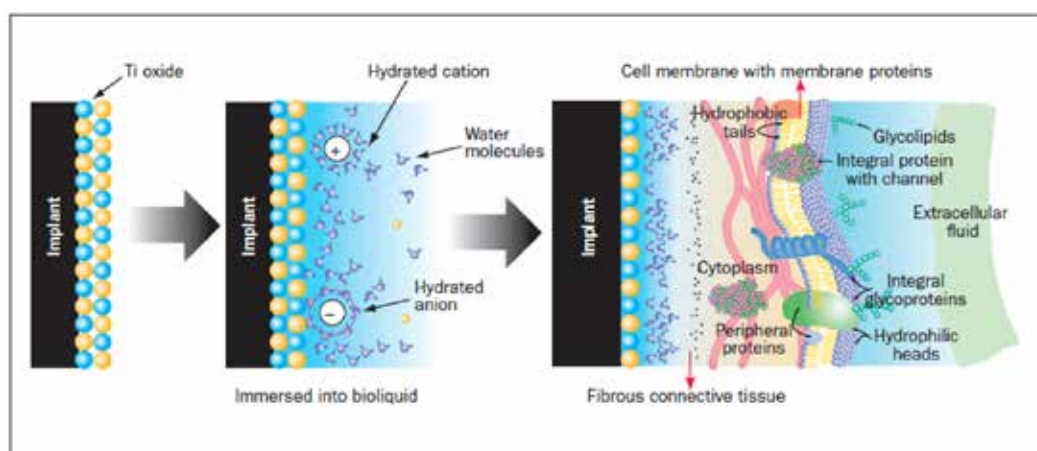


Figura I.1 – Interações entre superfície e matriz extracelular nas etapas iniciais da cicatrização óssea.

A cicatrização óssea segue os mesmos processos definidos para a cicatrização dos tecidos moles e engloba as quatro fases da cicatrização: hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação. Aceita-se que os processos envolvidos na cicatrização óssea perimplantar, que poderão resultar em osteointegração, sigam o mesmo padrão (Terheyden et al. 2012; Lang et al. 2011; Bosshardt et al. 2011). Os conceitos de osteointegração ou anquilose funcional foram usados inicialmente por Per-Ingvar Brånemark (1969, 1977) e André Schroeder (1976, 1977), respetivamente, para descrever a deposição direta de osso sobre a superfície do implante (Albrektsson & Sennerby 1990; Salvi & Lang 2001; Bressan et al. 2013). Em 1985 Per-Ingvar Brånemark redefiniu a osteointegração como a união direta, estrutural e funcional entre osso, ordenado e vivo, com a superfície de um implante submetido a carga, traduzindo uma orientação funcional para o processo. Atualmente, de facto, parece que a cicatrização óssea perimplantar ocorre na intimidade da superfície do implante, ainda que tenuemente separadas por uma linha cementante, num estado de equilíbrio estável da reação entre o tecido ósseo e o corpo estranho que incorpora (Davies 1996; Davies 2003; Puleo & Nanci 1999; Brunski et al. 2000; Albrektsson & Wennerberg 2004b; Albrektsson et al. 2014).

1.1.1. Hemóstase

O trauma, cirúrgico ou acidental expõe as superfícies sobre as quais ocorrerá a cicatrização tecidual, desencadeando uma série coordenada de eventos reparadores do organismo. A primeira fase de cicatrização, a hemóstase ou fase exsudativa, inicia-se subsequentemente ao trauma com a interação das moléculas de água e iões dos fluídos extracelulares com as superfícies. Os iões bivalentes como o cálcio podem modificar o padrão de carga das superfícies e facilitar a adsorção de proteínas plasmáticas (como albumina, globulinas e fibrinogénio ou de proteínas ósseas, factores de crescimento e diferenciação) armazenados na matriz óssea e entretanto expostas pelo trauma e libertadas das suas ligações heparínicas por hidrolases (Brunski et al. 2000; Puleo & Nanci 1999; Terheyden et al. 2012; Davies 2003; Variola et al. 2011). O processo de adsorção de proteínas é muito rápido e efetivo; determinado inicialmente pela concentração dá lugar progressivamente à adsorção de proteínas em menor concentração, mas com elevada afinidade como a vitronectina e fibronectina, numa complexa série de processos de adsorção e deslocamento conhecido como efeito Vroman. A carga, o tamanho, a estabilidade da estrutura, a composição e a conformação das proteínas, mas também as características do meio e das superfícies como a energia de superfície, topografia e microestrutura influenciam seletivamente a adsorção das proteínas (Chang et al. 2010; Liu et al. 2005; Terheyden et al. 2012; Sela et al. 2007). As superfícies com elevada energia superficial e comportamento hidrofílico promovem a adsorção de proteínas segundo um arranjo globular fino que favorece as interações proteína-superfície, ao contrário do arranjo trinodular em rede que favorece as reações proteína-proteína característico das superfícies hidrófobas e com baixa energia superficial. A adsorção das proteínas segundo um arranjo globular induz menos alterações da conformação das proteínas, o que minimiza a reação inflamatória por diminuição da exposição de epítomos responsáveis pela atração de células inflamatórias. Menores alterações conformacionais também desempenham um papel crítico na hemóstase e coagulação por aumentarem a reatividade das plaquetas com as superfícies e por isso promover a adesão e agregação plaquetárias por ligação específica das proteínas com a glicoproteína (GP) IIb-IIIa das plaquetas (J. Y. Park et al. 2001; Kämmerer et al. 2011; Lang et al. 2011; Terheyden et al. 2012; T. F. Keller et al. 2013; Kim & Lee 2014). Tanto a adsorção de proteínas como a ativação das plaquetas são essenciais para a mediação do recrutamento, adesão e diferenciação de células osteogénicas assim como para a neovascularização ou angiogénese necessária para todo o processo reparador. Nos locais com lesão vascular formam-se agregados de plaquetas para fechar as lesões, o que também dá origem à formação de algumas moléculas bioativas como a trombina, trombospondina e ADP. Estes estímulos ativam a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

das plaquetas as quais interagem com o fibrinogénio através da GP IIb-IIIa para se unirem num agregado de plaquetas e formar um coágulo. Através da mesma integrina, as plaquetas ligam-se também à rede de fibrina, formada por polimerização do fibrinogénio pela trombina, quer iniciada pelas plaquetas (sistema extrínseco) quer pelo factor de Hageman (sistema intrínseco), o que leva à potenciação da sua ativação e à retração do coágulo. Também alguns trombócitos se podem ligar à rede de fibrina através da GP IIb-IIIa, o que resulta na sua ativação e desgranulação. A hemóstase pode decorrer durante minutos ou horas, sendo suportada por substâncias vasoativas das plaquetas como a serotonina e o tromboxano que têm um efeito vasoconstritor. A desgranulação das plaquetas com libertação de citocinas marca o início da fase inflamatória (Davies 2003; Variola et al. 2011; Kämmerer et al. 2011; Terheyden et al. 2012; Klein, Kämmerer, et al. 2010b; Klein, Bijelic, et al. 2010a)

1.1.2. Inflamação

A fase inflamatória começa com a desgranulação das plaquetas, aproximadamente 10 minutos após a cirurgia, e perdura pelos primeiros dias. As plaquetas são uma fonte local de moléculas mensageiras, como citocinas e também hormonas; ambas participam na comunicação celular à distância, para além da comunicação celular transmembranar direta. As hormonas (peptídeas ou aminas) são ativas em concentração nanomolar e a maior distância, enquanto as citocinas (interleucinas, factores de crescimento e de diferenciação) são ativas em concentração femtomolar e em áreas restritas. Normalmente estes mensageiros interagem com receptores específicos na superfície da membrana celular e, por alteração da conformação, ativam os receptores transmembranares que se tornam enzimaticamente ativos; a ativação transmembranar desencadeia o sistema de segundo mensageiro intracelular que amplifica, modifica e transporta a informação até ao núcleo celular e dá origem à resposta celular através da ativação de alguns genes ou da expressão de algumas proteínas (Stanford 2008; Omar et al. 2009; Terheyden et al. 2012; Terheyden et al. 2014). A desgranulação das plaquetas liberta alguns factores de crescimento como o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (platelet-derived growth factor) e o factor de crescimento transformante (TGF- β) (transforming growth factor beta), factor de crescimento dos fibroblastos básico (bFGF) (basic fibroblast growth factor) os quais desempenham um papel importante na cicatrização pelo efeito estimulador na proliferação e migração de diferentes tipos celulares. A libertação concomitante de alguns factores vasoativos como a serotonina e a bradicinina (que aumenta a permeabilidade vascular, ou a histamina, com efeito vasodilatador e hiperémico por aumento do fluxo e diminuição da velocidade de circulação sanguínea) permitem concretizar este recrutamento e migração celulares. Nos estádios iniciais da inflamação, uma resposta inata do sistema imunitário é desencadeada de forma inespecífica por moléculas de origem bacteriana, consistindo numa resposta molecular através do sistema do complemento ou numa resposta celular com leucócitos polimorfonucleares (PMN ou também chamados neutrófilos granulócitos) e macrófagos. O sistema do complemento é um grupo de glicoproteínas que formam canais perfurantes da membrana (perforinas) bacteriana. O complemento C3b liga-se às bactérias, ou outro corpo estranho, marcando-as – opsonização – para posterior fagocitose pelas células do sistema imunitário. Os PMN invadem o coágulo por migração ameboide através de pequenos espaços desenvolvidos nas paredes dos vasos sanguíneos – diapedese. Os leucócitos colocam-se na periferia da corrente sanguínea e as moléculas de adesão intercelular I (intercellular adhesion molecule) – ICAM-1 e ICAM-2 (semelhantes a imunoglobulinas) e a molécula de adesão celular vascular I (vascular cell adhesion molecule) VCAM-1, através de ligação a integrinas na membrana dos leucócitos, resgatam-nos da corrente sanguínea. Os PMN produzem colagenases e elastases que os ajudam a digerir a lâmina basal dos vasos sanguíneos e a atravessá-los; uma vez fora da corrente sanguínea a sua migração é orientada por quimiotaxia. As substâncias quimiotáticas para os

PMN incluem produtos da ativação e degradação da fibrina, proteínas bacterianas e factores do complemento, e algumas citocinas como o factor ativador das plaquetas (PAF – platelet activating factor), factor plaquetário 4 (PF4 – platelet factor 4), PDGF e interleucina-8 (IL-8), algumas das quais são produzidas por PMN ou macrófagos presentes no local e com contacto com antígeno. Quando a presença inicial de um grande número de bactérias prolonga e amplifica a reação imunitária celular, provoca não só a eliminação das bactérias, mas também a destruição das células e tecidos circundantes, devido à produção de radicais tóxicos (radicais de oxigénio, grupos hidroxilo, radicais cloretos e hipocloritos) inespecíficos para as bactérias. Para além disso também a produção de elastases e colagenases pelos PMN, num ambiente com concentração elevada de citocinas pro-inflamatórias e radicais tóxicos, pode contribuir para dissolver a rede de fibrina e diminuir a concentração de glicoproteínas protetoras da matriz extracelular como a fibronectina e decorina; estas proteínas ligam-se normalmente aos factores de crescimento e protegem-nos da ação de enzimas proteolíticas, mas desta forma o seu papel protetor desaparece e agravam-se as lesões tecidulares. Condições de assepsia rigorosa durante a fase cirúrgica ajudam o organismo a passar rapidamente pela fase inflamatória. Os PMN têm vida relativamente curta em feridas agudas e são rapidamente substituídos por macrófagos e linfócitos. O papel destes não está bem definido, mas parecem coadjuvar na secreção de citocinas e agentes quimiotáticos para os fibroblastos e na remoção de velhos neutrófilos. Numa ferida limpa de bactérias e restos de tecidos os macrófagos iniciam a secreção de factores de crescimento fibrinogénicos e angiogénicos. O nível de óxido nítrico (NO), produzido na ferida pela sintetase induzível do óxido nítrico (iNOS – inducible nitric oxide synthase) dos macrófagos, está relacionado com a atividade da cicloxigenase e produção de prostaglandinas necessárias para ativação das células mesenquimatosas estaminais (mesenchymal stem cells – MSC), as quais secretam metaloproteinasas inibidoras dos tecidos (TIMPs – tissue inhibitors of metalloproteinases) que antagonizam as enzimas proteolíticas dos PMN. A crescente concentração de factores de crescimento, protegidos da degradação e por contínua secreção de bFGF e PDGF pelos macrófagos, associada a uma grande quantidade de fibronectina permite a adesão e migração de MSC para a ferida (Davies 2003; Omar et al. 2009; Chang et al. 2010; Liu et al. 2005; Variola et al. 2011; Terheyden et al. 2012; Terheyden et al. 2014; Hamlet et al. 2012).

1.1.3. Proliferação

A formação de uma nova matriz extracelular e o aumento da atividade angiogénica dão origem à formação de um tecido de granulação que caracteriza o início da fase proliferativa, a qual se estende de alguns dias a algumas semanas. Células mesenquimatosas estaminais dos tecidos envolventes migram para o coágulo atraídas por diferentes factores de crescimento [como FGF, PDGF, TGF- β , fator de crescimento do tecido conjuntivo (connective tissue growth factor – CTGF), fator de crescimento endotelial (endotelial growth factor – EGF), proteínas morfogenéticas (bone morphogenetic proteins – BMP)] e são orientadas pelo gradiente dos mesmos. Estas células secretam metaloproteinasas que degradam a rede de fibrina enquanto expõem as sequências de peptídeos RGD de ligação nestes fragmentos aos quais se ligam através de integrinas. Enquanto migram para o interior da ferida através da matriz extracelular degradada produzem fibronectina e outras proteínas extracelulares insolúveis como colagénios, vitronectina, decorina e outros proteoglicanos para substituição da matriz degradada. Estas células migrantes são células indiferenciadas, com elevada capacidade proliferativa e multipotentes, que se podem diferenciar em diferentes linhagens mesenquimatosas dependendo da estimulação e do padrão de ativação; convencionalmente são definidas como células aderentes, não hematopoiéticas e que expressam determinados marcadores, mas existe a convicção crescente que são pericitos na parede capilares cujos percursos têm origem nas células da medula óssea (Davies 2003; Stanford 2008; Chang et al. 2010; Liu et al. 2005; Variola et al. 2011; Terheyden et al. 2012). A paragem da circulação

sanguínea na ferida causa isquemia local e atrai os macrófagos, os quais são capazes de sobreviver adaptando o seu metabolismo para a geração de ATP independente de oxigênio. Contudo, libertam VEGF que estimularão a produção de percursoros das células endoteliais, a partir de pericitos que se destacam da parede externa dos vasos sanguíneos, e que, sob a sua ação quimiotática se condensam em grupos e formam tubos. Estes tubos conectam-se com vasos sanguíneos na proximidade e criam uma nova ansa vascular. Esta atividade angiogénica é essencial para a formação óssea, uma vez que nenhuma célula óssea madura sobrevive afastada mais de 200 μm de um vaso sanguíneo, um processo de formação óssea dependente da vascularização também designado por osteogénese angiogénica (Davies 2003; Raines et al. 2010; Terheyden et al. 2012; Gruber et al. 2008). As células precursoras dos osteoblastos ou MSC em migração, migram através do coágulo degradando a fibrina e ligando-se por integrinas às sequências de peptídeos RGD. A adesão celular à matriz extracelular provoca o agrupamento de integrinas em complexos de adesões focais (focal adhesion – FA), os quais ativam a cascata da sinalização intracelular para além de serem importantes na transmissão de força e regulação do citoesqueleto. Nestes locais a célula estabelece ligações transmembranares, através das subunidades α e β do domínio extracelular das integrinas, entre proteínas da matriz extracelular (fibronectina, laminina e vitronectina) e a actina do citoesqueleto através do domínio citosólico das integrinas. A este domínio citosólico ligam-se diferentes proteínas citoplasmáticas as quais estão implicadas no reforço da ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto ou na sinalização mediada pela adesão. As adesões focais estão fortemente ligadas à migração celular, permitindo à célula exercer tração sobre o citoesqueleto o que para além de lhe imprimir movimento também se transmite ao núcleo e modela a produção de alguns fatores de transcrição; esta força de tração, na ordem dos 3 nN, é também responsável pela contração cicatricial que se faz notar a partir do quinto dia. As células mesenquimatosas estaminais continuam a sua migração em direção à superfície, óssea ou do biomaterial, e também a sua diferenciação e restrição/dedicação à diferenciação osteogénica. A diferenciação osteoblástica é mediada por um fator de transcrição essencial chamado “core-binding-factor-1” (Cbfa1) ou RUNX2 através de duas vias de sinalização independentes: via proteínas morfogenéticas 2 (BMP2) e ativação da via SMAD ou via fator de crescimento de transformação (TGF β 1) e ativação das vias ERK (extracelular signal regulated kinases) e MAPK (mitogen activated protein kinase). Um segundo fator de transcrição, o osterix (Osx) foi descrito como tendo um papel na sub-regulação do RUNX2 e necessário para a contínua diferenciação osteogénica. Após a restrição à diferenciação osteogénica as MSC estão diferenciadas em preosteoblastos, os quais se apresentam elípticos com um núcleo alongado e com capacidade proliferativa e expressam, ainda que em baixa quantidade, alguns marcadores de osteoblastos como a fosfatase alcalina (ALP), colagénio tipo I, osteopontina (OPN). Na presença de RUNX2, Osx e b-catenina os preosteoblastos prosseguem a sua migração e diferenciação tornando-se osteoblastos imaturos, com forma espiralada ou fusiforme e expressando proteínas da matriz óssea, sialoproteína óssea (BSP) e OPN. No estágio final da migração e diferenciação das MSC, o RUNX2 inibe a maturação dos osteoblastos enquanto que o Osx produz a maturação final dos osteoblastos e induz a expressão de osteocalcina. Apresentam forma cubóide e atividade secretora, com forte expressão de ALP, osteocalcina, colagénio tipo I e diminuição da expressão da OPN (Meyer et al. 2004; Stanford 2008; Davies 2003; Donos et al. 2011; Terheyden et al. 2012; Bressan et al. 2013; Kojima & Uemura 2005; Brett et al. 2004; Balloni et al. 2009; Xu et al. 2009; Vlacic-Zischke et al. 2011). A esta fase de migração e diferenciação das MSC em células osteogénicas ao longo do coágulo de fibrina – a osteocondução - segue-se a fase de formação da matriz óssea assim que atingem a superfície, óssea ou do biomaterial. Contudo esta formação óssea *de novo* não ocorre diretamente sobre as superfícies, sendo interposta a linha cimentante, uma estrutura sem colagénio e mineralizada, entre o novo osso e a superfície. Conhecida desde as primeiras referências de von Ebner em 1875 a uma “kittlinien”, linha de cimento em português, que demarcava os osteons do tecido ósseo envolvente. Só recentemente se reconheceu a sua importância crítica na estrutura e composição das interfaces da união óssea. A formação óssea *de novo* é um processo de quatro fases que compreende: a adsorção de proteínas não

colagénicas (como a sialoproteína óssea e a osteopontina para formar uma linha cimentante sem colagénio); a iniciação da mineralização pelas proteínas adsorvidas (nomeadamente a sialoproteína óssea devido à sua capacidade de inicializar focos de nucleação de fosfato de cálcio); o crescimento dos cristais e continuação da mineralização; e, por fim, a junção das fibras de colagénio (que se incrustam na linha cimentante para formar a matriz extracelular rica em colagénio a qual progressivamente se calcifica). A rápida calcificação das proteínas não colagénias da linha cimentante estabelece uma forte interligação com as características sub-micrométricas da superfície envolvendo a própria matriz da linha cimentante e proporciona um nível superior de adesão. Por seu lado, o componente colagenoso do osso recém formado abraça os elementos micrométricos mais grosseiros enquanto se torna mineralizado e proporciona resistência mecânica a longo prazo. Tão cedo quanto uma semana após o trauma começa a formação óssea; o osso inicialmente formado é um osso imaturo (woven bone), caracterizado pela orientação desordenada não paralela das fibras de colagénio. Dependendo do tipo de ossificação (endocondral ou intramembranosa) as fibras de colagénio podem ser tipo II ou tipo III, as quais serão mais tarde substituídas por colagénio tipo I; a cicatrização alveolar é um processo de ossificação intramembranosa. O processo de mineralização durante a formação de osso imaturo é um processo rápido, relativamente desorganizado e sem relação com as fibras de colagénio – mineralização extrafibrilar. O mecanismo iniciador exato pode estar relacionado com a capacidade de nucleação direta de algumas proteínas não colagénias (como a sialoproteína óssea) ou iniciação por vesículas dispersas na matriz. Este osso imaturo é mais tarde removido pelos osteoclastos para dar lugar a osso maduro, num processo em que hidroxapatite nanométrica é axialmente orientada segundo as fibras de colagénio – mineralização interfibrilar. É o início da fase remodeladora (Davies 1996; Davies 2007; Berglundh et al. 2003; Meyer et al. 2004; Brunski et al. 2000; Puleo & Nanci 1999; Terheyden et al. 2012; Davies et al. 2013; Davies et al. 2014; Lang et al. 2011; Bosshardt et al. 2011).

1.1.4. Remodelação

A fase de remodelação inicia-se concomitantemente com os primeiros indícios de formação óssea. Aos sete dias após o trauma já é possível encontrar osteoclastos na ferida, particularmente em zonas de contacto com o osso velho ou sobre fragmentos ósseos, os quais começam a criar espaço para a deposição de novo osso. Após remodelação o novo osso apresenta as fibras de colagénio paralelas e organizadas e é chamado de osso lamelar. Este segue uma orientação semelhante aos arcos góticos para suporte dos esforços mecânicos que lhe são transmitidos, construindo uma estrutura tão leve quanto possível. Os osteoclastos e osteoblastos atuam de forma interdependente resultante de um equilíbrio entre a atividade RANKL - o ligando do RANK (receptor activator of nuclear kappa beta) - e a osteoprotegerina, ambos segregados pelos osteoblastos. A relação da atividade RANKL/osteoprotegerina pode ser modulada por diferentes mensageiros como a IL-1, a prostaglandina E2, a hormona paratiróide (PTH) ou a vitamina D, na medida em que a expressão do RANKL ativa a osteoclastogénese e a expressão da osteoprotegerina inibe a osteoclastogénese. Os osteoclastos formam-se de monócitos que deixam a corrente sanguínea atraídos por quimiotaxia para o osso onde, na presença de RANKL, se unem para formar células gigantes multinucleadas; estas células têm uma vida média de 12 dias em humanos. Os osteoclastos formam uma taça de sucção na superfície óssea, selando as margens com um anel de inserções de integrinas. Entre os osteoclastos e o osso é formado um espaço - a lacuna de reabsorção - onde são lançadas as enzimas para reabsorção óssea, primeiro a dissolução da matriz inorgânica e depois a degradação enzimática do componente orgânico. Sobre a taça de reabsorção os osteoclastos aumentam a superfície da sua membrana celular formando microinvaginações, o designado bordo rugoso, que se estendem dentro do osso até 1 µm para criar uma superfície de reabsorção com uma complexidade tridimensional ao nível sub-micrométrico - o soalho da lacuna de Howship. Assim, o processo de reabsorção/remodelação cria

uma superfície de algumas centésimas de micrómetro com elevada complexidade topográfica e retenções sobre a qual a matriz da linha cimentante pode ser depositada para formar um mecanismo de ancoragem do novo osso ao osso antigo. Esta remodelação é organizada na forma de cones de corte, vários osteoclastos à frente de uma ansa vascular, o qual deixa atrás de si um túnel que é preenchido com camadas concêntricas de osso lamelar recém formado. No seu estado final a nova unidade organizada contendo um vaso sanguíneo no seu interior é designada por sistema Haversiano. A remodelação óssea orientada pelas cargas permite obter uma estrutura otimizada, nem demasiado porosa (osteopenia) ou demasiado densa (osteopetrose), que para além de leve e resistente serve ainda de reservatório de minerais e proteínas e também proporciona um mecanismo de reparação sem cicatrizes (Davies 2007; Lang et al. 2011; Bosshardt et al. 2011; Terheyden et al. 2012; Terheyden et al. 2014).

1.2. Biomaterial

Um material é uma matéria prima humanizada (Osório 2014). Um biomaterial pode ser considerado, num sentido lato e humanístico, uma matéria prima biohumanizada, ou mais propriamente biofuncionalizada. Segundo a Sociedade Europeia de Biomateriais um biomaterial é um material não vivo usado num dispositivo médico para interação com os sistemas biológicos. Os biomateriais são usados para construir órgãos artificiais, dispositivos de reabilitação ou implantes para substituir os tecidos corporais naturais, isto é, usados em contato estreito ou direto com os tecidos para aumentar ou substituir os tecidos em falta ou alterados. Qualquer dispositivo médico feito de um ou mais biomateriais quando colocado intencionalmente no organismo, total ou parcialmente sob a superfície epitelial é definido como um implante. A utilização bem sucedida dos implantes, ou dos biomateriais implantados, requer um adequado nível de tolerância do biomaterial no organismo. Os biomateriais não são nunca na verdade verdadeiramente inertes, sendo no máximo biotoleráveis. A interface célula-biomaterial é mais do que uma simples fronteira entre o hospedeiro e o dispositivo implantado - constitui a base fundamental para a adesão celular e subsequente indução e formação tecidual. O OBJETIVO de um biomaterial é não só evitar os efeitos negativos nos tecidos envolventes, mas sobretudo favorecer uma reação adequada com o organismo. Considerando o comportamento dos biomateriais no organismo, podem ser classificados como incompatíveis, biotolerados, bioinertes ou bioativos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Classificação das reações tecidulares aos materiais.

Incompatível	Libertação de substâncias em concentrações tóxicas, que conduzem a efeitos adversos no organismo vivo e que podem resultar na rejeição do implante.
Biotolerante	Libertação de substâncias em concentrações não tóxicas, que conduzem a um encapsulamento no interior do tecido conjuntivo.
Bioinerte	Ausência de libertação de substâncias tóxicas.
Bioativo	Interação positiva com diferenciação dos tecidos, que conduz a uma adesão estreita e a uma interconexão ao longo da interface entre o implante e os tecidos.

O desempenho dos materiais numa aplicação específica no hospedeiro, ou seja, a biocompatibilidade depende, sobretudo, da harmonia do biomaterial com o organismo. A compatibilidade dos materiais com o meio biológico é dividida em dois tipos: a biocompatibilidade superficial, em estrita relação com as propriedades físicas, químicas e biológicas, incluindo topografia e resistência à corrosão; a biocompatibilidade estrutural, dependente da forma e das propriedades mecânicas, tais como módulo de elasticidade e resistência à tração.

Por isso a escolha do biomaterial para utilização no organismo é definida pela sua aplicação, o que no caso dos implantes para substituição de tecidos duros (ósseos) o objetivo passe pela seleção de materiais com propriedades mecânicas para suportar cargas elevadas. Em geral, de um ponto de vista químico, os materiais para implantes dividem-se em três categorias: metais, cerâmicas e polímeros (Tabela 1.2) (Crubézy et al. 1998; Steinemann 1998; Sykaras et al. 2000; Bauer et al. 2013; Bressan et al. 2013).

Tabela 1.2 – Classificação dos Materiais para Implantes Dentários.

Atividade Biodinâmica	Composição Química		
	Metais	Cerâmicas	Polímeros
Biotolerante	Ouro Ligas de Cobalto-Cromo Aço Inoxidável Zircônio Nióbio Tântalo		Polietileno Poliamida Polimetilmetacrilato Politetrafluoroetileno Poliuretano
Bioinerte	cp Titânio Liga de Titânio (Ti-6Al-4V)	Óxido de Alumínio Óxido de Zircônio	
Bioativo		Hidroxiapatite Fosfato Tricálcico Fosfato Tetracálcico Pirofosfato de Cálcio Fluorapatite Brucite Carbono: vítreo e pirolítico Silício de carbono Biovidro	

1.2.1. Metais

Os metais são materiais inorgânicos que apresentam ligações metálicas não direcionais com uma rede de electrões muito móvel que lhe confere condutividade eléctrica e térmica. A facilidade com que são conformados em formas complexas por diferentes técnica de processamento, a qualidade no acabamento e adequação aos processos comuns de esterilização fizeram com que se tornassem uma escolha natural como biomaterial para implantes. Algumas aplicações biomédicas comuns dos metais são referidas na Tabela 1.3 (Crubézy et al. 1998; Sykaras et al. 2000; Albrektsson et al. 2008; Bauer et al. 2013).

Tabela 1.3 – Aplicações dos metais como biomaterial.

Metal	Aplicações
Ligas Cobalto-Cromo	Válvulas cardíacas artificiais; Próteses dentárias; Placas de fixação ortopédicas; Componentes articulares artificiais; Stents vasculares.
Aço Inoxidável	Próteses dentárias; Placas de fixação ortopédicas; Stents vasculares.
Ligas de Titânio	Válvulas cardíacas artificiais; Implantes dentários; Componentes articulares artificiais; Parafusos ortopédicos; Revestimento de <i>pacemaker</i> ; Stents vasculares.
Ouro e Platina	Restaurações dentárias; Eléctrodos para implantes cocleares.
Liga de Prata-Estanho-Cobre	Amálgama dentário.

1.2.1.1. Titânio

O titânio (Ti) é um dos elementos mais frequentes na Terra. Foi descoberto quase em simultâneo em Inglaterra em 1791 por William J. Gregor e em 1795 na Hungria, quando foi denominado titânio em honra das figuras mitológicas Titãs, os primeiros filhos da Terra da antiga cultura grega. A sua introdução na indústria é relativamente recente, em 1936, só após a introdução do processo de Kroll para o seu processamento industrial. Na tabela 1.4 descreve-se algumas das suas propriedades.

Tabela 1.4 – Propriedades do titânio.

	Densidade (g.cm ⁻³)	Coef. Expansão Térmica 20°C (°C ⁻¹)	Temperatura de Fusão (°C)	Temperatura de Ebulição (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)
Titânio	4,54	8,4x10 ⁻⁶	1668	3260	108

Quimicamente, o titânio é um elemento de transição leve pertencente ao grupo IVB da tabela periódica, tri ou tetravalente de cor branca e aparência prateada, sólido à temperatura ambiente, não tendo a orbital d da sua estrutura eletrónica completamente preenchida. Este facto permite-lhe formar soluções sólidas substitucionais com elementos numa gama de tamanho de $\pm 20\%$. Na forma elementar, o titânio é um material alotrópico, que apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp) até 882,5°C, chamada de fase alfa (α -Ti); acima desta temperatura a sua estrutura passa a ser cúbica de corpo centrado (ccc), dita fase beta (β -Ti) (Figura 1.2). Dependendo das condições de processamento o Ti também pode apresentar as fases metastáveis hexagonal martensítica α' e a fase ortorombica α'' (Ikarashi et al. 2005; Correa et al. 2014).

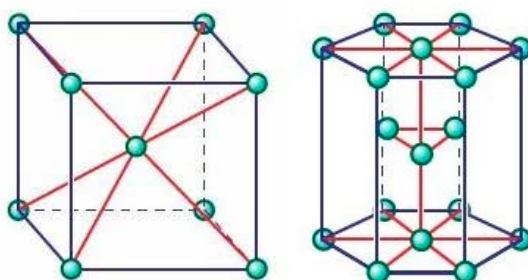


Figura 1.2 – Estruturas cristalinas metálicas comuns: Cúbica de Corpo Centrada (BCC – body cubic centered) à esquerda; Embalagem Hexagonal Compacta (HCP – Hexagonal Pack Compact) à direita.

Na tabela seguinte é apresentada a composição química para o titânio comercialmente puro (cp Ti). O titânio comercialmente puro existe em vários graus de pureza, de 1 a 4, sendo que os de 5 a 10 dizem respeito a ligas. A maioria dos implantes é feita de titânio grau 4 (maior teor de impurezas), pois é o que apresenta maior resistência mecânica (Sykaras et al. 2000).

Tabela 1.5 – Composição química do cp titânio (cp Ti) (wt%).

Elemento	Grau de cp Ti			
	1	2	3	4
Nitrogénio, máx.	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbono, máx.	0,10	0,10	0,10	0,10
Hidrogénio, máx.	0,01	0,01	0,01	0,01
Ferro, máx.	0,20	0,30	0,30	0,50
Oxigénio, máx.	0,18	0,25	0,35	0,40
Titânio	99,48	99,31	99,19	98,94

As propriedades da superfície têm particular importância, pois esta é a interface entre o implante e o organismo. A excelente biocompatibilidade e a capacidade de osteointegração do titânio estão relacionadas com as propriedades que apresenta: existência de uma camada de óxido densa, com 4-17 nm, resultante de passivação e muito resistente. Esta camada de óxido forma-se muito rapidamente quando o Ti é exposto ao ar ou a fluidos, a qual protege o metal de corrosão e oxidação adicional (Steinemann 1998; Sykaras et al. 2000). A corrosão é a destruição dos metais com libertação de compostos para o meio biológico que podem causar efeitos adversos ou ruptura estrutural (Leinenbach & Eifler 2009). A resistência à polarização e o potencial de ruptura têm sido usados *in vivo* para avaliar a resistência à corrosão. O potencial de ruptura do Ti e ligas de Ti é 2-2,4 V, cerca de dez vezes superior ao das ligas de aço e cromo-cobalto (0,2-0,4 V) o que traduz a forte resistência à corrosão daqueles materiais, para além de que apresentam uma elevada velocidade de repassivação e de crescimento do filme de óxidos (44 e 47 msec respetivamente para o cpTi) que também contribui para a sua proteção. Da mesma forma a resistência à polarização é elevada para o Ti e ainda que semelhante, por exemplo, à das ligas de aço, de cromo-cobalto e de Ti6Al4V, a reação tecidual desencadeada é contudo bastante diferente: alguma reação de sequestro/rejeição é visível para estes materiais apesar da forte resistência à polarização, o que parece indicar uma regra para as ligas – evitar a presença de elementos tóxicos que possam desencadear reações de corpo estranho. Por outro lado, a reduzida taxa de dissolução da camada oxidada, que origina concentrações insignificantes de subprodutos indesejados, pode também explicar a ausência de reações para o cpTi. De facto, o cpTi apresenta solubilidade constante para valores de pH entre 3 a 12, o que sugere a presença de espécies eletricamente neutras em solução e com baixa capacidade para se ligarem com moléculas orgânicas; daí a reação inerte nos tecidos. Efetivamente, em cultura de células fibroblásticas e de células osteoblásticas em contato com diferentes metais, há inibição da proliferação celular para todos os metais exceto para o Ti e Zircônio (Zr) - é a tradução da biocompatibilidade destes materiais promovida e intermediada pela formação da camada de óxidos aderentes e resistentes (Steinemann 1998; Spyrou et al. 2002; Saulacic et al. 2012).

O modo como se forma a camada de óxidos garante um comportamento anfotérico da superfície, que apresenta a possibilidade de se ligar tanto a ácidos como a bases: o potencial isoelétrico zero ocorre a um pH 6, próximo da neutralidade, quer para a estrutura amorfa da camada de óxido de Ti, mais comum, quer para ambas as variantes cristalinas tetragonais, rutilo e anatase (Lim et al. 2001). Um modelo simples de interação electrostática da adesão de proteínas com a superfície de óxidos explica como a ligação de proteínas ocorre, quer sejam carregadas positiva ou negativamente, sendo que a forma como a superfície liga os catiões bivalentes de cálcio (Ca) ao oxigénio (O) servirá de ligação aos fosfatos.

As superfícies de óxido de Ti com estrutura de rutilo apresentam um comportamento hidrófobo, enquanto que um comportamento hidrofílico é observado em superfícies com co-dominância de rutilo e anatase., dependentes dos procedimentos de tratamento de superfície e da rugosidade. De qualquer modo, esta interação com as proteínas pode alterar também o comportamento superficial da mesma forma que pode modular a adesão celular e assim o comportamento biológico.

De facto, os implantes constituídos por cp Ti apresentam uma maior percentagem de contacto osso – implante (Bone-to-Implant Contact - BIC), indicando uma osteointegração mais eficaz em relação aos da liga Ti-6Al-4V (Han et al. 1998; Stenport & Johansson 2008; Saulacic et al. 2012). O grau de pureza do Ti é um fator a ter em consideração assim como a presença de alguns elementos potencialmente tóxicos nas ligas. O cp Ti de grau 4 (maior teor de impurezas) é o mais utilizado, em detrimento do Ti de grau I em implantes para cumprimento da resistência mecânica requerida. A elevada afinidade dos fluoretos para a superfície do Ti e a sua capacidade para infiltrar e dissolver a camada de óxido faz aumentar o potencial de corrosão e diminuir a sua resistência; esta ação dos fluoretos é aumentada em pH mais ácido (Tschernitschek et al. 2005; Barão et al. 2012; Mareci et al. 2014). O aumento da reatividade da superfície do Ti, principalmente durante o

processamento, produz uma camada de óxido mais espessa, entre 50 μm e 80 μm – a α -case (a caixa alfa). Esta zona apresenta tendência para desenvolver micro-fracturas e libertar partículas que podem ser nefastas para os tecidos envolventes, criando mesmo reações de corpo estranho ou acumulações nos tecidos em volta dos implantes. Pode surgir, ainda que sem outras alterações, um escurecimento dos tecidos, particularmente após erosão das superfícies por desgaste. Este extremo contacto com os tecidos pode também ser responsável pelo aparecimento de reações de sensibilização/ alergia ao Ti, mesmo quando usado como alternativa em pacientes com alergias a outros metais (Damen et al. 1991) (J. C. Keller et al. 1990; Olefjord & Hansson 1993; Steinemann 1998; Crubézy et al. 1998; Placko et al. 2000; Sykaras et al. 2000; Morra et al. 2003; Lim et al. 2001; Damen et al. 1991; Taborelli et al. 1997; Lumbikanonda & Sammons 2001; HAN et al. 1998; Rosa & Beloti 2003; Tschernitschek et al. 2005; Saulacic et al. 2012; Bauer et al. 2013; Vallés et al. 2008; Barão et al. 2012) (Wennerberg et al. 2004; Ellingsen et al. 2006; Meyer et al. 2006; Stájer et al. 2008).

1.2.1.2. Ligas de Ti

1.2.1.2.a. Ligas Ti-6Al-4V

A liga Ti-6Al-4V, conjuntamente com o cp Ti, é um dos materiais mais usados em implantologia, quer em implantes dentários, mas essencialmente em implantes ortopédicos. A liga Ti-6Al-4V é uma liga bifásica ($\alpha + \beta$) com boas propriedades mecânicas e estabilidade química; combina a maior resistência à corrosão e melhor capacidade de oxidação da fase alfa, com a maior resistência e possibilidade de trabalho da fase beta. Adiciona-se um elemento alifágneo (Alumínio – Al) para endurecimento e um elemento betagénio (Vanádio – V) para estabilizar a fase beta. As propriedades mecânicas, a estabilidade química e estabilidade de estrutura podem ser alteradas por diferentes tratamentos térmicos ou processamento mecânico; o aumento da resistência por formação de estruturas martensíticas ou estruturas alfa-Widmanstätten pode ocorrer por transformação da microestrutura da fase beta durante o arrefecimento (Wennerberg & Albrektsson 1993; Özcan & Hämmerle 2012; Bauer et al. 2013; Brunski et al. 2000; Eisenbarth et al. 2004; Variola et al. 2008). Na tabela seguinte encontram-se algumas propriedades das ligas de Ti.

Tabela 1.6 – Propriedades mecânicas de biomateriais metálicos.

Material	Estado	Módulo de Young (MPa)	Limite de Elasticidade (MPa)	Resistência à Tração (MPa)
X2CrNiMo17122	Recozido	190	331	586
(AISI 316L)	30% Trabalhado a frio	190	792	930
	Forjado a frio	190	1213	1351
Co20Cr6Mo	Fundido	210	448-517	655-889
	Forjado a quente	210	896-1200	1399-1586
Co20Cr15W10Ni	Forjado a quente	210	484-648	951-1220
	44% Forjado a frio	210	1606	1896
Co35Ni35Cr20Mo10	Fundido	232	965-1000	1206
cp-Ti	Grau 2	105-110	250	390-540
Ti6Al4V	Trabalhado a frio	105-110	830-1070	920-1140
Ti6Al7Nb	-	110	810-1010	870-1010
Ti5Al2.5Fe	-	110-115	780	860
Ti12Mo6Zr2Fe	-	74-85	1000-1060	1060-1100
Ti13Nb13Zr	-	64-83	435-905	705-1035
Ti29Nb13Ta4.6Zr	-	65	400	1000-1050
Ti20Nb	-	63-80	500	700
Ti30Ta	-	60-70	590	740

Apesar da estrutura cristalina da fase alfa (rutilo e anatase) da liga Ti-6Al-4V ser idêntica à estrutura do cp Ti e apresentar um comportamento idêntico em solução, molhabilidade e corrosão, alguns tratamentos de superfície para a promoção da osteointegração não são eficazes (Lim et al. 2001; Barão et al. 2012). O jateamento da superfície com partículas de alumina (Al_2O_3) seguido de condicionamento da superfície com ácido não é um tratamento de superfície linear para ligas de Ti alfa-beta devido ao condicionamento preferencial da fase alfa ou da fase beta. Diferenças das propriedades eletroquímicas das duas fases e diferença no pH e no tipo de oxidantes modificam a cinética e a reação termodinâmica do processo. O jateamento seguido do condicionamento com a combinação de ácidos HNO_3/HF produz o ataque preferencial da fase alfa e enriquecimento superficial de da fase beta rica em V; quando é usado uma combinação de oxidantes como H_2PO_4/H_2O_2 após o jateamento a fase beta é atacada preferencialmente deixando uma superfície com microrugosidade aumentada, mas sem aumento de elementos potencialmente tóxicos (Eisenbarth et al. 2004; Variola et al. 2008; Bernhard et al. 2009). Ainda que a liga Ti-6Al-4V apresente um elevada resistência à polarização tal como o cp Ti, reações tecidulares de sequestro/rejeição são visíveis para aqueles materiais. A inibição da proliferação celular de células fibroblásticas e osteoblásticas em cultura com contacto direto com diferentes metais, nomeadamente o V e o Al, reforça o potencial citotóxico que existe nas liga Ti-6Al-4V e que elementos que desencadeiam este tipo de reação não devem participar na composição das ligas (Steinemann 1998; Rosa & Beloti 2003; Saulacic et al. 2012; Cremasco et al. 2011; Y.-J. Park et al. 2013).

Em estudos *in vivo* a percentagem de contacto osso-implante (Bone-Implant-Contact – BIC) para implantes de liga Ti-6Al-4V foi inferior ao BIC de implantes de cp Ti; ainda que a diferença não tenha sido significativamente diferente em alguns estudos, o binário de remoção do implante (Removal Torque Value – RTV) foi sempre menor para os implantes de liga Ti-6Al-4V (Han et al. 1998; Stenport & Johansson 2008; Saulacic et al. 2012). A existência de partículas de metal, a presença de alguns elementos e iões podem desencadear reações inflamatórias exacerbadas tipo corpo estranho e também mediar o aumento de células gigantes multinucleadas no local e conseqüente diminuição da osteointegração (Braddock et al. 2001; Spyrou et al. 2002; Rosa & Beloti 2003; Davies 2007; Albrektsson et al. 2014). Existe uma preocupação crescente com este tipo de liga de Ti, apesar de outros estudos não terem encontrado qualquer diferença na resposta celular ou tecidual entre implantes da liga Ti-6Al-4V e implantes de cp Ti e também reportarem taxas de sobrevivência idênticas para ambos os tipos de implantes (Velasco-Ortega et al. 2010; Saulacic et al. 2012; Bauer et al. 2013; Özcan & Hämmerle 2012).

Novas técnicas de processamento têm sido pesquisadas para maximizar as potencialidades da liga Ti-6Al-4V. Webster (Webster & Ejiófor 2004) refere que a adesão de células osteoblásticas cultivadas sobre materiais metálicos de fase nanométrica, nomeadamente liga Ti-6Al-4V, cp Ti e liga CoCrMo, têm uma adesão superior à adesão dos mesmos metais convencionais. A modificação de comportamento parece dever-se ao tamanho nanométrico das partículas que proporcionam mais focos de adesão para as células e simultaneamente a nanorugosidade, que pode contribuir como zona focal de deposição de precipitados de Ca e P. O tratamento térmico da liga Ti-6Al-4V investigado por Wang ((Wang et al. 2008) resulta na alteração das características da nanotopografia da superfície, a qual seria responsável por uma maior capacidade de adsorção de Ca/P e promoveria maior força de adesão inicial [cerca de 38,5 a 58,9 nN (nanonewtons)], dos osteoblastos. Uma liga de Ti-6Al-4V jateada com alumina e passivada com ácido nítrico parece cumprir com todos os requisitos dos procedimentos da International Organization for Standardization (ISO), no que respeita a citotoxicidade e genotoxicidade, podendo por isso ser considerada uma opção como material para implantes (Velasco-Ortega et al. 2010). Contudo, novos materiais – e não novos tratamentos ou técnicas de processamento – continuam a surgir englobando na sua composição elementos com elevada biocompatibilidade e segurança biológica.

1.2.1.2.b. Ligas Titânio-Zircônio (TiZr)

As ligas de Ti surgiram como uma alternativa ao cp Ti para tentar colmatar as suas menos boas propriedades mecânicas. Contudo a introdução de alguns elementos nas ligas de Ti para melhoria das suas propriedades mecânicas trouxe alguma preocupação em relação ao seu potencial citotóxico, nomeadamente o Al e o V. Surgem por isso outras ligas de Ti que não incluem estes elementos e, por isso, retêm as vantagens das ligas sem os seus potenciais efeitos adversos, entre as quais as ligas de Titânio-Zircônio (TiZr).

O Zircônio (Zr), tal como o Ti, é um elemento de transição leve pertencente ao grupo IVB da tabela periódica que apresenta propriedades similares ao Ti (Tabela 1.7).

Tabela 1.7 – Propriedades do titânio e zircônio.

	Densidade (g.cm ⁻³)	Coef. Expansão Térmica 20°C (°C ⁻¹)	Temperatura de Fusão (°C)	Temperatura de Ebulição (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)
Titânio	4,54	8,4x10 ⁻⁶	1668	3260	108
Zircônio	6,49	5,7x10 ⁻⁶	1852	4400	68

É produzido como um subproduto da produção de Ti, também através do processo de Kroll. Tem uma transformação alotrópica similar com uma temperatura de transição de fase semelhante, i.e., apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp) chamada de fase alfa (α -Zr). Acima da temperatura de transição de fase a sua estrutura passa a ser cúbica de corpo centrado (ccc), a fase beta (β -Zr). O Zircônio quando adicionado ao Ti é considerado neutral (nem alfa-Zr nem beta-Zr) e forma uma solução sólida, apresentando elevada solubilidade, tanto na fase alfa-Ti como beta-Ti; pode por isso formar ligas de várias proporções (Ikarashi et al. 2005; Ho et al. 2008; Bernhard et al. 2009; Correa et al. 2014).

A composição química das ligas TiZr em solução substitucional traduz uma concentração de Zr muito perto da estequiometria, a qual é acompanhada por um aumento da densidade, quando comparada com a densidade do cp Ti (4,51 g/cm³), devido à maior densidade do Zr (6,50 g/cm³).

Os padrões de difração de raios-X revelam apenas a presença de picos coincidentes com a fase alfa, não existindo qualquer pico de fase beta ou fases intermediárias, o que mostra uma completa solução sólida para ambas as fases. Devido ao maior raio atômico do Zr (0,162 nm) em relação ao do Ti (0,147 nm), a adição de Zr na liga de TiZr produz um aumento dos parâmetros da rede cristalina da fase alfa o que implica um desvio dos picos do difractograma para ângulos de difração menores (desvio para a esquerda). Quanto maior o aumento de Zr na liga mais notório será o desvio. A estrutura da fase alfa corresponde à estrutura típica hexagonal compacta (hcp) com algumas estruturas martensíticas aciculares, as quais aumentam com o aumento do teor de Zr, provavelmente como resultado da diminuição da temperatura de início da transformação martensítica induzida pelo soluto (Ho et al. 2008; Correa et al. 2014). A dureza das ligas TiZr é superior às do cp Ti e aumenta com o aumento do teor de Zr na liga (Figura 1.3 e Figura 1.4).

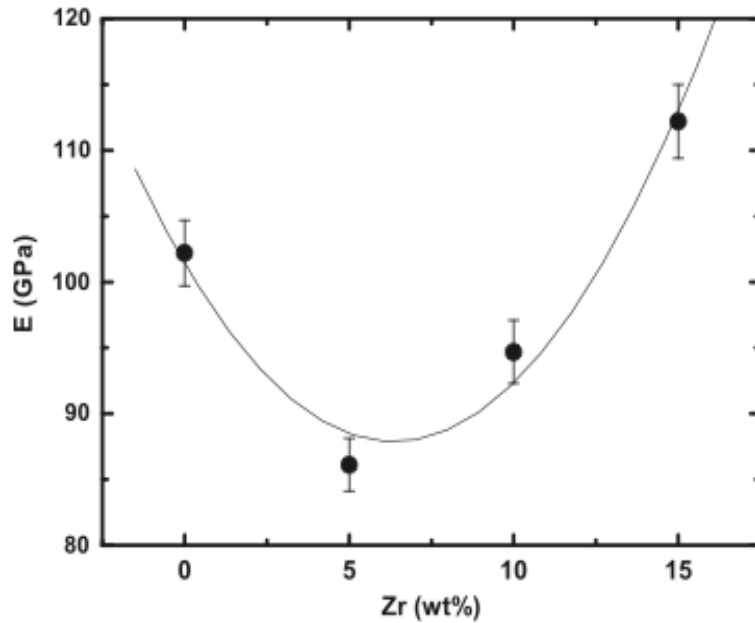


Figura 1.3 – Variação do módulo do módulo de elasticidade em função do teor de zircônio.

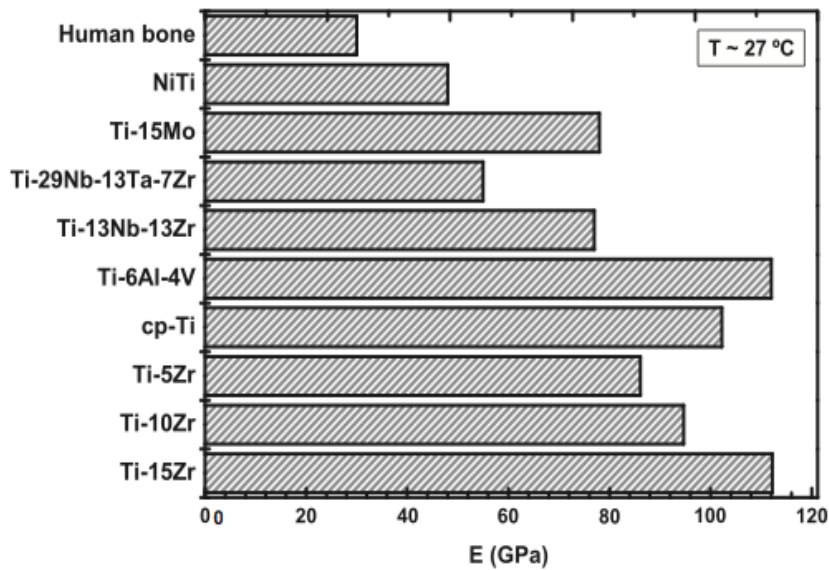


Figura 1.4 – Módulo de elasticidade de algumas ligas biomédicas.

A oxidação do Ti nas ligas está ligada simultaneamente à oxidação do oxigênio no metal e à escala de formação de óxidos; por isso, a solução sólida do oxigênio na liga Ti pode desencadear o mecanismo de endurecimento. No caso das ligas TiZr, a distorção da rede cristalina e a restrição de deslocamento provocada pelo Zr substitucional podem produzir o reforço em solução sólida. A avaliação do conteúdo de oxigênio em três ligas TiZr com teores diferentes de Zr revelou a existência de menor quantidade de oxigênio em solução sólida na liga com valor mais baixo de dureza (Correa et al. 2014). Contudo, devido à completa solubilidade em solução sólida do Zr (Figura 1.5), o endurecimento em solução sólida da fase alfa coadjuvado por uma microestrutura fina parece explicar o aumento de dureza das ligas de TiZr com o aumento do teor de Zr (Ho et al. 2008).

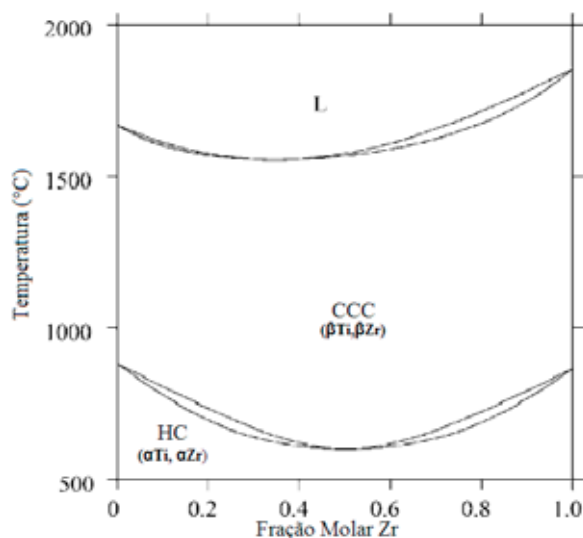


Figura 1.5 – Diagrama de equilíbrio do sistema Ti-Zr.

Na medida em que o teor de Zr na liga aumenta, assim aumentam as propriedades mecânicas da liga, como a resistência, a recuperação elástica e a dureza, comparando-se superiormente com as propriedades do cpTi. De acordo com o diagrama de equilíbrio de fases do sistema binário TiZr, o Ti e o Zr são completamente miscíveis e não se forma qualquer outro composto intermetálico; qualquer melhoria das propriedades mecânicas resulta de um reforço de fases em solução sólida (Ho et al. 2008; Bernhard et al. 2009) (Tabela 1.8).

Tabela 1.8 – Propriedades mecânicas do TiZr.

cp Ti grau 4	Propriedades mecânicas	
	Resistência tensão (MPa)	0,2% Yield strength (MPa)
cp Ti grau 4, trabalhado a frio	550	483
Ti-6Al-4V	680	520
Ti-6Al-7Nb	860	780
TiZr	900-953	800-849

As ligas de TiZr não apresentam na sua composição elementos indesejáveis e passíveis de desencadear reações citotóxicas; os elementos Ti e Zr são aliás referidos por Steinemann (Steinemann 1998) como os únicos metais que não desencadeiam inibição da proliferação de fibroblastos e osteoblastos quando em cultura direta. Estes elementos encontram-se no grupo dos materiais com maior potencial biológico (Cremasco et al. 2011; Y.-J. Park et al. 2013), não sendo por isso de esperar compromissos na biocompatibilidade destas ligas.

No teste de biocompatibilidade de uma liga TiZr por implantação subcutânea em ratos de uma amostra por um período de 8 (oito) meses, Ikarashi (Ikarashi et al. 2005) verificou que as amostras de não provocaram qualquer toxicidade sistêmica ou diminuição na resposta imunitária dos animais; para além disso, o número de macrófagos e células inflamatórias em torno da cápsula que envolvia as amostras de TiZr foi o mais baixo, o que indica melhor biocompatibilidade, até mesmo que o cpTi. A citotoxicidade direta avaliada pela colocação de células osteoblásticas diretamente sobre amostras de TiZr revelou não existir efeito citotóxico. Correa (Correa et al. 2014) observou que comparativamente à compatibilidade de amostras de cpTi, as amostras de TiZr apresentavam uma ligeira diminuição de biocompatibilidade, significando que o Zr na liga de TiZr afetava ligeiramente o desempenho biológico da liga; contudo, a vantagem de ter o Zr na liga de TiZr para favorecer as suas propriedades mecânicas justificava a sua utilização.

Em 2009 foi lançado no mercado um implante dentário feito com uma liga de TiZr, na sequência dos trabalhos de Bernhard (Bernhard et al. 2009). Essa liga, chamada Roxolid® e propriedade do Institut Straumann AG, contém 13-17% de Zr, por peso, o que significa que cada sexto a oitavo átomo de Ti na liga é substituído por um de Zr e que, em média, cada átomo de Ti está ligado a dois átomos de Zr. Apresenta uma estrutura monofásica alfa, o que permite o tratamento da superfície com jateamento e condicionamento com HCl/H₂SO₄, e uma melhoria das propriedades mecânicas de 13-42% relativamente ao cp Ti. Foi cumprido um conjunto alargado de testes de biocompatibilidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, respeitando as normas ISO e os requerimentos da Food and Drugs Administration (FDA), os quais demonstraram que a liga TiZr Roxolid® era no mínimo tão biocompatível como o cp Ti. Outros estudos têm demonstrado a sua biocompatibilidade: Wen (Wen et al. 2014) comparou a osteointegração de implantes cp Ti e TiZr em coelhas ovariectomizadas e, apesar de não ter registado uma diferença significativamente diferente nos parâmetros da histomorfometria, registou que os valores de binário (ou torque) de remoção dos implantes de TiZr eram superiores, o que provavelmente refletiria uma maior quantidade de osso em redor dos implantes. Noutro estudo *in vivo*, Saulacic (Saulacic et al. 2012) comparou a osteointegração de implantes de cp Ti, implantes de liga Ti-6Al-4V e implantes de TiZr colocados no maxilar de porcos anões. A quantidade de novo osso dentro dos sulcos/espiras dos implantes aumentou com o tempo e com diferenças significativas entre os materiais; o contato osso-implante (BIC) aumentou para os implantes cp Ti e TiZr enquanto que diminuiu para os implantes Ti-6Al-4V. A osteointegração ocorreu mais rapidamente e com a presença de menos células gigantes multinucleadas para as superfícies de cp Ti e TiZr, o que realça a influência da topografia e composição química nos resultados. Esta liga TiZr é usada nos implantes Roxolid® comercializados pela Straumann® e até ao momento são os únicos implantes que apresentam este tipo de material. Desde o início da sua utilização clínica que os implantes TiZr Roxolid® são apenas comercializados com a superfície modificada, por um tratamento de jateamento com partículas de alumina de grão grosso (0,25 mm – 0,5 mm) seguido de ataque ácido a quente (125 °C – 130 °C) com HCl/H₂SO₄ e armazenamento dos dispositivos em solução 0,9% NaCl sob atmosfera de nitrogénio – a superfície SLActive® (Bernhard et al. 2009; Frank, Walter, Lyngstadaas, et al. 2013b).

Diversos estudos clínicos têm comprovado a sua segurança e eficácia. O estudo piloto de Barter (Barter et al. 2011), uma série de casos-controlo prospectiva, avaliou o desempenho clínico de implantes TiZr Roxolid® de diâmetro reduzido (3,3 mm) em 22 pacientes por um período de 24 meses. Cada paciente recebeu um implante dos quais apenas foram perdidos 2 implantes (um deles porque o paciente não cumpriu a consulta de controlo). A perda óssea média foi de $0,33 \pm 0,54$ mm após 2 anos de carga com tecidos perimplantares saudáveis, cumprindo os critérios de sobrevivência e sucesso como definidos por Albrektsson (Albrektsson et al. 1986; Albrektsson & Sennerby 1990; Albrektsson et al. 2008). Num estudo observacional, prospetivo, não intervencionista, multicêntrico, foi avaliada a sobrevivência e o sucesso de implantes TiZr Roxolid® de diâmetro reduzido (3,3 mm) na prática clínica diária durante 2 anos. Nesse estudo, Al-Nawas (Al-Nawas et al. 2014) refere a observação de 603 implantes colocados em 357 pacientes com uma taxa de sobrevivência e sucesso cumulativas de 97,8% e 97,6% respetivamente depois de 1 ano; após 2 anos essas taxas eram 97,6% e 97,4% respetivamente, continuando os níveis ósseos e gengivais perimplantares estáveis na maioria dos pacientes. Num estudo randomizado controlado clínico (randomized clinical trial – RCT), duplamente cego, multicêntrico, ao final de 36 meses de observação, Quirynen (Quirynen et al. 2014) refere resultados semelhantes entre os implantes observados. Foram tratados 91 pacientes desdentados mandibulares com a colocação de dois implantes bone-level de diâmetro 3,3 mm, um de cp Ti grau 4 e outro TiZr Roxolid®, na região interforaminal; os implantes foram carregados às 6-8 semanas com uma sobredentadura (overdenture) retida por conectores Locator®; apenas 75 pacientes cumpriram os três anos de seguimento, resultando, para estes pacientes, numa taxa de sobrevivência de 98,7% e 97,3% e uma alteração média do nível ósseo de $-0,78 \pm 0,75$ e $-0,60 \pm 0,71$ respetivamente para implantes TiZr Roxolid® e cp Ti grau 4.

Apesar dos resultados clínicos excelentes com implantes de diâmetro reduzido de liga TiZr Roxolid®, continuam a ser investigados ligas de TiZr com propriedades mecânicas melhoradas ou tratamentos de superfície que possam melhorar o comportamento biológico. Yao (Yao et al. 2014) conseguiu, através de um processo de refundição superficial por laser (LSR – laser surface remelting) um aumento de 92,9% na microdureza e de 21,78% no módulo elástico. O efeito de reforço obtido com LSR resulta da transformação de fase α em fase β + fase ω metaestável (uniformemente distribuída no interior da fase β) + fase α e de um refinamento do arranjo microestrutural. A liga TiZr com tratamento de superfície SLActive apresenta uma concentração de hidreto 1,9 vezes superior à superfície de cp Ti tratada do mesmo modo. Esta camada de hidreto pode ser responsável pelo excelente comportamento biológico das ligas TiZr assim tratadas: o zircônio parece favorecer a formação de hidreto nas ligas de TiZr quando atacadas com ácido (Frank, Walter, Lyngstadaas, et al. 2013b). O desenvolvimento e a modificação da camada de hidreto por polarização catódica foram estudados por Gómez-Florit (Gómez-Florit et al. 2014) e Frank (Frank, Walter, Bucko, et al. 2013a). Este autor refere que a camada de hidreto não pode ser aumentada, mas sofreu re-estruturação essencialmente na nanotopografia, enquanto que o primeiro afirma que a implementação da camada de hidreto por polarização catódica contribuiu para uma melhor adesão dos fibroblastos gengivais humanos sobre superfícies de TiZr e que poderá ser usada para melhorar a integração dos tecidos moles.

1.2.1.2.c. Outras ligas de Ti e considerações biomecânicas

A tendência recente no desenvolvimento de biomateriais procura uma aproximação biomimética tanto do ponto de vista biológico como biomecânico. Isto é particularmente importante para biomateriais sujeitos a transferência de carga como os implantes, para os quais a procura de soluções tem passado por ligas de Ti composta por elementos sem potencial citotóxico ou alérgico e também por conseguir materiais com módulo de Young mais baixo, sem compromisso das propriedades mecânicas. O cp Ti ou as ligas de Ti atualmente usadas para implantes apresentam um módulo de Young na ordem dos 110 GPa, muito superior ao do osso (10-30 GPa) onde estão inseridos. Esta diferença de “rigidez” entre o implante e o osso gera uma transferência de carga não homogênea, criando no osso, menos rígido, um estado de sobrecarga ou pré-esforço – “stress shielding” – que condiciona a remodelação óssea (C. H. Park et al. 2010; Özcan & Hämmerle 2012; Bauer et al. 2013; Gepreel & Niinomi 2013). Como o cp Ti e as ligas de cp Ti apresentam uma estrutura monofásica α -Ti ou bifásica (α + β)-Ti respetivamente, e a fase α -Ti é mais resistente e menos dúctil, a procura de novos materiais tem-se centrado nas ligas de β -Ti. As ligas Ti-6Al-7Nb e Ti-5Al-2.5Fe, desenvolvidas especificamente para biomateriais, são ligas com propriedades semelhantes à liga Ti-6Al-4V, mas excluem os potenciais problemas biológicos relacionados com a presença de V na liga (Steinemann 1998; Rosa & Beloti 2003; Saulacic et al. 2012; Cremasco et al. 2011; Y.-J. Park et al. 2013). Ti-6Al-7Nb é uma liga bifásica (α + β)-Ti, com a introdução do elemento betagénio Nb (Nióbio) como estabilizador da fase β -Ti e com superior biocompatibilidade. Quando Shapira (Shapira et al. 2009) comparou o comportamento de células osteoblásticas Saos-2 em cultura sobre discos da liga Ti-6Al-4V ou da liga Ti-6Al-7Nb verificou que sobre estas as células atingiam mais rapidamente a maturação como osteoblastos, sugerindo que este material poderia considerado uma opção como biomaterial. Também Osathanon (Osathanon et al. 2011) reportou uma boa adesão e proliferação de células osteoblásticas humanas em superfícies de liga Ti-6Al-7Nb com diferentes rugosidades.

Outro parâmetro importante para o desempenho biológico das superfícies dos implantes é a capacidade para a formação de precipitados de Ca/P ou tipo apatite. Park (I. S. Park et al. 2008) tratou a superfície de amostras de liga Ti-6Al-7Nb com uma solução de NaOH e, após imersão em solução de Hank por 15 dias, confirmou a formação de uma densa camada de precipitado tipo apatite. Esse tratamento melhorou

também a citotoxicidade e a compatibilidade, tendo as amostras de liga Ti-6Al-7Nb tratadas apresentado melhor desempenho que as amostras comerciais sem tratamento. A mais recente geração de ligas para implantes inclui as ligas Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF), Ti-15Mo-5Zr-3Al, Ti-15Sn-4Nb-2Ta-02Pd assim como a liga Ti-13Nb-13Zr. Apresentam uma estrutura monofásica de β -Ti, tendo o Nb como betagênio e o Zr com um comportamento neutro na liga. São ligas dúcteis e de elevada maquinabilidade, com razoável resistência à corrosão e resistência e com módulo de Young (módulo de elasticidade) baixo (Özcan & Hämmerle 2012; Bauer et al. 2013; Chen et al. 2013; Kumar et al. 2014). O tratamento térmico e o trabalho a frio destas ligas permite elevar o limite elástico, por transformação martensítica da fase β -Ti para α -martensite. Assim consegue-se atingir um elevado limite elástico capaz de garantir integridade estrutural a longo prazo dos implantes e simultaneamente um baixo módulo de Young (<80 GPa), que diminui as tensões causadas pelo efeito de pré-esforço ou sobrecarga (“stress shielding”) (C. H. Park et al. 2010; Mishnaevsky et al. 2014). Uma liga de Ti-13Nb-13Zr de grão ultrafino foi comparada com ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V de grão grosso por Park (C. H. Park et al. 2010) em cultura de células pre-osteoblásticas. Ambas as ligas Ti-13Nb-13Zr apresentaram melhor proliferação e diferenciação celular, sendo que a liga de grão ultrafino apresentou também um ângulo de contacto menor que as outras ligas; para isso contribui o facto de apresentar um tamanho de grão submicrométrico, mas também aos elementos não citotóxicos da liga. Recentemente uma liga de β -Ti, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr, referida como TNTZ, com um módulo de Young <60 GPa foi desenvolvida por intenso trabalho a frio e pressão, refinamento de grão e reforço por precipitação e dispersão; desta forma, consegue-se manter o módulo de Young muito baixo e o limite elástico elevado. A adição de ítria (Y_2O_3) na matriz das ligas TNTZ pode melhorar a resistência à fadiga, facto também importante em biomateriais sujeitos a transferência de cargas cíclicas (Özcan & Hämmerle 2012; Bauer et al. 2013; Gepreel & Niinomi 2013).

1.2.2. Cerâmicas

Os implantes cerâmicos estão a ser considerados uma alternativa aos implantes de cp Ti e das suas ligas por receio de um compromisso estético devido à cor escura dos implantes de Ti, do potencial citotóxico de alguns metais das ligas de Ti e ao próprio Titânio, porque existe um número crescente de pacientes que pedem por soluções sem metal e porque as cerâmicas brancas estão na moda. As cerâmicas como material para implantes já foram investigadas e usadas clinicamente há 40 anos atrás: o Prof. Sandhaus foi um dos primeiros a usar a alumina para produzir o seu “parafuso cristalino ósseo”. Mais tarde, já nos anos 80 do século XX, um outro implante feito de alumina, o Tubinger Immediate Implant, foi usado e mais tarde retirado devido à elevada taxa de fraturas (Wenz et al. 2008; Andreiotelli et al. 2009).

A alumina (Al_2O_3) e a zircónia (ZrO_2) são os dois óxidos cerâmicos mais relevantes para utilização em aplicações biomédicas que combinam excelente resistência à corrosão, com alta resistência ao desgaste e elevada resistência.

Tabela 1.9 – Propriedades mecânicas de cerâmicas usadas para aplicações biomédicas.

Propriedade	α - Al_2O_3	ZrO_2 (Y-TZP)	ZrO_2 (Mg-PSZ)	Al_2O_3 reforçada ZrO_2 (ZTA)	Al_2O_3 matriz compósito (AMC)	Hidroxiapatite densa (HA)
Resistência Flexão (MPa)	595	1000	800	912	1150	20-80
Resistência Compressão (MPa)	4250	2000	1850	-	4700	100-900
Módulo Young (GPa)	400	150	208	285	350	70-120
Dureza (HV)	2400	1200	1120	1500	1975	500-800

Na tabela anterior podemos encontrar algumas propriedades de materiais cerâmicos usados em aplicações biomédicas e na tabela seguinte encontramos algumas das suas aplicações (Bauer et al. 2013).

Tabela I.10 – Cerâmicas usadas em aplicações biomédicas.

Cerâmica	Aplicações
Óxidos de Alumínio	Substituição de articulação ortopédica; Implantes ortopédicos para suporte de carga; Revestimento de implantes; Implantes dentários.
Óxidos de Zircônio	Substituição de articulação ortopédica; Implantes dentários.
Fosfatos de Cálcio	Revestimento de implantes dentários e ortopédicos; Materiais de implantes dentários; Materiais substituintes de enxerto ósseo.
Vidros Bioativos	Revestimento de implantes dentários e ortopédicos; Implantes dentários; Componentes de reconstrução facial; Materiais substituintes de enxerto ósseo; Cimento ósseo.

Os implantes de alumina utilizam uma granulometria muito fina de alfa-alumina policristalina, são depois fabricados por pressão isostática a quente (hot isostatic pressing – HIP) e subsequente sinterização entre 1600-1800°C. Uma granulometria abaixo dos 4 µm garante excelentes propriedades mecânicas e permite manter a capacidade de resistência ao desgaste e à fricção. A alumina apresenta um elevado módulo de Young que em conjunto com a sua elevada dureza e a sua relativamente baixa resistência à torção e resistência ao impacto, a tornam propensa à fratura; a fratura não foi porém a razão frequentemente apontada para a perda dos implantes; talvez a tensão de pré-esforço ou pré-carga (“stress shielding”) devido ao elevado módulo de Young, por analogia com os metais, possa explicar essas falhas (Andreiotelli et al. 2009; Bauer et al. 2013). Atualmente não existe nenhum sistema de implantes de alumina no mercado.

A zircónia para além de muito estável nos meios fisiológicos apresenta elevada resistência ao impacto (K_{IC} 7-10 MPam^{-1/2}), elevada resistência à flexão (900-1200 MPa) e simultaneamente um módulo de Young relativamente baixo (210 GPa), o que a torna num material com elevado potencial em implantologia. Quer a zircónia parcialmente estabilizada (PSZ – partially stabilized zirconia) como a zircónia tetragonal estabilizada com ítria (TZP – tetragonal zirconia polycrystal) são usadas para aplicações biomédicas. A diferença reside na fase cristalina para estabilizar a transformação de fase, o que também se traduz em diferentes propriedades (Tabela I.9). A zircónia apresenta uma fase monoclinica desde a temperatura ambiente até 1170°C, a mais elevadas temperaturas transforma-se em fase tetragonal, primeiro, e depois em fase cúbica a 2370°C. Durante o arrefecimento, após as elevadas temperaturas de sinterização, as transformações de fase que ocorrem até à temperatura ambiente induzem tensão mecânica devido à expansão volumétrica de 3-5% associada à transformação de fase, tornando a zircónia num material propenso à formação de fissuras.

A adição de óxidos como MgO, CaO e Y₂O₃, permite gerar cerâmicas multifásicas com uma microestrutura que consiste maioritariamente de fase cúbica com precipitado de fase monoclinica e tetragonal como fases menores. Esta zircónia é conhecida como zircónia parcialmente estabilizada (PSZ) e quando uma tensão é aplicada e a propagação da fissura ocorre, a fase tetragonal metaestável na ponta da fissura transforma-se em fase monoclinica estável e expande, o que contraria a propagação da fissura ao gerar forças compressivas contrárias – é o endurecimento por transformação de fase. A zircónia parcialmente estabilizada também se pode obter por adição de pequenas quantidades de Y₂O₃, formando-se neste caso uma fase tetragonal estável

à temperatura ambiente. Esta zircônia parcialmente estabilizada com ítria, Y-TZP, obtém-se com adição de não mais do que 2-3% mol de Y_2O_3 . O tamanho de grão formado (idealmente pequeno e não superior a 1 μm), a quantidade de fase retida na matriz e a tensão que nela exercem condicionam as propriedades da cerâmica. A zircônia completamente estabilizada (>8% mol Y_2O_3) forma uma solução sólida de fase cúbica estável à temperatura ambiente, mas que não é adequada para aplicações biomédicas (Wenz et al. 2008; Andreiotelli et al. 2009; Bauer et al. 2013). É conhecido que devido à metaestabilidade da fase tetragonal à temperatura ambiente a Y-TZP é propensa ao envelhecimento na presença de água. Esse problema potencial pareceu muito limitado perante as condições *in vivo* até ao ano 2001, quando, num curto espaço de tempo, 400 cêndilos femorais falharam, ficando ligadas ao envelhecimento acelerado da cerâmica em meio aquoso. A degradação a baixa temperatura (low-temperature degradation) ocorre por uma transformação superficial lenta da fase metaestável tetragonal para a fase monoclinica em presença de água ou vapor de água; o processo ocorre por nucleação e crescimento da fase e está relacionado com várias etapas do processamento que influenciam a microestrutura (Wenz et al. 2008).

A zircônia apresenta também excelentes propriedades biológicas. Hempel (Hempel et al. 2010) analisou o comportamento de células osteoblásticas Saos-2 em contacto com amostras de zircônia e amostras de cp Ti com diferentes rugosidades. Em todos os tempos observados as células Saos-2 apresentaram maior adesão, proliferação e diferenciação nas amostras de zircônia, reforçando a sua biocompatibilidade. Os resultados da cultura de células CAL72 osteoblásticas sobre diferentes substratos de zircônia e cp Ti não se destacaram tanto a favor da zircônia, mas nunca foram inferiores aos das outras superfícies: para quase todos os parâmetros da análise não houve diferença significativa, mas havendo, favorecia a zircônia (Bachle et al. 2007).

A osteointegração dos implantes de zircônia foi investigada em diversos estudos. Num modelo de estudo animal com o coelho, Sennerby (Sennerby et al. 2005) avaliou histológica e biomecanicamente a resposta óssea a implantes Y-TZP com duas modificações de superfície e comparou-as com a resposta a implantes Y-TZP sem tratamento de superfície (maquinados) e a implantes de cp Ti oxidado (TiUnite). Após um período de cicatrização de 6 semanas os implantes foram sujeitos a teste de torque de remoção (RTV) ou removidos em bloco para analisar o contacto osso-implante (BIC). Os valores do RTV foram significativamente mais elevados para as superfícies modificadas de zircônia; em relação ao BIC não foi registada diferença, mas qualitativamente os autores referem sinais de osteogénese de contacto e formação óssea direta nos implantes de zircônia com superfície modificada (rugosidade) e nos implantes de cp Ti, levando os autores a concluir que a resposta aos implantes de zircônia é no mínimo semelhante aos implantes de cp Ti. Hoffmann (Hoffmann et al. 2007) avaliou histologicamente o grau de aposição óssea em implantes de zircônia (Z-system, Konstanz, Alemanha) às 2 e 4 semanas pós-inserção. Os implantes de zircônia demonstraram um grau ligeiramente mais elevado de aposição óssea (54-55%) comparado com os implantes de cp Ti às 2 semanas, mas a aposição óssea foi maior para os implantes de cp Ti (68-91%) do que para os implantes de zircônia (62-80%) às 4 semanas, considerando por isso o desempenho semelhante para ambos os materiais.

Clinicamente os resultados são de alguma forma pouco claros e até controversos, mas essencialmente escassos. Oliva (Oliva 2010) avalia o desempenho clínico de implantes de zircônia de uma só peça (CeraRoot, Barcelona, Espanha) com três superfícies distintas até 5 anos de observação. Foram usados 831 implantes nas mais variadas situações clínicas em 378 pacientes. A taxa de sucesso (sobrevivência) global após 5 anos de observação foi de 95% (92,77% para os implantes não revestidos, 93,57% para os implantes revestidos e 97,60% para os implantes com superfícies atacadas por ácido). As diferenças realçam o facto de que os tratamentos de superfícies melhoram o desempenho clínico dos materiais e que são necessários mais estudos para otimizar esse desempenho. Por outro lado Cannizzaro (Cannizzaro et al. 2010) usou implantes de zircônia (Z-Systems, Konstanz, Alemanha) unitários num protocolo de carga imediata, referindo 12,5% de perdas precoces de

implantes e acentuada perda óssea um ano após a carga. Quando considerado o grupo de implantes imediatos (com carga imediata) as perdas sobem para 40%, o que levou os autores a concluir que os implantes de zircónia em alvéolos pós-extração e em carga imediata apresentam um elevado risco de insucesso.

O comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* (estudos animais) aponta no sentido de um favorecimento dos mecanismos de adesão e diferenciação celular ou aceleração da osteointegração, o que tem levado os investigadores a desenvolver outras formas de usar a zircónia. Assim, Sollazzo (SOLLAZZO et al. 2008) utilizou a zircónia como revestimento após deposição de uma suspensão coloidal de zircónia sobre a superfície de implantes de cp Ti. Avaliou histologicamente a formação óssea nestes implantes revestidos e comparou-os com implantes idênticos de cp Ti, tendo verificado que o BIC era significativamente maior para os implantes revestidos. Contudo, os dados relativos aos implantes de zircónia são ainda reduzidos, indicando que estes implantes poderão apresentar um desempenho semelhante aos implantes de cp Ti. As modificações de superfície e de microestrutura poderão melhorar a cicatrização óssea inicial e o contacto osso-implante (Wenz et al. 2008; Andreiotelli et al. 2009; Özkurt & Kazazoglu 2011).

1.3. Topografia

As modificações da topografia e da superfície dos implantes têm recebido um interesse significativo nos últimos anos. Os implantes maquinados do início da implantologia viram-se suplantados pelas modificações topográficas micrométricas introduzidas face aos resultados dos estudos animais que favoreciam uma melhor e mais rápida resposta óssea das superfícies mais rugosas. Atualmente, a identificação *in vitro* de estruturas nanométricas na superfície dos implantes tem sido relacionada com uma maior adesão e proliferação das células osteoblásticas. A maior complexidade da estruturação das superfícies atuais necessita de uma caracterização rigorosa, com parâmetros e técnicas bem definidos, para validação, controlo e desenvolvimento das interações célula/superfície ao nível nanométrico.

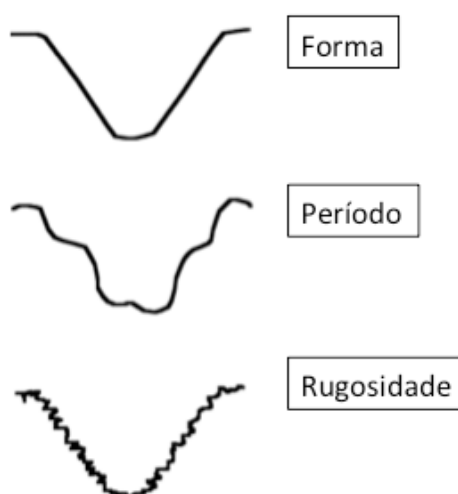


Figura 1.6 – Exemplificação de forma, período e rugosidade.

A topografia consiste de forma, período (“waviness”) e rugosidade. A rugosidade diz respeito à quantidade de irregularidades da superfície e como estão distribuídas e orientadas nessa superfície, ou seja, é o que fica quando removemos a forma e o período (Figura 1.6). Em relação com a rugosidade da superfície

Albrektsson (Albrektsson & Wennerberg 2004b) propôs a classificação das superfícies (Tabela 1.11) em lisas, minimamente rugosas, moderadamente rugosas e rugosas segundo o valor do S_a (parâmetro de caracterização da rugosidade que corresponde à média aritmética dos desvios em relação a uma superfície).

Tabela 1.11 – Classificação das superfícies segundo a rugosidade S_a .

	Rugosidade S_a
Lisa	0,0 - 0,4 μm
Minimamente rugosa	0,5 - 1,0 μm
Moderadamente rugosa	1,0 - 2,0 μm
Rugosa	> 2,0 μm

Ao aumento do número e complexidade das superfícies tem correspondido também um aumento do número dos estudos sobre as mesmas. Não existe um conjunto de regras para avaliação e caracterização das superfícies de implantes, como existe para outras áreas, o que tem dificultado a valorização e integração de todos os resultados por falta de normalização.

A avaliação da topografia de uma superfície deve ser efectuada de forma a ser representativa de toda a superfície. Em amostras planas ou cilíndricas a topografia será idêntica em diferentes localizações; contudo, em formas complexas como os implantes poderá existir variação. É por isso recomendado realizar medições em diferentes zonas do implante, como topo da espira, flanco da espira e vale entre espiras (Figura 1.7). Essa avaliação deve ser baseada em 9 medições (3 topos, 3 flancos, 3 vales) por implante e fazê-lo em 3 implantes por forma a obter um valor médio válido (Wennerberg & Albrektsson 2000).

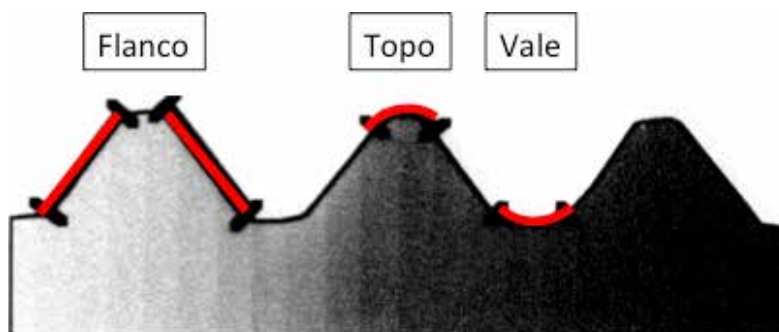


Figura 1.7 – Desenho esquemático ilustrando as áreas das espiras dos implantes que é necessário avaliar.

A caracterização da superfície deve incluir parâmetros 2D (perfil) e 3D (área/superfície). A generalidade dos implantes tem uma orientação isotrópica da rugosidade, isto é sem uma orientação preferencial da rugosidade em nenhum sentido ou sempre igual em qualquer sentido. Em superfícies anisotrópicas como as maquinadas, i.e. com orientação da rugosidade, a medição deve ser sempre efectuada cruzando a orientação e não ao longo; são necessárias 25 medições por superfície (Wennerberg & Albrektsson 2000; Kohles et al. 2004). Apesar dos parâmetros topográficos 2D do perfil serem os mais habitualmente referidos, para caracterizar uma superfície atual é recomendável incluir parâmetros 3D de superfície, tais como a descrição de parâmetros de altura, espaço e híbridos. Porém, normalmente são encontrados apenas valores relativos a R_a , R_q , R_z e R_t para descrição 2D e os seus equivalentes 3D: S_a , S_q , S_z e S_t . O valor de R_a traduz a média aritmética dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição; R_q a raiz quadrada da média aritmética dos quadrados dos desvios do perfil também conhecido por R_{rms} ; R_z é a média dos maiores desvios

pico-vale após dividir o perfil (ou superfície) em cinco intervalos iguais. O parâmetro S_a fornece informação mais consistente da superfície e não é influenciado pela direção de medição. Adicionalmente uma medida do alargamento da área da superfície (S_{dr}) – mede em percentagem o alargamento da área comparado com a área total do plano de referência. Um parâmetro híbrido como o índice de retenção de fluido (Sci) é o ratio de volume vazio da área da amostra sobre a raiz quadrada média do desvio: o Sci mede a capacidade de retenção de fluido da superfície e deve completar a informação relativamente à topografia da superfície.

Para a análise da superfície os perfilómetros mecânicos de contacto estão contraindicados essencialmente devido ao risco de deterioração da superfície pelo contacto com a ponta de diamante. Os instrumentos de medição óticos são indicados para investigação em biomateriais protegendo a superfície muitas vezes frágil dos biomateriais. São normalmente mais rápidos e têm melhor resolução. Os sistemas de medição ótica mais usados são os perfilómetros de laser, o microscópio de varrimento confocal laser e o interferómetro. O principal problema com os sistemas óticos tem a ver com a reflectância das superfícies, que em excesso ou defeito, pode perturbar a medição e formação da imagem. Os equipamentos de medição por contacto de elevada resolução, como a sonda microscópica de varrimento ou o microscópio de força atômica (AFM), permitem ultrapassar esta limitação; contudo, a sonda de leitura é tão pequena que limita a leitura a áreas muito pequenas. O microscópio electrónico de varrimento (SEM) é normalmente usado para uma caracterização não quantitativa da superfície. O microscópio de varrimento confocal laser, o interferómetro e o microscópio de força atômica permitem caracterizar e medir a generalidade das superfícies atuais (Wennerberg & Albrektsson 2000; Wieland et al. 2001; Mazor & Cohen 2003; Nawas & Götz 2003; Wennerberg & Albrektsson 2009; Wennerberg & Albrektsson 2010).

A topografia da superfície é considerada um dos parâmetros determinantes do comportamento biológico dos biomateriais. Os efeitos da topografia sobre o comportamento celular varia com o tipo de célula: os fibroblastos aderem a superfícies polidas enquanto que os osteoblastos apresentam adesão preferencial a superfícies mais rugosas. As variações de dimensão da microestrutura da superfície e a sua orientação influenciam a adesão, morfologia, proliferação e diferenciação celular. Determinam por isso o sucesso ou insucesso a longo prazo. Kasemo e Lausmaa teorizaram que micro – irregularidades (ou microporos) na superfície dos implantes com dimensão inferior a 100 μm , mas acima do nanómetro poderiam influenciar a resposta biológica na interface osso-implante, porque apresentariam dimensões semelhantes às células e às biomoléculas maiores; para além disso as micro-irregularidades de 100 μm e maiores participariam também na retenção micro-mecânica e na transferência de tensões na interface osso-implante (Wieland et al. 2001; Mazor & Cohen 2003). A observação efectuada por Gotfredsen (Gotfredsen et al. 1991), onde os implantes jateados por plasma de Ti suportavam um crescimento ósseo mais rápido e maior do que os implantes de cp Ti maquinados, foi mais tarde reiterada pela observação de maior formação óssea e mais rápida também sobre uma superfície com rugosidade sub-micrométrica, preparada por jateamento e ataque ácido. Estas observações indicaram que a superfície do cp Ti poderia ser modificada para favorecer a deposição óssea, podendo ter um papel regulador da atividade celular e assim condicionar as respostas tecidulares (Mendonça et al. 2008). Este facto ficou bem evidenciado com os trabalhos de Zhao (Zhao et al. 2006) com cultura de células osteoblásticas MG63 sobre substratos de cp Ti com diferentes topografias. A rugosidade sub-micrométrica influenciou a atividade das células MG63 na secreção de Osteocalcina, PGE2 e TGF- β 1, confirmando o papel da micro-rugosidade na diferenciação osteoblástica e a importância das variações topográficas da superfície. Também a revisão sistemática de Shalabi (Shalabi et al. 2006) suporta a relação positiva entre o contacto osso-implante (BIC) e a rugosidade da superfície; quase todos os artigos analisados mostraram existir um aumento do BIC e dos valores da força dos testes de remoção do implante (RTV) com um aumento da rugosidade da superfície. Um valor ideal para a micro-rugosidade não pode ser estabelecido, mas as superfícies moderadamente rugosas

– com Sa compreendido entre 1,0 e 2,0 μm e Sdr de 50% – proporcionam respostas ósseas melhores que as superfícies mais lisas e mais rugosas (Albrektsson & Wennerberg 2004b). Os mecanismos envolvidos nesta otimização da resposta óssea não estão totalmente esclarecidos. As razões para o insucesso das superfícies mais lisas podem ser puramente mecânicas, porque há uma fricção demasiado baixa para proporcionar adequada retenção. Mas também pode dever-se a um achatamento (alongamento) demasiado das células que impeça a chegada de nutrientes. Também o insucesso das superfícies mais rugosas pode ser explicado pelo facto de que uma superfície tão rugosa seja percebida pelas células como uma superfície lisa devido à distância entre picos, o que também proporciona baixa retenção por contacto ósseo apenas nos picos e, por isso, baixa estabilidade (Wennerberg & Albrektsson 2009).

Três linhas de pensamento tentam melhor interpretar e explicar como a topografia sub-micrométrica da superfície pode aumentar o contacto osso-implante. A teoria biomecânica de Hansson (Hansson & Norton 1999) descreve a interação teórica do osso com a superfície do implante e define matematicamente o papel da rugosidade dentro deste modelo. O resultado é que a superfície deveria estar coberta por poros (“pits”) de aproximadamente 1,5 μm de profundidade e 3-5 μm de diâmetro. Assim, proporcionaria uma retenção micro-mecânica essencial para melhorar o desempenho dos implantes, equilibrando a adaptação óssea face às cargas mecânicas funcionais e ativaria os osteócitos como mecanorreceptores. Por seu lado, Davies (Davies 2003) descreve o papel da rugosidade sub-micrométrica da superfície na estabilização do coágulo de fibrina e assim melhora a osteointegração. A retenção física (mecânica) das fibras de fibrina nas microretenções da superfície promove o crescimento dirigido das células osteoblásticas diretamente na interface osso/implante. O relevo topográfico ajuda também a estabilizar a frágil matriz extracelular formada e conduzir as células em direção à superfície (orientação por contacto e osteogénese de contacto). A terceira teoria envolve os mecanismos de sinalização celular pela superfície (Brunette 1988; Puleo & Nanci 1999; Schwartz et al. 1999) através do controlo de muitas funções celulares, nomeadamente as que controlam a diferenciação celular e a síntese de matriz extracelular. Alterações da forma celular condicionadas pela topografia da superfície podem alterar a ativação dos receptores para as proteínas da matriz extracelular (integrinas) e alterar a diferenciação celular.

Desenvolvimentos recentes indiciam uma potencial melhoria da osteointegração, não só pelas superfícies apresentarem uma microrugosidade definida, mas também pela presença de nanoestruturas. No estudo *in vitro* conduzido por Gutwein (Gutwein & Webster 2004) foi investigada a viabilidade e densidade de células osteoblásticas em cultura na presença de nanopartículas comparativamente à de partículas convencionais de alumina e titânia por um período até 6 horas. Os resultados demonstraram que as células se apresentavam melhor estendidas, com melhor morfologia e mais viáveis na presença de nanopartículas de alumina ou titânia. Também se demonstrou que as nanopartículas (< 100 μm) apresentavam uma topografia que seletivamente favorece a diferenciação osteoblástica e aumenta a deposição de precipitados de cálcio. No mesmo sentido Webster (Webster & Ejiófor 2004) evidenciou a melhoria de adesão de células osteoblásticas em presença de nanopartículas, quando comparada com a adesão a metais convencionais. As células aderiam preferencialmente nos limites/interfaces das nanopartículas, assim como o faziam no limite/interface das partículas convencionais; como mais limites/interfaces ocorrem para as nanopartículas, mais células aderem a estas superfícies. Como a adesão das células osteoblásticas é um pré-requisito para as subsequentes etapas da osteointegração, as superfícies com nanopartículas devem favorecer a integração óssea dos implantes.

No estudo de Mendes (Mendes et al. 2007) a deposição discreta cristalina (DCD) de nanocristais de fosfato de cálcio melhorou a integração de placas de cp Ti quando implantadas no fémur de rato. A força de disrupção da placa foi significativamente superior para as amostras com DCD, concluindo os autores que a melhoria na adesão óssea se ficou a dever ao aumento de complexidade estrutural (nanorugosidade) mais do que à alteração química.

A influência do padrão nanotopográfico da adesão e morfologia de células osteoblásticas ficou evidenciado no estudo de Puckett (Puckett et al. 2008). Foram usados substratos de cp Ti com padrões nano e microtopográficos criados por uma técnica de evaporação de feixe de electrões (electron beam evaporation), sobre os quais se cultivaram células osteoblásticas. Os resultados mostraram uma adesão e alinhamento mais rápidos nas zonas de nanotopografia, preferindo as zonas com padrão nanotopográfico de 80 μm , mostrando existir uma topografia preferencial. Os resultados *in vitro* foram também confirmados *in vivo*. O problema experimental é que quando as superfícies são alteradas por diferentes técnicas, a microrugosidade altera-se em simultâneo com a nanorugosidade.

Meirelles (Meirelles et al. 2007) desenvolveu um modelo em que através de electropolimento de um implante cilíndrico conseguiu remover todas as irregularidades micrométricas ficando apenas com a nanorugosidade, podendo assim investigar a influência de apenas este parâmetro. O implante teste precisou de estabilização externa para fixação de forma a que não ocorressem micromovimentos durante a osteointegração impeditivos da cicatrização óssea. Num primeiro estudo mostrou-se que os implantes revestidos com hidroxiapatite (HA) nanométrica proporcionavam maior resposta óssea do que os implantes polidos (controlo). Como esse facto poderia advir da nanorugosidade ou da alteração química, realizou-se uma segunda experiência (Meirelles et al. 2008) com a introdução também de nanopartículas de Ti; como estes implantes mostraram melhor resposta que os implantes de nanopartículas de HA, a hipótese química foi excluída. Provavelmente a existência de mais sítios para ligação das proteínas extracelulares – que inicialmente aderem à superfície e que depois governarão a subsequente resposta celular – explicará o melhor desempenho. A ocorrência destas nanoestruturas foi também detetada em implantes em uso clínico atual. Wennerberg (Wennerberg et al. 2012) investigou a evolução de nanoestruturas na superfície cp Ti SLActive® e TiZr SLActive®, em função do tempo e condições de armazenamento, da dependência do material de armazenamento e em que etapa da reorganização da superfície ocorreria a sua formação. No final de 2 semanas de armazenamento, a formação e evolução das nanoestruturas estavam completas mesmo quando as superfícies eram armazenadas em água; as nanoestruturas formadas na superfície TiZr apresentavam morfologia e distribuição diferente e em número menor. Concluiu que o processo de ataque ácido para modificação da superfície e o armazenamento eram responsáveis pela reorganização da camada mais externa de óxido de titânio, numa camada bem definida repleta de nanoestruturas. A influência destas nanoestruturas e da molhabilidade da superfície SLActive na osteointegração foi avaliada *in vivo* por um estudo biomecânico em tibia de coelho (Wennerberg et al. 2013). Discos com combinações de molhabilidade e nanoestruturas, que apresentassem a mesma composição e microrugosidade, foram implantados na tibia de coelho e após 4 e 8 semanas de cicatrização foram sujeitos ao teste de remoção (pull-out test). As superfícies hidrofóbicas apresentavam maior contaminação por carbono; para os tempos observados a melhor resposta óssea (maior valor da força de remoção) foi sempre obtida pela combinação molhabilidade-nanoestruturas (SLActive). A presença de remanescentes ósseos na superfície das amostras com maior valor da força de remoção revela que por vezes a fratura ocorreu não na interface, mas sim no interior do osso, traduzindo o efeito sinérgico entre a hidrofília da superfície e a presença de nanoestruturas.

1.4. Molhabilidade

As propriedades da superfície dos implantes são determinantes no processo de cicatrização óssea. Propriedades das superfícies dos materiais como a composição química, a energia superficial, a topografia (macro, micro e nano) e a molhabilidade condicionam, com um valor indeterminado, as etapas iniciais da cascata de eventos que ocorre na interface biomaterial/hospedeiro e que de forma significativa determinarão a integração do biomaterial.

A forma mais comum de avaliar a molhabilidade de uma superfície é através do ângulo de contacto que ela forma. A molhabilidade é diretamente influenciada pela rugosidade e pela composição química da superfície; a energia superficial na interface sólido/ar é a expressão da química da superfície quando considerada plana. O ângulo de contacto de uma superfície plana é determinado pelas energias interfaciais sólido/líquido, líquido/ar e sólido/ar que atuam na linha de contacto e estabelecem o equilíbrio (Figura 1.8); por isso, a molhabilidade é influenciada pelo estado energético da superfície (Rupp et al. 2011).

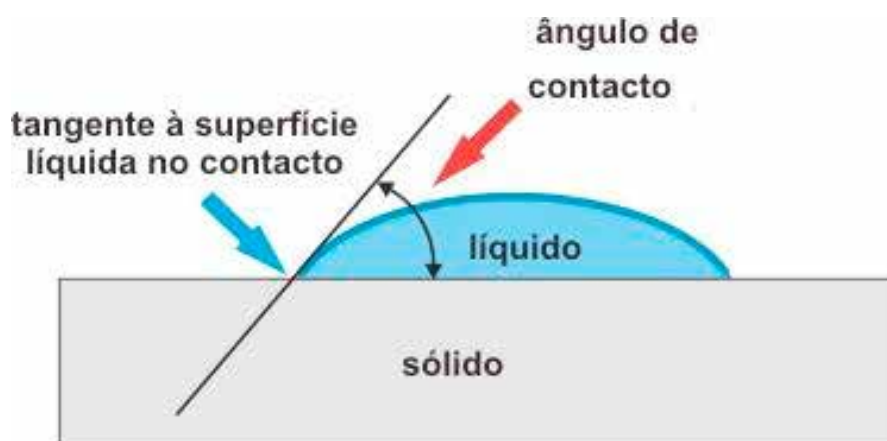


Figura 1.8 – Ângulo de contacto.

Da mesma forma uma superfície rugosa perturba drasticamente o equilíbrio da gota formada na superfície: o ângulo de contacto resultante é um ângulo de contacto aparente, metaestável, que mede a hidrofília de uma superfície rugosa não ideal. A medição do ângulo de contacto através da técnica da gota séssil é uma

das técnicas mais comuns: uma gota de um determinado líquido, habitualmente 1 gota de água com 1-5ml, é colocada na superfície e o ângulo que a tangente à gota no limite da interface tripla sólido/líquido/ar faz com a linha horizontal da superfície sólida é o ângulo de contacto θ . A gota é observada com uma lente ampliadora e o ângulo é medido com um goniômetro.

As superfícies com ângulo de contacto $< 90^\circ$ são hidrófilas; para ângulos de contacto quase 0° as superfícies são ditas superhidrófilas; superfícies com ângulos de contacto $> 90^\circ$ são designadas hidrófobas e para ângulos de contacto $> 150^\circ$ são ditas superhidrófobas.

A técnica da gota séssil permite efetuar medições estáticas ou dinâmicas fazendo variar respetivamente a interface da gota por movimento imprimido à base e a variação do volume da gota. A alternativa para medir o ângulo de contacto dinâmico, de uma forma considerada mais precisa e menos subjetiva, é o método da placa tensiométrica de Wilhelmy: este método usa medições de força, adquiridas pela imersão e emersão de uma amostra de geometria conhecida fixada a uma electro-balança num dado líquido, para calcular o ângulo de contacto (Rupp et al. 2014; Gittens et al. 2014). Num estudo realizado para avaliar, com a técnica do tensiometro de Wilhelmy, a molhabilidade de implantes de cp Ti comercializados atualmente, Rupp (Rupp et al. 2011) encontrou uma gama completa de valores para o ângulo de contacto dos diferentes implantes, desde os completamente hidrófilos/superhidrófilos até aos hidrófobos e virtualmente sem molhabilidade. Contudo, verificou-se durante os testes que após a primeira imersão a generalidade dos implantes adquiria completa molhabilidade, o que seria explicado pela histerese de re-hidratação. Três dos nove implantes analisados foram considerados como hidrófilos. Concluiu-se que o impacto da hidrofília da superfície dos implantes nos resultados clínicos não está completamente esclarecido, havendo resultados clínicos positivos para os diferentes sistemas.

Baseado no conhecimento atual, é sugerida uma cadeia de reações interfaciais inicial diferente para os implantes hidrófilos relativamente aos implantes hidrófobos; nos hidrófilos passa pelo condicionamento rápido da superfície com proteínas plasmáticas e formação do coágulo. De facto, o estudo de Kohavi (Kohavi et al. 2012) confirma o papel da molhabilidade da superfície na adsorção de proteínas plasmáticas na superfície dos implantes. No estudo que conduziu, avaliou-se também o papel da forças electrostáticas na adsorção das proteínas usando Ca e Mg, para controlo das cargas da energia de superfície. Os resultados indicaram que a adsorção de albumina era favorecida pela molhabilidade (hidrofília), pela presença de Ca e Mg (cargas positivas) e pela rugosidade da superfície, enquanto que a adsorção de fibronectina foi favorecida pela molhabilidade e pela rugosidade. Por isso, concluiu-se que para além da molhabilidade outros factores participam na velocidade e quantidade de proteínas adsorvidas, podendo a molhabilidade atuar como seletor e catalisador nesta interação.

Num estudo *in vitro* de longa duração Klein (Klein, Bijelic, et al. 2010a) avaliou o efeito de diferentes características da superfície na diferenciação de células osteoblásticas, tendo confirmado a topografia (micro e nano) e a hidrofília com efeito positivo de longa duração no favorecimento da diferenciação celular. Outros autores investigaram o efeito da hidrofília foto induzida na resposta celular *in vitro* e formação óssea *in vivo*. Sawase (Sawase et al. 2008) e Hirakawa (Hirakawa et al. 2012) induziram hidrofília na anatase da camada cristalina de óxido de titânio com luz UV por um período de 24 horas e avaliaram o seu efeito na viabilização celular e osteointegração em tibia de coelho e mandíbula de cão, respetivamente. Ambos os autores confirmaram que a hidrofília das superfícies testadas melhorava a resposta celular e acelerava a formação óssea. Wennerberg (Wennerberg et al. 2013) e Park (J.-W. Park et al. 2012) analisaram a resposta óssea em superfícies superhidrófilas SLActive em modelo de estudo animal em coelhos tendo ambos concluído existir um papel importante da hidrofília no favorecimento da rápida formação óssea, mas que como coadjuvante de outras propriedades da superfície como a nanotopografia e composição química, respetivamente.

Os estudos *in vitro* confirmam a inter-relação das propriedades da superfície dos materiais, nomeadamente rugosidade, composição química e molhabilidade e confirmam também que os resultados surgem de um equilíbrio, sem uma fronteira clara, entre os diversos factores.

I.5. Tratamentos de superfície

A tecnologia dos biomateriais deve ter por objetivo primordial usar a capacidade inigualável dos sistemas biológicos para responder às características da superfície dos materiais e dirigi-la para uma recuperação biofuncional otimizada.

Um número crescente de modificações de superfície tem sido introduzido, apesar de não ser completamente claro a superioridade de uma em relação a outra: a modificação de um parâmetro provoca também alterações em outros parâmetros, o que nem sempre é devidamente avaliado e validado.

As modificações da superfície, em função da escala das características que se alteram, podem dividir-se em macro, micro e nano topográficas. A macro topografia é definida como os aspetos do implante na escala de milímetros a 10 mm; está diretamente relacionada com a geometria do implante, com as suas espiras e macroporos. A forma do implante, depois dos implantes cilíndricos e ocos, foi otimizada e estabelecida há muito tempo e partilha uma forma mais ou menos comum. O objetivo desta macroforma é garantir alguma estabilidade inicial, que a superfície se apresente de forma estabilizada às células osteoblásticas e que, após a formação óssea, possa contribuir para minimizar as cargas e estabilizar a remodelação óssea (Hansson & Norton 1999; Hansson 2003; Shi et al. 2007). Recentemente foram publicados dois estudos por Chowdhary (Chowdhary et al. 2011; Chowdhary et al. 2013) que analisaram a alteração das macro-espiras e introdução de micro-espiras entre as espiras principais na estabilidade primária, secundária e o eventual efeito estimulador ósseo. Concluíram que a introdução de micro-espiras entre espiras principais pode melhorar a resposta óssea, principalmente em osso de menor qualidade biomecânica. A micro topografia refere-se às características dos implantes na ordem de grandeza de 1-10 μm . As superfícies moderadamente rugosas apresentam melhor e mais rápida osteointegração (Albrektsson & Wennerberg 2004b) que as superfícies mais lisas; contudo, uma rugosidade ideal não está determinada e os estudos referem valores entre 1-10 μm (Bauer et al. 2013). A nano topografia tem ganho recentemente um crescente destaque na osteointegração, sendo-lhe atribuído um papel importante na adsorção de proteínas e adesão das células osteoblásticas; não é conhecida qual a nano rugosidade ideal (Brett et al. 2004; Le Guéhennec et al. 2007).

Não existe uma classificação sistemática para os tratamentos de modificação da superfície, mas podemos agrupar os diferentes tratamentos em modificações da micro rugosidade e modificações da nano rugosidade.

1.5.1. Tratamentos para modificação da micro rugosidade

1.5.1.1. Jateamento

O jateamento consiste no uso de partículas abrasivas duras que são projetadas contra outro material sob elevada pressão de ar para polir, remover contaminantes ou criar rugosidade na superfície. A rugosidade pode ser controlada pelo tamanho da partícula usada, pressão e tempo de jateamento. As partículas usadas devem ser quimicamente estáveis e biocompatíveis, sendo normalmente usadas partículas de alumina, de titania ou de um material reabsorvível – hidroxiapatite ou fosfato tricálcico (Le Guéhennec et al. 2007; Wennerberg & Albrektsson 2009; Bauer et al. 2013; Bressan et al. 2013).

A produção de superfícies rugosas com este tratamento de superfície subtrativo conduz ao aumento de rugosidade da superfície. No estudo conduzido por Wennerberg (Wennerberg et al. 1995) foram usados implantes com 3 superfícies diferentes e inseridos na tíbia de coelho. Após 12 semanas de cicatrização, o torque de remoção dos implantes foi significativamente mais elevado para os implantes que tinham sido jateados com partículas de 25 μm de titânia e os implantes jateados com partículas de 75 μm de alumina do que os implantes com superfície maquinada. Os implantes jateados apresentavam uma rugosidade entre 0,9-1,3 μm como uma distribuição isotrópica da rugosidade contrariamente aos maquinados que tinham rugosidade de 0,4 μm e uma orientação clara da rugosidade. No estudo conduzido pelo mesmo autor (Wennerberg et al. 1997) com 1 ano de seguimento de implantes, com o mesmo modelo animal, apenas com a modificação para a partícula de jateamento de alumina e para 250 μm em vez de 75 μm , continuou a encontrar maior fixação para ambos os implantes jateados. A quantidade de Ti libertada para os tecidos foi a mesma para todas as superfícies, como publicado num estudo pelo mesmo autor mais tarde (Wennerberg et al. 2004) o que não suporta a hipótese de ser a libertação de partículas de Ti a razão para a menor integração dos implantes rugosos. A alumina também é frequentemente usada como partícula de jateamento, contudo algumas partículas ficam aprisionadas na superfície do implante e permanecem mesmo após limpeza ultra-sónica; como é um material resistente aos ácidos é difícil de remover e pode criar heterogeneidade na superfície e diminuir a osteointegração (Le Guéhennec et al. 2007; Bauer et al. 2013). Uma terceira alternativa consiste em usar um material de jateamento biocompatível, osteocondutivo e reabsorvível, normalmente um fosfato de cálcio como a hidroxiapatite ou o b-fosfato tricálcico: ao serem reabsorvíveis deixam a superfície limpa e texturada (Le Guéhennec et al. 2007). Mazar (Mazar & Cohen 2003) comparou o desempenho e caracterizou a superfície dos implantes MTX[®] (jateado com partículas de hidroxiapatite), Osseotite[®] (ataque ácido duplo) e SLA (jateada e ataque ácido). A rugosidade Ra era 0,76 μm para MTX[®], 0,80 μm para Osseotite[®] e 2,10 μm para SLA. Os implantes MTX[®] após 48 meses de função, como suporte de restaurações unitárias, apresentaram uma taxa de sucesso 100% com uma perda óssea marginal média inferior a 1 mm; não foi efetuada comparação com os outros dois implantes.

1.5.1.2. Ataque ácido

O cp Ti e as suas ligas podem ser largamente estruturados através do ataque ácido da sua superfície. O Ti é muito resistente à corrosão, contudo alguns ácidos fortes são capazes de produzir decação (“etching”) da superfície – remoção de uma pequena quantidade de material para criar microporos e fissuras com dimensões de 0,5-2 μm . Existe uma diversidade de combinações de ácidos para ataque da superfície do Ti, mas habitualmente são usados HCl, HNO₃, H₂SO₄ e em particular o HF (Le Guéhennec et al. 2007; Wennerberg &

Albrektsson 2009; Bauer et al. 2013). O ataque ácido aumenta a área da superfície e transforma uma superfície anisotrópica em isotrópica (Wennerberg & Albrektsson 2009).

É possível obter diferentes rugosidades com esta técnica subtrativa de tratamento da superfície combinando diferentes ácidos e tempos de aplicação. Att (Att et al. 2007) comparou os procedimentos de ataque ácido de uma e duas etapas e obteve uma rugosidade Ra de 0,9 μm para ataque ácido de uma etapa e 0,6 μm para o procedimento de duas etapas. Contudo isso não resultou em qualquer diferença nos testes de tração “push-out” bem como em qualquer diferença na atividade das células osteoblásticas. A imersão de implantes de cp Ti por alguns minutos numa mistura concentrada de HCl e H₂SO₄ aquecida acima de 100°C (duplo ataque ácido – “dual acid-etching” – DAE) produz uma superfície micro rugosa. Esta superfície foi estudada em animais e avaliada em estudos clínicos. Klokkevold (Klokkevold et al. 1997) comparou a força do torque de remoção de implantes cp Ti DAE com implantes cp Ti maquinados após 2 meses de cicatrização. O valor da força do torque de remoção foi significativamente superior para os implantes cp Ti DAE, traduzindo assim a melhoria na osteointegração. A superfície de implantes de cp Ti com DAE favorecem os processos osteocondutivos através da estabilização do coágulo de fibrina e favorecendo a osteocondução das células osteoblásticas para a superfície do implante, o que resulta na formação óssea direta sobre o implante – osteogênese de contacto (J.Y. Park & Davies 2000; Davies 2003). Os implantes cp Ti DAE (Ra 0,7 μm) foram comparados histologicamente com implantes cp Ti maquinados (Ra 0,5 μm), implantes cp Ti revestidos com HA (Ra 9 μm) e implantes TPS (Titanium Plasma Sprayed) (Ra 10 μm) após 1-8 semanas de cicatrização em modelo de coelho. Neste estudo London (London et al. 2002) registou-se uma percentagem de contacto ósseo significativamente maior para os implantes DAE, não havendo diferença entre os outros implantes, mesmo com um Ra 10 μm que não parece adequado para osteointegração. Clinicamente o resultado do estudo multicêntrico prospetivo de implantes Osseotite® (cp Ti DAE) em pacientes parcialmente desdentados posteriores, ao final de 3 anos, apresentou uma taxa de sobrevivência de 98,9% para a mandíbula e 100% para o maxilar, comprovando a efetividade clínica mesmo com um protocolo de carga aos 2 meses não recomendado para a data (Testori et al. 2002).

1.5.1.3. Jateamento e ataque ácido

É muito comum o ataque ácido ser efetuado após a etapa de jateamento para remover restos do material de jateamento e zonas da superfície danificada pelo jateamento, mas ao mesmo tempo para redefinir as características da rugosidade. Misturas mais agressivas de ácidos condicionam uma superfície com distribuição mais fina da rugosidade, enquanto que misturas de ácidos menos agressivas produzem um decapamento mais superficial. Contudo, após o jateamento a reatividade da superfície em relação aos ácidos é diferente e por isso grandes modificações da superfície podem ocorrer (Wennerberg & Albrektsson 2009; Bauer et al. 2013).

A superfície é jateada com partículas de titânia com diâmetro médio de 25 μm para criar uma superfície rugosa com Ra 1,12 μm ; depois as superfícies são mantidas a temperatura e pH constante e atacadas com um enxaguamento contínuo com ácido hidrófluorídrico (HF). Isto resulta na diminuição da rugosidade para Ra de 0,91 μm e a incorporação de flúor na superfície cerca de 0,5-3% atómico (Isa et al. 2006). Outros autores referem uma rugosidade inicial após jateamento com Ra 1,5 μm e a rugosidade final após ataque com HF também superior com Ra 1,3 μm , para além de uma fixação de flúor na ordem 1,0% atómico; como resultado deste tratamento é também referida a presença de nanoestruturas com cerca de 100 nm de diâmetro na superfície dos implantes, sobrepondo uma nano rugosidade a uma superfície micro rugosa (Mendonça et al. 2008; Monjo et al. 2008; Valencia et al. 2009).

Os estudos *in vitro* indicam que esta modificação da superfície proporciona uma melhor proliferação e diferenciação celular (Isa et al. 2006), atuando sobre a expressão genética dos mediadores da inflamação e reabsorção/formação óssea (Monjo et al. 2008), sendo por isso fortemente osteoindutora e osteocondutora para as células mesenquimatosas pluripotentes aderentes (Valencia et al. 2009). Também *in vivo* esta modificação de superfície parece favorecer a osteointegração. Berglundh (Berglundh et al. 2007) e Abrahamsson (Abrahamsson et al. 2008) avaliaram o desempenho de implantes com superfície jateada com titânia e atacada com flúor (Osseospeed®) e implantes com superfície apenas jateada com titânia (Tioblast®), respectivamente durante as etapas iniciais da osteointegração e em defeitos peri-implantares, em modelo de cão. A percentagem de contacto osso-implante nas análises histológicas efetuadas foram sempre superiores, em todos os tempos observados, para a superfície Osseospeed, o que levou ambos os autores a concluir que esta superfície favorecia a formação óssea e a osteointegração. Clinicamente o desempenho dos implantes de ambas as superfícies (Tioblast® e Osseospeed®) tem sido igualmente positivo, com taxas de sucesso e sobrevivência a 3 anos entre os 99,5% e os 100% (Albrektsson & Wennerberg 2004a; Collaert et al. 2011).

A combinação de etapas de jateamento e ataque ácido consegue produzir hipoteticamente uma rugosidade ótima para a fixação micro-mecânica. Para uma rugosidade mais fina e de elevada frequência para adsorção de proteínas será com a combinação de procedimentos de jateamento com os procedimentos de decapamento por ataque ácido. Esta topografia de diferentes escalas na mesma superfície é o resultado do jateamento com partículas de alumina de grande dimensão (250-500 µm), seguido de ataque ácido a quente com mistura de HCl/H₂SO₄. Esta superfície designada SLA® (Sandblasted Large grit Acid etched) apresenta por isso dois níveis de rugosidade sobrepostos, um mais largo com 20-40 µm de pico a pico e resultante do jateamento, e um segundo nível com 2-4 µm resultante do decapamento com ataque ácido (Cochran et al. 1996; Cochran et al. 1998; Wennerberg & Albrektsson 2009); a rugosidade resultante da combinação destes processos é um Ra de 2-2,18 µm (Buser et al. 1998; Li et al. 2002). A comparação *in vivo* em modelo de cão entre os implantes com superfície SLA e implantes de cp Ti com superfície TPS® (Titanium Plasma-Sprayed) até 15 meses de carga foi efetuada em dois estudos de Cochran (Cochran et al. 1996; Cochran et al. 1998). No primeiro estudo a avaliação foi feita através da medição de parâmetros radiográficos com e sem carga; no segundo a avaliação foi efetuada por análise e avaliação do contacto osso-implante (BIC) após carga. Em ambos os estudos os parâmetros foram consistentemente favoráveis aos implantes com superfície SLA, proporcionando uma osteointegração melhor e mais rápida. Também Buser (Buser et al. 1998) e Li (Li et al. 2002) compararam a superfície SLA, respectivamente, com implantes com superfície com duplo ataque ácido e com implantes de superfície maquinada, por comparação dos valores do torque de remoção (RTV) dos implantes em modelo animal com porco anão.

Clinicamente o estudo de Bornstein (Bornstein et al. 2005) em pacientes parcialmente desdentados posteriores com um protocolo de carga antecipada às 6 semanas demonstrou, após 5 anos de seguimento, uma taxa de sucesso de 99%, o que permitiu concluir que os implantes com superfície SLA podem conseguir e manter uma integração tecidual com elevada previsibilidade. Também Albrektsson (Albrektsson & Wennerberg 2004a) refere uma taxa de sucesso de implantes com superfície SLA® de 98% após um período de seguimento de 3 anos. O processo de ataque ácido pode criar uma camada de hidreto de titânio na superfície para além do dióxido de titânio. Perrin (Perrin et al. 2002) investigou a superfície SLA com e sem esta camada de hidreto de titânio num modelo animal com porco anão. A análise do contacto osso-implante sem hidreto de titânio foi 82% e com hidreto de titânio 75% o que levou o autor a concluir pela influência da topografia – e não da composição química da superfície – nos bons resultados. Com o objetivo de melhorar a superfície SLA uma mudança foi introduzida na molhabilidade da superfície: passou de um comportamento hidrófobo com um ângulo de contacto 138,3 ° para um comportamento superhidrófilo com um ângulo de contacto 0 ° (Buser et

al. 2004). A alteração da superfície não representa a mudança de nenhuma das etapas do procedimento anterior. Apenas as etapas de limpeza com ácido nítrico no final do ataque ácido e a lavagem em água desionizada são agora efetuadas sob atmosfera de nitrogénio para impedir a contaminação da superfície, os implantes são posteriormente lavados em solução 0,9% de NaCl e armazenadas em solução 0,9% de NaCl com pH 4-6; por isso, também não são reportadas alterações da rugosidade da superfície, SLA Sa 1,15 μm e modSLA 1,16 μm (Buser et al. 2004; Mamalis & Silvestros 2010; Wennerberg et al. 2012). Esta superfície é designada por SLActive® para a diferenciar da sua antecessora com as mesmas características micro topográficas, mas sem a alteração da molhabilidade. Esta superfície tem sido analisada *in vitro*, *in vivo* e clinicamente. Os estudos *in vitro* de Mamalis (Mamalis & Silvestros 2010) e Bang (Bang et al. 2013) avaliam a influência da superfície SLActive® na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas comparativamente à superfície SLA®. A superfície modificada SLActive® contribui para uma melhor e mais controlada proliferação celular ao mesmo tempo que promove uma mais rápida diferenciação celular, verificando-se ainda um efeito anti-osteoclástico que poderá contribuir para a estabilização óssea a longo prazo.

Os estudos animais baseados em análise histomorfométrica conduzidos por Buser (Buser et al. 2004) e Lai (Lai et al. 2009) confirmam os efeitos observados *in vitro*. Em modelos animais distintos, porco anão e cão respetivamente, a percentagem de contacto osso-implante foi significativamente mais elevada às 2 e 4 semanas em ambos os estudos para a superfície SLActive®, não tendo contudo ocorrido diferença significativa às 8 semanas em ambos os estudos. Os resultados sobreponíveis confirmam assim a promoção de uma osteointegração melhor e mais rápida nos estádios iniciais da formação óssea. Os estudos clínicos de Ganeles (Ganeles et al. 2008) e de Morton (Morton et al. 2010) em protocolos de carga imediata e antecipada de implantes SLActive®, no sector posterior da mandíbula e maxilar de pacientes desdentados parciais referem taxas de sucesso de 98% um ano após a carga e 97% após 2 anos, respetivamente. Mais recentemente foi detetada a presença de nanoestruturas na superfície de implantes com superfície SLActive® (ver página 27), que assim para além da micro topografia com dois níveis de rugosidade, da hidrofília da superfície apresentaria mais um nível de estruturação da superfície com a introdução de nano rugosidade (Wennerberg et al. 2012). Foi referido ser o processo de ataque ácido para modificação da superfície e o armazenamento os responsáveis pela reorganização da camada mais externa de óxido de titânio numa camada bem definida repleta de nanoestruturas. A influência destas nanoestruturas e da molhabilidade na osteointegração foi avaliada *in vivo* por um estudo biomecânico em tibia de coelho (Wennerberg et al. 2013). Usando discos com combinações de molhabilidade e nanoestruturas, mas com a mesma composição e microrugosidade, as superfícies hidrofóbicas apresentavam maior contaminação por carbono; para os tempos observados a melhor resposta óssea (maior valor da força de remoção) foi sempre obtida pela combinação molhabilidade-nanoestruturas (SLActive®). A presença de remanescentes ósseos na superfície das amostras com maior valor da força de remoção revela que por vezes a fratura ocorreu não na interface, mas sim no interior do osso, traduzindo o efeito sinérgico entre a hidrofília da superfície e a presença de nanoestruturas.

1.5.1.4. Anodização ou Oxidação anódica

A camada nativa de óxido dos implantes de cpTi pode ser aumentada através de um tratamento térmico ou com o implante na posição de ânodo de uma célula galvânica, com um electrólito adequado após passagem de corrente. Este procedimento de anodização galvânica utiliza ácidos fortes em solução (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF) sob elevada densidade de corrente (200 A/m^2) ou potencial ($>100 \text{ V}$). O resultado é o aumento de espessura da camada de óxidos da sua dimensão nativa 7-10 nm para mais de 1000 nm. Uma camada tão espessa oferece maior proteção contra a corrosão e quase que suprime a possibilidade de exposição de

elementos que eventualmente existam nas ligas de Ti. A anodização acima de 100V de potencial pode ser tão intensa que a espessura do óxido não possa crescer mais, mas atinge o seu ponto dielétrico ou limite de quebra. O óxido deixa de ser resistente e passa a ser condutor deixando passar a corrente através da camada de óxido; como resultado, nestes pontos aumenta a evolução do gás – do oxigênio na solução – e faíscas podem ser observadas. Este tipo de anodização a elevada voltagem é frequentemente designada por anodização por faísca ou oxidação de micro-arco. Nos locais de faísca/ignição forma-se um óxido cristalino irregular e passado algum tempo toda a superfície começa a mostrar pontos de faísca/ignição originando uma camada de óxido porosa irregular. Normalmente esta camada é muito dura, resistente à fratura e ao desgaste. O processo de anodização é bastante complexo, e depende de muitos parâmetros tais como: a densidade de corrente, a concentração da solução de ácidos, a composição e temperatura do electrólito (Le Guéhennec et al. 2007; Wennerberg & Albrektsson 2009; Bauer et al. 2013).

A caracterização detalhada da superfície de óxido produzida por anodização e a otimização das propriedades que favorecessem a formação óssea foi realizada por Sul (Sul et al. 2005) usando um modelo animal de coelho. Foram usados implantes com diferentes características da camada de óxidos, com espessura de 1000-5800 nm, diâmetro dos poros $< 0,5 \mu\text{m}$ a $< 0,3 \mu\text{m}$, e rugosidade média S_a de 0,68-098 μm . Após 6 semanas de cicatrização os animais foram sacrificados para proceder ao teste biomecânico de torque de remoção (RTV) e assim avaliar a resposta óssea. Concluiu-se que as propriedades químicas da superfície influenciam a resposta óssea e, em função dos materiais testados, a superfície devia apresentar 9% atômico de Mg, uma espessura de 1000-5000 nm, porosidade cerca 24%, rugosidade S_a 0,8 μm e com uma estrutura cristalina mista de anatase e rutilo. Já anteriormente Sul (Sul, Johansson & Albrektsson 2002a) e Ivanoff (Ivanoff et al. 2003) tinham determinado a importância da composição química da superfície anodizada na melhoria da resposta óssea em humanos e em modelo animal (Sul, Johansson, Kang, et al. 2002b). A caracterização detalhada da interface estabelecida entre implantes com superfície anodizada e o osso foi efetuada por Schupbach (Schupbach et al. 2005) em implantes clinicamente recuperados de humanos e após osteointegração e função. Ficou evidenciada a formação e crescimento ósseos para dentro dos poros da superfície anodizada, estabelecendo uma forte interligação e retenção. Sul (Sul et al. 2008) caracterizou os implantes de superfície anodizada usados clinicamente. Os implantes caracterizados, um implante anodizado enriquecido com Mg e o outro um implante anodizado sem alteração química – a superfície TiUnite® – apresentaram, respetivamente: 9% atômico de Mg e 11% atômico de P; morfologia da superfície com estrutura dupla de óxidos, isto é, com uma barreira interna densa sem poros e uma camada porosa externa; diâmetro dos poros $< 2 \mu\text{m}$ - $< 1,5 \mu\text{m}$ e $< 4 \mu\text{m}$ - $< 10 \mu\text{m}$; espessura homogênea da camada de óxido com 3,4 μm e uma espessura variável ao longo do implantes com 1 μm na zona cervical, que aumentava progressivamente até 10 μm em apical; estrutura cristalina mista de anatase e rutilo; rugosidade S_a de 0,69 μm e S_a de 1,35 μm . Clinicamente as taxas de sucesso e sobrevivência elevadas são reportadas para ambos os implantes. Para os implantes TiUnite, Albrektsson (Albrektsson & Wennerberg 2004a) refere 4 estudos com uma taxa de sobrevivência cumulativa de 96,8% após um ano de função. Por seu lado, Pang (Pang et al. 2012) refere 100% de taxa de sucesso para os implantes de superfície anodizada com Mg após 15 meses de função, num estudo clínico randomizado duplamente cego e reabilitações unitárias no sector posterior em carga diferida.

1.5.1.5. Projeção de plasma – “Plasma-Spraying”

A projeção de plasma é uma versão da projeção térmica; é uma técnica usada para a produção de revestimentos através da injeção partículas/pós de Ti para uma fonte de plasma a elevada temperatura, as quais são projetadas na superfície do implante onde se condensam e se fundem, formando um filme com cerca

de 30 μm a milímetros de espessura. Normalmente uma espessura mínima de 40-50 μm é necessária para se conseguir um revestimento completo da superfície; as superfícies produzidas apresentam uma rugosidade elevada – são referidos valores até Ra 20 μm , mas valores Ra 7 μm são mais frequentes (Le Guéhennec et al. 2007; Wennerberg & Albrektsson 2009; Bauer et al. 2013).

A vantagem das superfícies rugosas frente às superfícies maquinadas menos rugosas ficou demonstrada em vários estudos animais. Gotfredsen (Gotfredsen et al. 1992) comparou o torque de remoção de implantes de plasma de Ti com o de implantes maquinados em mandíbulas de cão, após 12 semanas de integração, e registou uma melhor ancoragem dos implantes mais rugosos de plasma de Ti. No estudo de Ong (Ong et al. 2004), em modelo animal em cão foi comparada a integração, através de análise histomorfométrica e de teste de remoção (“pull-out”), de implantes maquinados, implantes revestidos com hidroxiapatite (HA) e implantes com superfície de plasma de Ti. A força de remoção dos implantes de plasma de Ti foi similar à dos implantes revestidos com HA, mesmo não tendo apresentado a mesma percentagem de contacto osso-implante, realçando assim o papel que o aumento da rugosidade teve no aumento da retenção micro-mecânica. Esse contributo já tinha sido destacado em estudos *in vitro* onde o aumento da rugosidade favoreceu a adesão e diferenciação de células osteoblásticas, apesar de haver um limite (entre 0,72-1,30 μm) após o qual não se verificou melhor adesão (Mustafa et al. 2000; Mustafa et al. 2001). Existia alguma preocupação com a espessura do revestimento e o possível desprendimento de partículas para os tecidos adjacentes, com potencial efeito tóxico ou alérgico. Contudo isso nunca foi confirmado e estudos clínicos relatam uma elevada taxa de sucesso, como no estudo de Rocuzzo (Rocuzzo et al. 2001) onde é comparado a performance de implantes de plasma de Ti TPS® e implantes SLA® e não foi encontrada qualquer diferença entre os implantes e com uma taxa de sucesso de 100% um ano após carga.

A projeção de plasma é a técnica mais usada para depositar fosfatos de cálcio. Contudo algumas limitações existem com a deposição de fosfato de cálcio através de projeção de plasma; a pouca adesão entre a apatite projetada e o material do substrato levava à delaminação do revestimento e desprendimento do mesmo para os tecidos com resposta inflamatória consequente. Adicionalmente ocorrem alterações na composição e cristalinidade do material depositado, tornando imprevisível o resultado da deposição (Le Guéhennec et al. 2007; Bauer et al. 2013).

Outras técnicas, deposição física em fase vapor (Physical vapor deposition - PVD), deposição por feixe de iões, deposição magnetron, foram introduzidas para a deposição de revestimentos finos de fosfato de cálcio sobre os implantes. As deposições inicialmente amorfas por natureza podem ser melhoradas facilmente por tratamento térmico, para além de que a adesão destes revestimentos é mais elevada e, por serem mais finos, o problema da delaminação não se coloca. Ong (Ong et al. 2002) comparou em modelo animal de cão, através de análise histomorfométrica e biomecânica, a osteointegração de implantes revestidos com HA por projeção de plasma e implantes revestidos com fosfato de cálcio por pulverização em modo RF. Não registou diferenças histomorfométricas ou diferença no torque de remoção dos implantes, pelo que considerou a técnica de pulverização adequada para a deposição de revestimentos finos de fosfato de cálcio. O estudo, em modelo animal de coelho, de longa duração, 9 meses, realizado por Mohammadi (Mohammadi et al. 2004) trouxe a confirmação de uma resposta óssea favorável, estável e duradoura no tempo aos implantes com um revestimento ultra-fino de 0,1 μm de fosfato de cálcio.

1.5.2. Tratamentos para modificação da nano rugosidade

As características da superfície regulam as interações na interface biomaterial-hospedeiro; influenciam a adsorção de proteínas da matriz extracelular a formação de precipitados, coordenam a migração e adesão

celular e regulam a diferenciação celular com ações tão coordenadas quanto interdependentes, assim como as propriedades da superfície em que umas propriedades condicionam as outras. Essas interações na interface começam ao nível sub-micrométrico com os íons e proteínas plasmáticas e com as plaquetas sanguíneas. As interações na superfície dos materiais são difíceis de isolar, até mesmo com modificações ao nível nanométrico as alterações influenciam diferentes características do material, como por exemplo: composição química, a rugosidade e a molhabilidade (Albrektsson & Wennerberg 2004b; Rupp et al. 2011; Davies et al. 2013; Davies et al. 2014). O papel exato destas características é desconhecido devido à falta de superfícies padronizadas, as quais poderiam ajudar a perceber a interação específica entre proteínas e células. São poucos os estudos que apresentam superfícies com topografia e composição química controlada e reprodutível ao nível nanométrico. A maior parte usa métodos de processamento derivados da indústria eletrônica, como a litografia e a impressão laser.

A aplicação da nanotecnologia à superfície de implantes envolve o arranjo de nano estruturas em dois planos: ao longo do plano da superfície e a partir do plano da superfície. As superfícies dos implantes são isotrópicas quando avaliadas em relação à quantificação da rugosidade e anisotrópicas quando avaliadas em relação à qualidade da rugosidade, isto é, apresentam sempre a mesma rugosidade qualquer que seja a direção analisada, mas sem padrão (repetição, organização) algum. A aplicação de nano estruturas obedecerá a uma distribuição isotrópica (de rugosidade e padrão) com um padrão claro de orientação (linhas, círculos, quadrados,...) ou anisotrópica (apenas no padrão) sem reprodutibilidade de orientação, mas com estruturas nanométricas.

A nanotecnologia foi definida, pela NASA (National Aeronautics and Space Administration), como a criação de materiais, aparelhos e sistemas funcionais através do controle da matéria à escala nanométrica (1-100 nm) e a exploração de novos comportamentos e propriedades (físicas, químicas e biológicas) a essa escala (Le Guéhennec et al. 2007; Mendonça et al. 2008; Bauer et al. 2013). A nanotecnologia exige novas formas de manipulação dos materiais (Figura 1.9).

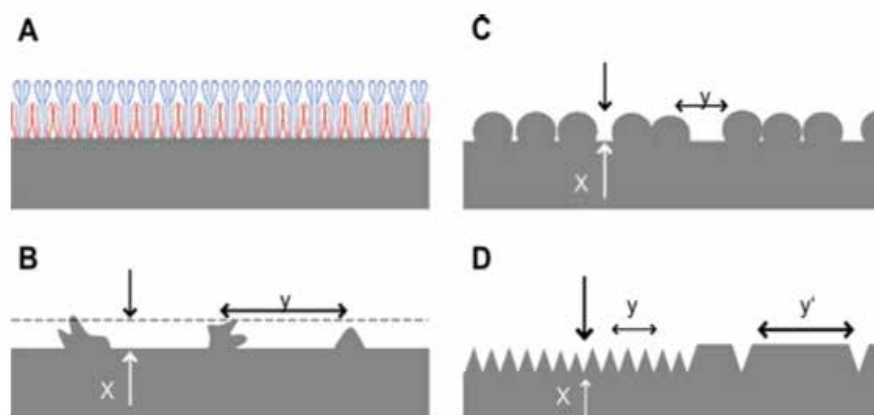


Figura 1.9 – Modificações de superfície nanométricas. (A) Camadas de auto-arranjo (SAM – Self assembled monolayers) podem mudar a topografia e a composição química. (B) deposição ou modificação química com nano estruturas ($x < 100$ nm) distribuídas em escala micro ($y > 100$ nm). (C) deposição com nanoestruturas em distribuição nano escala. (D) superfície isotrópica em escala nano, em distribuição nano (y) ou micro (y').

1.5.2.1. Compactação de nano partículas em materiais nanofásicos

É um processo físico de compactação de nano partículas de titânio ou titânia para conseguir fronteira de grão nanométrica. A química da superfície do material base não é alterada em diferentes topografias. A

utilização de nano partículas de alumina, titânia, Ti, Ti-6Al-4V e CoCrMo para a elaboração de metais nanofásicos e comparação com os respectivos metais convencionais, foi efetuada por Gutwein (Gutwein & Webster 2004) e Webster (Webster & Ejiófor 2004). O processo de criação dos metais com pós com partículas nanométricas envolve a sinterização por 2 horas, entre 600°C e 1000°C dos pós compactados; depende da temperatura de sinterização o tamanho do grão pode crescer de 23-32 nm iniciais para 177 nm até 2,12 µm. Em ambos os casos, a caracterização dos metais revelou que a superfície dos metais nanofásicos apresentava a mesma composição química que os metais convencionais, apenas diferindo na quantidade de interfaces nanométricas e que seriam estas a proporcionar mais sítios de adesão para as células osteoblásticas. Assim se justifica a melhoria de adesão e proliferação celular nestas superfícies. Porém, este processo de estruturação é muito laborioso, difícil e produz superfícies nem sempre dentro das características desejadas.

1.5.2.2. Camadas de auto-arranjo – SAM (Self-assembly monolayers)

São formadas por adsorção química espontânea e arranjo compacto em posição vertical das moléculas, num substrato específico expondo apenas o grupo terminal na interface. O grupo terminal pode ser um qualquer grupo funcional osteoindutivo ou uma molécula para adesão celular, como uma sequência peptídica mais ou menos longa, os quais se podem ligar a um substrato de polietileno glicol (PEG) aplicado na superfície do implante. Diferentes substratos têm sido usados para ligar diferentes grupos peptídeos. Bell (Bell et al. 2011) usou um substrato de poli-L-Lisina-g- polietileno glicol para revestir o implante e aderir peptídeos funcionais arginina-glicina-aspartato (RGD). Schliephake (Schliephake et al. 2002) usou implantes revestidos com colagénio e fixados por processo electroquímico, para depois ligar peptídeos RGD por ligação covalente. Reyes (Reyes et al. 2007) também usou implantes revestidos com colagénio para ligar um peptídeo promotor da ligação da integrina $\alpha 2\beta 1$; Lutz (Lutz et al. 2010) utilizou um implante atacado com ácido após jateamento e revestiu-o com HA e funcionalizou-o com um peptídeo P-15. Todos os processos demonstraram resultados não esclarecedores, até mesmo os resultados mais prometedores do último estudo podem ser atribuídos também à topografia e à composição química da HA. Uma camada de nanotubos de titânia foi desenvolvida na superfície de cp Ti, através de uma técnica electroquímica por von Wilmowsky (Wilmowsky et al. 2012). Os nanotubos formados com diferentes diâmetros (50, 70 e 100 nm) tiveram influência sobre os padrões de diferenciação celular e expressão das proteínas, podendo ser uma técnica a explorar no sentido do esclarecimento destes processos.

1.5.2.3. Tratamento químico com ácidos ou bases fortes

O tratamento da superfície com ácidos ou bases fortes pode expor grupos reativos do material ou criar uma topografia nanométrica. O tratamento da superfície com NaOH catalisa a produção de nano estruturas para fora da superfície do Ti, produzindo uma camada em estado gel de titanato de sódio. Esta camada de titanato de sódio é rapidamente formadora de hidroxiapatite (Protivínský et al. 2007; Kodama et al. 2008).

O ataque ácido com HF depois da superfície ter sido jateada com partículas de titânia (ver página 34) resulta na diminuição da rugosidade inicial após jateamento para Ra de 0,91 µm e a incorporação de flúor na superfície cerca de 0,5-3% atómico (Isa et al. 2006). Alguns autores referem uma rugosidade inicial após jateamento com Ra 1,5 µm e a rugosidade final após ataque com HF também superior com Ra 1,3 µm, para além de uma fixação de flúor na ordem 1,0% atómico; como resultado deste tratamento é também referida

a presença de nanoestruturas, com cerca de 100 nm de diâmetro na superfície dos implantes, sobrepondo uma nano rugosidade a uma superfície micro rugosa (Mendonça et al. 2008; Monjo et al. 2008; Valencia et al. 2009). Os estudos *in vitro* indicam que esta modificação da superfície proporciona uma melhor proliferação e diferenciação celular (Isa et al. 2006), atuando sobre a expressão genética dos mediadores da inflamação e reabsorção/formação óssea (Monjo et al. 2008), sendo, por isso, fortemente osteoindutora e osteocondutora para as células mesenquimatosas pluripotentes aderentes (Valencia et al. 2009).

Também recentemente foi detetada a presença de nanoestruturas na superfície de implantes com superfície SLActive® (ver página 27), que para além da micro topografia com dois níveis de rugosidade e da hidrofília da superfície apresentaria mais um nível de estruturação da superfície com a introdução de nano rugosidade (Wennerberg et al. 2012). Foi referido serem o processo de ataque ácido (ataque ácido a quente com mistura de HCl/H₂SO₄) para modificação da superfície e o armazenamento, os responsáveis pela reorganização da camada mais externa de óxido de titânio numa camada bem definida repleta de nanoestruturas.

1.5.2.4. Deposição e revestimento

De forma a ultrapassar os problemas da deposição por projeção de plasma foram desenvolvidas técnicas que permitissem controlar a quantidade e qualidade dos materiais depositados, conseguindo-se assim espessuras reduzidas de deposição e melhor controlo da microestrutura dos materiais. Dessa forma, o problema de destacamento do material depositado e possível toxicidade seria diminuído.

Algumas técnicas inspiraram-se no modelo natural de bio-mineralização; assim promovem a precipitação de cristais de apatite na superfície do implante quando imersa numa solução idêntica aos fluidos corporais; várias técnicas foram desenvolvidos para melhorar o processo.

A técnica de deposição sol-gel promove a deposição de formações de fosfato de cálcio nanométrico na superfície. Devido à interação à escala quase atômica, as formações apresentam uma forte interação física. Apesar de habitualmente usada para deposição de fosfato de cálcio, materiais como alumina, titânia e zircônia podem ser depositados. O processo envolve o estabelecimento das soluções I e II (específicas para cada material), que são misturadas e envelhecidas a 0 °C por 24 horas para formar o sol para revestimento; as superfícies serão depois mergulhadas e removidas no sol à velocidade 0,30 mm/s e depois submetidas a tratamento térmico a 500 °C por 10 minutos. Após o tratamento térmico as superfícies são lavadas e secas, devendo todos os procedimentos ser repetidos algumas vezes para assegurar homogeneidade do revestimento. Este procedimento foi usado por Meirelles (Meirelles et al. 2007; Meirelles et al. 2008) e por Ballarre (Ballarre et al. 2008) em estudos *in vivo* e *in vitro*, respetivamente, para conseguir deposições de nanométricas de materiais como titânia, fosfato de cálcio e HA.

A deposição cristalina discreta (“Discrete crystalline deposition”) consiste numa deposição de nano cristais de fosfato de cálcio. Tem sido usada como uma segunda camada topográfica que se sobrepõe à existente micro topografia e comercializada como Nanotite®. Brevemente consiste em: após o duplo ataque da superfície, imersão das superfícies numa solução de base alcoólica, à temperatura ambiente, contendo as partículas nano estruturadas de fosfato de cálcio em suspensão (20-100 nm de dimensão, >95% cristalino). Após remoção da solução as superfícies são secas em forno a 100 °C. No estudo conduzido por Mendes (Mendes et al. 2007) foram comparados implantes com e sem tratamento DCD, através de testes biomecânicos de disrupção da osteointegração em implantes colocados em ratos; os implantes com superfície DCD apresentaram uma força disruptiva mais elevada e a interface implante-osso manteve-se muitas vezes integra com fratura intra-óssea, logo os autores concluíram em favor das propriedades “adesivas” para o osso desta superfície. Contudo, o

estudo de Abrahamsson (Abrahamsson et al. 2012) não encontrou qualquer diferença nos parâmetros usados para avaliar a osteointegração, em modelo de cão, de implantes com e sem tratamento de superfície com DCD, concluindo não haver vantagem desta deposição sobre o duplo ataque ácido simples na promoção da integração óssea. Schliephake (Schliephake et al. 2009) já tinha concluído o mesmo não com uma deposição discreta de fosfato de cálcio, mas com uma deposição de HA.

A implantação de iões é uma técnica que permite a alteração química e topográfica da superfície. Neste processo, espécies iónicas específicas são incorporadas na superfície acelerando um feixe energético de iões para o substrato. É uma técnica rápida, muito homogénea e com grande pureza do dopante (espécie implantada), que permite a implantação de camadas estreitas quase sem alteração da morfologia do substrato e sem alterar as propriedades do material do implante. Uma vez que a dosagem pode ser controlada com precisão, é uma ferramenta muito útil para produzir superfícies de forma reprodutível para estudos (Sawase et al. 2001; Nayab et al. 2003). Das versões mais recentes da implantação de iões, a implantação de iões imersa em plasma parece oferecer ainda mais capacidade de controlo sobre as espécies implantadas e conferir com toda a certeza características nanotopográficas às superfícies (Yang et al. 2011; Meirelles et al. 2011).

1.5.2.5. Litografia

A fotolitografia é uma técnica estruturante para fabricar pormenores bem definidos da superfície e é muito usada na tecnologia dos semicondutores. A técnica fotolitográfica cria uma máscara com o padrão para transferir para a superfície, onde será desenvolvido sob a influência da luz e subsequentemente removido, deixando então a topografia resistente em torno das áreas expostas do substrato. Outra etapa abrasiva sobre a área exposta será efetuada, por ataque químico ou removida reactivamente por bombardeamento de iões. Para produção de estruturas nanométricas são usadas fontes de comprimento de onda curto como a os UV profundos ou raios-X. Atualmente o seu uso para produção de nano topografia é limitado, mais frequentemente são usadas as técnicas de litografia por feixe de electrões ou a litografia coloidal.

A litografia por feixe de electrões é usada para produzir padrões na ordem dos 10 nm, sendo muito adequada para a investigação; no entanto, o desafio continua em estabelecer padrões sobre grandes áreas pois o feixe desfoca para deflexões superiores a 1 μm . Por outro lado, a litografia coloidal apresenta a possibilidade de produzir grandes superfícies nanoestruturadas e em larga escala e a baixos custos. O princípio desta técnica é baseado na capacidade dispersiva e eletrostática de auto-arranjo dos nano-colóides num substrato. Estas superfícies são depois bombardeadas com iões para remoção do material envolvente e do próprio colóide. A produção reprodutível destas superfícies fornece material de trabalho importante em investigação sobre superfícies (Mendonça et al. 2008; Tomisa et al. 2011; Bauer et al. 2013).

I.6. Enquadramento da Problemática

A reabilitação oral suportada por implantes vem desde os trabalhos pioneiros de Per Ingvar Branemark e também Andre Schroeder há quase 50 anos, restituindo qualidade de vida a muitos pacientes, resolvendo mutilações e devolvendo esperança e confiança.

Inicialmente a sua utilização era restrita à mandíbula, na zona intermentoniana, para a reabilitação de desdentados totais, com protocolos cirúrgicos muito rígidos e rigorosos. Gradualmente a taxa de sucesso obtida com este procedimento levou à sua aceitação e generalização a outros tipos de reabilitação em ambos os maxilares. A elevada taxa de sucesso destes procedimentos faz com que seja um dos procedimentos cirúrgicos com uma das mais elevadas taxas de sucesso, apesar da sua utilização, por vezes, indiscriminada e muitas vezes até abusiva.

Hoje a reabilitação com implantes passa por protocolos de carga imediata, por implantes imediatos pós-extração, pela reabilitação unitária, pela reabilitação de desdentados parciais e totais, pela reabilitação de pacientes com grandes perdas ósseas, mas apesar disso continuamos a recolher elevadas taxas de sucesso e os pacientes a usufruir de uma alternativa terapêutica sem igual. Ainda assim continuamos a usar, de uma forma geral, o mesmo material que pioneiros da Implantologia usaram... o Titânio.

O Titânio surpreendeu o anatomista Branemark ao apresentar uma forte deposição óssea sobre a sua superfície a qual dificultava a recuperação das câmaras de Titânio que usava para estudar a micro-circulação. Verificou a formação de osso vivo, organizado e funcional diretamente sobre a superfície do material, o que viria a ser designado por osteointegração ou anquilose funcional. O Titânio sofre uma forte e rápida oxidação da superfície para formar dióxido de titânio, muito aderente à superfície e resistente à corrosão, permitindo que apresente um comportamento bioinerte no organismo. Isso fez do Titânio o material de eleição para ancoragem e suporte de reabilitações orais até aos dias de hoje. Contudo, hoje a interface que se estabelece entre o implante e o tecido ósseo é diferente da interface nos primórdios da Implantologia, sobretudo devido à contínua modificação das superfícies dos implantes que têm vindo a ser introduzidas na procura de melhorias dessa interface.

De facto, tem-se procurado conhecer melhor os processos de osteointegração e a sua ligação com as características da superfície dos biomateriais para poder proceder ao seu desenvolvimento e assim obter biomateriais mais biomiméticos, quase “taylor made”. Do implante maquinado de há muitos anos atrás, temos

hoje implantes com superfícies muito trabalhadas e quase multi-estruturadas. Conhecem-se e caracterizam-se bem e melhor a superfície dos implantes e a sua relação com as etapas de cicatrização óssea. As diferentes propriedades e características dos biomateriais estão de tal forma interligadas que é praticamente impossível alterar uma característica sem modificar uma(s) outra(s).

Neste contexto surgiu o nosso estudo, para desenvolver uma metodologia, controlada e reprodutível, que pudesse replicar as características do novo biomaterial e esclarecer *in vitro* de que forma participam nos processos de osteointegração. Para além disso, permitiu-nos também pesquisar outras formulações em relação com estas propriedades e características que pudessem ser majorativas para as etapas de cicatrização óssea.

Objectivos

Este trabalho experimental foi desenhado tendo como objetivos:

1. desenvolver e otimizar as condições de deposição para controlo das características dos filmes finos produzidos.
2. conseguir reprodutibilidade na deposição de filmes finos de TiZr de composição e estrutura controlada.
3. avaliar *in vitro* o potencial bioativo e o comportamento biológico dos filmes produzidos.
4. analisar a influência do teor de zircônio no comportamento biológico dos filmes testados.

Capítulo II. Materiais e técnicas experimentais

2.1. Materiais e Técnicas Experimentais

2.1.1. Materiais

A técnica de pulverização catódica, descrita detalhadamente na página 57, foi utilizada para revestir o material genericamente designado por substrato. O alvo é de onde se retira o material a depositar, ou seja, é a nossa fonte de átomos que posteriormente vão compor o revestimento ou filme fino.

2.1.1.1. Substratos

Foram utilizados vários tipos de substrato:

- i) Substratos de titânio comercialmente puro, cpTi, grau 4.
- ii) Substratos de aço inoxidável 316L.
- iii) Substratos de cp Ti grau 4 com superfície jateada e atacada com ácido, segundo o procedimento patenteado pela Straumann® como SLA® – Sandblasted, Large grit, Acid etched, fornecidos pela marca (cp Ti SLA®).
- iv) Substratos de liga de titânio (Ti) e zircônio (Zr), TiZr ou Roxolid®, com superfície SLA® fornecidos pela marca (TiZr).
- v) Substratos de silício, utilizados em todas as deposições para medição da espessura do filme.

Todos os substratos foram usados com a forma de disco com 16 mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

2.1.1.2. Alvos

Na deposição dos filmes finos foi utilizado um alvo de titânio puro com pastilhas de zircônio, em número variável, coladas na zona de maior erosão do alvo, de modo a obter a composição química pretendida. O alvo de Ti, com grau de pureza de 99,99%, tem 150 mm de largura, 150 mm de comprimento e 4 mm de espessura. As pastilhas de zircônio utilizadas são circulares com 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, aproximadamente.

2.1.2. Técnica de Deposição

Neste trabalho foi utilizada a técnica de pulverização catódica, também conhecida por “sputtering”, para fabricar os filmes finos Ti-Zr, sobre os diferentes substratos. Esta técnica de deposição física em fase de vapor é um dos métodos mais utilizados para a deposição de filmes devido à sua relativa simplicidade e grande versatilidade.

Grove e Plucker, em 1852, observaram pela primeira vez o fenômeno de pulverização num tubo de gás durante uma descarga elétrica. Nesta experiência, foi descoberto que durante uma descarga elétrica entre dois eletrodos condutores, no interior de um tubo com gás a pressão reduzida, a superfície do cátodo (alvo) era pulverizada por iões do gás e o material de que era constituído (o cátodo) ia sendo depositado na superfície do ânodo (substrato) e nas paredes do tubo, constituindo assim um revestimento fino. Nessa altura, a pulverização foi considerada como um fenómeno indesejável uma vez que, o cátodo e a grelha aceleradora no tubo de gás eram destruídos. A pulverização catódica foi utilizada pela primeira vez com fins industriais em 1877 no revestimento de espelhos.

Nas últimas décadas a pulverização catódica tem sofrido um enorme desenvolvimento, sendo hoje em dia um método amplamente utilizado a nível industrial para a deposição de filmes finos. A preferência por esta técnica deve-se tanto ao aumento da procura por filmes funcionais de alta qualidade em diversas áreas, como também à sua simplicidade, versatilidade e flexibilidade aliadas ao baixo impacto ambiental, sem utilização de produtos ou soluções tóxicas, nem produção de efluentes nocivos.

Existem várias variantes desta técnica, sendo que a mais utilizada é a pulverização catódica em modo magnetron. Em muitos casos, filmes depositados por pulverização catódica magnetron têm uma melhor performance quando comparados com filmes depositados por outros processos de deposição física em fase de vapor, podendo apresentar a mesma funcionalidade com espessuras inferiores. Como consequência, a pulverização catódica magnetron tem hoje um impacto significativo em diversas áreas de aplicação, como em filmes resistentes à fricção e corrosão, filmes decorativos e filmes com propriedades óticas ou elétricas específicas.

2.1.2.1. Equipamento

Os filmes de titânio com zircônio foram depositados sobre os respetivos substratos por pulverização catódica magnetron em corrente contínua. Foi utilizado o protótipo semi-industrial da empresa alemã Hartec (Figura 2.1).

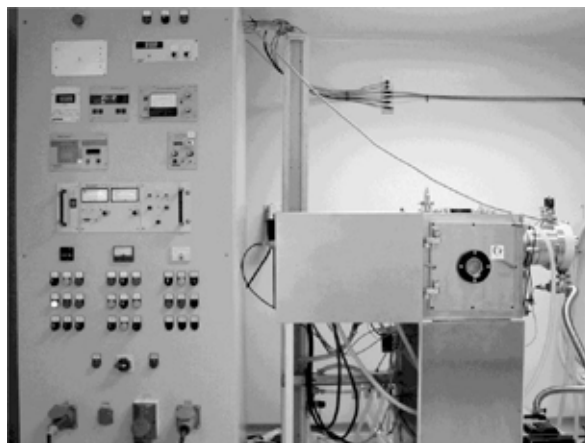


Figura 2.1 – Equipamento de pulverização catódica.

O equipamento é constituído fundamentalmente por três partes: um sistema de vácuo, uma câmara de deposição e um canhão de iões. O sistema de vácuo é constituído por duas bombas, uma rotativa (primária) que permite atingir os valores de pressão necessários para o funcionamento de uma bomba turbomolecular (secundária), que auxiliada pela bomba primária permite atingir vácuos da ordem dos 10^{-4} Pa no interior da câmara de deposição. Esta câmara apresenta dois cátodos que permitem, caso seja necessário a codeposição de mais de um elemento. Contém também um eléctrodo que, por focalização do feixe do canhão de iões, permite o aquecimento e decapagem iónica dos substratos. O sistema é controlado por sensores de monitorização de todo o processo e alimentado por quatro fontes de potência distintas: uma para a criação e conservação do plasma de cada alvo, uma relativa ao canhão de iões e finalmente uma responsável pela polarização dos substratos. O arrefecimento do cátodo durante a deposição é conseguido através da circulação de água entre o alvo e o magnetrão.

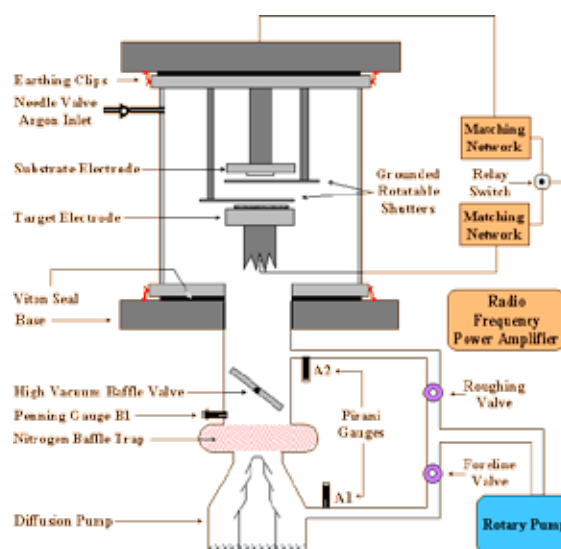


Figura 2.2 – Esquema ilustrativo dos componentes do equipamento de pulverização catódica.

2.1.2.2. O processo de Pulverização Catódica

O processo de pulverização catódica compreende três etapas: criação de uma fase gasosa, transporte dos átomos a depositar para o substrato (cátodo-ânodo) e deposição e crescimento do filme no substrato. Assim, a deposição é realizada numa câmara de alto vácuo na qual está presente um gás inerte a baixas pressões, geralmente árgon. Por aplicação de um campo eléctrico os átomos de Ar são ionizados, dando origem a iões Ar^+ , constituindo o plasma incandescente. Em modo magnetrão os ímãs existentes na parte posterior do cátodo criam um campo magnético que auxilia o processo de ionização do árgon e conseqüentemente o processo de remoção dos átomos do alvo. Juntamente com a diferença de potencial de algumas centenas de volts entre o cátodo (alvo) e o ânodo (substrato), o campo magnético cria trajetórias preferenciais para os iões, o que também torna mais eficaz o processo de remoção, pois faz com que o número de colisões iões-alvo seja maior. Assim, os iões de Ar^+ são acelerados e bombardeiam, chocam, com o alvo, o que provoca a remoção, - "sputtering" - de átomos do alvo. Estas partículas poderão ser átomos de material que constitui o alvo ou átomos carregados (iões) os quais podem ser refletidos e neutralizados no processo e causar a emissão de electrões secundários devido ao impacto. Os electrões secundários quando acelerados posteriormente podem dar origem a novos iões Ar^+ e por isso desempenham um papel importante na manutenção do plasma..

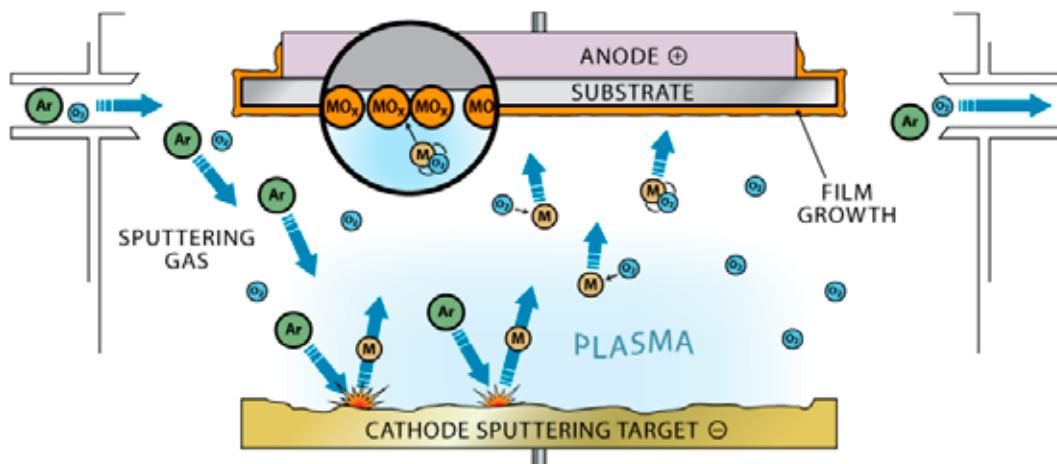


Figura 2.3 – Interações das espécies existentes dentro da câmara de vácuo durante o processo de deposição.

A presença do magnetrão (pulverização catódica magnetrão) forma um campo magnético orientado paralelamente ao alvo, obrigando os elétrons secundários, emitidos quando do arranque dos átomos, a adquirirem trajetórias helicoidais fechadas junto ao alvo, aumentando assim a probabilidade da ocorrência do choque com o Ar, e conseqüente ionização. A principal desvantagem do modo magnetrão é a desigual erosão do alvo, devido à concentração do plasma na zona que engloba a trajetória dos elétrões, desgastando-se, preferencialmente, na zona onde se faz sentir a influência do campo magnético. Isto encarece significativamente o processo se o alvo não for recuperável ou reciclável, contudo permite pressões mais baixas que facilitam o percurso dos átomos arrancados do alvo para o substrato, para uma deposição e adesão convenientes. Os átomos neutros arrancados são posteriormente depositados no substrato colocado num suporte em frente ao alvo (Figura 2.4).

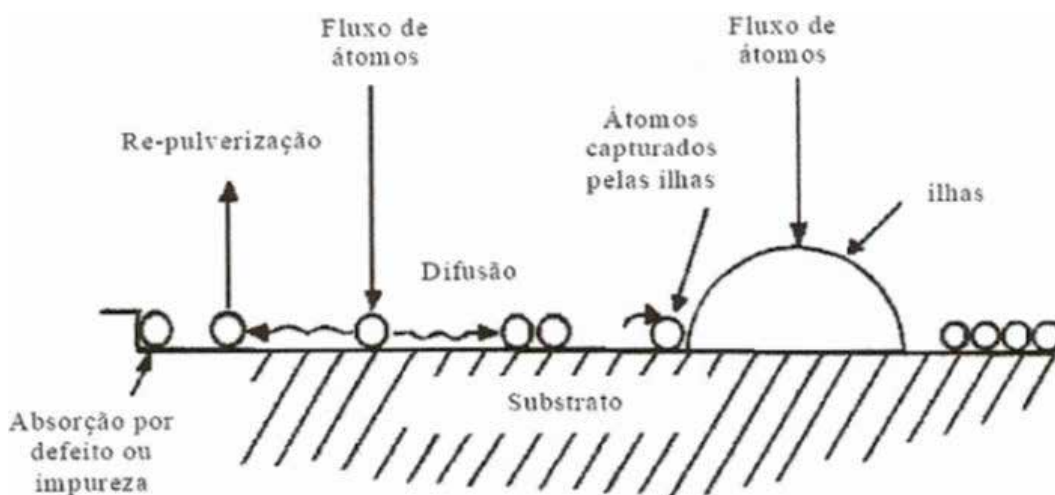


Figura 2.4 – Interações na superfície do substrato.

A utilização de pressões de trabalho muito baixas permite sintetizar materiais com elevada pureza. Na maior parte dos casos após revestimento a morfologia superficial do substrato é praticamente reproduzida.

2.1.3. Técnicas de Caracterização

Para avaliar a qualidade e funcionalidade dos revestimentos produzidos, foram utilizadas várias técnicas para caracterização topográfica, física, química e do potencial biológico.

2.1.3.1. Caracterização topográfica: Rugosimetria

A caracterização topográfica 2D e 3D dos substratos é efetuada através da avaliação dos parâmetros de rugosidade. A rugosimetria também foi utilizada para avaliar a espessura dos revestimentos.

2.1.3.1.a. Perfilometria

Na avaliação da espessura dos filmes foi utilizado um rugosímetro Mahr modelo Perthometer S4P Perthen S4P (Figura 2.5) com cabeça ótica que permite medições através de um feixe laser, sem nunca entrar em contacto com a superfície. Este procedimento é muito utilizado devido à sua relativa precisão, simplicidade e rapidez de operação. A cabeça laser desloca-se na superfície em análise, por um comprimento previamente estabelecido, registando a altura a que se encontra em cada instante. A determinação da espessura é possível, medindo a dimensão de um degrau criado intencionalmente. O degrau resulta da colocação prévia de uma gota de nitreto de boro sobre um substrato de silício (tem baixa rugosidade e é opticamente plano), a qual após deposição é removida e o degrau resultante é medido por perfilometria.



Figura 2.5 – Rugosímetro Mahr modelo Perthometer S4P Perthen S4P.

2.1.3.1.b. Topografia

Os vários substratos utilizados neste trabalho foram sujeitos a uma análise topográfica, visando a determinação das características da rugosidade em perfil da superfície, parâmetros R_a (rugosidade média) e também da sua distribuição espacial, parâmetros S_a (rugosidade média por área). Na análise topográfica 2D, foi utilizado o rugosímetro Perthen S4P já referido, e foram medidos os seguintes parâmetros: R_a (rugosidade

média) e R_q (rugosidade quadrática média). Na análise topográfica 3D utilizou-se um microscópio ótico 3D de elevada resolução, Alicona Infinite Focus (Figura 2.6).

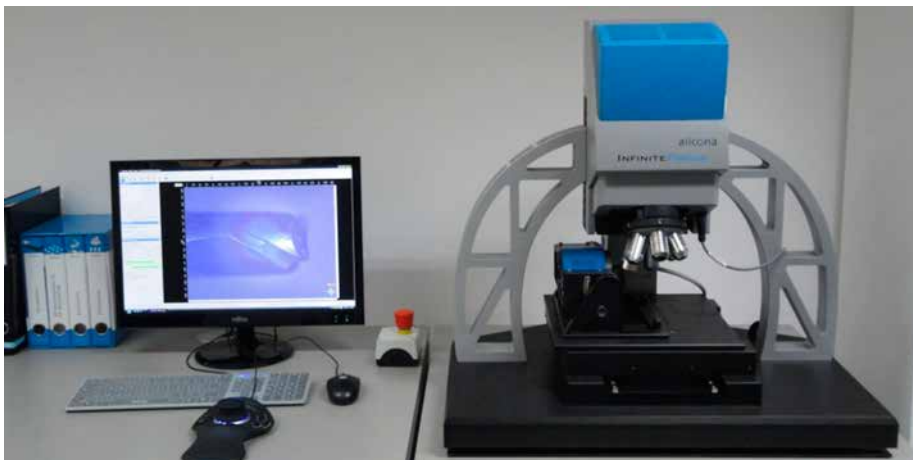


Figura 2.6 – Microscópio ótico 3D de elevada resolução de focagem infinita - Alicona Infinite Focus.

Os princípios de variação de foco combinam a baixa profundidade de focagem do sistema ótico com o varrimento vertical para fornecer informação topográfica e colorimétrica da superfície. Ao contrário de outras técnicas de análise 3D, este instrumento possui um alcance vertical elevado e permite avaliar não só a rugosidade, mas também a forma. O algoritmo de reconstrução transforma os dados num conjunto de dados 3D com a informação topográfica. A resolução “Z” pode ser tão baixa quanto 10 nm, o que torna esta técnica adequada para a mensuração de materiais homogêneos e compostos. A utilização do módulo de medição da textura superficial (Surface Texture Measurement) permite obter medições mais complexas e mais detalhadas da superfície tais como a média de todas as dimensões, o achatamento, os parâmetros de volume e gradiente de distribuição. Esta informação exaustiva permite caracterizar a topografia da superfície com detalhe, com determinação da região de interesse (region of interest – ROI) direta e facilmente na imagem ótica, a qual pode ser apresentada em escalas de cinzento ou num mapa de profundidade pseudo colorido. Uma comparação com os parâmetros de rugosidade R_a das medições tácteis (ou óticas) é possível seguindo a norma ISO 4287/4288 para cada categoria R_a e os correspondentes valores L_c e dimensões de perfil; contudo, focalizamos a análise nos parâmetros de superfície S_a . Uma limitação porém advém do facto de em superfícies polidas e brilhantes, devido à elevada reflectância, a análise poder ser perturbada (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Características e propriedades do microscópio ótico de focagem infinita.

Especificações Gerais							
Princípios de Medição	Sem contacto, óptica, tridimensional, baseada em Variação Focal.						
Resultado da Medição	Denso, conjunto de dados 3D em cor real com 2-100 pontos de medição Mio.						
Iluminação	Luz LED branca coaxial, elevado poder, controlável; Opcional: luz anelar LED branca, elevado poder, controlável; Opcional: polarização.						
Varição de Deslocamento Lateral (XY)	100mm x 100mm						
Varição de Deslocamento Vertical (Z)	100mm						
Textura superficial da amostra	Topografia superficial Ra acima de 10-15nm, dependendo da estrutura superficial.						
Material	Qualquer superfície sólida.						
Lentes							
		2.5x	5x	10x	20x	50x	100x
Resolução Óptica Lateral	µm	5.6	2.2	1.1	0.8	0.6	0.4
Resolução Vertical (velocidade reduzida)	nm	2300	410	100	50	20	10
Campo de Visão X	µm	5716	2858	1429	715	286	143
Campo de Visão Y	µm	4351	2175	1088	544	218	109
Software							
Medição	Conjunto de dados 3D em profundidade de campo completa, medição da superfície 3D registada em cor real e pseudo cor.						
Módulos de Medição	ProfileFormMeasurement (peso, ângulo); ProfileRoughnessMeasurement (rugosidade, Ra); SurfaceTextureMeasurement (Sa, dimensão fractal); VolumeMeasurement, 3DFormMeasurement (opcional); DifferenceMeasurement (opcional), ContourMeasurement (opcional); EdgeMeasurement (opcional), 2D ImageMeasurement, 3D Editor.						
Visualização	Imagem 2D única e estéreo, visualização 3D de alta resolução, visualização anaglífica.						

2.1.3.2. Caracterização da composição: Microsonda eletrónica – EPMA (Electron Probe MicroAnalysis).

A composição química dos filmes em estudo foi avaliada por microsonda eletrónica (EPMA – Electron Probe MicroAnalysis). Esta técnica não destrutiva permite determinar a composição química qualitativa e quantitativa em volumes muito pequenos, permitindo o cálculo de concentrações de quase todos os elementos da tabela periódica. A precisão analítica é muito elevada, através de espectrómetros por dispersão angular de comprimento de onda, fazendo desta ferramenta uma das mais utilizadas na avaliação da composição química de materiais nos mais variados ramos da ciência [57]. A microsonda eletrónica é constituída por três elementos base: sistema de produção do feixe de electrões, sistema de deteção dos raios X emitidos e sistema de aquisição e tratamento de dados.

O princípio de funcionamento consiste na emissão de raios X após um feixe de electrões acelerado incidir na amostra, permitindo assim uma análise focalizada qualitativa e quantitativa, visto que a energia dos raios X emitidos é característica de cada elemento. Este equipamento permite uma análise química não destrutiva, de forma fácil e direta. A análise qualitativa é feita através do posicionamento dos picos e pela sua identificação, ao passo que a análise quantitativa é baseada na intensidade das riscas dos elementos presentes na amostra e comparação com amostras padrão, de composição química conhecida.

Neste estudo foi utilizado o equipamento CAMECA, modelo Camebax SX50, equipado com um microscópio eletrónico de varrimento e dois espectrómetros por dispersão angular de comprimento de onda, de quatro canais cada. Os valores obtidos por EPMA resultam da média aritmética de quatro medições pontuais. A tensão de aceleração utilizada foi de 15 kV e as correntes de feixe da ordem de 40 nA.



Figura 2.7 – Microsonda electrónica (EPMA – Electron Probe MicroAnalysis), o equipamento CAMECA, modelo Camebax SX50.

2.1.3.3. Caracterização morfológica: Microscopia electrónica de varrimento – SEM (Scanning Electron Microscope)

A microscopia electrónica de varrimento (SEM – Scanning Electron Microscopy) é uma técnica que permite a observação e caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos heterogêneos, numa escala micro e nanométrica. Esta técnica permite, não só visualizar as características topográficas/morfológicas dos filmes, mas também, detectar a presença de defeitos. A sua grande popularidade deve-se à capacidade de obter imagens de aparência tridimensional de superfícies de um vasto leque de materiais, desde que apresentem uma boa condutividade eléctrica superficial. Quando as amostras não apresentem boa condutividade eléctrica superficial, têm de ser revestidas com um material condutor, normalmente o ouro/paládio (Au/Pd). O SEM é constituído por uma fonte de iluminação (feixe de electrões); um sistema condensador, que permite variar a intensidade de iluminação; uma lente objectiva, que fornece uma primeira ampliação do objeto; e um sistema que forma e projeta a imagem final.



Figura 2.8 – Microscópio electrónico de varrimento (SEM) equipado com um espectrómetro de dispersão de energia (EDS – Energy Dispersive Spectroscopy).

A amostra a examinar é irradiada com um feixe de electrões, normalmente em condições de vácuo para que estes não sofram dispersão nem diminuição de energia cinética. Este feixe pode “varrer” (“scanning”)

uma dada área para formar uma imagem, ou pode ser estático para uma análise pontual. Da interação entre o feixe de elétrons acelerado e a superfície da amostra resultam elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, elétrons Auger, fótons de radiação X característica do material em estudo, entre outros. Isto permite analisar características como a morfologia, topografia ou composição química. Ao nível da imagem, os elétrons secundários sofrem alterações com as variações da topografia e por isso fornecem indicações sobre a mesma, ao passo que o contraste da imagem resulta da interação dos elétrons retrodifundidos, sensíveis ao número atômico, como consequência das diferenças de composição química. A aparência tridimensional das micrografias resulta em larga medida da grande profundidade de campo do SEM [47]. A avaliação qualitativa e semi-quantitativa da composição química, é possível em microscópios equipados com um espectrómetro de dispersão de energia (EDS – Energy Dispersive Spectroscopy) através da detecção dos raios X emitidos.

Na caracterização morfológica e química dos substratos e filmes finos em estudo, foi utilizado um microscópio eletrónico de varrimento JEOL JSM-5310 equipado com sistema EDS EDAX, utilizando uma tensão de aceleração do feixe eletrónico de 10 kV. Algumas amostras foram analisadas num microscópio de emissão de campo de alta resolução ou cátodo frio FEI Quanta 400FEG ESEM.



Figura 2.9 – Microscópio de emissão de campo de alta resolução FEI Quanta 400FEG ESEM.

2.1.3.4. Caracterização estrutural: Difração de raios X – XRD (X ray diffraction)

A difração de raios X é uma das técnicas mais utilizadas na caracterização estrutural de materiais. É uma técnica não destrutiva, utilizada em diversos ramos do conhecimento, que permite fornecer informação sobre as fases presentes numa dada amostra e sobre os parâmetros de rede, tamanho das cristalites e existência de textura.

Os raios X com comprimento de onda conhecido, ao atingirem o material sofrem vários tipos de interações, mas apenas uma parte da radiação incidente é difundida pelos átomos do material, resultando assim, num fenómeno de difração, que pode ser traduzido pela lei de Bragg:

$$n \lambda = 2 d(hkl) \sin \theta \quad (1)$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação usada, $d(hkl)$ é a distância entre os planos (hkl), θ é o ângulo de difração do feixe de raios X e n é um número inteiro que define a ordem de reflexão. Na figura 6 é apresentado um esquema ilustrativo da difração de raios X pelos planos de átomos AA' e BB' (Lei de Bragg).

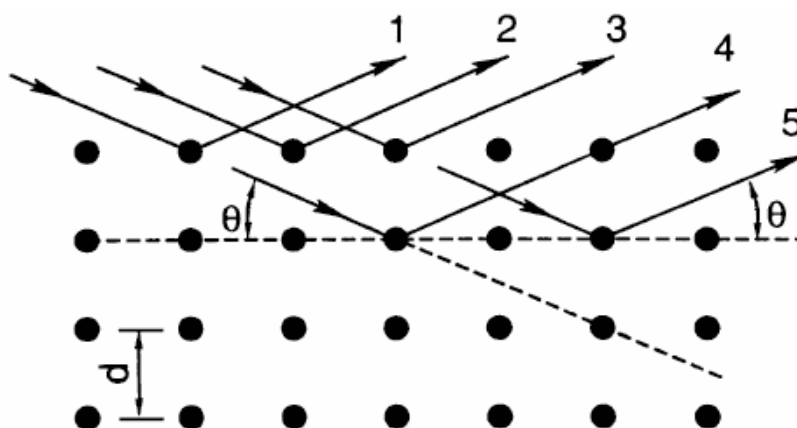


Figura 2.10 – Esquema ilustrativo da difração de raios X .

Na prática conhece-se o comprimento de onda da radiação utilizada, geralmente cobre ou cobalto, e o ângulo para o qual ocorre a difração, o que nos permite calcular, pela equação de Bragg as distâncias interplanares que, por sua vez, permitem a identificação e indexação das fases presentes, por comparação com fichas padrão.



Figura 2.11 – Difractor PHILIPS modelo X'Pert.

Os ensaios de raios X foram realizados num difractor PHILIPS modelo X'Pert com goniômetro PW 3020/00, sob uma tensão de 40 kV e uma corrente de 35 mA de intensidade. Como anti-cátodo foi utilizado cobalto (comprimentos de onda $\lambda_{K\alpha 1} = 0,178896$ nm e $\lambda_{K\alpha 2} = 0,179285$ nm). De um modo geral, os ensaios foram efetuados em modo convencional num intervalo de difração $20 < 2\theta < 120^\circ$ com um passo de $0,03^\circ$ e um tempo de aquisição de 1s por canal.

2.1.3.5. Caracterização energética da superfície: Potencial Zeta (ζ)

Quase todos os materiais adquirem carga elétrica superficial quando estão em contato com um líquido, ou com fluídos orgânicos. O potencial electrocinético ou potencial zeta (ζ) é uma medida indicativa da carga

elétrica de uma dada superfície. A carga elétrica superficial de um material é considerada como um dos principais fatores envolvidos na evolução biológica dos biomateriais. Esta carga depende de diversos fatores como a composição química da superfície em contacto com os tecidos e também a composição e pH do fluido biológico local. O estudo do potencial zeta assume, por esta razão, particular relevância nos estudos da química superficial.

Quando os materiais são imersos numa solução de eletrólito, podem ocorrer várias interações, tais como a dissociação e a adsorção de iões da solução.

A diferença de potencial na interface sólido/líquido é denominada por potencial zeta. Este valor pode ser calculado por electroforese ou pela medição do potencial do “potencial de fluxo”. O potencial zeta é medido na interface entre a camada de Stern e a camada difusa (Figura 2.12). A camada de Stern é formada por contra-iões que anulam a carga da superfície em análise; os iões concentram-se perto da superfície e diminuem com o afastamento da mesma, formando então a camada difusa. Quando um eletrólito é forçado por pressão hidráulica, a fluir pela superfície da amostra sólida numa corrente de fluxo contínua este equilíbrio de cargas é quebrado, gerando o potencial zeta. Este potencial depende portanto do deslocamento de cargas na dupla camada originado pela passagem do fluxo.

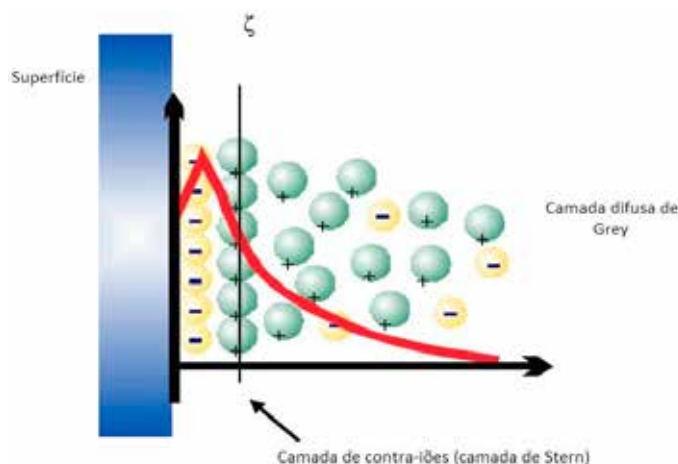


Figura 2.12 – Diagrama esquemático da dupla camada elétrica (camada de Stern) associada ao potencial zeta.

O potencial zeta foi medido com recurso a um analisador eletrocinético - o SuRPass, da Anton Paar (Figura 2.13) - e a medição efetuada com a célula “célula fechada” que avalia a corrente e permite o cálculo do potencial zeta (ζ) através da equação de Helmholtz – Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{dU}{dp} \times \frac{\eta}{\epsilon \times \epsilon_0} \times \frac{L}{A}$$

onde ζ é o potencial zeta, $\frac{dU}{dp}$ corresponde ao declive da “corrente de fluxo” versus pressão, η é a viscosidade do eletrólito, ϵ_0 a permissividade do vácuo, ϵ a constante dielétrica do eletrólito, L comprimento do canal e A é a secção transversal do canal. O eletrólito utilizado foi uma solução aquosa de KCl 1mM, com valor de pH @7 e foram efetuadas oito medições por cada superfície.



Figura 2.13 – Analisador eletrocinético SuRPass, da Anton Paar.

2.1.3.6. Caracterização da bioatividade - Formação de precipitados em solução de Hank

A interface dos biomateriais com as células é estabelecida após a formação de uma camada mineralizada bioativa na superfície dos materiais; só então as células aderem e proliferam. A capacidade de formar precipitados em meio aquoso é por isso importante para a avaliação de um bom desempenho biológico dos biomateriais.

A avaliação da bioatividade dos materiais *in vitro* é efetuada pela sua imersão em solução de Hank por um período de várias horas a dias e posterior avaliação e caracterização dos precipitados formados.

É usada uma solução de Hank com a seguinte composição (em g L⁻¹): NaCl – 8.00; CaCl₂ – 0.14; KCl – 0.40; NaHCO₃ – 0.35; Glucose 1.00; MgCl₂·6H₂O – 0.10; Na₂HPO₄·2H₂O – 0.60; KH₂PO₄ – 0.06; MgSO₄·7H₂O – 0.06. Os biomateriais são imersos na solução por períodos de horas a dias e intervaladamente é efetuada a avaliação e caracterização dos precipitados formados. A avaliação estrutural é mensurada com microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-5310 equipado com espectrómetro de dispersão de energia (EDS – Energy Dispersive Spectroscopy) pela deteção dos raios X emitidos, e permite simultaneamente a caracterização química dos elementos presentes.

2.1.3.7. Caracterização da dureza superficial: Nanoindentação

Tradicionalmente, o ensaio de dureza consiste na aplicação de uma carga na superfície de um material segundo a direção normal à mesma. Para tal é utilizado um indentador de um material duro, normalmente diamante. A dureza é definida como a razão entre a carga máxima aplicada e a área da indentação residual:

$$Dureza = \frac{P}{A} = \frac{P_{max}}{24,5h_c^2}$$

onde, P é a carga aplicada e A a área projetada (área de contacto ideal). Neste caso, a área é função da profundidade de contacto da indentação, h_c . Dependendo da gama de valores da carga máxima, existem ensaios de macro, micro e ultramicrodureza. Mais recentemente surgiu o ensaio de nanoindentação que permite a

utilização de cargas máximas inferiores a 1 mN. Para determinação da dureza de revestimentos ou filmes finos torna-se necessário utilizar cargas reduzidas de modo a evitar a influência do substrato, pelo que por vezes é necessário o recurso à técnica de nanoindentação.

Os ensaios de ultramicrodureza e nanoindentação são sensíveis à profundidade de indentação – ensaios dinâmicos de dureza - permitindo o traçado da curva carga-descarga, que representa a evolução da carga aplicada com a profundidade de indentação durante o ensaio. Esta curva é constituída por uma fase de carga seguida de uma fase de descarga. Entre estas fases é frequente proceder-se a um estágio de manutenção à carga máxima cuja finalidade é estabilizar a deformação induzida durante a carga. Na descarga também é comum a realização de um estágio de manutenção à carga mínima (ou a uma carga próxima desta) de modo a corrigir a deriva térmica do equipamento.

A partir dos ensaios dinâmicos de dureza é possível determinar através do método de Olivier e Pharr, não só a dureza, mas também o módulo de elasticidade reduzido. Posteriormente o módulo de elasticidade é calculado a partir do módulo reduzido, utilizando a seguinte equação:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu^2}{E} = \frac{1-\nu_i^2}{E_i}$$

onde, E e ν são, respetivamente, o módulo de elasticidade e o coeficiente de Poisson do material em estudo, representando E_i e ν_i as correspondentes constantes elásticas do material do indentador. O coeficiente de Poisson da maioria dos materiais situa-se entre 0,25 e 0,3, enquanto o módulo de elasticidade e o coeficiente de Poisson do diamante (indentador Vickers, Berkovich ou cónico) são 1140 GPa e 0,07, respetivamente.



Figura 2.14 – Equipamento para nanoindentação da Micro Materials com um indentador de diamante Berkovich (geometria piramidal triangular).

Neste trabalho, o comportamento mecânico dos filmes finos foi avaliado por nanoindentação utilizando um equipamento da Micro Materials com um indentador de diamante Berkovich (geometria piramidal triangular) (Figura 2.14). A carga máxima utilizada foi de 3 mN, mantida 5s antes de iniciar a descarga, e foram feitas cerca de 50 medições por amostra sob a forma de matriz (5x10) com uma distância de 10 mm entre cada ensaio. A carga máxima foi selecionada por forma a que a profundidade máxima de indentação não excedesse um décimo da espessura do filme, de modo a garantir que não havia influência do substrato.

2.1.4. Caracterização do potencial biológico: culturas celulares

2.1.4.1. As células

Foi utilizada a linha celular MG63 (ATCC® CRL-1427™) de células osteoblásticas humanas, derivadas de osteossarcoma (paciente do sexo masculino, caucasiano, com 14 anos de idade). De acordo com as indicações do laboratório, esta linha celular apresenta características hipotriplóides, com uma moda de 66 cromossomas em 44% da população celular. A percentagem de células com uma plóidia superior é inferior a 2%. Globalmente, entre 18 e 19 cromossomas são comuns a todas as células analisadas.

As populações celulares derivadas de tumores ósseos são frequentemente utilizadas na caracterização de materiais biomédicos que visam a aplicação no tecido ósseo. Permitem uma triagem biológica rápida e efectiva, com boa correlação com análises realizadas com células primárias. A linha celular MG63 apresenta a expressão de marcadores característicos do fenótipo osteoblástico e tem sido utilizada por rotina na caracterização de biomateriais e dispositivos biomédicos para aplicação e regeneração do tecidos ósseo.

Neste trabalho, todos os reagentes e primers utilizados para a caracterização por reação em cadeia da polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction) foram adquiridos, salvo alguma exceção devidamente mencionada à empresa Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As placas de cultura utilizadas foram adquiridas à empresa Corning (Corning, Corning, Nova Iorque, USA).

2.1.4.2. Caracterização da adesão celular

Para a caracterização da adesão celular, os materiais colonizados foram observados através de microscopia electrónica de varrimento. Previamente à observação no microscópio, as suerfícies das amostras foram revestidas com uma camada fina de ouro/paládio. As amostras foram então observadas num Microscópio Electrónico de Varrimento (Jeol JSM-6301F) e analisadas por espectroscopia de raios X de dispersão de energia (Voyager XRMA System, Noran Instruments).

2.1.4.3. Caracterização da proliferação celular

A proliferação/viabilidade celular foi determinada, de forma indireta, com a determinação da atividade metabólica das culturas celulares estabelecidas, através da quantificação da redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria num leitor ELISA (Denley Wellscan).

2.1.4.4. Caracterização da atividade osteoblástica

Atividade da fosfatase alcalina

Para avaliação da atividade osteoblástica procedemos à quantificação da atividade da fosfatase alcalina nas amostras colonizadas, através da quantificação em lisado celular e quantificação espectrofotométrica do

p-nitrofenol formado a 405 nm, num leitor ELISA (Denley Wellsan). Os resultados obtidos foram determinados em função de uma reta padrão construída com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol.

Expressão génica de marcadores osteoblásticos

Para a caracterização da expressão génica de genes relevantes na atividade osteoblástica, foi analisada a expressão dos seguintes genes: GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), fosfatase alcalina, BMP-2, colagénio tipo I, RANKL (*Receptor activator for nuclear factor kB ligand*) e osteoprotegerina (OPG). De cada amostra, foram utilizados 0,5 mg para a realização do PCR (Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polimerase). Os resultados obtidos foram normalizados para a expressão do gene *housekeeping* GAPDH.

Capítulo III. Estudio Experimental

3.1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVOS

Este trabalho experimental foi desenhado tendo como objetivos:

1. desenvolver e otimizar as condições de deposição para controlo das características dos filmes finos produzidos;
2. conseguir reprodutibilidade na deposição de filmes finos de TiZr de composição e estrutura controlada;
3. avaliar *in vitro* o potencial bioativo e o comportamento biológico dos filmes produzidos;
4. analisar a influência do teor de zircónio no comportamento biológico dos filmes testados.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Preparação dos substratos

3.2.1.1. Substratos

Foram utilizados vários tipos de substrato em forma de disco.

- i) Substratos de titânio comercialmente puro, cpTi, grau 4, polidos desde a lixa de 500 até à lixa de 2400 na escala de Mesh, com suspensão de diamante de 3 μm e 1 μm , sucessivamente e, acabamento com suspensão de sílica coloidal (OP-S).
- ii) Substratos de aço inoxidável 316L polidos desde a lixa de 500 até 4000 na escala de Mesh, sendo acabados em suspensão de diamante de 1 μm .
- iii) Substratos de cp Ti grau 4 com superfície jateada e atacada com ácido, segundo o procedimento patenteado pela Straumann® como SLA® – Sandblasted, Large grit, Acid etched, fornecidos pela marca (cp Ti SLA®).
- iv) Substratos de liga de titânio (Ti) e zircônio (Zr), TiZr ou Roxolid®, com superfície SLA® fornecidos pela marca (TiZr).
- v) Substratos de silício, utilizados em todas as deposições para medição da espessura do filme.

Todos os substratos foram usados com a forma de disco com 16 mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

O cp Ti grau 4 utilizado neste trabalho e o aço 316L foram adquiridos à Goodfellow em varão (16 mm de diâmetro) e posteriormente cortados com cerca de 1 mm de espessura. O cp Ti SLA e o TiZr foram gentilmente cedidos pela Straumann já em forma de disco e com tratamento de superfície (SLA) numa face.

Todos os substratos foram limpos em banhos de ultrassons, sucessivamente em acetona e álcool, e posteriormente secos em corrente de ar quente. Nos substratos de silício foi colocada uma gota de nitreto de boro de modo a permitir a medição da espessura do filme.

O estudo foi dividido em etapas cumulativas e preparatórias da etapa seguinte; na figura 3.1 é apresentado o esquema geral do estudo.

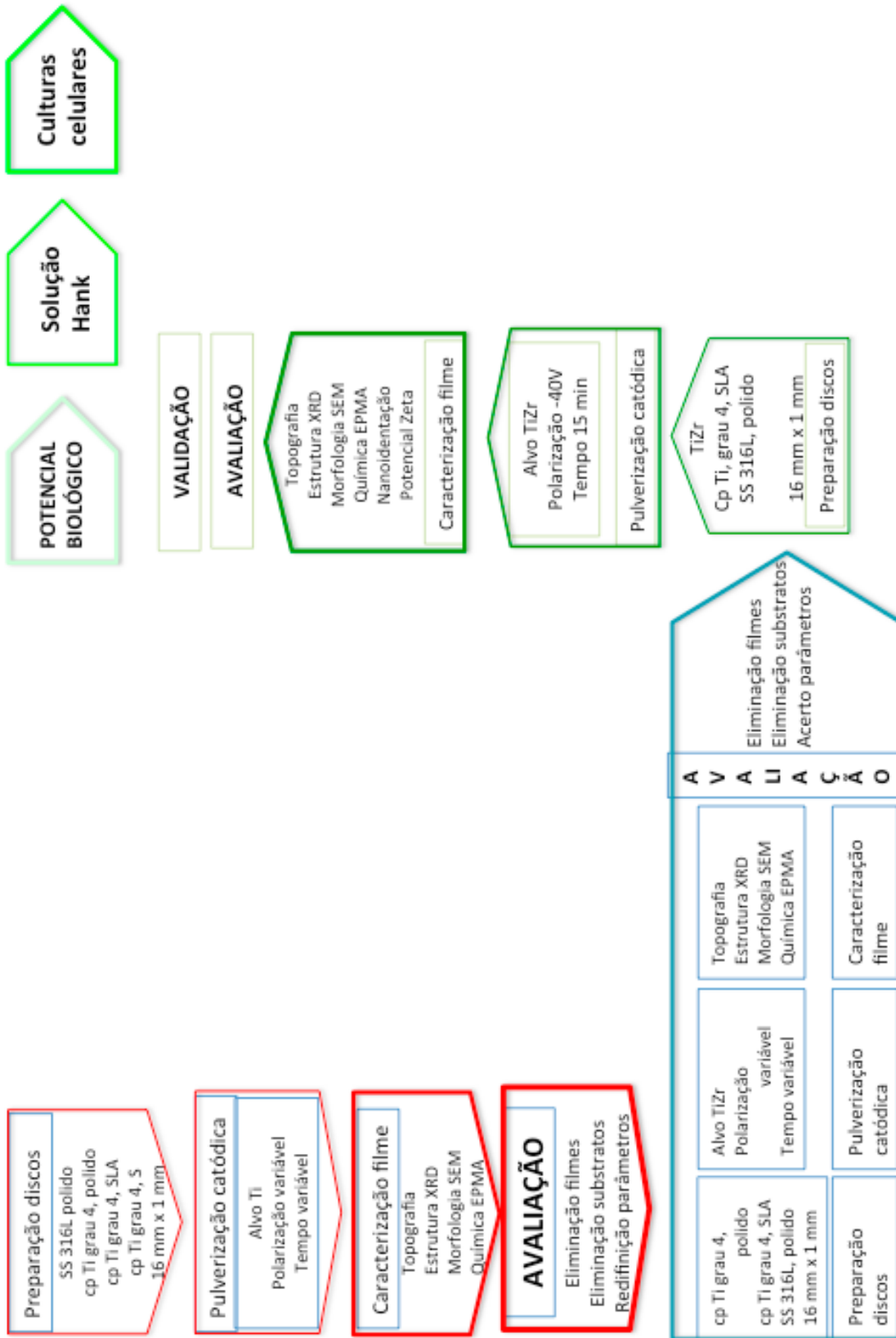


Figura 3.1 – Esquema ilustrativo das etapas de trabalho do estudo *in vitro*.

3.2.1.2. Alvos

Na deposição dos filmes finos foi utilizado um alvo de titânio puro com pastilhas de zircônio, em número variável, coladas na zona de maior erosão do alvo, de modo a obter a composição química pretendida. O alvo de Ti, com grau de pureza de 99,99%, tem 150 mm de largura, 150 mm de comprimento e 4 mm de espessura. As pastilhas de zircônio (insertes) utilizadas são circulares com 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, aproximadamente (Figura 3.2).

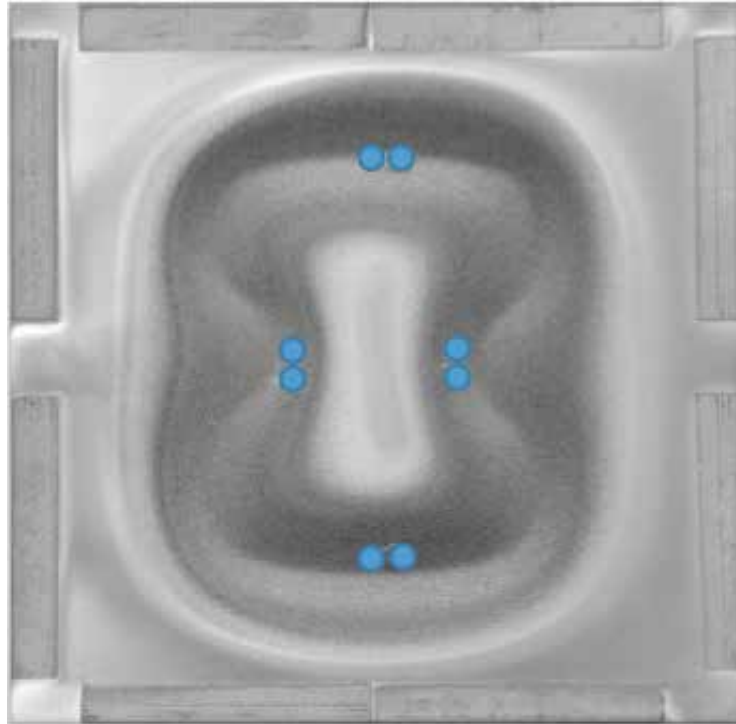


Figura 3.2 – Alvo de Ti e representação por desenho do posicionamento das pastilhas de Zr para utilização como alvo composto.

3.2.2. Procedimento de deposição por pulverização catódica

Após seleção dos materiais a utilizar, os filmes de TiZr foram depositados sobre os respectivos substratos por pulverização catódica magnetron em corrente contínua. O equipamento utilizado foi um protótipo semi-industrial da empresa Hartec (Oerlikon Balzers Hartec GmbH, Stetten, Alemanha) .

Todos os substratos foram sujeitos a limpeza em ultrassons em banhos de acetona e álcool sucessivamente, sendo de seguida colados no porta-substratos de cobre que será colocado dentro da câmara de deposição. Os substratos foram colocados no interior da câmara de modo a que a distância entre o alvo e o substrato seja, aproximadamente 65 mm. A câmara foi selada para a realização do vácuo primário com o auxílio da bomba primária. Só quando foram atingidas pressões da ordem dos 30 Pa foi aberta a válvula da bomba secundária. Em conjunto, as duas permitem que se atinja uma pressão de 5×10^{-4} Pa, momento a partir do qual é introduzido argon na câmara, até uma pressão de $1,5 \times 10^{-1}$ Pa. Após a introdução do gás inerte, procedeu-se à limpeza dos substratos. Esta consistiu em, através do canhão de iões, aquecer os substratos por bombardeamento eletrónico e realizar um ataque iónico por iões Ar^+ (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Condições de Limpeza dos substratos e Condições Gerais de Deposição.

	Limpeza		Deposição
	Aquecimento	Ataque iônico	Alvo TiZr
Pressão (Pa)	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	3×10^{-1}
Densidade de potência (Wmm^{-2})	-	-	$6,2 \times 10^{-2}$
Distância alvo-substrato (mm)	-	-	65
Polarização substratos (V)	0 a 70	-40 a -50	-40 a -100
Duração (min)	8	2	7 a 30
Rotação porta substratos (rpm)		23	

Desligado o canhão de iões, foram realizadas várias deposições em modo não reativo, a uma pressão de 3×10^{-1} Pa e aplicando uma potência de 1500 W no alvo (150 x 150 mm). Foram usados vários tempos de deposição (diferentes espessuras) e/ou diferentes números de pastilhas Zr (diferentes teores de zircônio), variando a polarização do substrato de -40V a -100V.

3.2.3. Caracterização da superfície

A morfologia da superfície dos discos de cpTi SLA, de TiZr e dos filmes finos depositados foi observada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) com microscópio JEOL JSM-5310 (JEOL, Akishima-Shi, Tóquio, Japão) equipado com sistema EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) EDAX, utilizando uma tensão de aceleração do feixe electrónico de 10 kV. Algumas amostras foram analisadas num microscópio de emissão de campo de alta resolução ou cátodo frio FEI Quanta 400FEG ESEM (FEI, Hillsboro, Oregon, USA).

A estrutura cristalina dos filmes foi avaliada por difractometria de raios X num difractómetro PHILIPS modelo X'Pert (Philips, Amesterdão, Holanda) com goniómetro PW 3020/00, sob uma tensão de 40 kV e uma corrente de 35 mA de intensidade.

A composição química dos filmes foi avaliada por microsonda electrónica (EPMA – Electron Probe MicroAnalysis) CAMECA, modelo Camebax SX50 (CAMECA SAS, Gennevilliers Cedex, França), equipado com um microscópio electrónico de varrimento e dois espectrómetros por dispersão angular de comprimento de onda, de quatro canais cada.

A análise da topografia dos filmes incluiu a medição da rugosidade em perfil (2D) e a medição da sua distribuição espacial (3D). Para isso foram usados um rugosímetro Perthen S4P (Mahr GmbH, Gottingen, Alemanha) na análise topográfica 2D e um microscópio ótico 3D de elevada resolução para a análise 3D; as medições foram efetuadas em três amostras de cada superfície (filme) e cinco medições foram efetuadas em cada amostra segundo o esquema da figura esquema medir Microscópio ótico de focagem infinita.

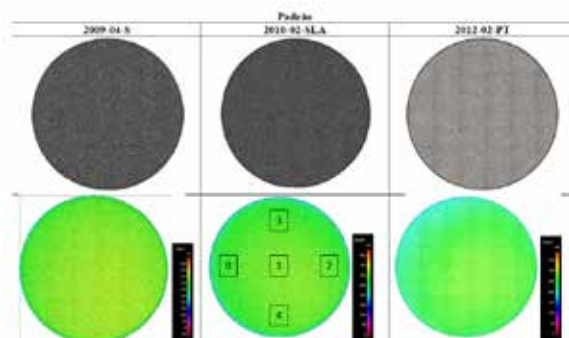


Figura 3.3 – Disposição das áreas e seqüência de medição por amostra durante a análise da topografia da superfície.

A carga eléctrica da superfície foi analisada por medição do potencial electrocinético ou potencial zeta (ζ) da superfície com um analisador electrocinético, o SuRPass, da Anton Paar (Anton-Paar, Graz, Áustria); a medição foi efetuada com a célula “célula fechada” com uma solução aquosa de KCl 1mM de pH @7 como electrólito; foram usadas duas amostras de cada superfície e efectuadas oito medições por cada amostra.

3.2.4. Avaliação da bioatividade *in vitro*

Para avaliar a capacidade das superfícies para formar precipitados de fosfato de cálcio, as amostras (discos de cp Ti SLA, discos de TiZr e discos com filmes depositados) foram imersas em 30 ml de solução de Hank num frasco selado a um pH @ 7.4 e 37° C por 3, 7 e 28 dias. Depois da imersão as amostras foram lavadas em água destilada e secas ao ar. A formação de precipitados foi observada com SEM (JEOL JSM-5310) equipado com espectrómetro de dispersão de energia (EDS) através da deteção dos raios X emitidos que permitiu a simultaneamente a qualificação química e quantificação dos precipitados formados.

3.2.5. Cultura Celular

Foi utilizada a linha celular MG63 (ATCC® CRL-1427™) de células osteoblásticas humanas, derivadas de osteossarcoma.

As células Mg-63 foram cultivadas no meio de cultura α -Minimal Essential Medium (α -MEM) (GIBCO Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen), 50 mg/ml de ácido ascórbico, 2,5 μ g/ml de fungizona (GIBCO Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), 100 IU/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomina (GIBCO Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA).

As culturas foram mantidas numa incubadora à temperatura constante de 37 °C, numa atmosfera húmida de 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de cultura, com a composição acima referenciada, foi mudado duas vezes por semana.

Inicialmente, as culturas foram mantidas até próximo da confluência (entre 70 a 80% de confluência), altura em que foi efetuada a subcultura. Esta foi realizada após libertação enzimática da camada celular aderida (tratamento com uma solução de 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase tipo I).

Seguidamente, a suspensão celular obtida foi utilizada para efetuar a subcultura na superfície das amostras analisadas. Foram usadas amostras de cp Ti SLA, amostras de TiZr e amostras com os filmes TiZr. As células foram cultivadas a uma densidade de 5x10⁴ células/cm², tendo sido mantidas as condições de cultura (composição do meio de cultura e composição do microambiente) referenciadas previamente.

Os materiais colonizados foram mantidos em cultura durante 7 dias. O comportamento das culturas estabelecidas foi caracterizado relativamente à adesão celular à superfície do material, à morfologia celular, à proliferação celular e ao padrão de crescimento. Relativamente à expressão de marcadores característicos do fenótipo osteoblástico, nomeadamente a expressão da fosfatase alcalina e a expressão de genes característicos da linhagem osteoblástica foram efetuados marcadores osteoblásticos para a expressão génica.

A adesão celular foi caracterizada às 24 horas de cultura; a proliferação celular foi avaliada aos dias 1, 4 e 7 de cultura; a expressão da fosfatase alcalina foi avaliada aos dias 4 e 7 e a expressão dos genes característicos do fenótipo osteoblástico foi realizada aos 7 dias de cultura.

3.2.6. Caracterização da adesão celular

Para a caracterização da adesão celular, os materiais colonizados foram observados através de microscopia electrónica de varrimento. Assim, nos tempos de cultura adequados, os materiais colonizados foram lavados com solução de fosfato tamponada – PBS (Phosphate Buffer Solution), e fixados numa solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,14 M, durante 10 minutos.

Os materiais foram seguidamente desidratados em álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), e submetidos a secagem por ponto crítico. Previamente à observação no microscópio, as superfícies das amostras foram revestidas com uma camada fina de ouro/paládio. As amostras foram então observadas num Microscópio Electrónico de Varrimento (Jeol JSM-6301F, JEOL, Akishima-Shi, Tóquio, Japão) e analisadas por espectroscopia de raios X de dispersão de energia (Voyager XRMA System, Noran Instruments Inc, Fitchburg, WI, USA).

3.2.7. Caracterização da proliferação celular

A proliferação/viabilidade celular foi determinada, de forma indireta, com a determinação da atividade metabólica das culturas celulares estabelecidas, através da quantificação da redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, que resulta na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células.

Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria.

Neste trabalho, para determinação da atividade metabólica, foi adicionada uma solução aquosa de MTT (10 mg/L) ao meio de cultura, e foi incubada durante 4 horas. Seguidamente foi adicionado DMSO para promover a solubilização dos cristais obtidos e foi realizada a leitura a 550 nm, num leitor ELISA (Denley Wellscan).

3.2.8. Caracterização da atividade osteoblástica

Atividade da fosfatase alcalina

Para a quantificação da atividade da fosfatase alcalina nas amostras colonizadas, a superfície das amostras foi lavada duas vezes com PBS, e a camada celular foi lisada através da adição de Triton a 1%, a 37°C, durante 1 hora.

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada através da hidrólise do p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino (30 min, 37°C) e quantificada pela espectrofotometria do p-nitrofenol formado a 405 nm, num leitor ELISA (Denley Wellscan). Os resultados obtidos foram determinados em função de uma reta padrão construída com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol.

Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido, por minuto, por micrograma de proteína (nmol/min.µg proteína). Para a realização desta normalização, a quantidade de proteína total em cada amostra foi determinada pelo método de Lowry. Este método baseia-se na reação dos aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina) com o reagente de Folin-Ciocalteu, após tratamento com uma solução alcalina. O produto obtido apresenta uma coloração azul e é proporcional à quantidade de proteína total da amostra. Procedeu-se, de seguida, à determinação espectrofotométrica da amostra – a absorvância foi determinada a 750 nm num espectrofotómetro de fluxo contínuo (JENWAY 6405). Os valores obtidos foram determinados em função de uma reta padrão construída com uma série de padrões de albumina sérica bovina.

Expressão gênica de marcadores osteoblásticos

No que se refere à caracterização da expressão gênica de genes relevantes na atividade osteoblástica, foi analisada a expressão dos seguintes genes: GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), fosfatase alcalina, BMP-2, colágeno tipo I, RANKL (*Receptor activator for nuclear factor κ B ligand*) e osteoprotegerina (OPG).

Para a sua determinação, as amostras colonizadas foram lavadas com Phosphate Buffered Solution (PBS). Seguidamente procedeu-se à extração do RNA com o kit Mini Kit RNeasy® (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado e a sua pureza foi determinada através da determinação da absorvância das amostras a 260 e 280 nm, respetivamente. De cada amostra, foram utilizados 0,5 mg para a realização do Polimerase Chain Reaction (PCR). A amostra inicial foi amplificada durante 25 ciclos com o sistema Titan One Tube RT-PCR System (Roche), tendo sido utilizada uma temperatura de *annealing* de 55°C. Os produtos obtidos foram corridos num gel de agarose a 1% e fotografados com equipamento fotográfico digital. As imagens obtidas foram analisadas no software Image J e a intensidade das bandas obtidas foi quantificada por densitometria. Os resultados obtidos foram normalizados para a expressão do gene *housekeeping* GAPDH. Utilizaram-se as sequências de primers constantes na tabela seguinte:

GADPH	<i>Forward primer</i>	5'-CAGGACCAGGTTACCAACAAGT-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACTGT-3'
ALP	<i>Forward primer</i>	5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3'
COL I	<i>Forward primer</i>	5'-TCCGGCTCCTGCTCCTCTTA-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-ACCAGCAGGACCAGCATCTC-3'
BMP-2	<i>Forward primer</i>	5'-GCAATGGCCTTATCTGTGAC-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-GCAATGGCCTTATCTGTGAC-3'
OPG	<i>Forward primer</i>	5'-AAGGAGCTGCAGTACGTCAA-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-CTGCTCGAAGGTGAGGTTAG-3'
RANKL	<i>Forward primer</i>	5'-GAGCGCAGATGGATCCTAAT-3'
	<i>Reverse primer</i>	5'-TCCTCTCCAGACCGTAACTT-3'

3.2.9. Procedimentos analíticos e estatísticos

Os resultados apresentados neste trabalho, relativamente à avaliação biológica das amostras desenvolvidas, são resultado de experiências independentes, realizadas com três culturas distintas. Verificou-se, através da análise de variância (MANOVA), a não existência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), entre as três experiências realizadas.

As amostras dos materiais utilizados foram preparadas como descrito anteriormente. Para a avaliação das culturas estabelecidas foram utilizadas 5 amostras por condição experimental. Para a análise quantitativa os resultados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão; para a análise de comparação entre os grupos experimentais a avaliação foi feita pelo método estatístico MANOVA, para um valor de significância de $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

Os filmes de titânio e filmes de titânio e zircônio com diferentes teores de zircônio foram depositados sobre vários substratos por pulverização catódica magnetrão, variando alguns parâmetros (o tempo e a temperatura de deposição, ou a polarização do substrato).

3.3.1. Composição Química, Morfologia e Estrutura

3.3.1.1. Filmes de titânio

Numa primeira fase (Figura 3.4), foram depositados filmes de titânio puro sobre vários substratos, com o intuito de revestir superfícies polidas a diamante, mas também superfícies jateadas e atacadas com ácido (SLA). Para tal, foram produzidos filmes com 1 e 2 μm de espessura, variando o tempo de deposição (Tabela 3.2).

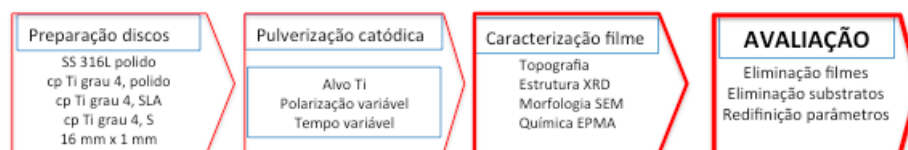


Figura 3.4 – Esquema ilustrativo das etapas da fase I do estudo.

Tabela 3.2 – Condições de Limpeza dos substratos e Condições Gerais de Deposição.

	Limpeza		Deposição
	Aquecimento	Ataque iónico	Alvo TiZr
Pressão (Pa)	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	3×10^{-1}
Densidade de potência (Wmm^{-2})	-	-	$6,2 \times 10^{-2}$
Distância alvo-substrato (mm)	-	-	65
Polarização substratos (V)	0 a 70	-40 a -50	-40 a -100
Duração (min)	8	2	7 a 30
Rotação porta substratos (rpm)	23		

A análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM) permitiu observar a morfologia da secção transversal e da superfície dos filmes de titânio, evidenciado nas micrografias superficiais da figura 3.5 e da figura 3.6, onde é igualmente visível a topografia dos substratos. Observa-se também o crescimento colunar do filme fino e pode-se confirmar os valores de espessura determinados por perfilometria de 1 e 2 μm respetivamente, em função da variação do tempo de deposição.

Na figura 3.7 e na figura 3.8 é visível a superfície dos filmes depositados sobre titânio polido a diamante; a superfície é homogénea, constituída por pequenos aglomerados globulares de dimensão submicrométrica com muito pouca porosidade visível.

Na figura 3.9 são apresentadas micrografias da superfície de cp Ti grau 4 com tratamento SLA e da superfície de filme fino de Ti de 2 μm de espessura depositado sobre substratos de cp Ti grau 4 com tratamento SLA, respetivamente. O filme fino deposita-se preferencialmente a partir dos microporos existentes formando aglomerados de forma esférica.

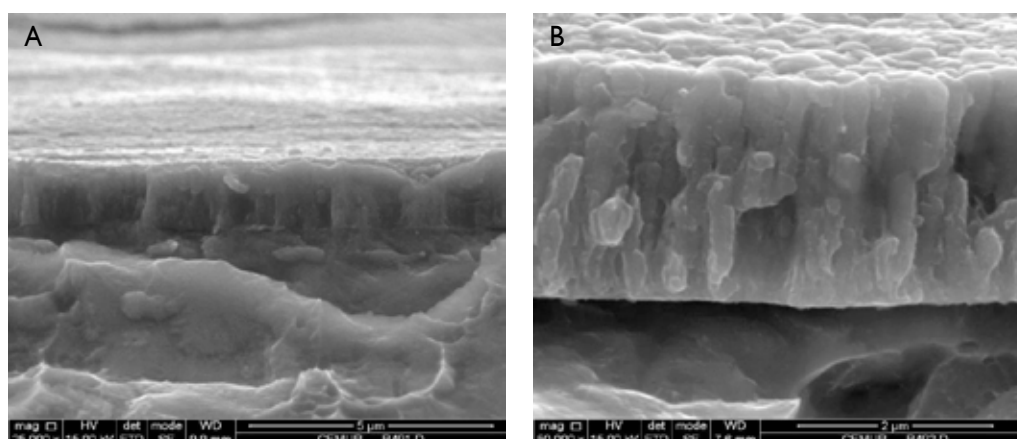


Figura 3.5 – Micrografias da secção transversal de filmes de titânio de (A) 1 e (B) 2 μm depositados sobre titânio polido a diamante.

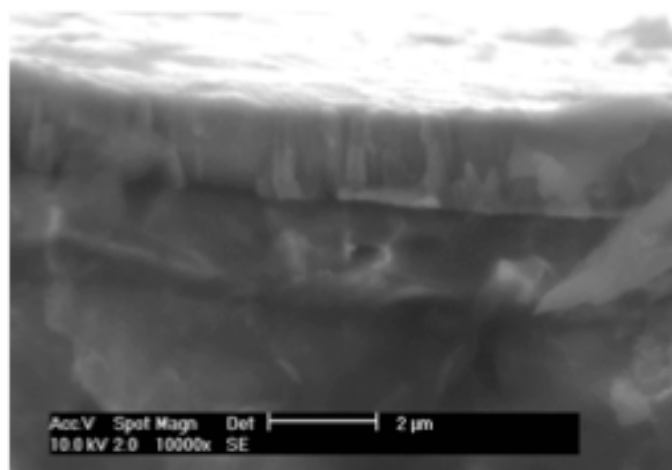


Figura 3.6 – Micrografia da secção transversal de filme de TiZr de 1 μm depositados sobre titânio polido a diamante.

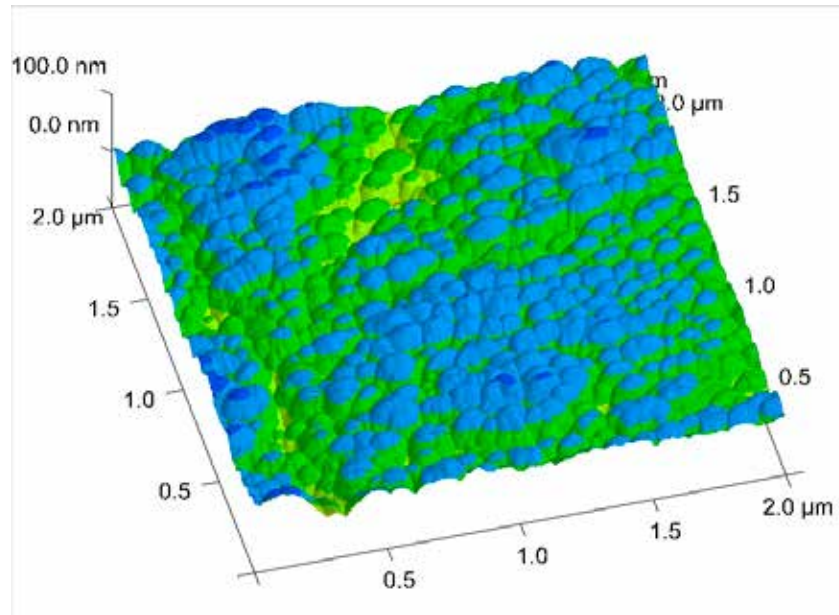


Figura 3.7 – Representação em diagrama da superfície do filme fino de TiZr de 1 μm depositado sobre titânio polido a diamante após análise por AFM.

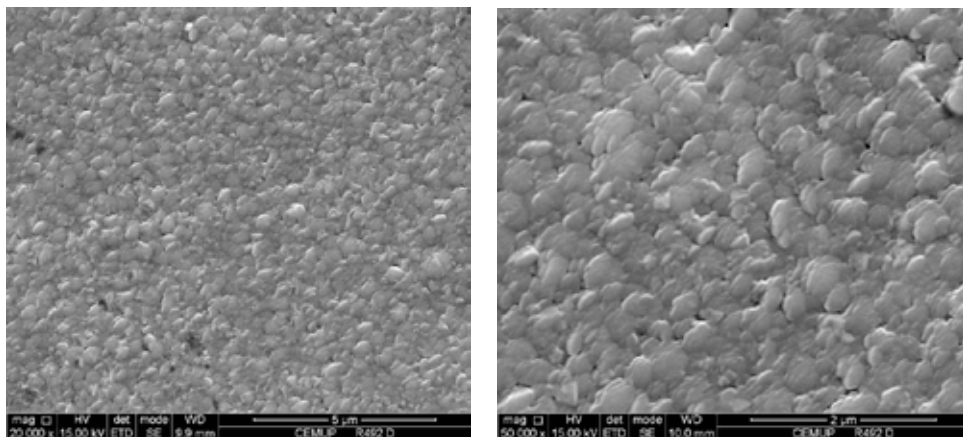


Figura 3.8 – Micrografias superficiais do filme de titânio de 2 μm depositado sobre titânio polido a diamante

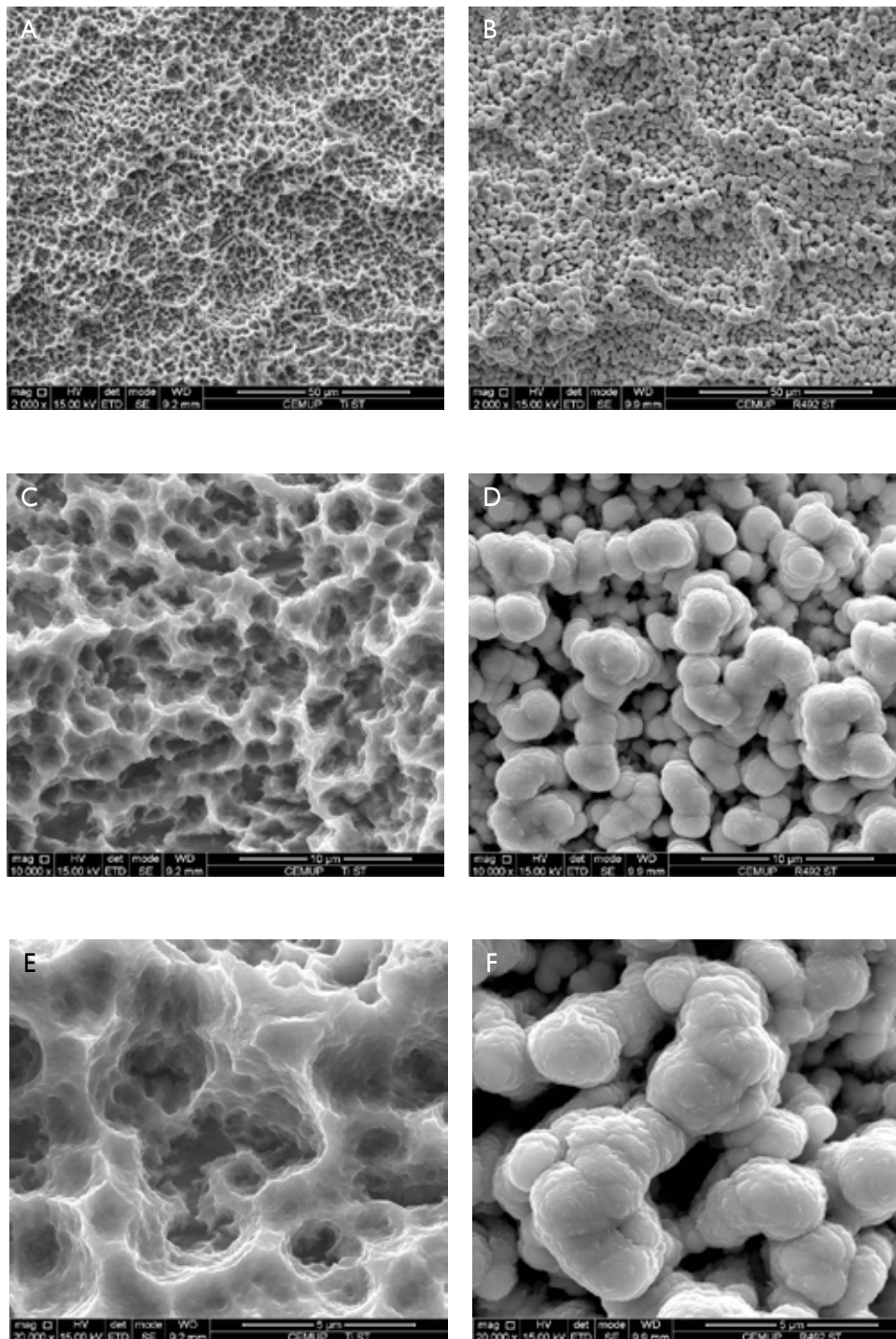


Figura 3.9 – Micrografias superficiais do Ti SLA ((A), C) e E); Micrografias superficiais do filme de titânio de 2 μm depositado sobre discos de titânio SLA (B), D) e F)).

Na figura 3.10 são apresentadas micrografias do filme fino de 1 μm depositado sobre discos de titânio SLA. A redução de espessura permitiu uma mimetização mais aproximada da superfície SLA original.

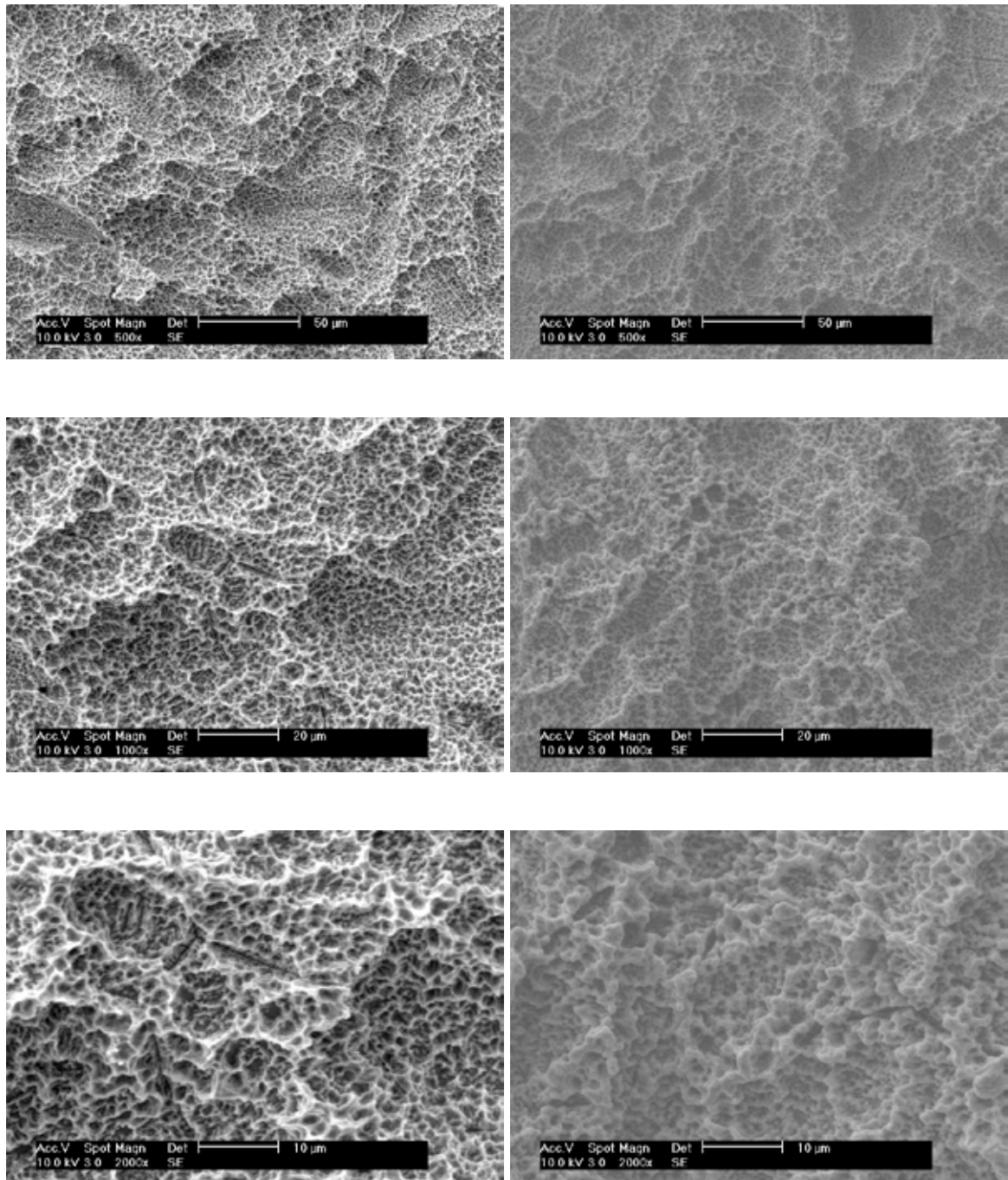


Figura 3.10 – Micrografias superficiais do Ti SLA e do filme de titânio de 1 μm depositado sobre discos de titânio SLA.

3.3.1.2. Filmes Ti-Zr

Filmes com diferentes teores de zircônio (Figura 3.11), em função do número de pastilhas de zircônio coladas no alvo de titânio, foram depositados sobre discos de titânio (grau 4) e de aço inox 316L, polidos a diamante, com rugosidade média (R_a) próximo de 0,04 μm.

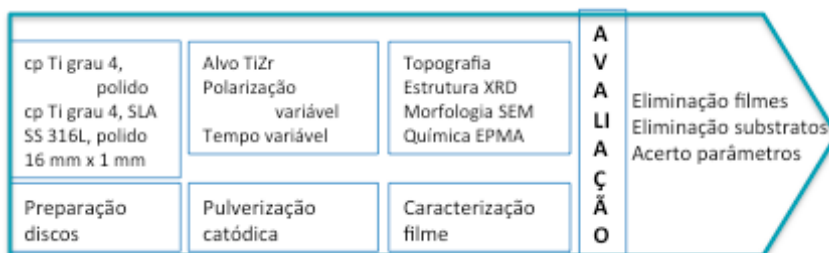


Figura 3.11 – Esquema ilustrativo das etapas da fase 2 do estudo.

No gráfico pastilhas vs teor zr e na tabela 15 são apresentados o teor de zircônio e o zircônio em peso atômico, respetivamente, em função do número de pastilhas/insertes de zircônio no alvo de titânio, após avaliação da composição química por microsonda electrónica (EPMA) em filmes com espessura > 1,5 µm.

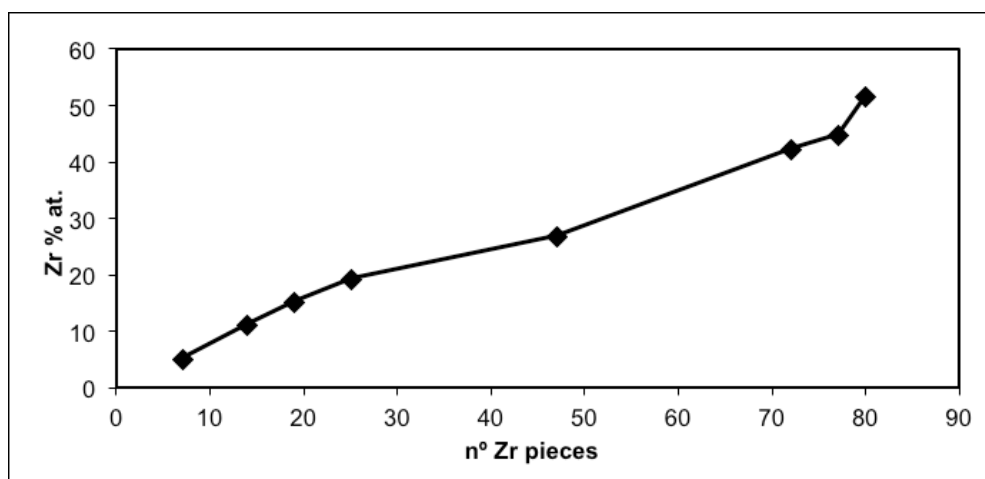


Gráfico 3.1 – Teor de zircônio (%at.) nos filmes finos TiZr depositados por pulverização catódica em função do número de pastilhas inseridas no alvo de Ti.

Tabela 3.3 – Teor de zircônio (wt%/at.) nos filmes finos TiZr depositados por pulverização catódica em função do número de pastilhas inseridas no alvo de Ti.

Deposição	Nº de pastilhas	Teor Zr [Wt%/At%]	Substratos	Espessura [µm]	XRD
R407	7	9,7 / 5,1	AA 304; Si	1,5	Não
R408	14	19,8 / 11,2	2 AA 304; Si	1,8	Sim
R409	20	26,0 / 15,3	2 AA 304; Si	1,6	Não
R410	26	32,1 / 19,2	2 AA 304; Si	1,85	Sim
R420	47	41,0 / 26,7	AA 304; Si	2,0	Não
R421	72	58,9 / 42,4	AA 304; Si	2,1	Não
R422	78	59,5 / 43,3	12 Ti-6Al-4V; AA; Si	2,4	Sim
R423	78	61,0 / 45,0	14 Ti-6Al-4V; Si	2,9	Não
R424	80	64,8 / 51,0	2 Ti-6Al-4V; 2AA; Si	1,6	Não

A composição química equiatômica dos filmes seria alcançada usando 80 pastilhas. Para os nossos propósitos a percentagem pretendida ronda os 15% de Zr o que foi conseguido usando 11 pastilhas no alvo. A tabela 3.3 apresenta a composição química dos filmes TiZr (wt%) e o correspondente número de pastilhas usados na deposição.

Tabela 3.4 – Composição química de filmes finos Ti-Zr (% pd.).

	O	Ti	Zr
Ti20Zr (14 pastilhas Zr)	2,0 ± 0,11	78,9 ± 0,51	20,4 ± 0,25
Ti14Zr (10 pastilhas Zr)	1,6 ± 0,10	85,5 ± 1,15	13,7 ± 0,21
Ti15Zr (11 pastilhas Zr)	2,0 ± 0,18	86,0 ± 0,48	14,7 ± 0,12

A estrutura cristalina dos filmes foi avaliada por difração de raios X em filmes depositados sobre aço inox 316L, de modo a distinguir mais facilmente os picos relativos ao filme fino e ao substrato. Na figura 3.12 é representado o difractograma de raios X dos filmes TiZr com diferentes teores de Zr. Os picos correspondentes ao aço inox são identificados com “S”, os restantes picos correspondem à fase α , hexagonal compacta, de baixa temperatura. Não se regista qualquer indício da fase β de alta temperatura, porque a temperatura de deposição é bastante inferior à temperatura de transição $\alpha - \beta$.

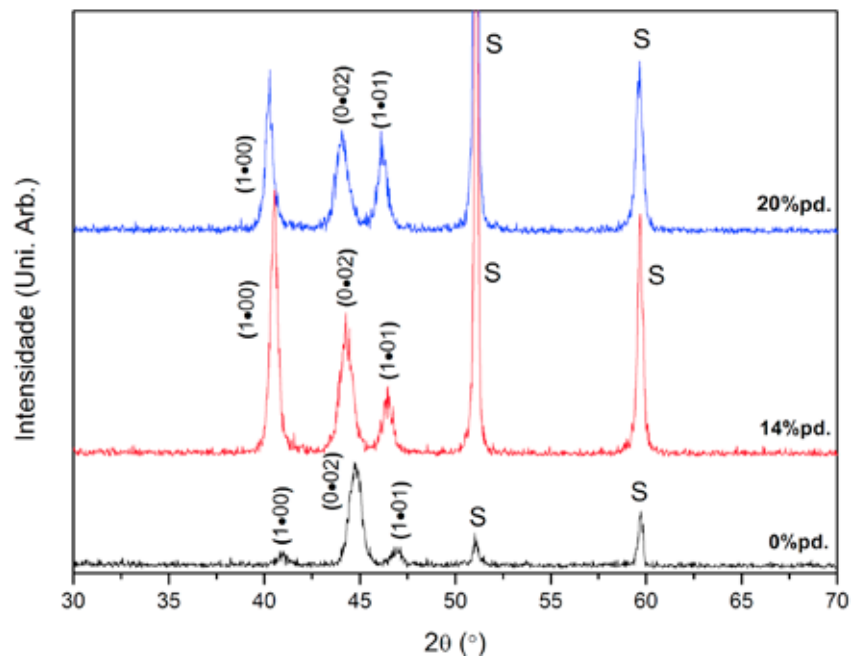


Figura 3.12 – Difractogramas de raios X dos filmes depositados sobre aço em função do teor de zircónio.

A avaliação em SEM dos filmes Ti15Zr com 1 μm de espessura mostra uma morfologia bastante aproximada à do substrato de cp Ti grau 4 SLA, ainda que se note algum “apagamento” da mesma (Fig 3.13).

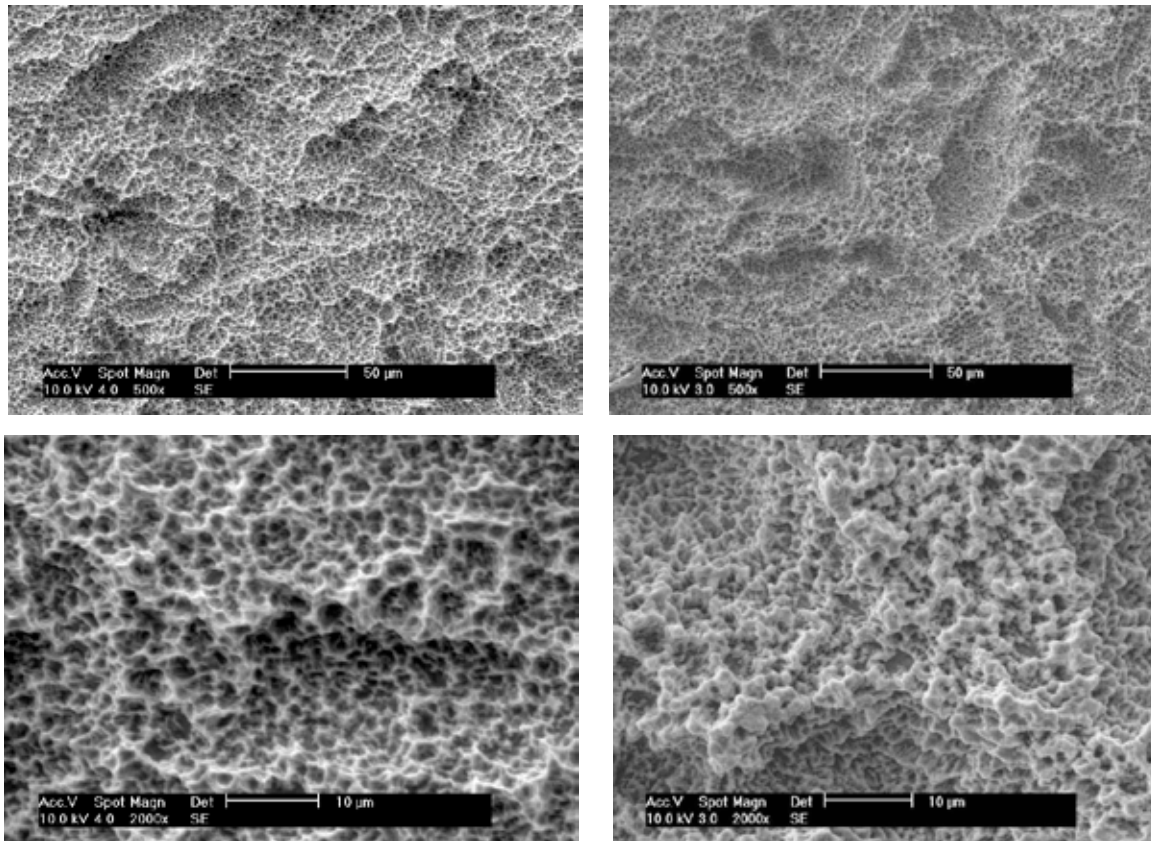


Figura 3.13 – Micrografias superficiais do Ti SLA e do filme Ti15Zr de 1 µm depositado sobre Ti SLA.

As análises de espectroscopia de dispersão de energia, utilizando o sistema EDS acoplado ao SEM na zona dos picos e vales mais profundos, revelou a presença de zircônio, mesmo nos vales mais profundos (mínimo cerca de 6 % pd.), o que corresponde ao revestimento da totalidade da superfície. Nos picos, como seria de esperar, a quantidade de zircônio encontrada é maior e próxima da determinada por EPMA (Figura 3.14 e Figura 3.15).

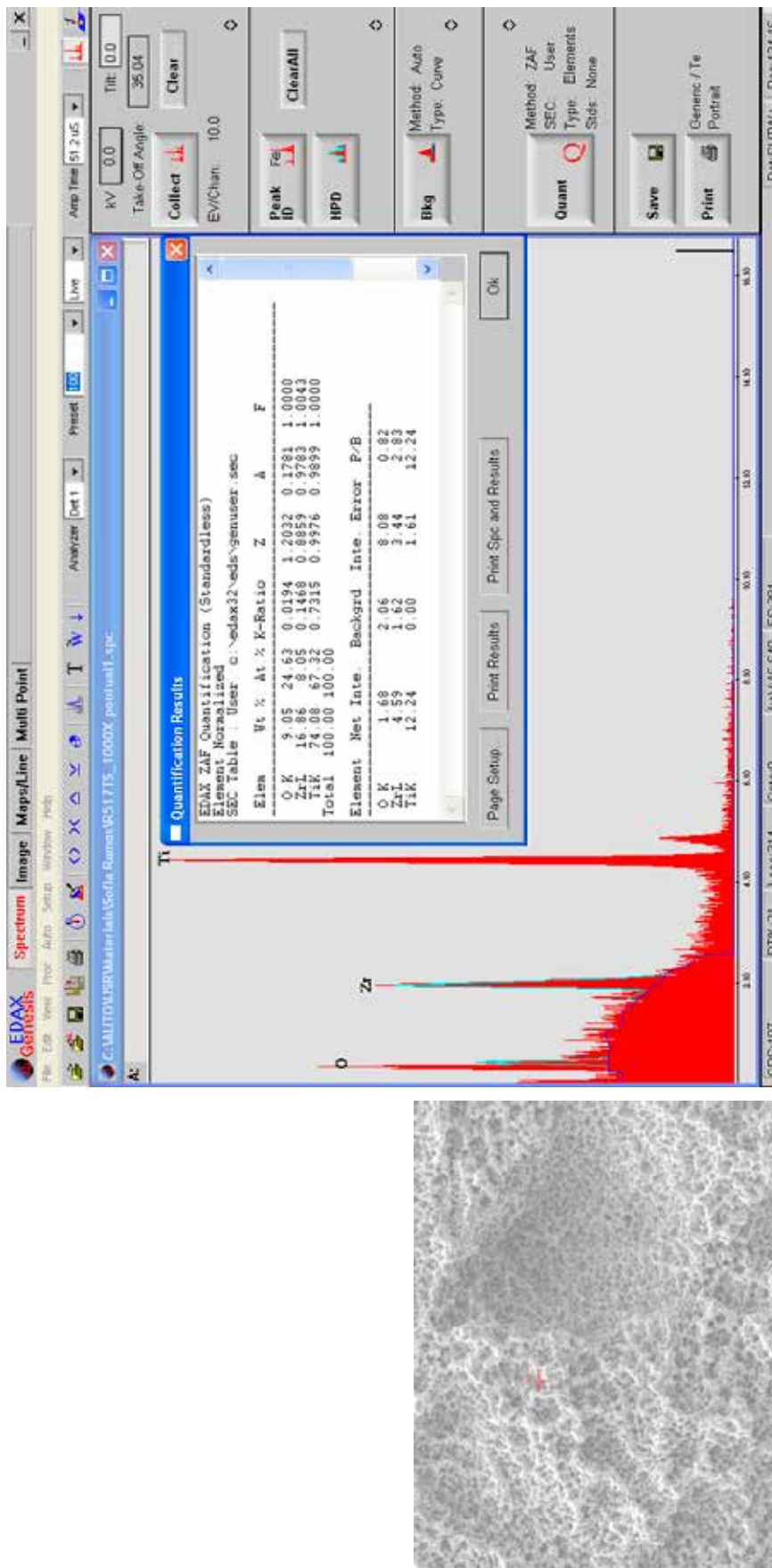


Figura 3.14 – Micrografias do filme Ti15Zr com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS e espectro resultante; composição química registrada numa zona de um pico.

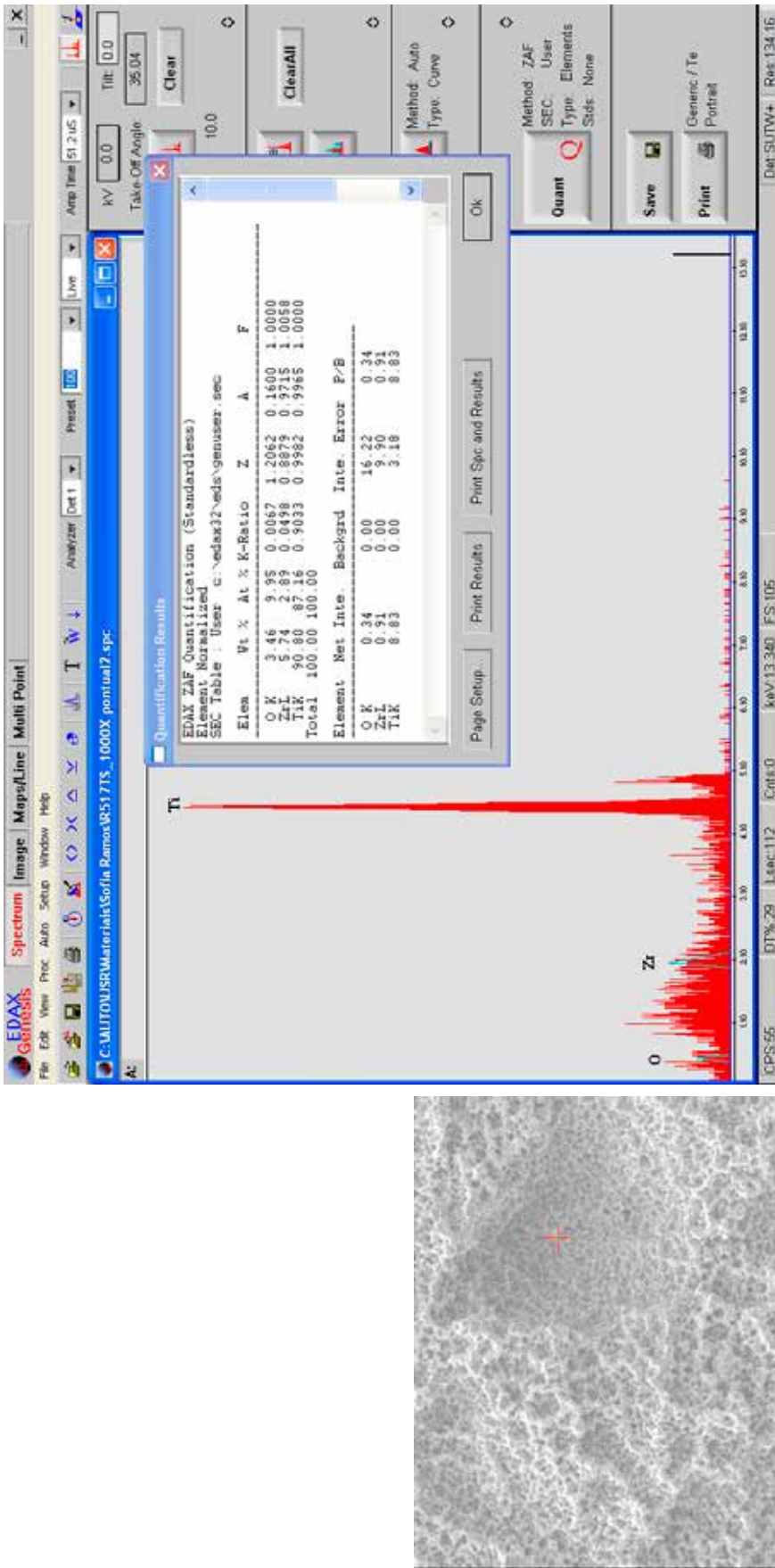


Figura 3.15 – Micrografias do filme Ti|5Zr com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS e espectro resultante; composição química registrada numa zona de um vale.

3.3.1.3. Variação dos parâmetros de deposição

A polarização dos substratos (V_s) promove o bombardeamento do filme fino em crescimento, conferindo maior energia aos adátomos. Na figura Filme Ti15Zr 70V são apresentadas micrografias SEM do filme Ti15Zr, com a polarização alterada para -70V. A morfologia é alterada com a formação de aglomerados característicos visíveis em toda a superfície e sem alteração significativa da composição (Figura 3.16, Figura 3.17 e Tabela 3.5).

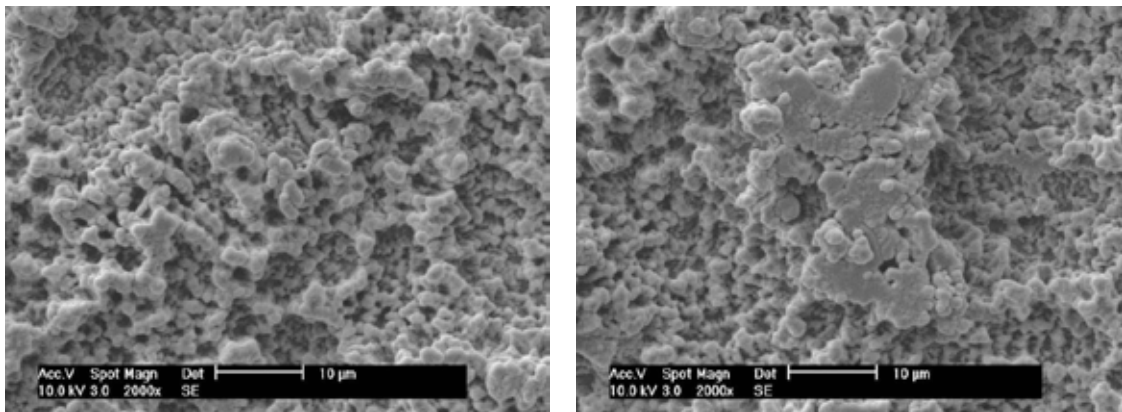


Figura 3.16 – Micrografias superficiais do filme fino Ti15Zr depositado sobre Ti SLA ($V_s = -70V$).

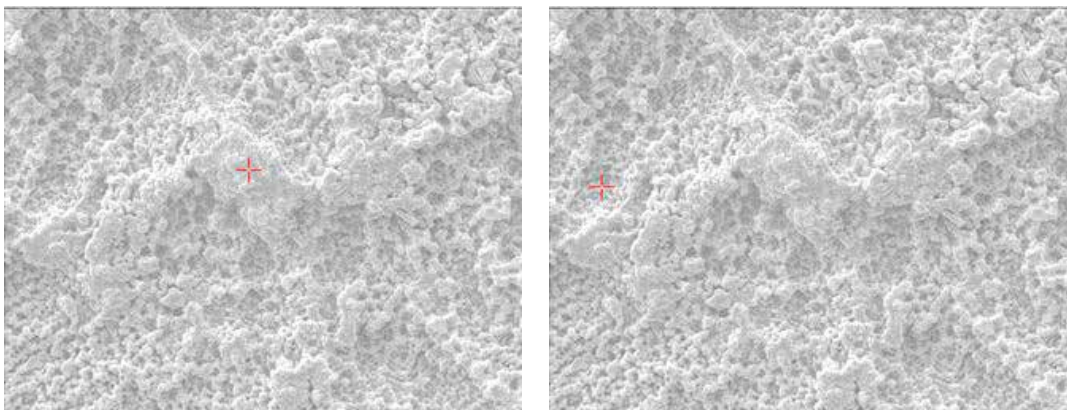


Figura 3.17 – Micrografias do filme fino Ti15Zr ($V_s = -70V$) com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS.

Tabela 3.5 – Composição química do filme fino Ti15Zr ($V_s = -70V$) avaliada por EDS (% wt.).

	O	Ti	Zr
Ponto 1 (aglomerado)	8	75	17
Ponto 2	11	72	17

A alteração do porta-substratos de cobre para um porta-substratos de aço proporcionou um aumento de temperatura durante a deposição e produziu os filmes da figura 3.18. É notório nestas imagens o aparecimento de aglomerados pequenos e fissuras (ainda que não sejam características apenas destes filmes, pois são visíveis também em cp Ti SLA).

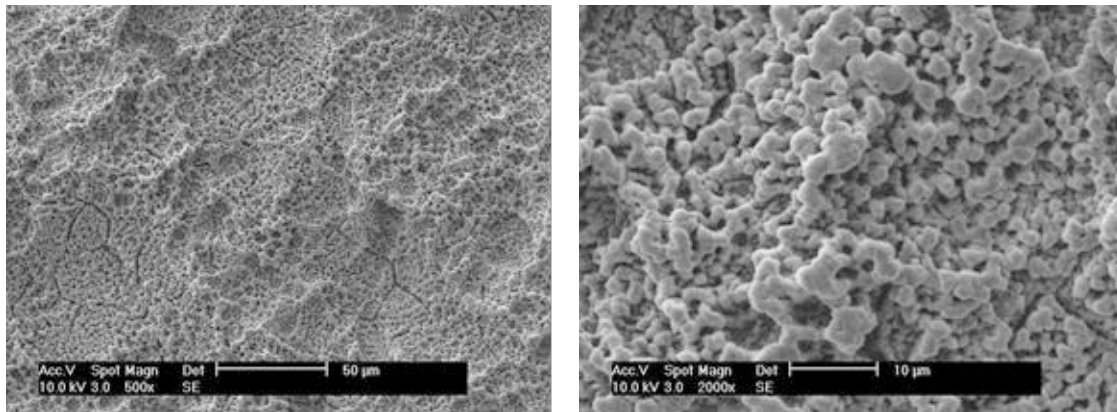


Figura 3.18 – Micrografias superficiais do filme Ti15Zr depositado sobre Ti SLA (porta-substratos de aço).

Nas figuras 3.19, 3.20, 3.21 e 3.22 são apresentadas micrografias representativas da morfologia resultante das alterações das condições de deposição dos filmes Ti15Zr ao nível do substrato e da espessura do filme fino.

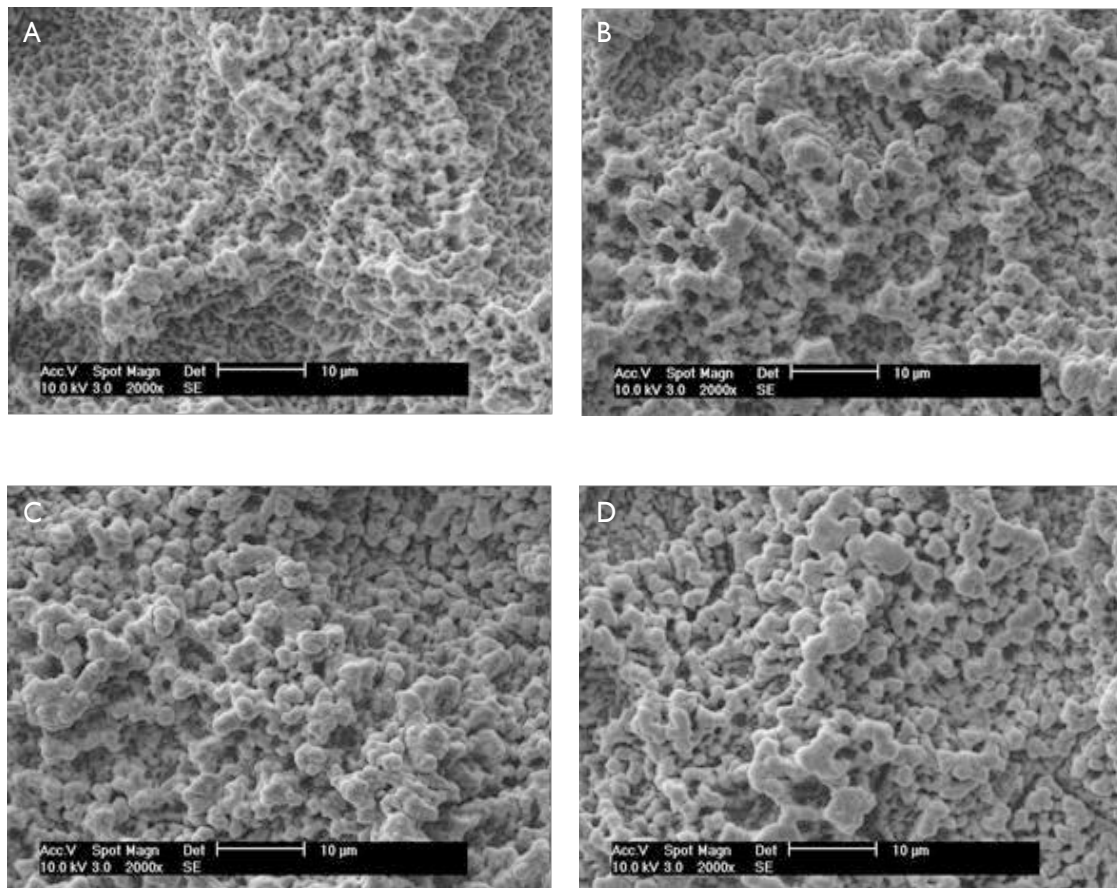


Figura 3.19 – Micrografias representativas dos filmes depositados variando os parâmetros de deposição: polarização e tipo de substrato. A) $V_s = -40V$; B) $V_s = -70V$; C) $V_s = -100V$; D) porta-substratos de aço.

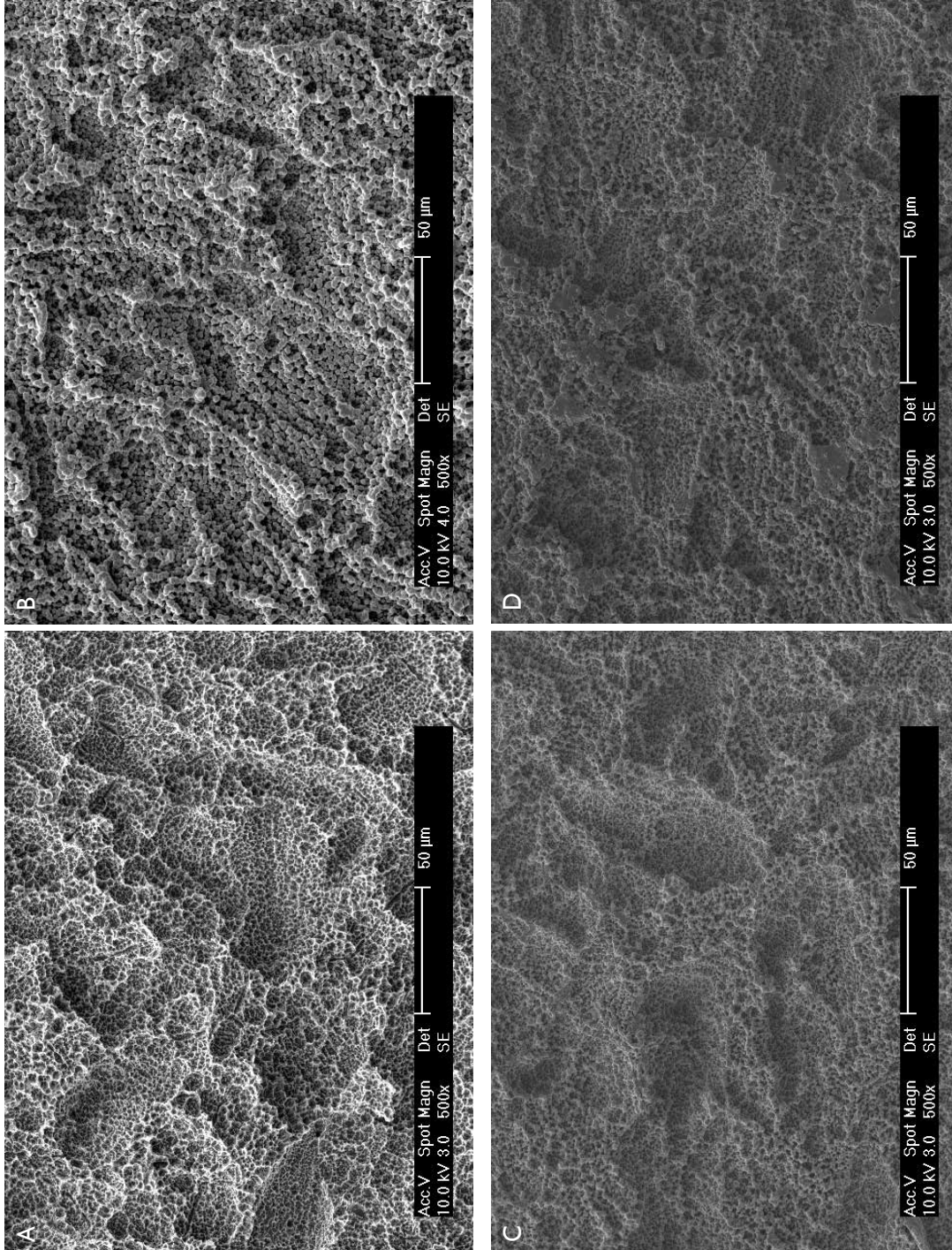


Figura 3.20 – Micrografias representativas da superfície cp Ti SLA e dos filmes depositados variando os parâmetros de deposição. A) cp Ti SLA; B) Filme Ti 2 µm, -40V; C) Filme Ti15Zr 1 µm, -40V; D) Filme Ti15Zr 1 µm, -70V. Ampliação x 500.

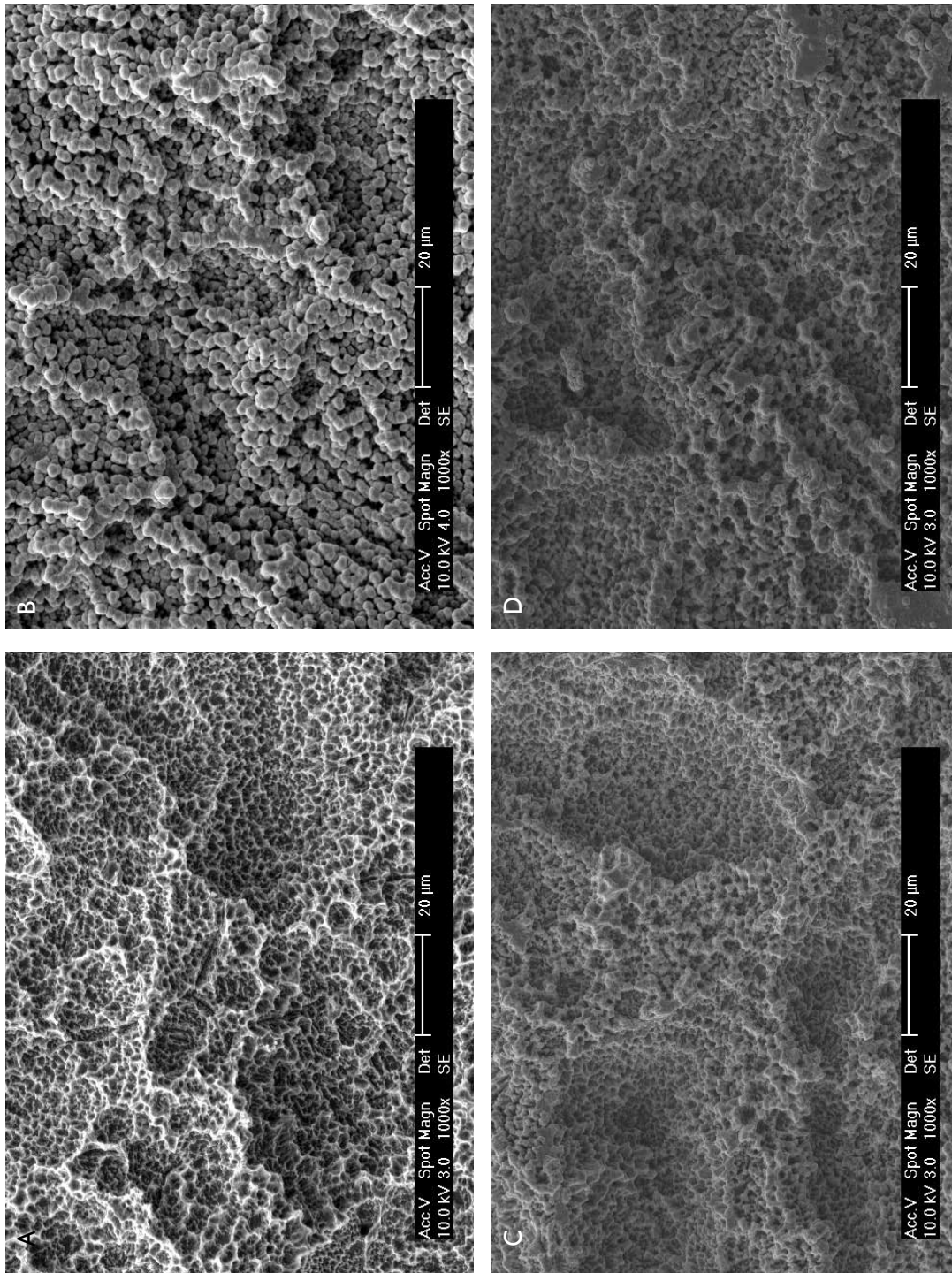


Figura 3.21 – Micrografias representativas da superfície cp Ti SLA e dos filmes depositados variando os parâmetros de deposição. A) cp Ti SLA; B) Filme fino Ti 2 µm, -40V; C) Filme fino Ti15Zr 1 µm, -40V; D) Filme fino Ti15Zr 1 µm, -70V. Ampliação x 1000.

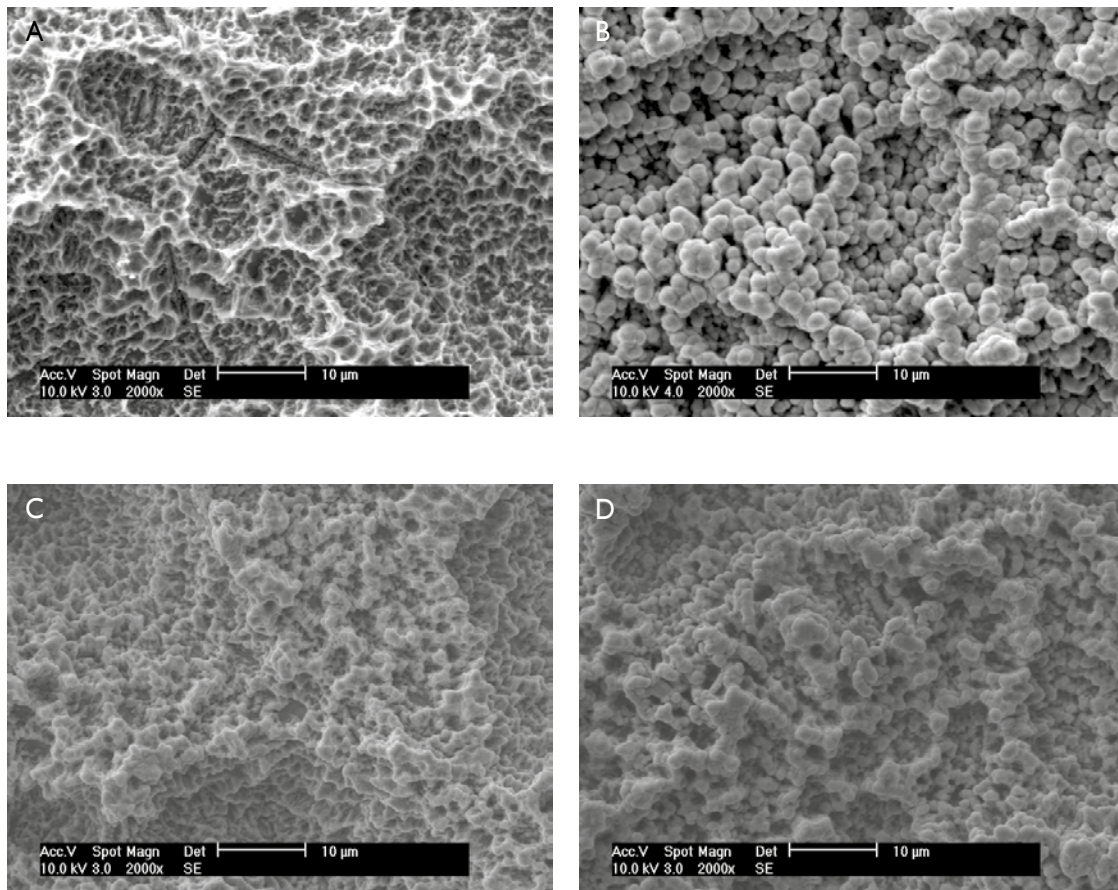


Figura 3.22 – Micrografias representativas da superfície cpTi SLA e dos filmes depositados variando os parâmetros de deposição. A) cp Ti SLA; B) Filme Ti 2 μm, -40V; C) Filme Ti1.5Zr 1 μm, -40V; D) Filme Ti1.5Zr 1 μm, -70V. Ampliação x 1000.

Os filmes de Ti1.5Zr com uma espessura de cerca de 1 μm produzidos utilizando um porta-substratos de cobre e aplicando uma polarização de -40 V aos substratos mantêm a morfologia aproximada inicial do substrato. Estas foram as condições usadas durante a fase 3 do estudo (Figura 3.23).



Figura 3.23 – Esquema ilustrativo das etapas da fase 2 do estudo.

As micrografias da figura 3.24 são ilustrativas de um filme fino com estas características e na tabela 3.6 encontram-se as condições de deposição para todos os filmes produzidos e as suas propriedades mais relevantes.

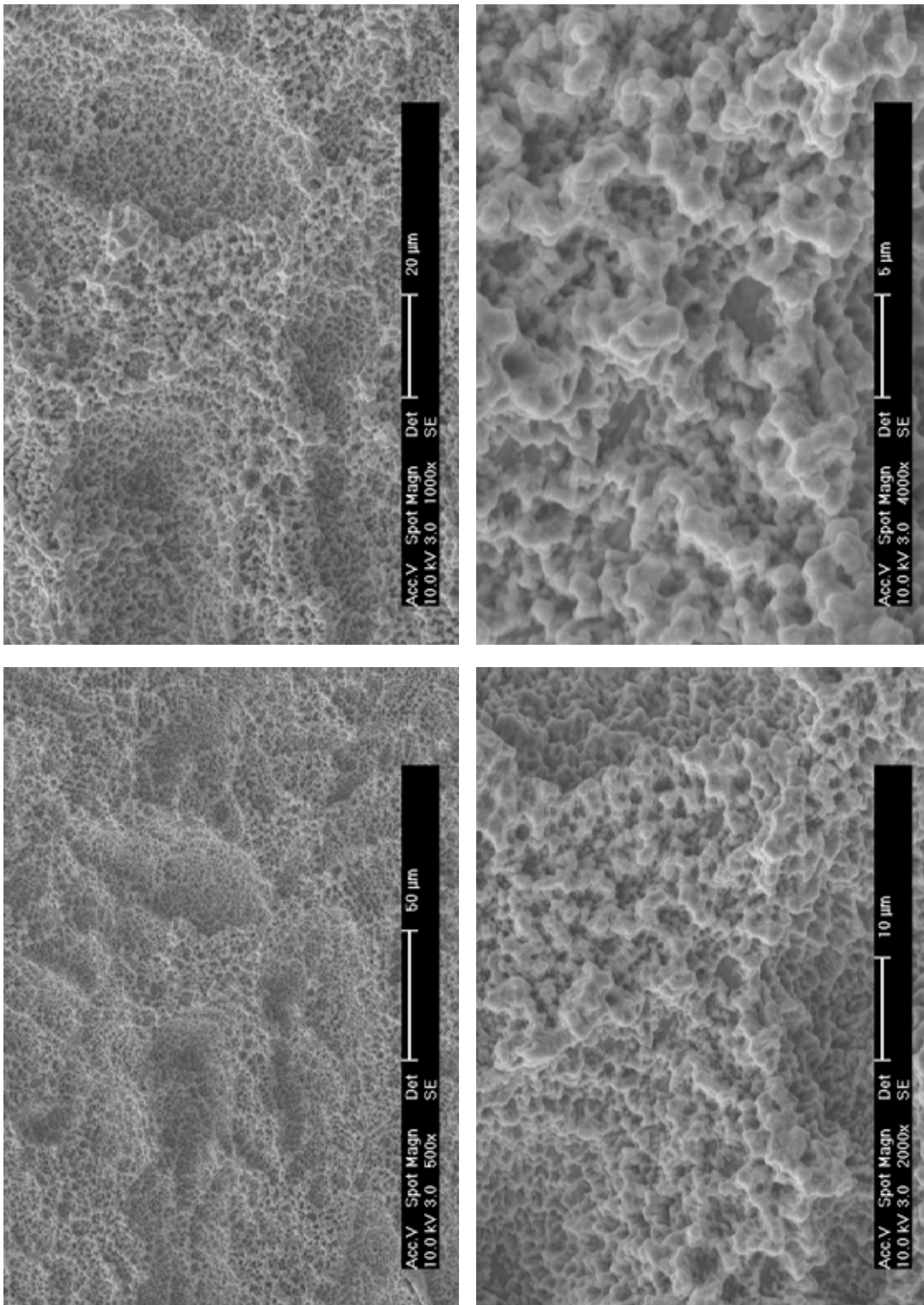


Figura 3.24 – Micrografias superficiais do filme Ti-15Zr de 1 μm depositado sobre Ti-SLA.

Tabela 3.6 – Condições de deposição e características dos filmes finos depositados por pulverização catódica.

	R491	R492	R510	R511	R512	R513	R514	R515	R517	R518	R519	R520	R521
Pressão (Pa)	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹
Densidade de potência (Wmm ⁻²)	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²
Distância alvo-substrato (mm)	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
Polarização substratos (V)	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-70	-100	-40	-40
Duração (min)	6 a 30	28	30	15	6	7	14,5	30	14	17	20	15	30
Rotação porta substratos (rpm)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Substrato	SS316L, Ti, TiS e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA	SS316L	SS316L e Ti	SS316L e Ti	SS316L e Ti	SS316L e Ti	SS316L	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA
Alvo TiZr (Nº de Pastilhas Zr)	10 a 22		14	14	14	10	10	10	11	11	11	11	11
Teor Zr (wt%)			20%	20%	20%	<15%	<15%	<15%	±15%	±15%	±15%	±15%	±15%
Espessura (µm)	0,5 a 2	2	2	1	0,5	0,5	1	2	1	1	2	1	2

(continuação tabela 3.6) Condições de deposição e características dos filmes depositados por pulverização catódica; # pastilhas muito gastas; * pastilhas novas.

	R527	R528	R529	R530	R531	R544	R545	R546	R547	R548	R549	R550	R551	R573	R574
Pressão (Pa)	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹	3x10 ⁻¹
Densidade de potência (Wmm ⁻²)	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²	6,2x10 ⁻²
Distância alvo-substrato (mm)	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65
Polarização substratos (V)	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40
Duração (min)	14,5	28	14,5	14,5	14,5	28	15	15	15	30	30	16	16	16,5	16,5
Rotação porta substratos (rpm)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Substrato	SS316, Ti e TiSLA	Ti	Ti, TiS e TiSLA	Ti, TiS e TiSLA	Ti, TiS e TiSLA	SS316L	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti e TiSLA	SS316, Ti, TiS e TiSLA	SS316L	SS316L	TiZr	TiZr	SS316L	TiZr
Alvo TiZr (Nº de Pastilhas Zr)		20	20	16	12	20	22#	18#	14#	14#	10*	10*	10*	5	5
Teor Zr (wt%)		25%	25%	20-25%	15-20%	25%	±25%	±20%	±15%	±15%	15%	15%	15%	7%	7%
Espessura (µm)	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1

3.3.1.4. Topografia

A análise da topografia foi efectuada por um regosímetro Perthen com cabeça laser para a avaliação da rugosidade superficial 2D e para a avaliação 3D dos parâmetros espaciais da rugosidade foi usado um microscópio ótico de elevada resolução com variação de foco.

Na tabela 3.7 são apresentados os valores da rugosidade superficial para amostras de cp Ti polido, aço 316L polido, filme fino R492 com 2 μm de espessura depositado em substrato de cp Ti SLA, e Ti grau 4 SLA. Os valores foram obtidos após serem feitas 8 medições por cada amostra, 4 transversais e 4 longitudinais (Figuras 3.25, 3.26 e 3.27).

Tabela 3.7 – Rugosidade de diferentes substratos.

Substrato	Ra (μm)	Rq (μm)	Sa (μm)
cp Ti	0,05	0,11	-
Aço 316L	0,04	-	-
R492	3,44	4,34	-
Ti SLA	1,90	2,4	2,92

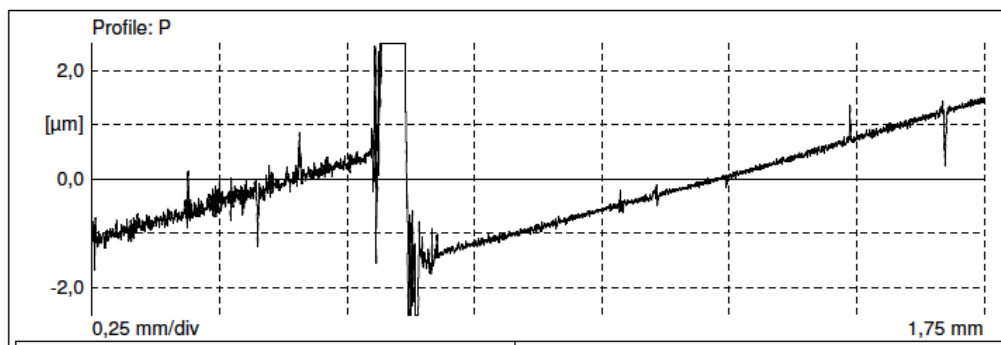


Figura 3.25 – Medição de espessura de filme de Ti depositado sobre amostra de Silício com gota de nitreto de boro - $\pm 2 \mu\text{m}$.

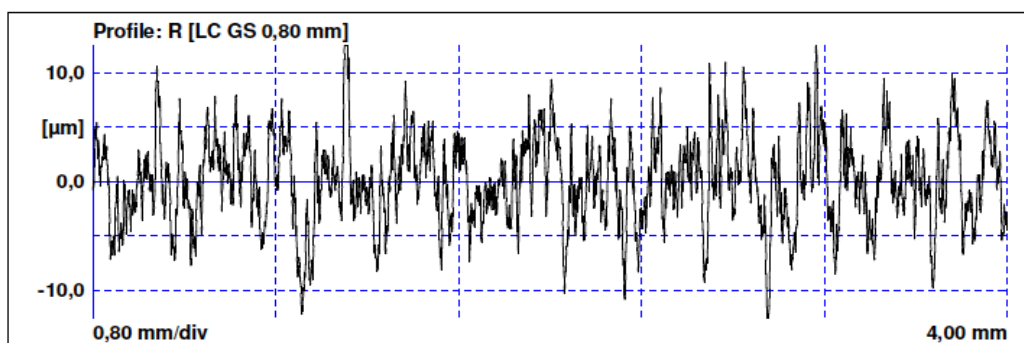


Figura 3.26 – Medição da rugosidade do perfil de filme R492 de 2 μm de espessura depositado sobre amostra de cp Ti grau 4 SLA - 3,44 μm .

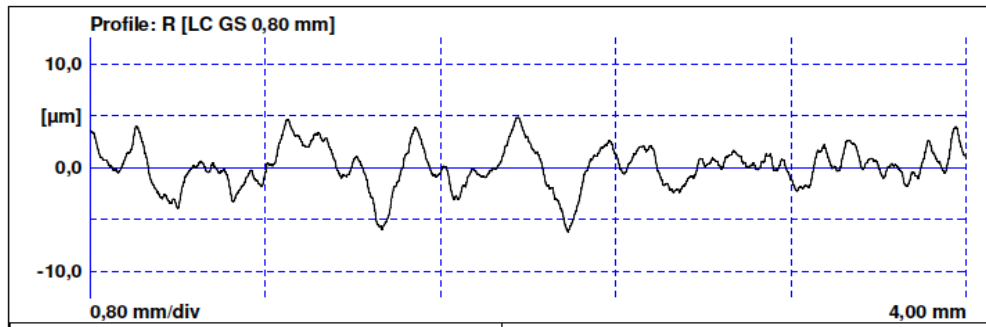


Figura 3.27 – Medição da rugosidade do perfil de amostra de cpTi grau 4 SLA – 1,90 μm .

Na análise topográfica 3D utilizou-se um microscópio ótico 3D de elevada resolução, Microscópio ótico de focagem infinita Infinite Focus, conjuntamente com o módulo de medição da textura superficial (Surface Texture Measurement), porque permite obter medições mais complexas e mais detalhadas da superfície. A figura 3.28 mostra, comparativamente antes e após revestimento, o mapa de pseudocores e histograma de medições gerado com o Surface Texture Measurement.

Foram efetuadas medições em três amostras de cada superfície e respectivos revestimentos e foram efetuadas cinco medições por cada amostra, i.e., a mesma amostra foi medida antes e depois de ser revestida. A alteração da topografia está representada nos gráficos 3.2 e 3.3 e a tabela 3.8 apresenta os valores médios S_a e S_{dr} para cada amostra antes e após revestimento. Os gráficos 3.4 e 3.5 representam a alteração registada no parâmetro S_{dr} (Surface developed ratio) para as amostras antes e após o revestimento.

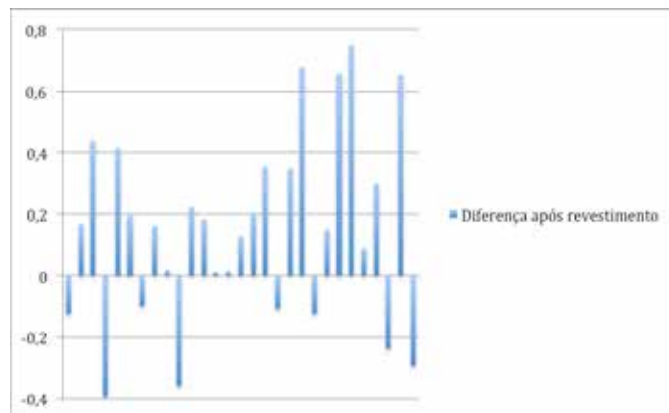


Gráfico 3.2 – Variação da rugosidade após deposição por pulverização catódica de filmes finos Ti15Zr sobre cpTi SLA.

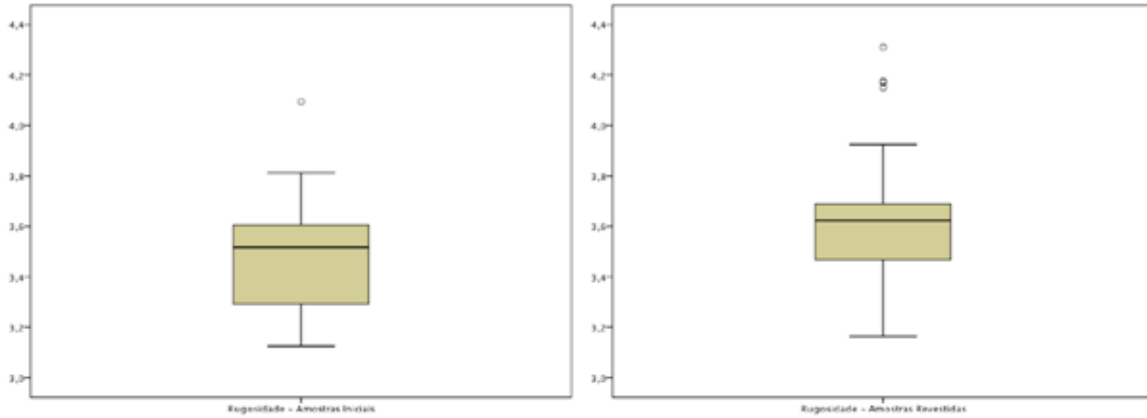


Gráfico 3.3 –Variação da rugosidade antes (esquerda) e após (direita) deposição por pulverização catódica de filmes finos Ti15Zr sobre cpTi SLA.

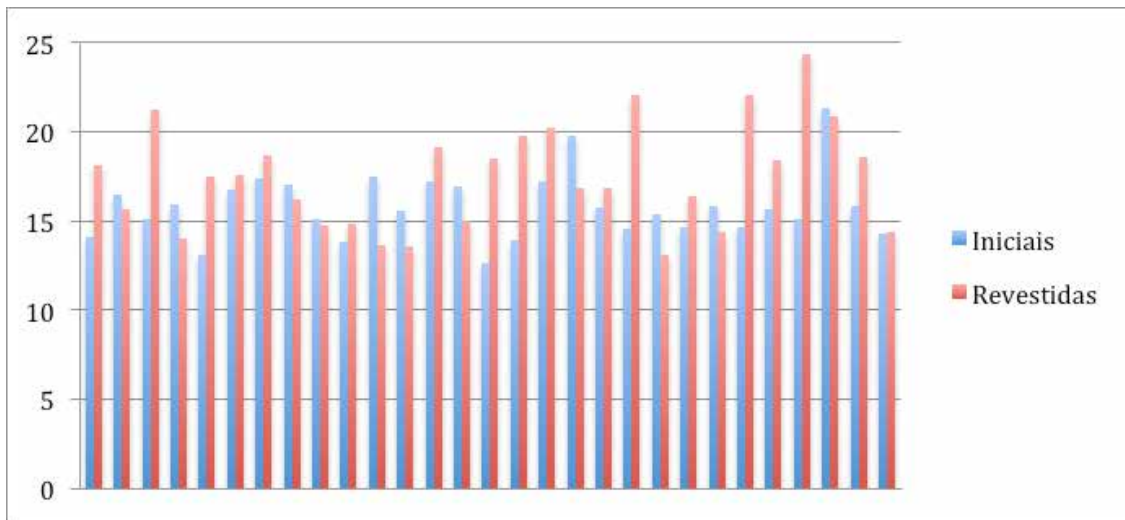


Gráfico 3.4 –Variação do aumento da superfície (Sdr) após deposição por pulverização catódica de filmes finos Ti15Zr sobre cpTi SLA.

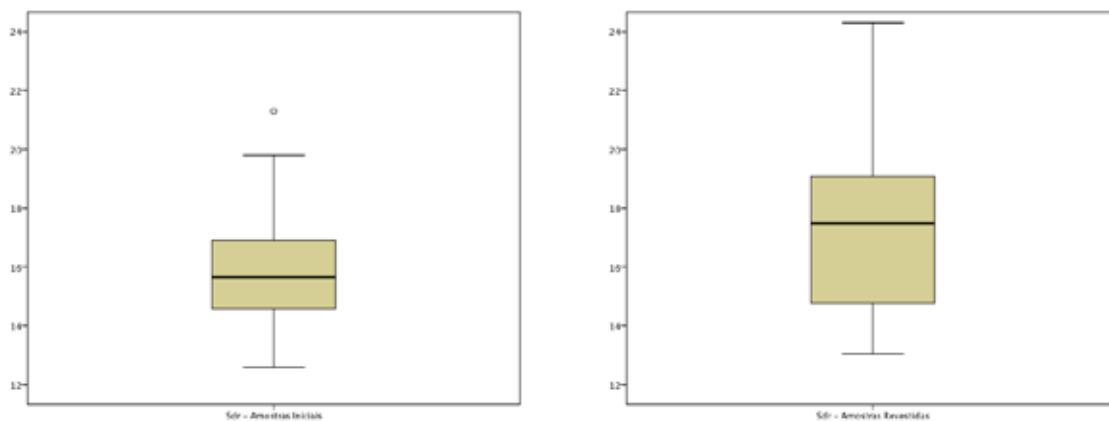


Gráfico 3.5 –Variação do aumento da superfície antes (esquerda) e após (direita) deposição por pulverização catódica de filmes finos Ti15Zr sobre cpTi SLA.

Tabela 3.8 – Rugosidade (Sa) e aumento da superfície (Sdr) de discos cp Ti SLA antes e após deposição por pulverização catódica de filme fino Ti15Zr.

Amostra	Sa (μm)		Sdr (μm)	
	Antes	Após	Antes	Após
1	3,8113	3,6873	14,03	18,089
2	3,4051	3,5744	16,493	15,61
3	3,1245	3,5651	15,103	21,203
4	3,5578	3,1652	15,899	13,99
5	3,222	3,6352	13,04	17,479
6	3,2734	3,466	16,708	17,542
7	3,6302	3,531	17,414	18,661
8	3,4774	3,6389	17,042	16,174
9	3,2818	3,299	15,04	14,724
10	3,605	3,2468	13,836	14,775
11	3,254	3,4751	17,482	13,613
12	3,292	3,4751	15,505	13,507
13	3,5152	3,5263	17,188	19,082
14	3,3842	3,399	16,915	14,965
15	3,5357	3,6629	12,586	18,455
16	3,2114	3,4156	13,878	19,727
1m	3,3249	3,6807	17,177	20,164
2m	3,7577	3,6501	19,795	16,803
3m	3,2753	3,6222	15,692	16,81
A	3,4742	4,1492	14,553	22,085
B	3,5392	3,4138	15,396	13,054
C	3,5668	3,7171	14,582	16,402
D	3,6546	4,3097	15,778	14,336
E	3,4217	4,1696	14,635	22,072
F	3,536	3,6272	15,654	18,363
G	3,6271	3,9247	15,07	24,302
H	4,095	3,8556	21,299	20,846
I	3,5249	4,1763	15,847	18,552
J	3,6591	3,3681	14,224	14,32

Após deposição do filme fino verifica-se um aumento ligeiro da rugosidade, não sendo sempre constante, mas ocorrendo mais frequentemente aumento da rugosidade do que diminuição, essencialmente por aumento da rugosidade intermédia. A Figura 3.28 apresenta a alteração do mapa de pseudo-cores, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico de elevada resolução com variação infinita de foco, que é exemplificativa do padrão de alteração da rugosidade, com aparecimento de cores médias correspondentes à rugosidade intermédia. Nas figuras 3.29 a 3.57 são apresentados os histogramas e os valores para os parâmetros da análise topográfica da superfície das amostras cp Ti SLA e do filme fino Ti15Zr depositado sobre cada uma delas, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico de elevada resolução com variação infinita de foco. Na tabela 3.9 é apresentada a síntese de todos os dados dos parâmetros de superfície antes e após o revestimento das amostras cp Ti SLA com um filme fino Ti15Zr.

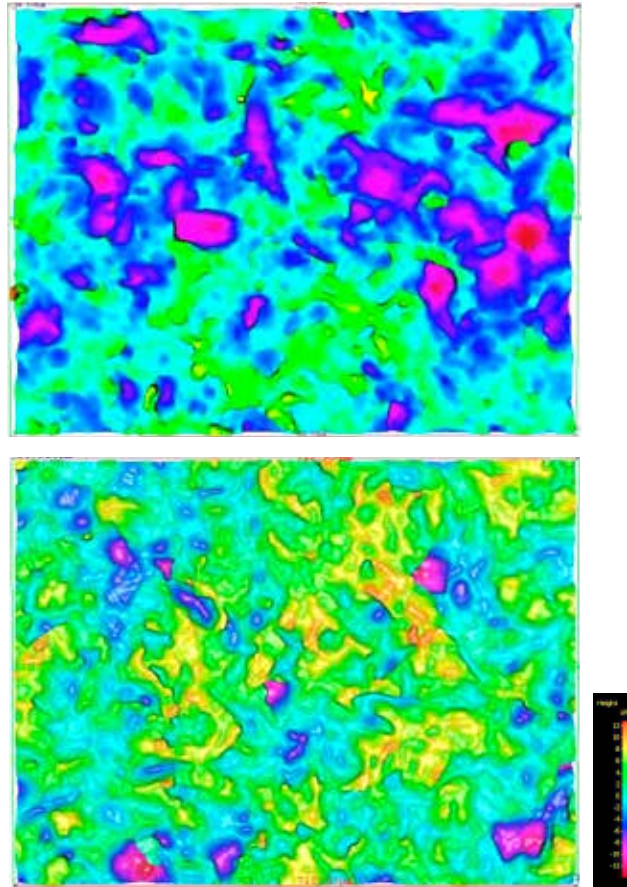


Figura 3.28 – Mapa de pseudo-cores, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico variação infinita de foco antes e após deposição de filme Ti15Zr.

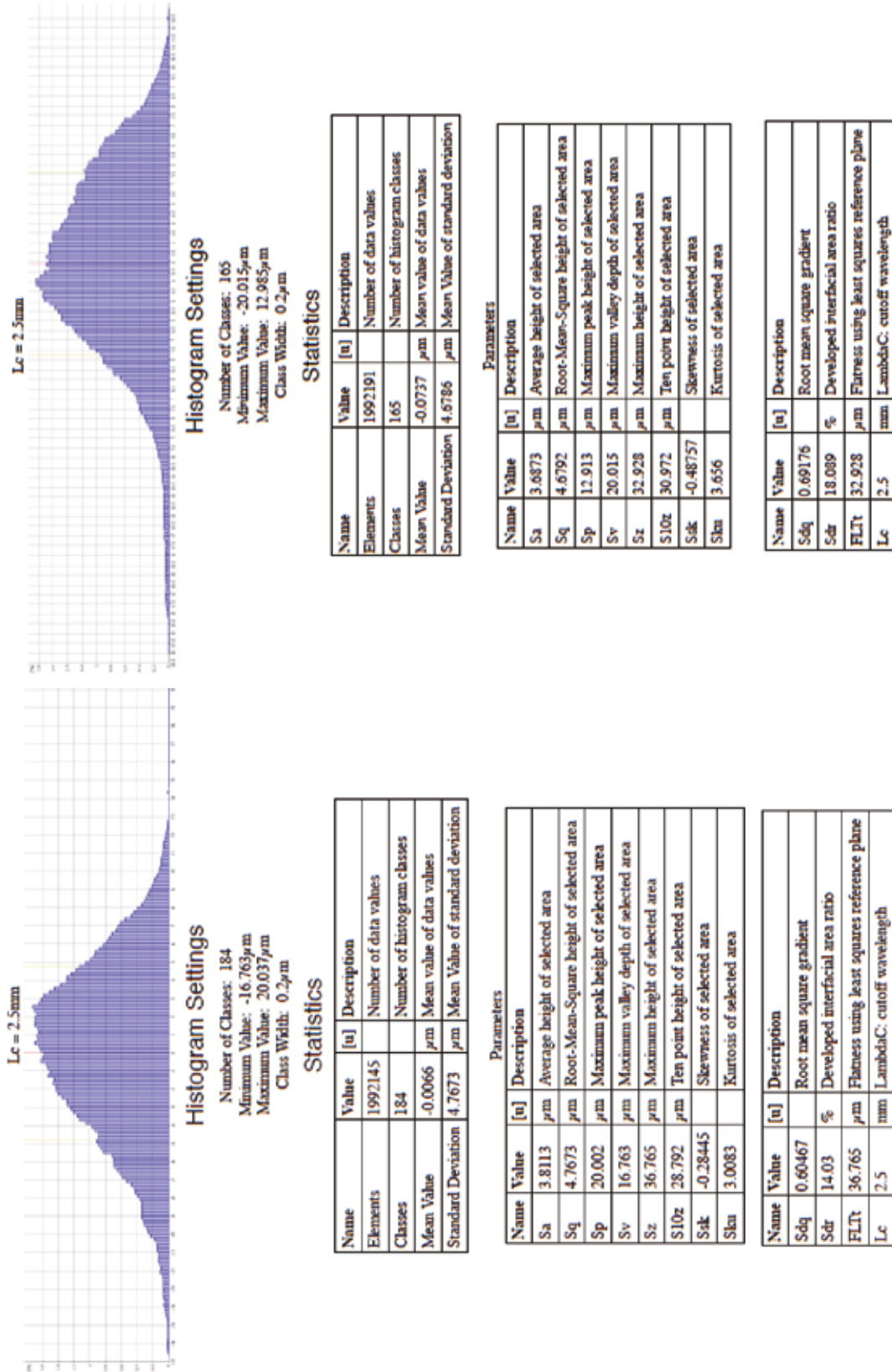


Figura 3.29 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra | cp Ti SLA e do filme fino | Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

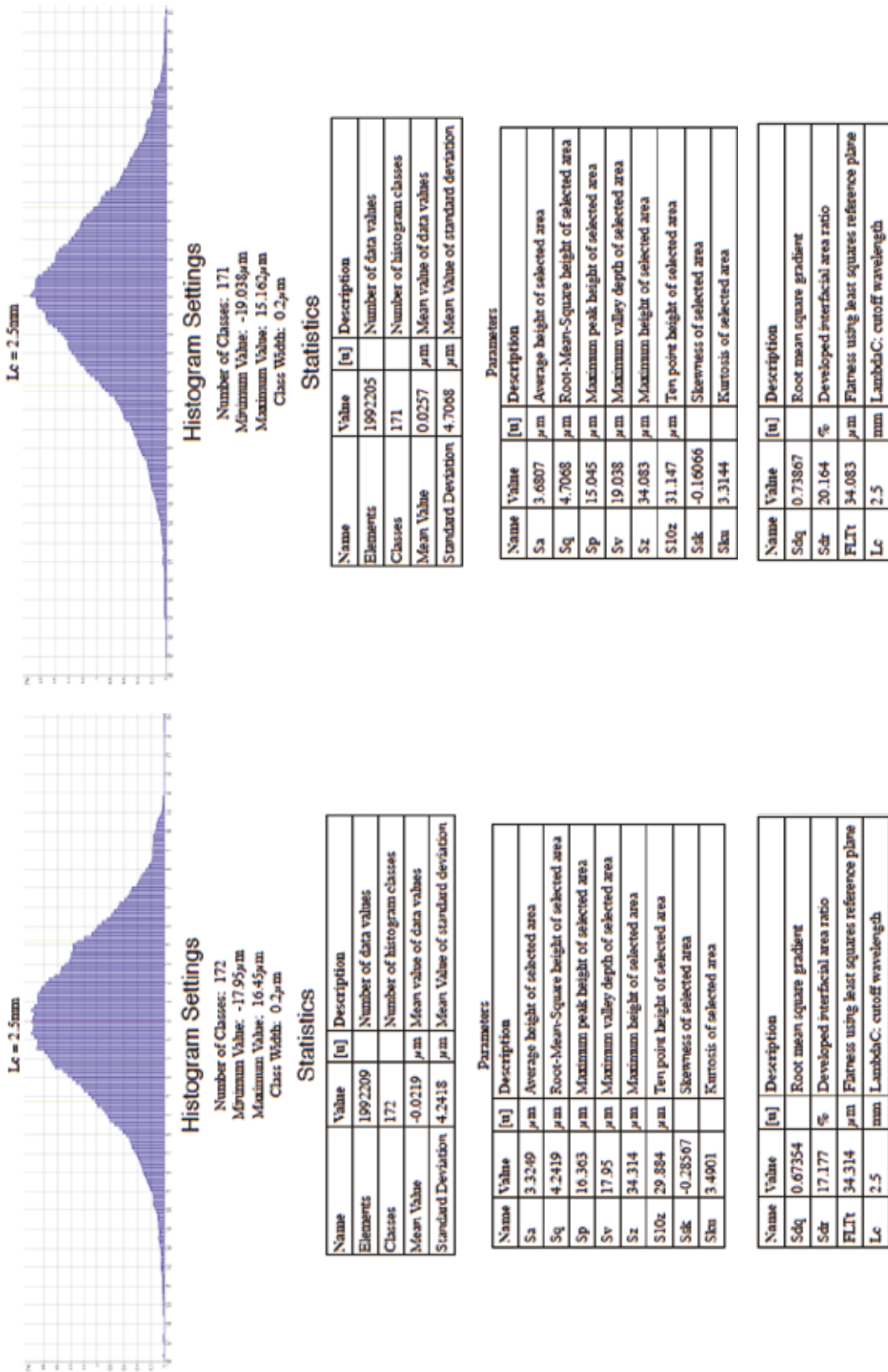


Figura 3.30 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 2 cp Ti SLA e do filme fino 2 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

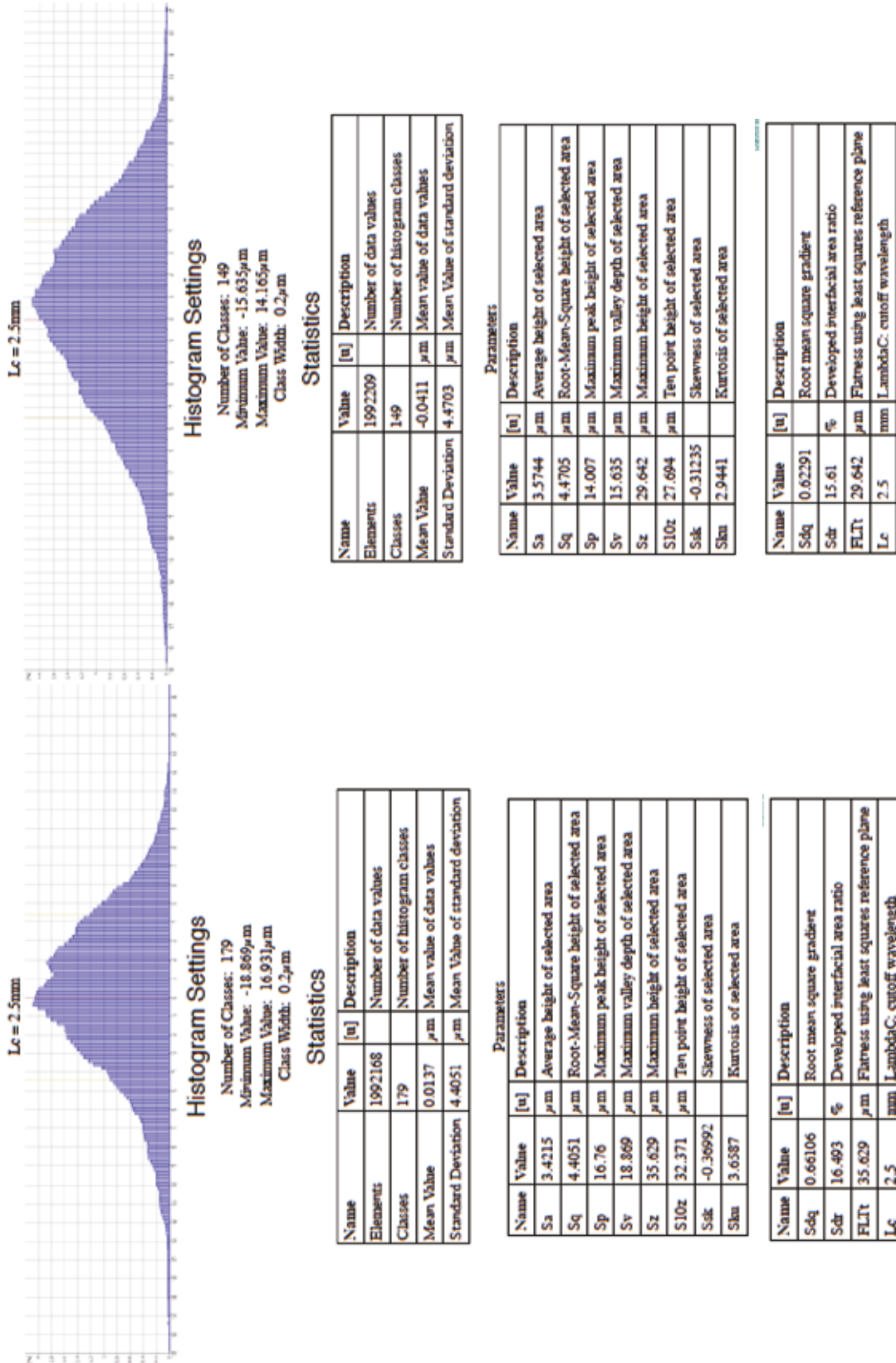
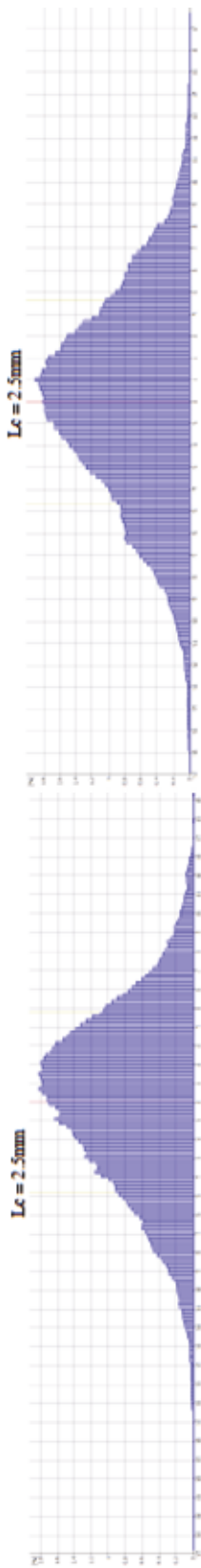


Figura 3.31 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 3 cp Ti SLA e do filme fino 3 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.



Histogram Settings

Number of Classes: 201
 Minimum Value: -23.805µm
 Maximum Value: 16.395µm
 Class Width: 0.2µm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1992097		Number of data values
Classes	201		Number of histogram classes
Mean Value	0.0152	µm	Mean value of data values
Standard Deviation	4.7775	µm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	3.7577	µm	Average height of selected area
Sq	4.7775	µm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	16.344	µm	Maximum peak height of selected area
Sv	23.805	µm	Maximum valley depth of selected area
Sz	40.149	µm	Maximum height of selected area
S10z	32.218	µm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.34005		Skewness of selected area
Sku	3.5725		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.73476		Root mean square gradient
Sdr	19.795	%	Developed interfacial area ratio
FLTt	40.149	µm	Flattness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Histogram Settings

Number of Classes: 173
 Minimum Value: -16.898µm
 Maximum Value: 17.702µm
 Class Width: 0.2µm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1992209		Number of data values
Classes	173		Number of histogram classes
Mean Value	-0.0074	µm	Mean value of data values
Standard Deviation	4.6109	µm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	3.6501	µm	Average height of selected area
Sq	4.6109	µm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	17.667	µm	Maximum peak height of selected area
Sv	16.898	µm	Maximum valley depth of selected area
Sz	34.565	µm	Maximum height of selected area
S10z	31.557	µm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.1214		Skewness of selected area
Sku	3.0838		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.65243		Root mean square gradient
Sdr	16.803	%	Developed interfacial area ratio
FLTt	34.565	µm	Flattness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Figura 3.32 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 4 cp Ti SLA e do filme fino 4 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

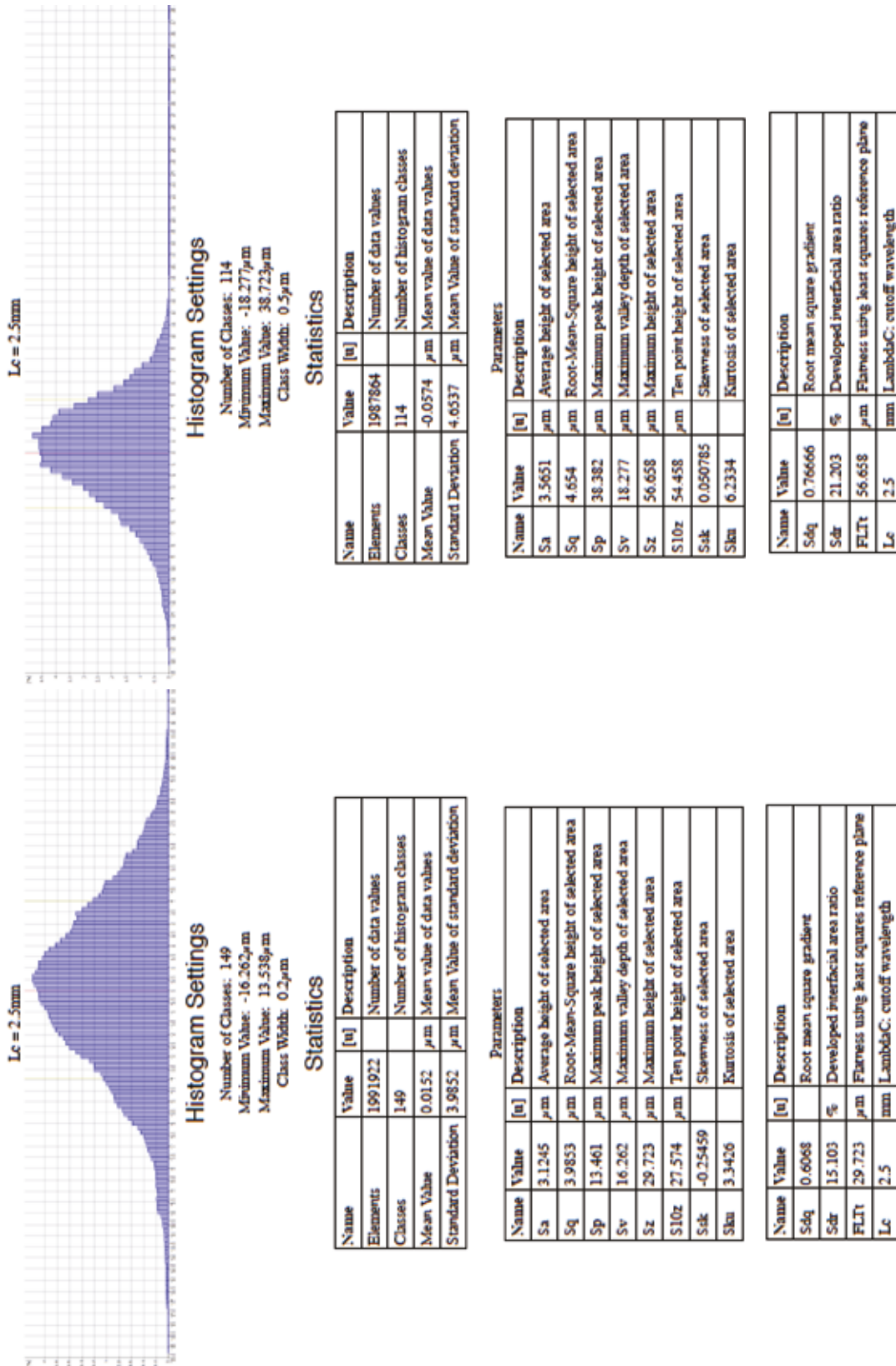


Figura 3.33 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 5 cp Ti SLA e do filme fino 5 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

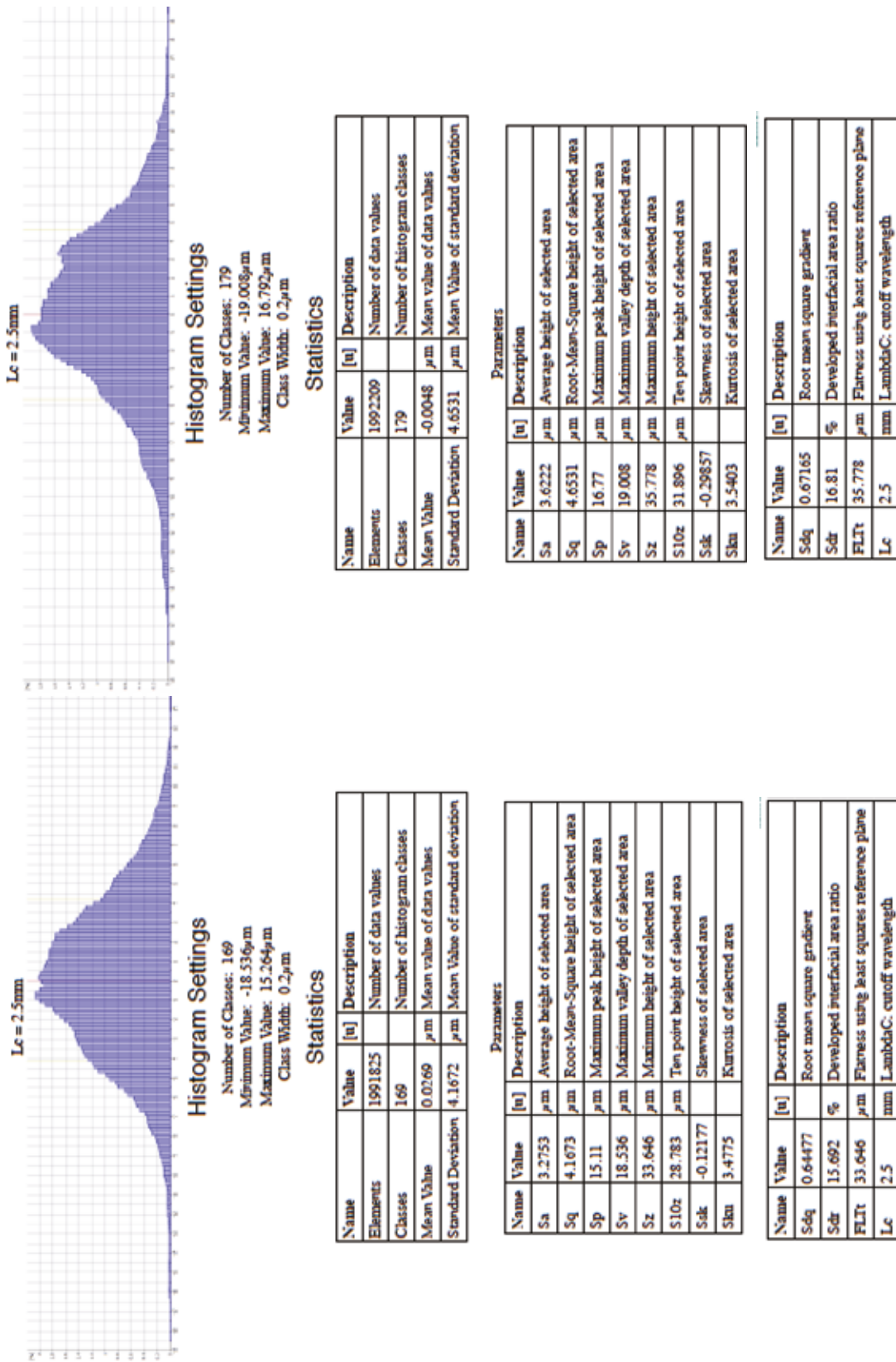


Figura 3.34 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 6 cp Ti SLA e do filme fino 6 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

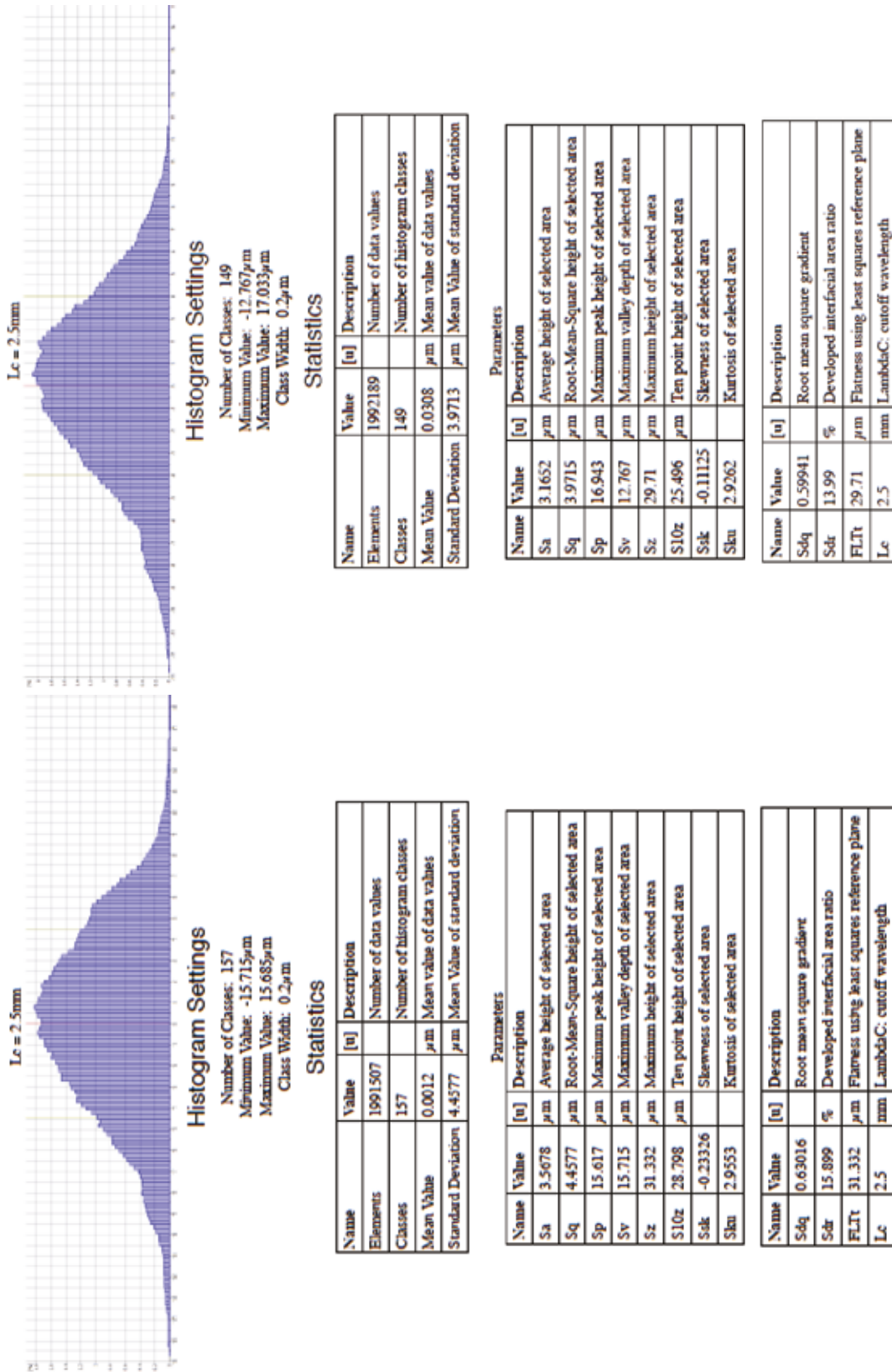
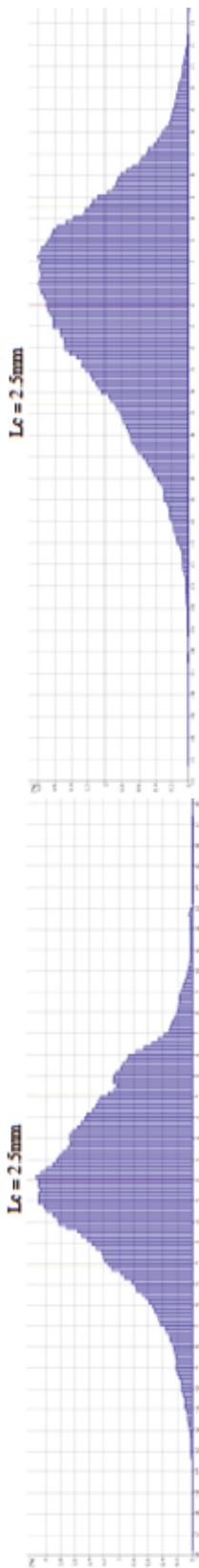


Figura 3.35 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 7 cp Ti SLA e do filme fino 7 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.



Histogram Settings

Number of Classes: 184
 Minimum Value: -17.775µm
 Maximum Value: 19.025µm
 Class Width: 0.2µm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1992198		Number of data values
Classes	184		Number of histogram classes
Mean Value	-0.016	µm	Mean value of data values
Standard Deviation	4.1001	µm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	3.222	µm	Average height of selected area
Sq	4.1002	µm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	18.986	µm	Maximum peak height of selected area
Sv	17.775	µm	Maximum valley depth of selected area
Sz	36.761	µm	Maximum height of selected area
S10z	28.064	µm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.14709		Skewness of selected area
Sku	3.4016		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.56293		Root mean square gradient
Sdr	13.04	%	Developed interfacial area ratio
FLIT	36.761	µm	Flatness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Histogram Settings

Number of Classes: 176
 Minimum Value: -21.305µm
 Maximum Value: 13.895µm
 Class Width: 0.2µm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1992209		Number of data values
Classes	176		Number of histogram classes
Mean Value	-0.0121	µm	Mean value of data values
Standard Deviation	4.5697	µm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	3.6352	µm	Average height of selected area
Sq	4.5697	µm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	13.869	µm	Maximum peak height of selected area
Sv	21.305	µm	Maximum valley depth of selected area
Sz	35.174	µm	Maximum height of selected area
S10z	29.742	µm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.38483		Skewness of selected area
Sku	3.3004		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.67928		Root mean square gradient
Sdr	17.479	%	Developed interfacial area ratio
FLIT	35.174	µm	Flatness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Figura 3.36 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 8 cp Ti SLA e do filme fino 8 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

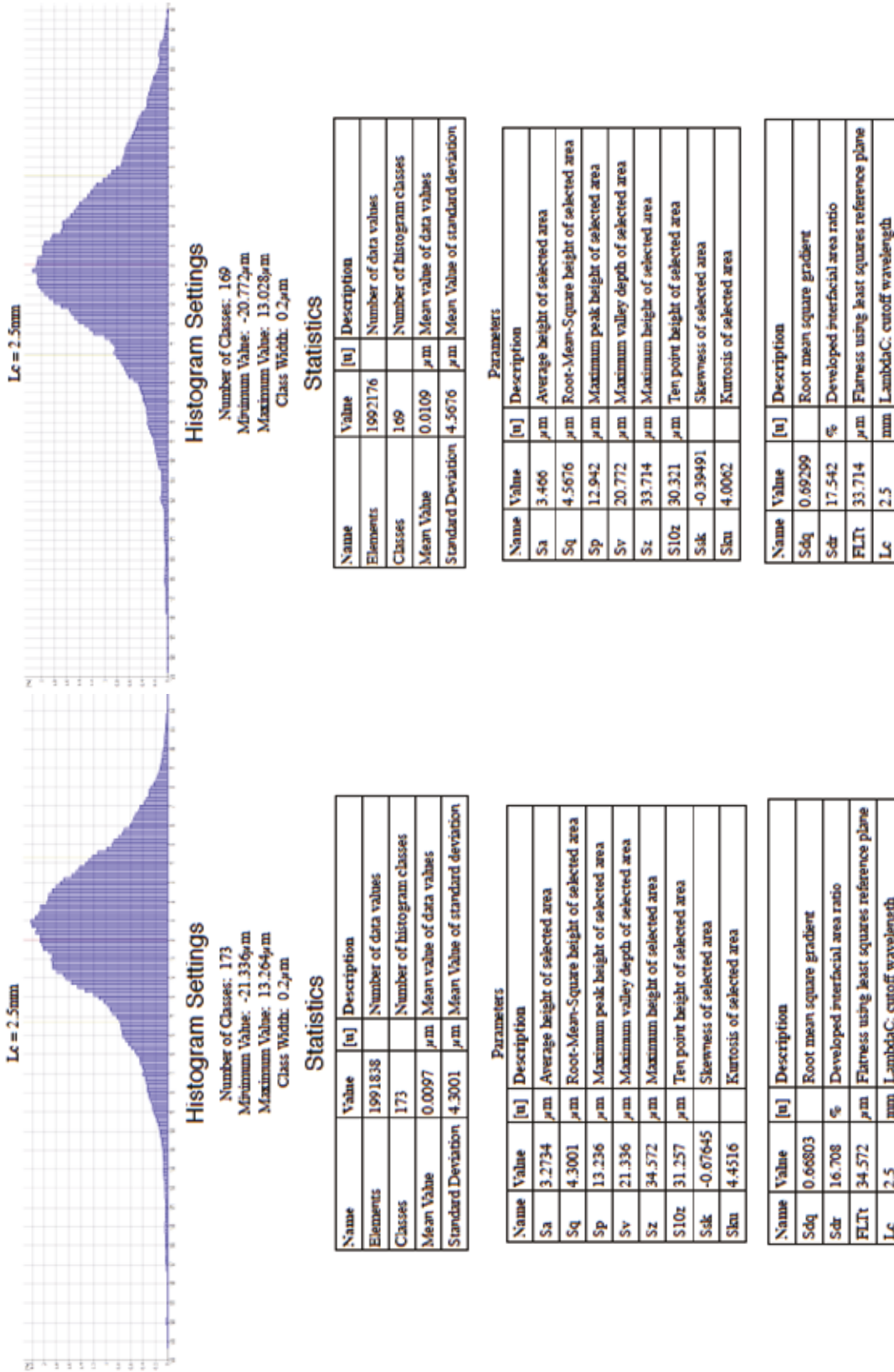


Figura 3.37 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 9 cp Ti SLA e do filme fino 9 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

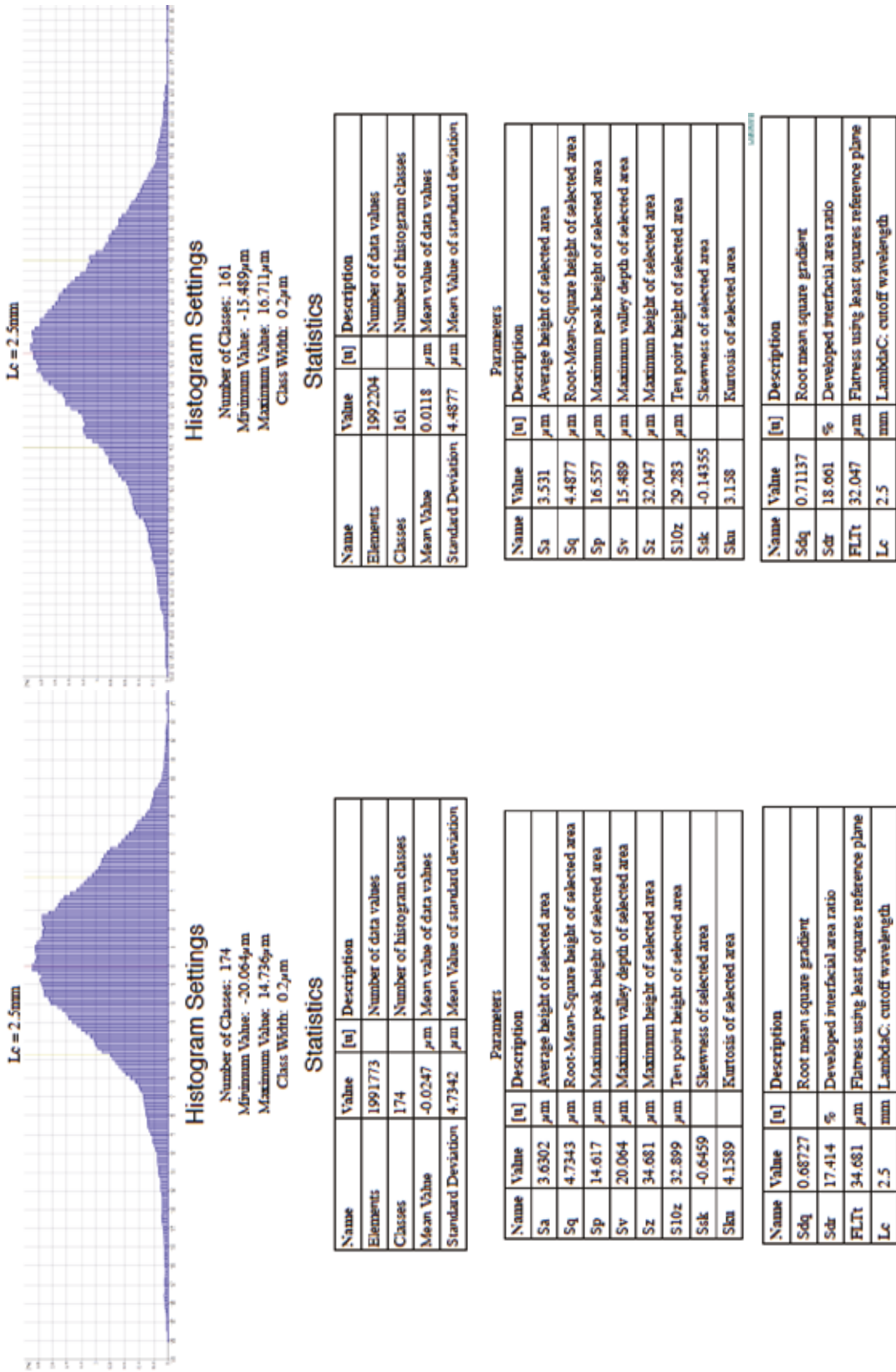


Figura 3.38 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 10 cp Ti SLA e do filme fino 10Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

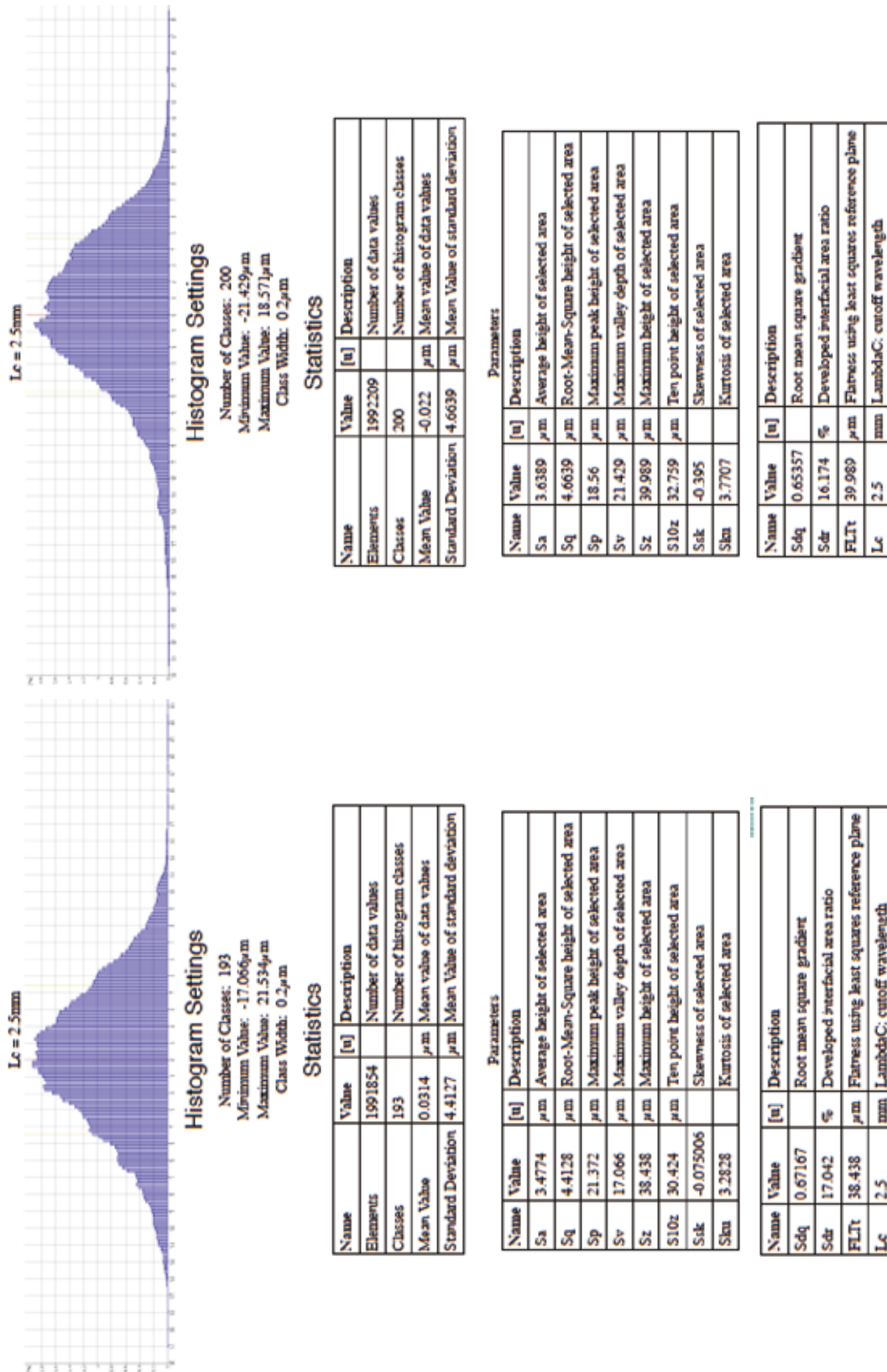


Figura 3.39 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 11 cp Ti SLA e do filme fino 11 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

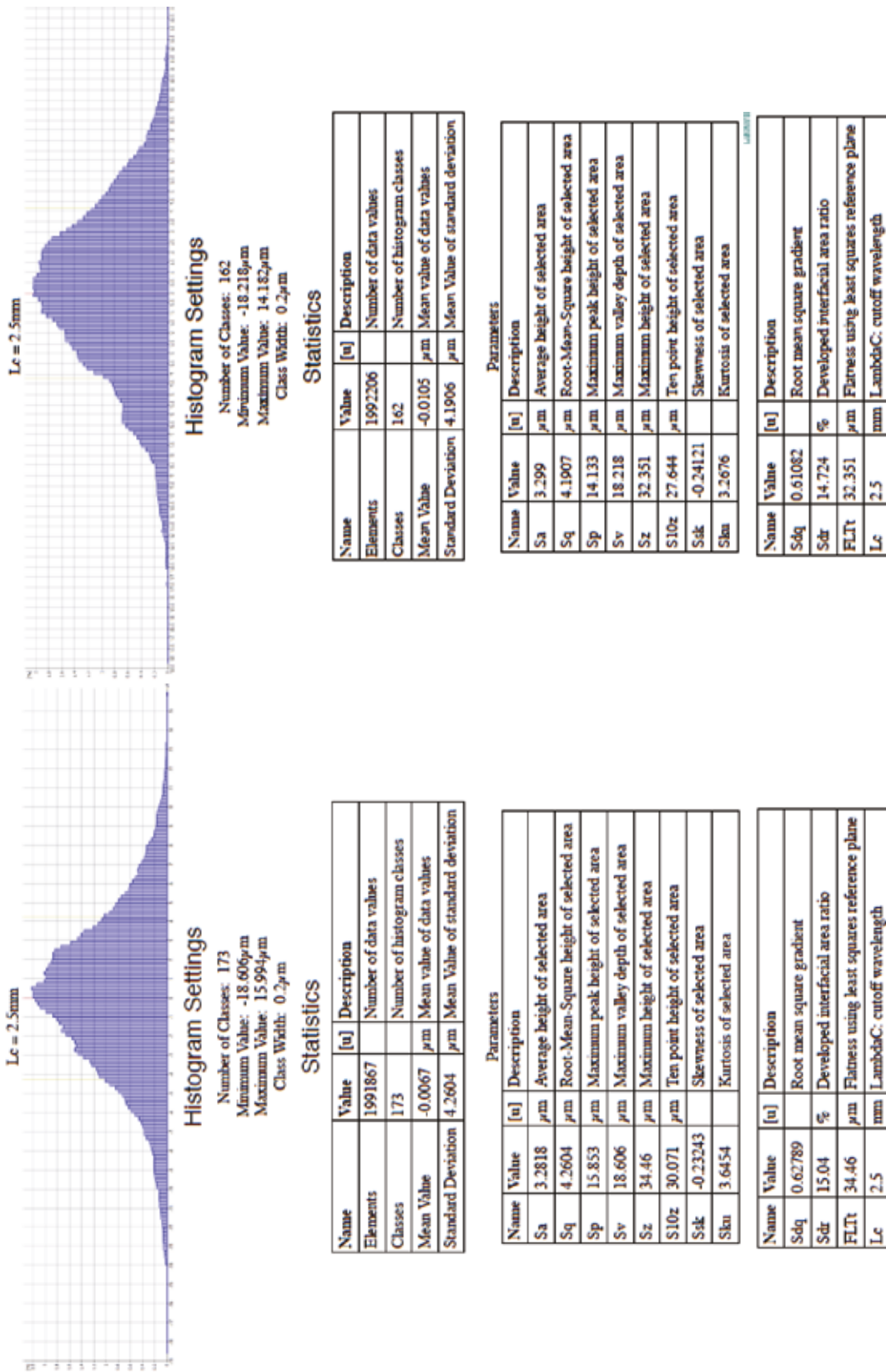


Figura 3.40 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 12 cp Ti SLA e do filme fino 12 Ti-15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

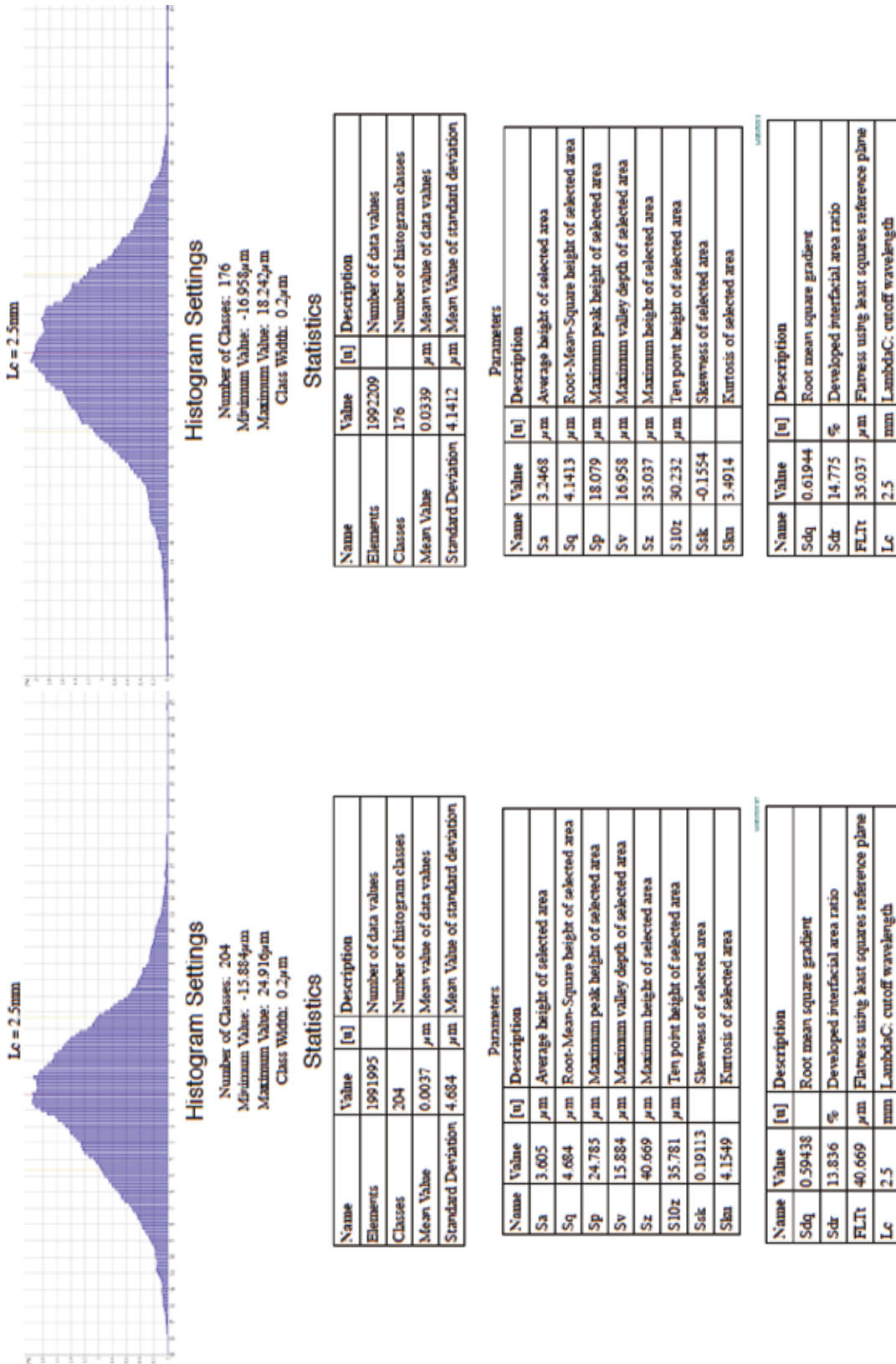


Figura 3.41 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 13 cp Ti SLA e do filme fino 13 Ti 15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

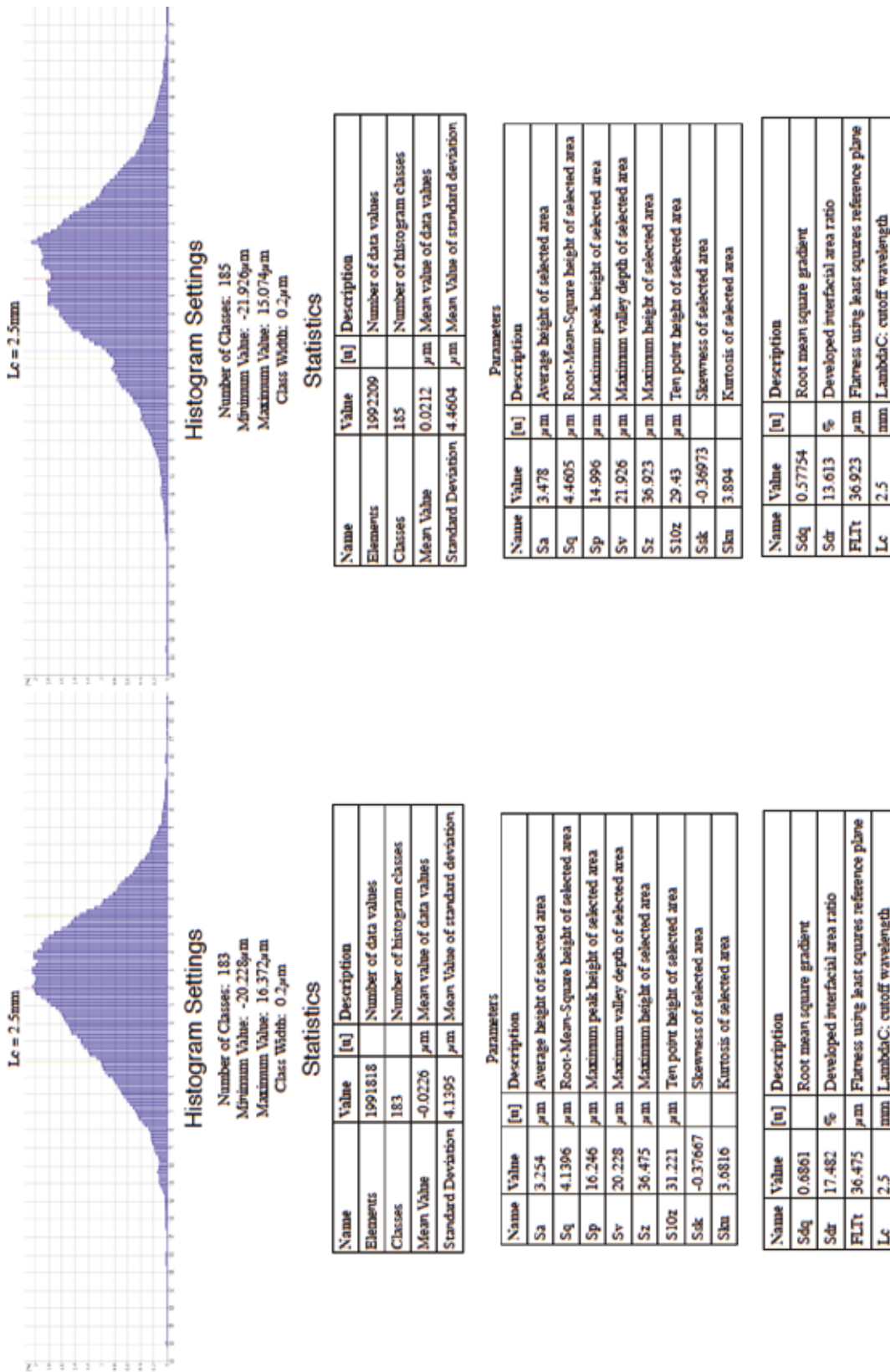


Figura 3.42 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 14 cp Ti SLA e do filme fino 14 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

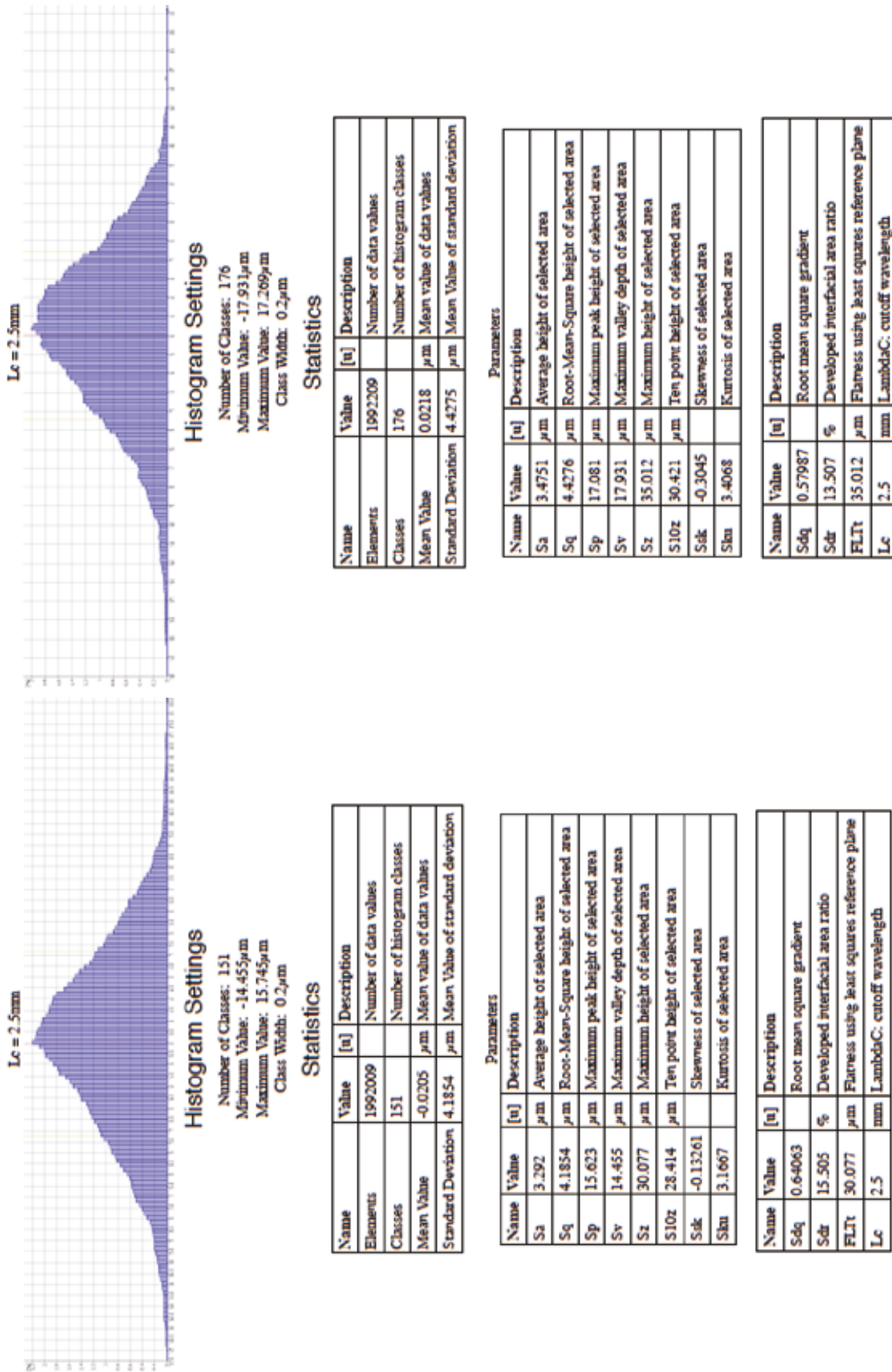


Figura 3.43 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 15 cp Ti SLA e do filme fino 15Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

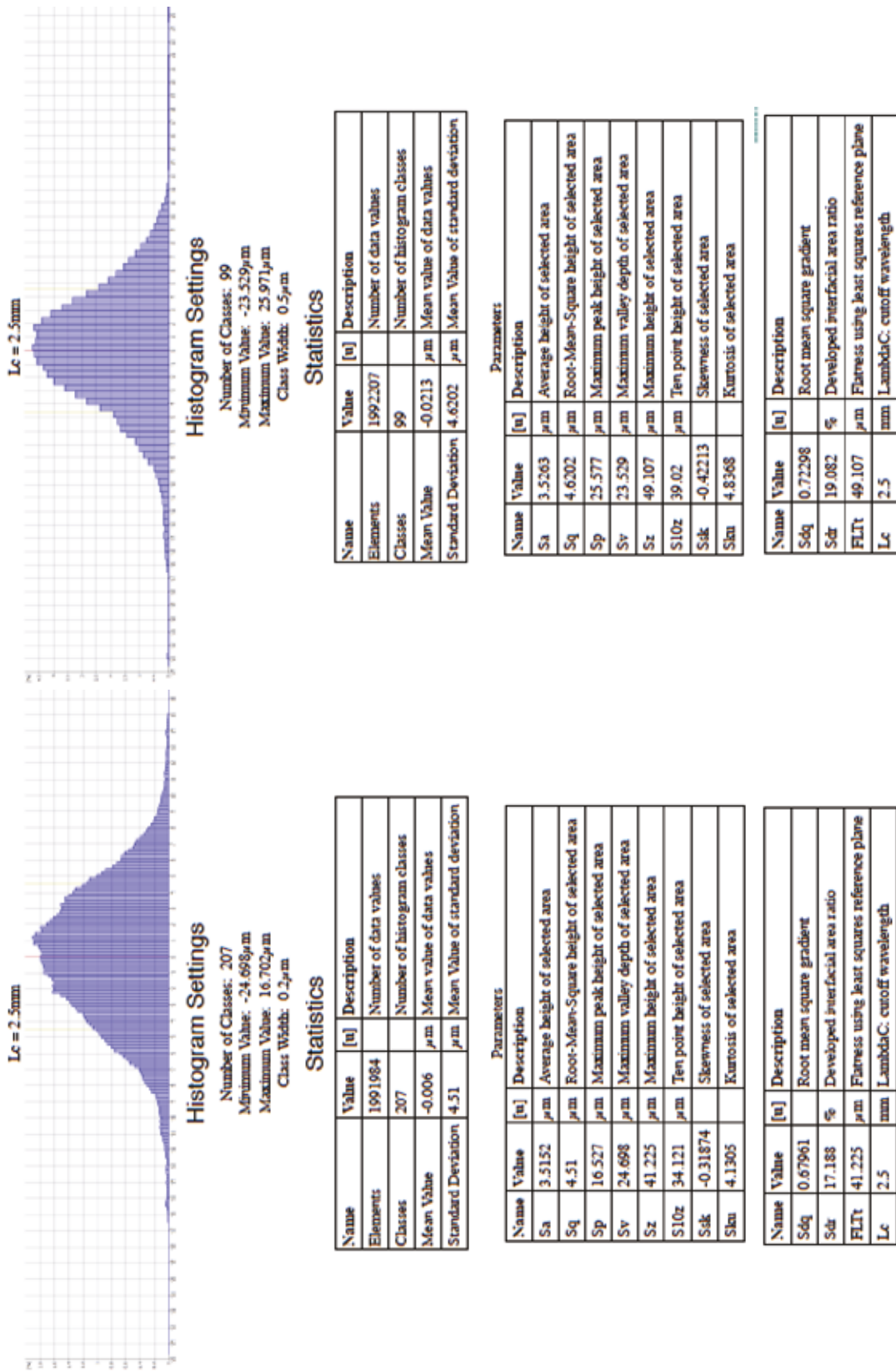


Figura 3.44 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 16 cp Ti SLA e do filme fino 16 Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

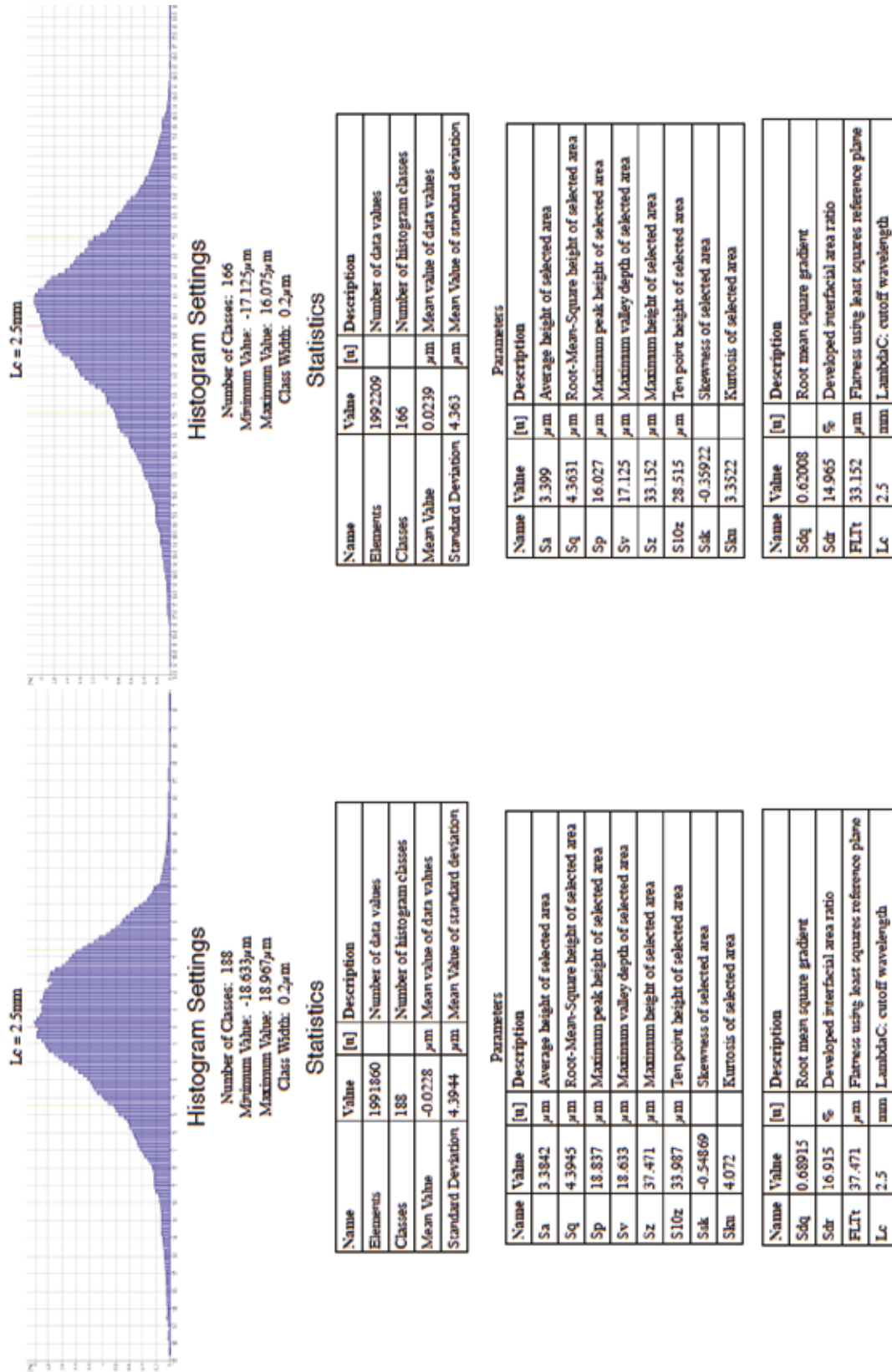


Figura 3.45 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 1m cp Ti SLA e do filme fino 1m cp Ti 15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

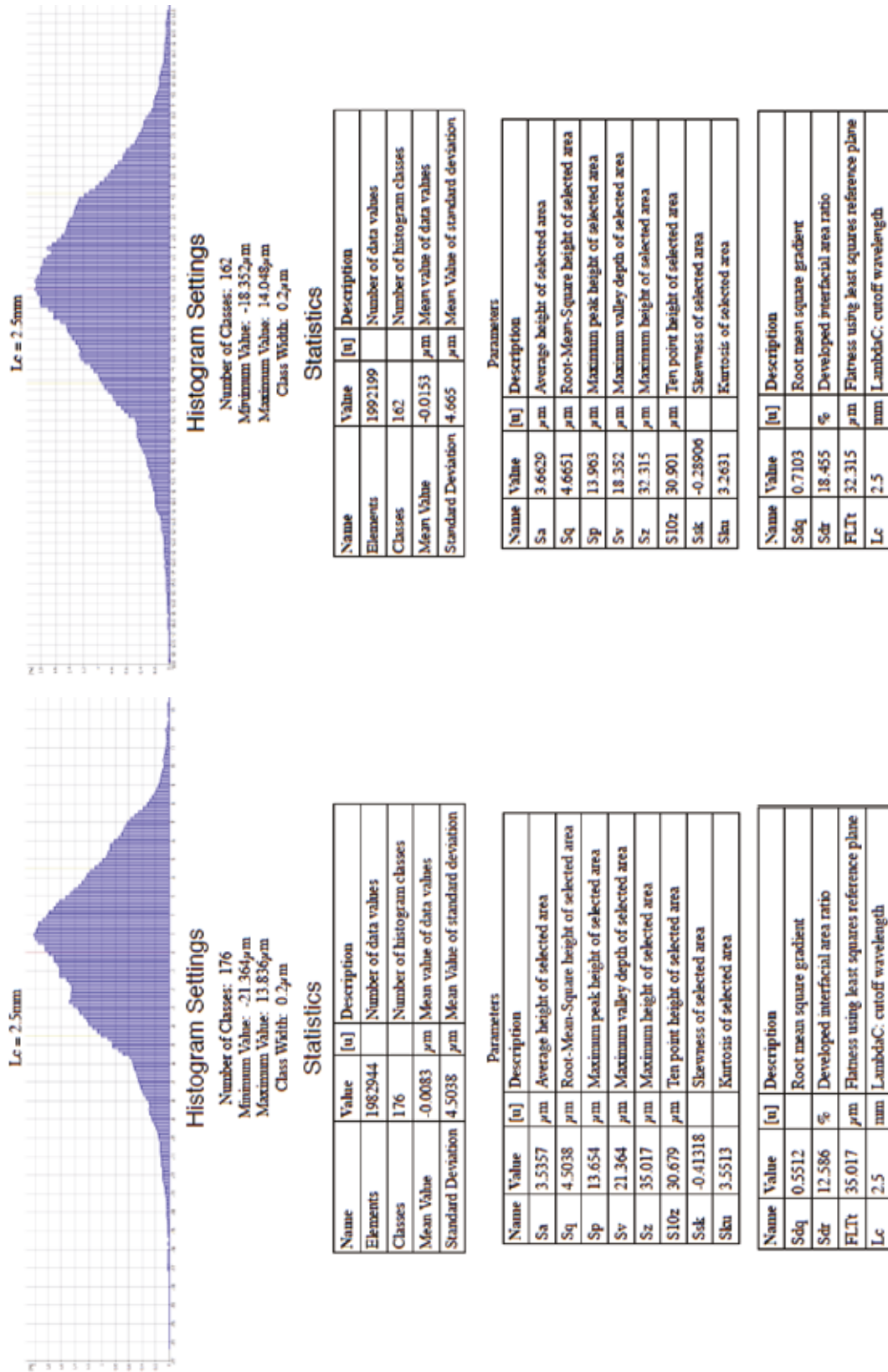


Figura 3.46 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 2m Ti SLA e do filme fino 2m Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

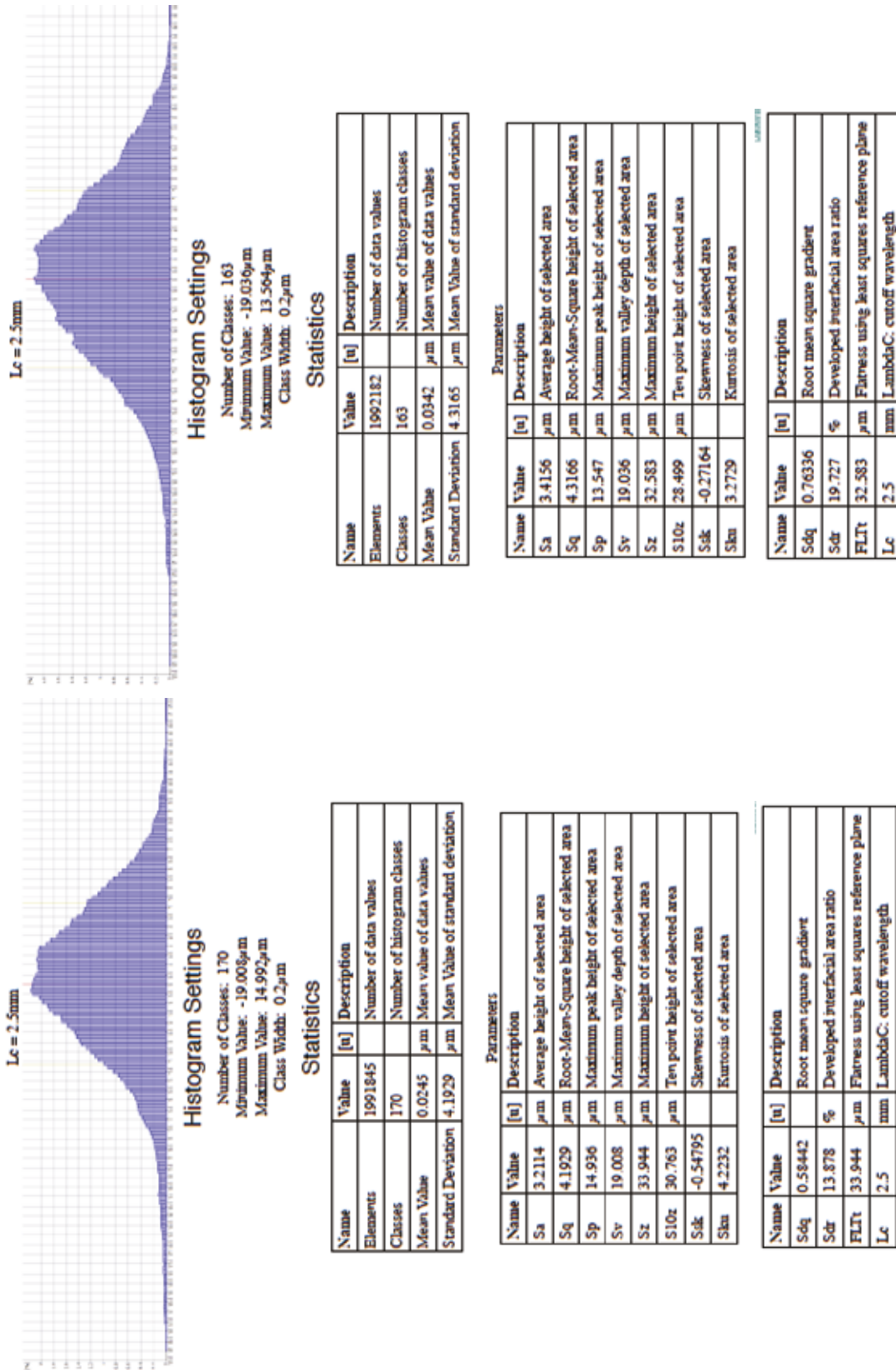


Figura 3.47 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 3m cp Ti SLA e do filme fino 3m Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

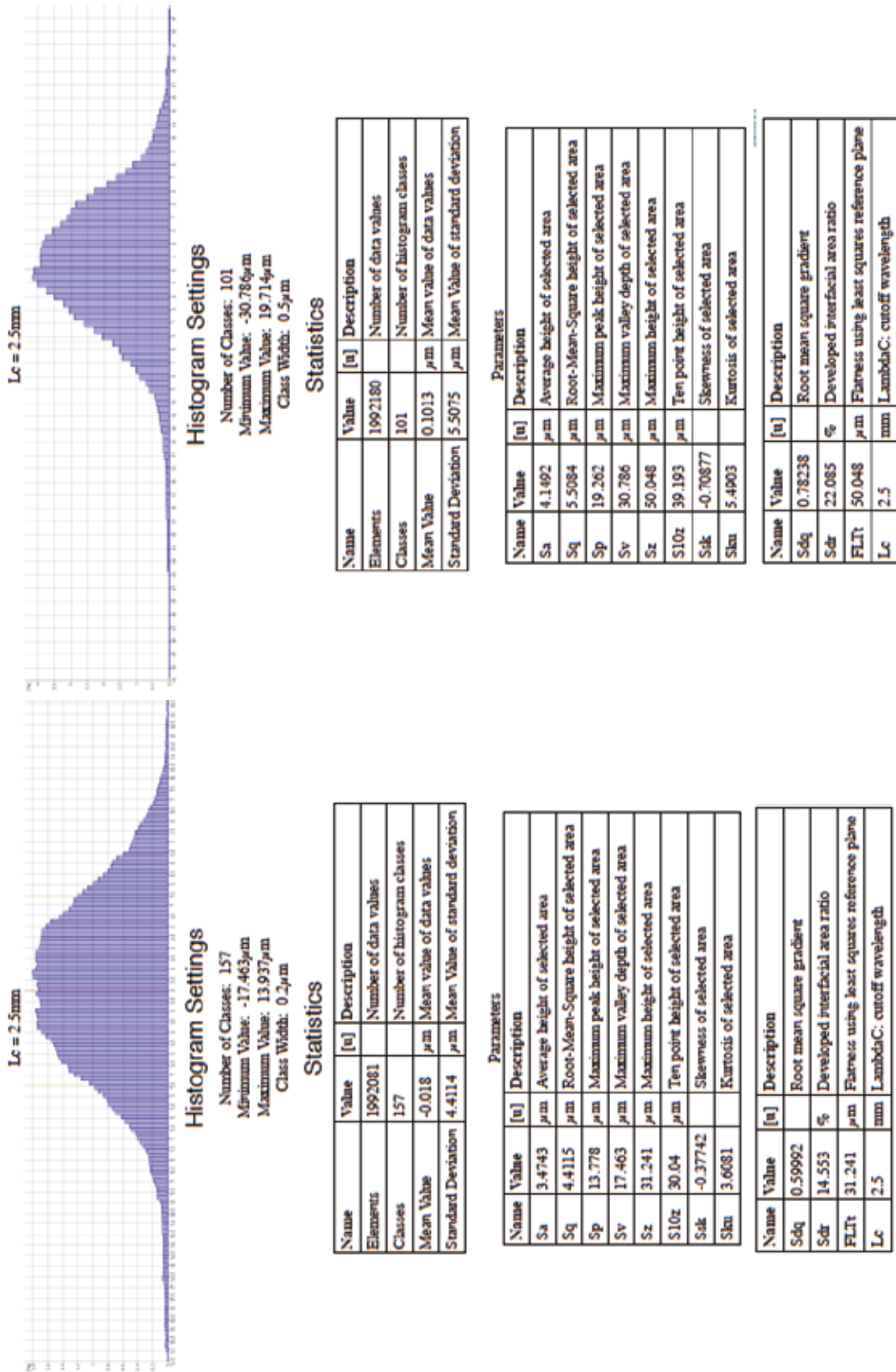


Figura 3.48 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra A cp Ti SLA e do filme fino A Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

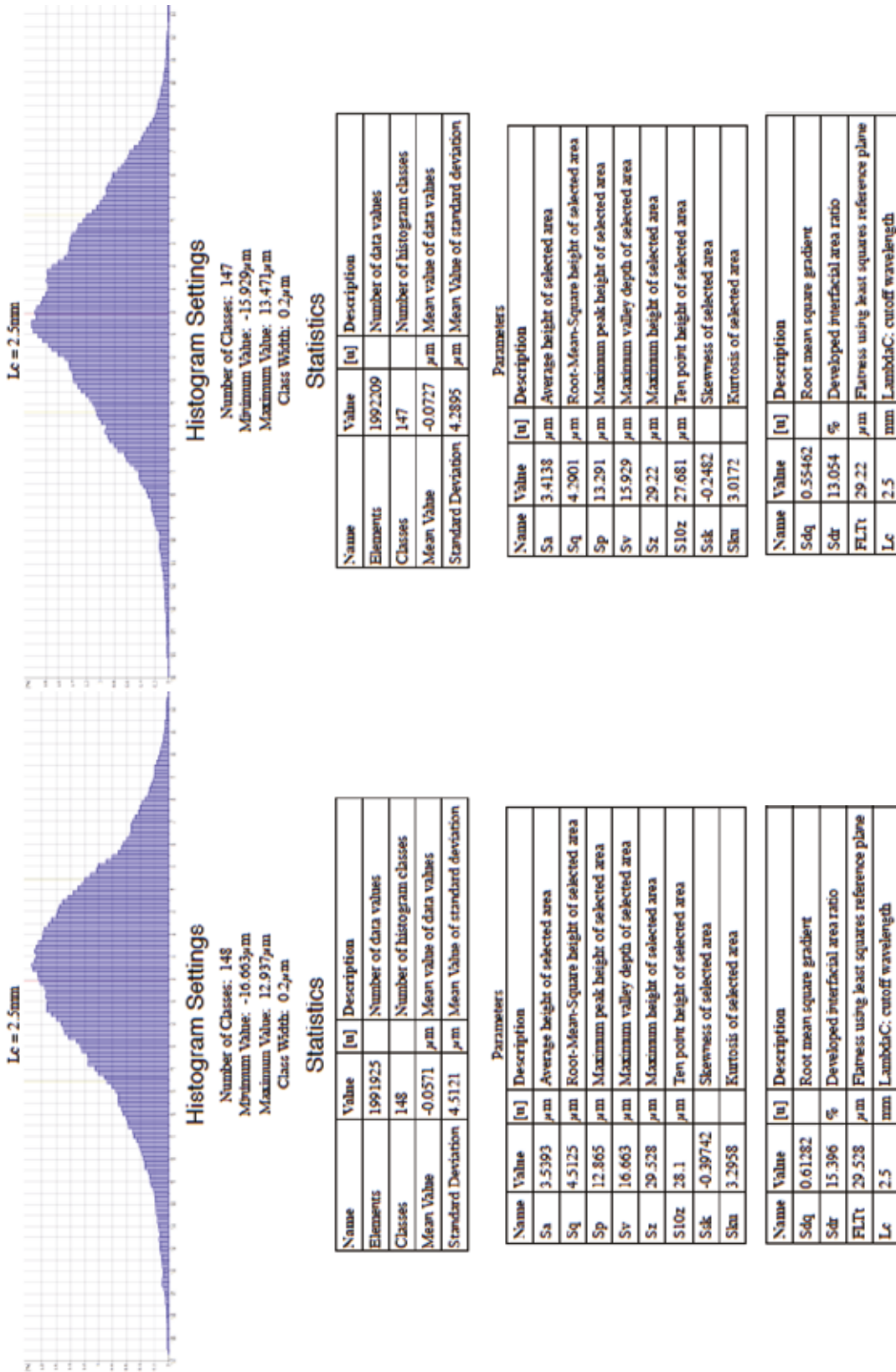


Figura 3.49 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra B cp Ti SLA e do filme fino B Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

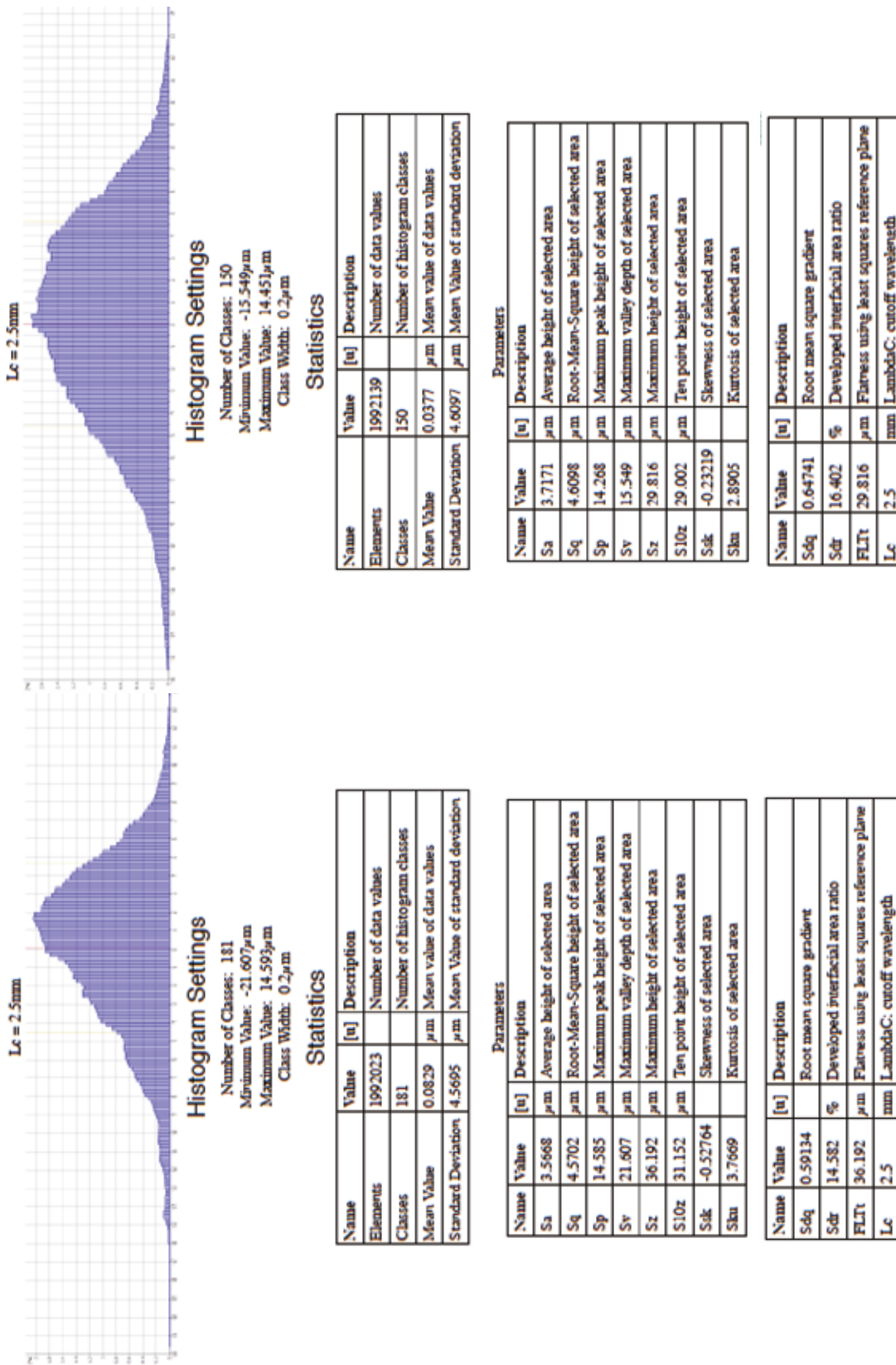


Figura 3.50 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra C cp Ti SLA e do filme fino C Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

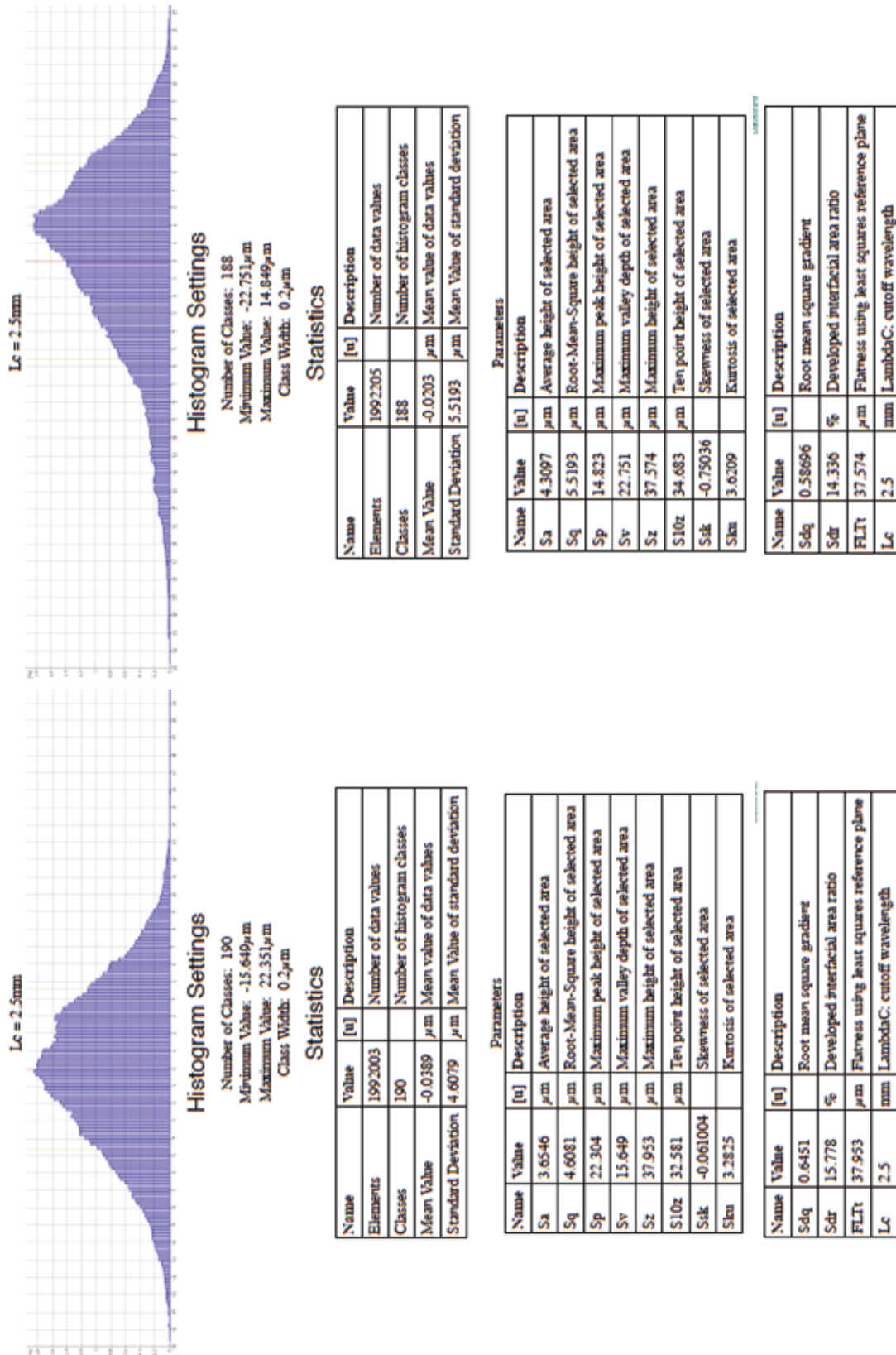


Figura 3.5 | – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra D cp Ti SLA e do filme fino D Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

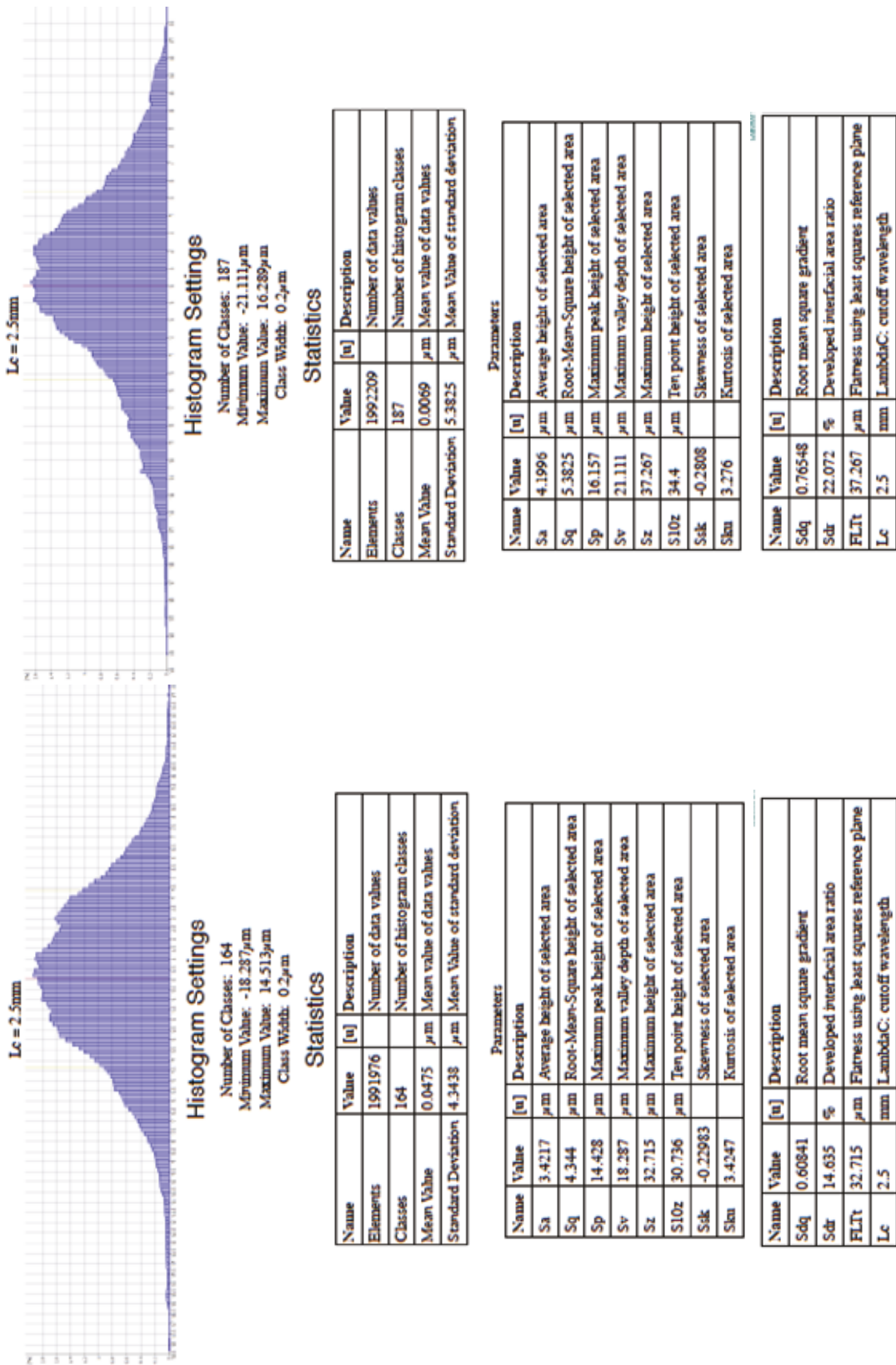


Figura 3.52 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra E cp Ti SLA e do filme fino E Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

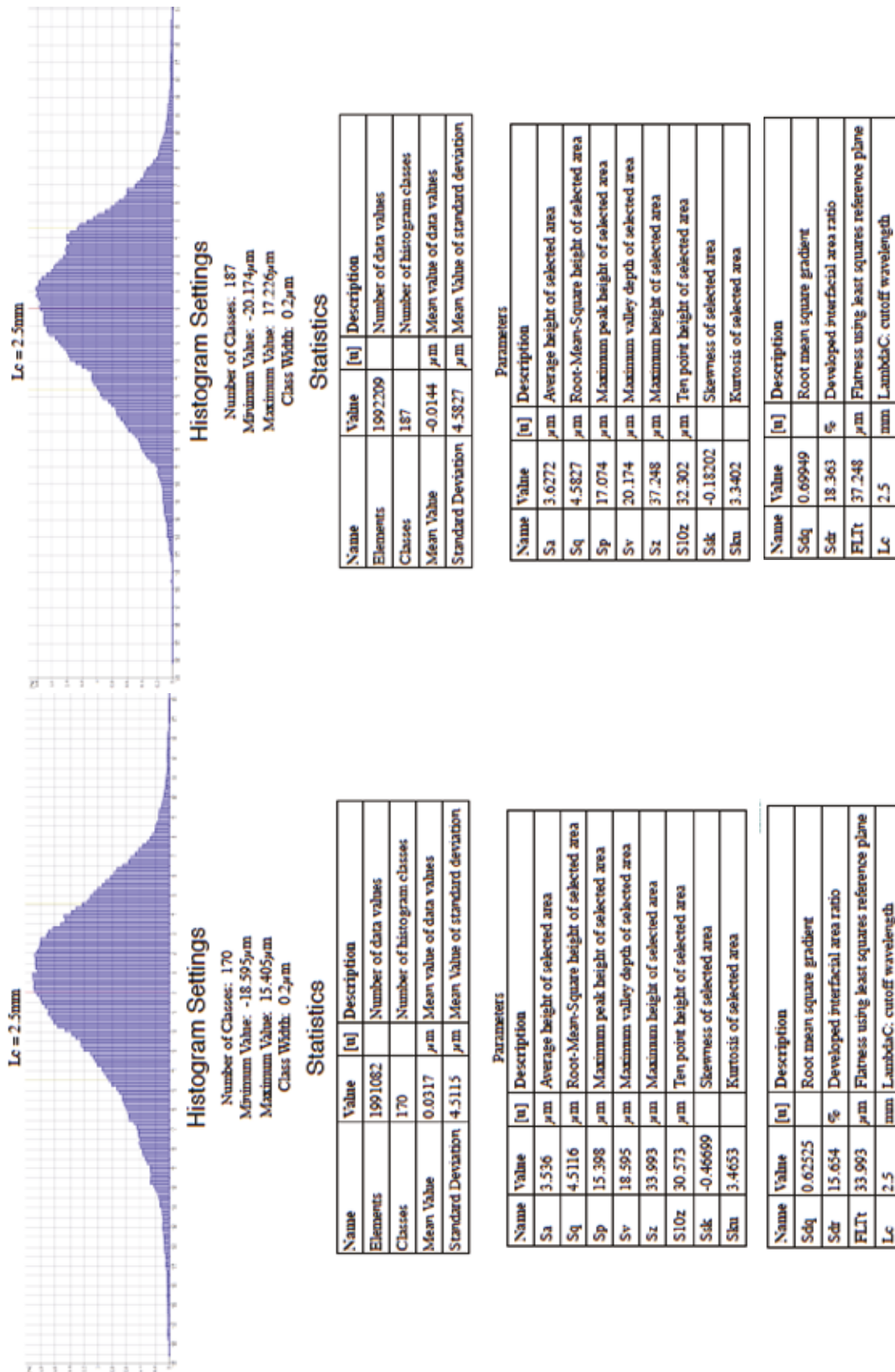


Figura 3.53 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra F cp Ti SLA e do filme fino F Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

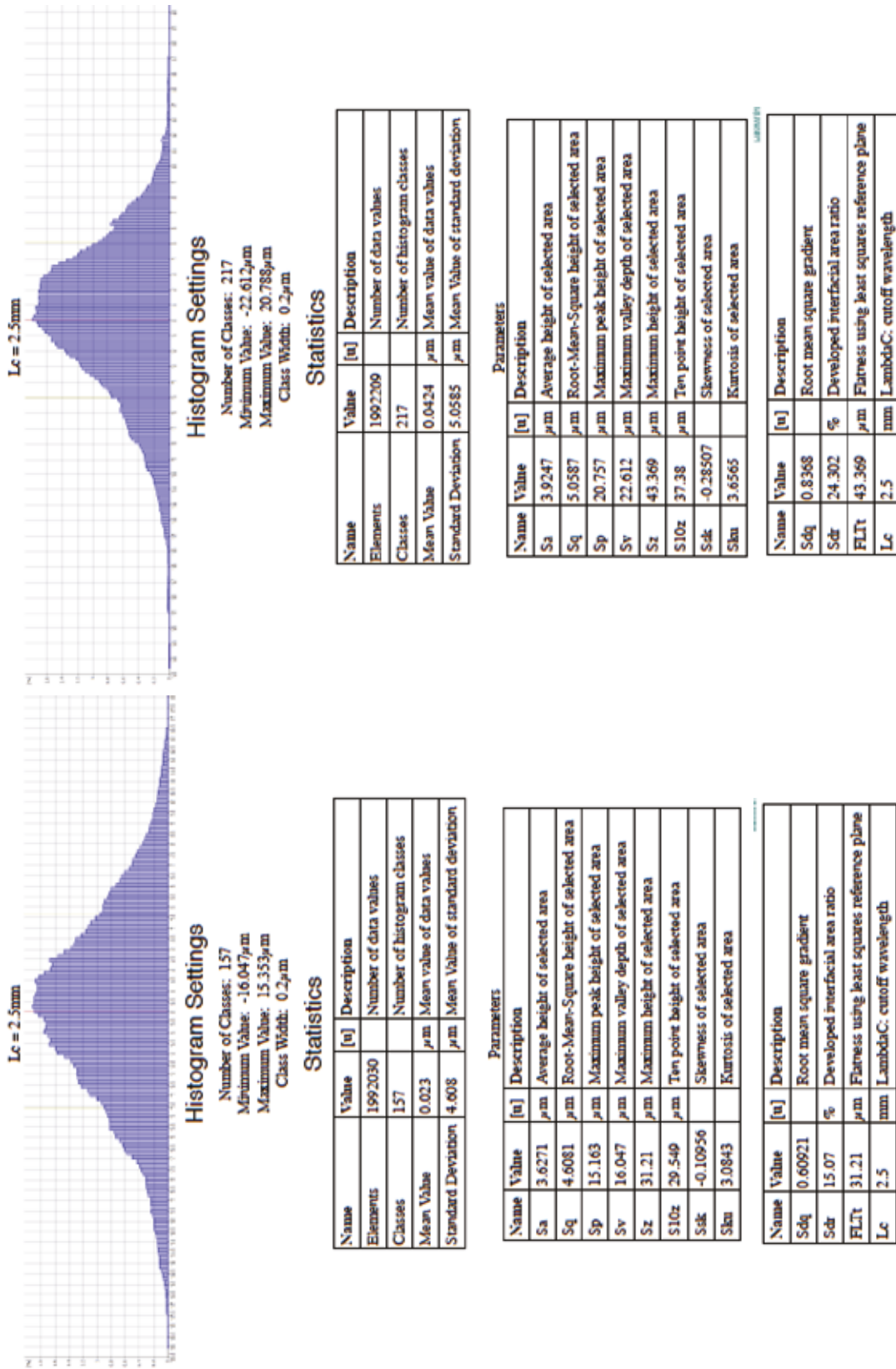


Figura 3.54 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra G cp Ti SLA e do filme fino G Ti 15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

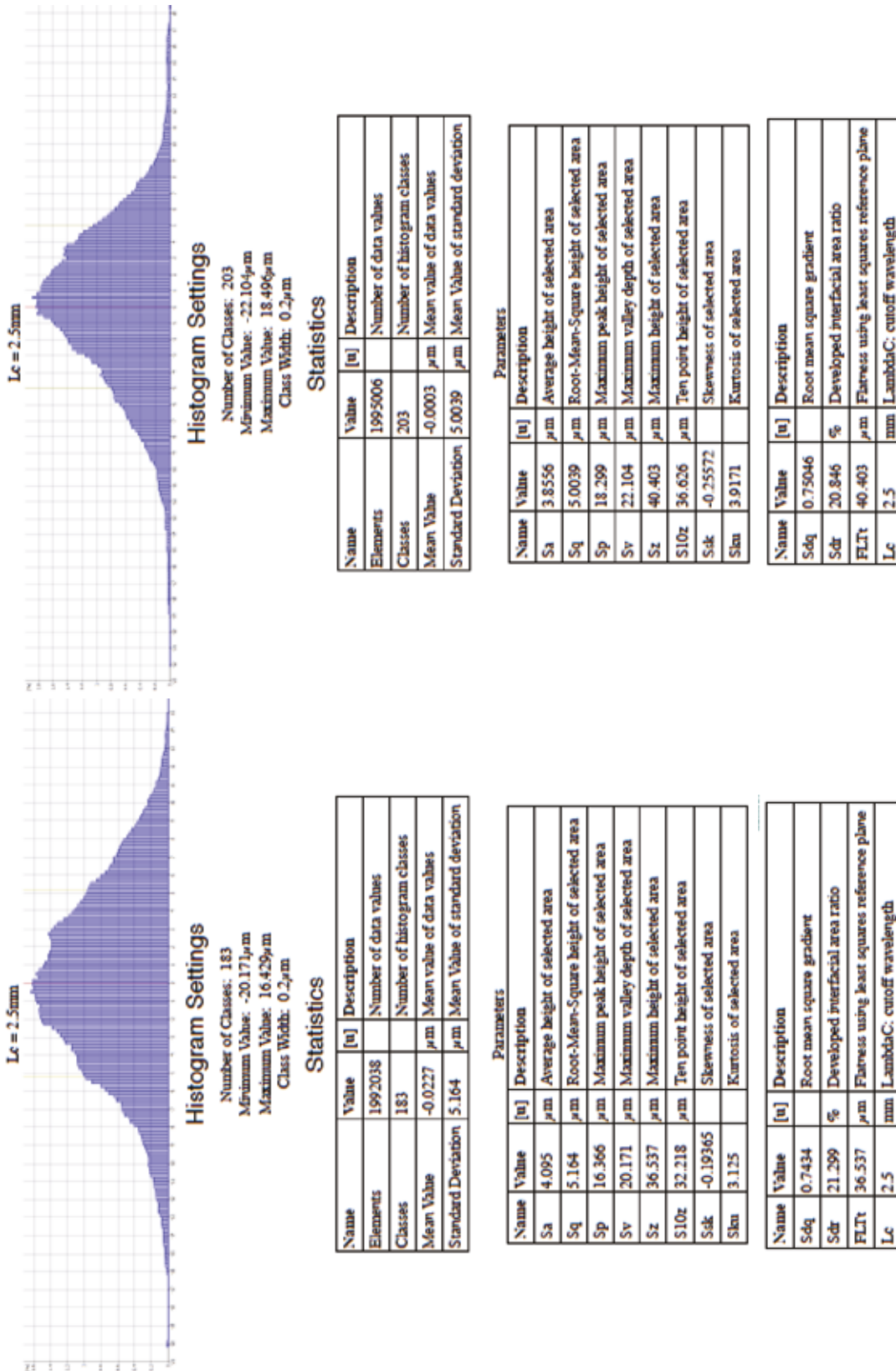
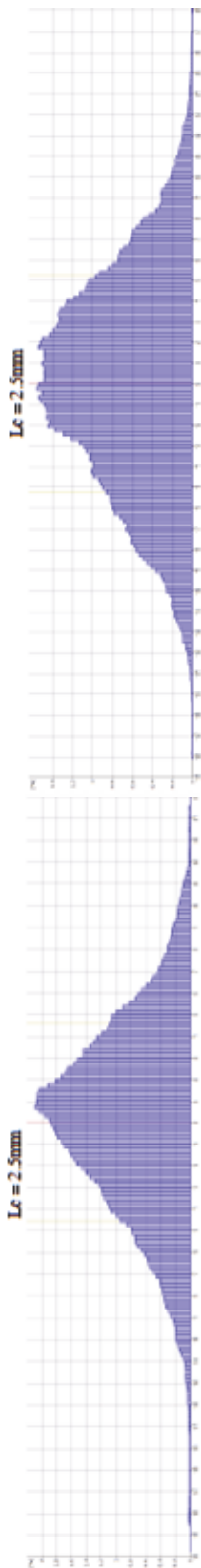


Figura 3.55 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra H cp Ti SLA e do filme fino H Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.



Histogram Settings

Number of Classes: 175
 Minimum Value: -19.777 μm
 Maximum Value: 15.223 μm
 Class Width: 0.2 μm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1992209		Number of data values
Classes	175		Number of histogram classes
Mean Value	0.0347	μm	Mean value of data values
Standard Deviation	4.5407	μm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	3.5240	μm	Average height of selected area
Sq	4.5408	μm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	15.22	μm	Maximum peak height of selected area
Sv	19.777	μm	Maximum valley depth of selected area
Sz	34.998	μm	Maximum height of selected area
S10z	32.759	μm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.29099		Skewness of selected area
Sku	3.692		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.62488		Root mean square gradient
Sdr	15.847	%	Developed interfacial area ratio
FLTt	34.998	μm	Flatness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Histogram Settings

Number of Classes: 181
 Minimum Value: -18.112 μm
 Maximum Value: 18.088 μm
 Class Width: 0.2 μm

Statistics

Name	Value	[u]	Description
Elements	1995060		Number of data values
Classes	181		Number of histogram classes
Mean Value	0.0416	μm	Mean value of data values
Standard Deviation	5.2255	μm	Mean Value of standard deviation

Parameters

Name	Value	[u]	Description
Sa	4.1763	μm	Average height of selected area
Sq	5.2257	μm	Root-Mean-Square height of selected area
Sp	17.892	μm	Maximum peak height of selected area
Sv	18.112	μm	Maximum valley depth of selected area
Sz	36.003	μm	Maximum height of selected area
S10z	34.761	μm	Ten point height of selected area
Ssk	-0.0020744		Skewness of selected area
Sku	2.9297		Kurtosis of selected area

Name	Value	[u]	Description
Sdq	0.70511		Root mean square gradient
Sdr	18.552	%	Developed interfacial area ratio
FLTt	36.003	μm	Flatness using least squares reference plane
Lc	2.5	mm	LambdaC: cutoff wavelength

Figura 3.56 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 1 cp Ti SLA e do filme fino 1Ti15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

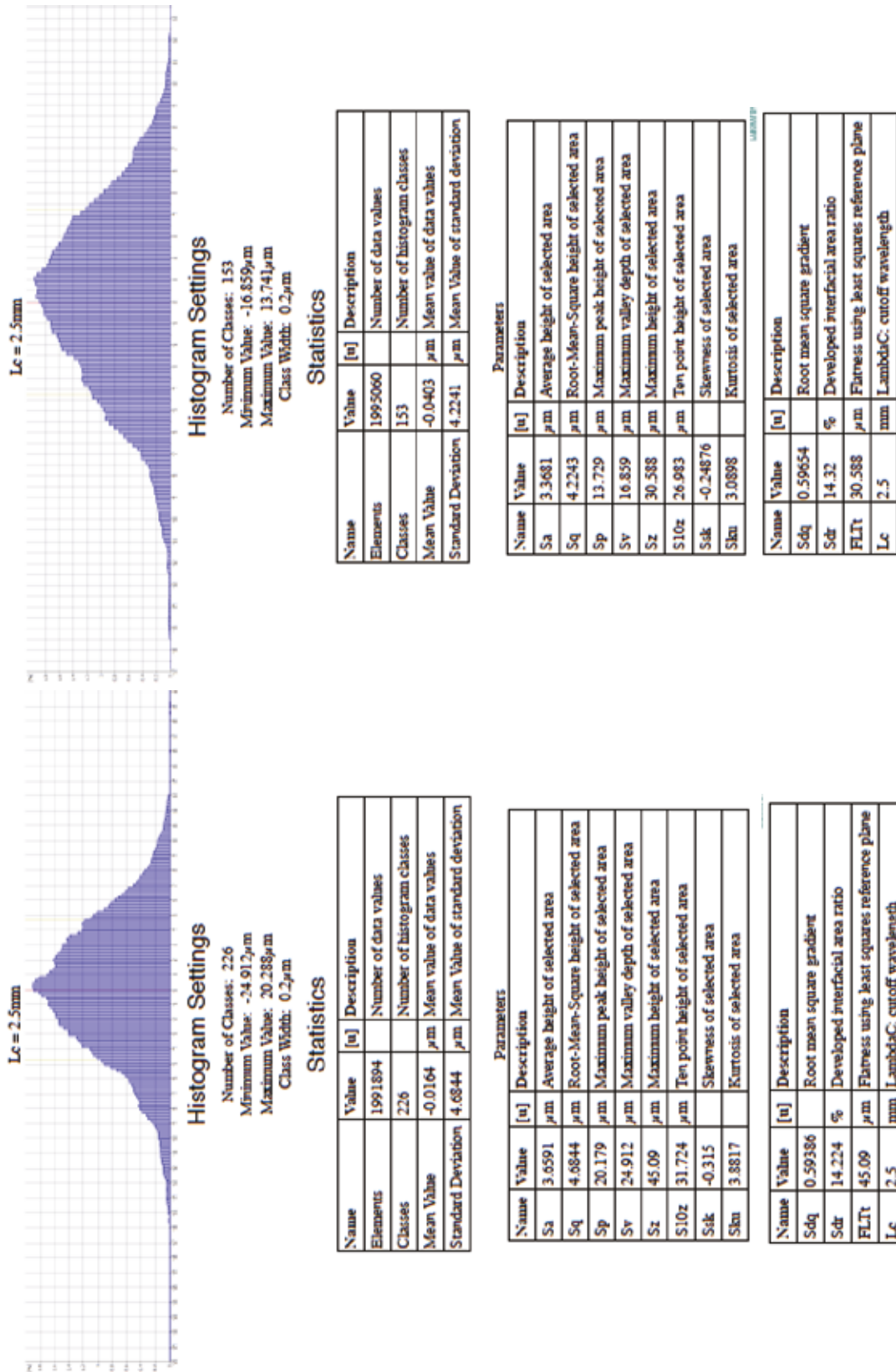


Figura 3.57 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra J cp Ti SLA e do filme fino J Ti 15Zr depositado sobre essa amostra, gerado pelo Surface Texture Measurement do microscópio ótico com variação infinita de foco.

Tabela 3.9 – Síntese de todos os dados topográficos da superfície antes e após o revestimento das amostras cp Ti SLA com um filme fino Ti15Zr resultantes da avaliação com microscópio ótico de variação infinita de foco.

Amostra	Sa (µm)		Sdr (%)		Ssk		Sku		FLTt (µm)	
	Antes	Após	Iniciais	Revestidas	Iniciais	Revestidas	Iniciais	Revestidas	Iniciais	Revestidas
1	3,8113	3,6873	14,03	18,089	-0,28445	-0,48757	3,0083	3,656	36,765	32,928
2	3,4051	3,5744	16,493	15,61	-0,36992	-0,31235	3,6587	2,9441	35,629	29,642
3	3,1245	3,5651	15,103	21,203	-0,25459	0,050785	3,3426	6,2334	29,723	56,658
4	3,5578	3,1652	15,899	13,99	-0,23326	-0,11125	2,9553	2,9262	31,332	29,71
5	3,222	3,6352	13,04	17,479	-0,14709	-0,38483	3,4016	3,3004	36,761	35,174
6	3,2734	3,466	16,708	17,542	-0,67645	-0,39491	4,4516	4,0062	34,572	33,714
7	3,6302	3,531	17,414	18,661	-0,6459	-0,14355	4,1589	3,158	34,681	32,047
8	3,4774	3,6389	17,042	16,174	-0,075006	-0,395	3,2828	3,7707	38,438	39,989
9	3,2818	3,299	15,04	14,724	-0,23243	-0,24121	3,6454	3,2676	34,46	32,351
10	3,605	3,2468	13,836	14,775	0,19113	-0,1554	4,1549	3,4914	40,669	35,037
11	3,254	3,4751	17,482	13,613	-0,37667	-0,36973	3,6816	3,894	36,475	36,923
12	3,292	3,4751	15,505	13,507	-0,13261	-0,3045	3,1667	3,4068	30,077	35,012
13	3,5152	3,5263	17,188	19,082	-0,31874	-0,42213	4,1305	4,8368	41,225	49,107
14	3,3842	3,399	16,915	14,965	-0,54869	-0,35922	4,072	3,3522	37,471	33,152
15	3,5357	3,6629	12,586	18,455	-0,41318	-0,28906	3,5513	3,2631	35,017	32,315
16	3,2114	3,4156	13,878	19,727	-0,54795	-0,27164	4,2232	3,2729	33,944	32,583
1m	3,3249	3,6807	17,177	20,164	-0,28567	-0,16066	3,4901	3,3144	34,314	34,083
2m	3,7577	3,6501	19,795	16,803	-0,34005	-0,1214	3,5725	3,0838	40,149	34,565
3m	3,2753	3,6222	15,692	16,81	-0,12177	-0,29857	3,4775	3,5403	33,646	35,778
A	3,4742	4,1492	14,553	22,085	-0,37742	-0,70877	3,6081	5,4903	31,241	50,048
B	3,5392	3,4138	15,396	13,054	-0,39742	-0,2482	3,2958	3,0172	29,528	29,22
C	3,5668	3,7171	14,582	16,402	-0,52764	-0,23219	3,7669	2,8905	36,192	29,816
D	3,6546	4,3097	15,778	14,336	-0,061004	-0,75036	3,2825	3,6209	37,953	37,574
E	3,4217	4,1696	14,635	22,072	-0,22983	-0,2808	3,4247	3,276	32,715	37,267
F	3,536	3,6272	15,654	18,363	-0,46699	-0,18202	3,4653	3,3402	33,993	37,248
G	3,6271	3,9247	15,07	24,302	-0,10956	-0,28507	3,0843	3,6565	31,21	43,369
H	4,095	3,8556	21,299	20,846	-0,19365	-0,25572	3,125	3,9171	36,537	40,403
I	3,5249	4,1763	15,847	18,552	-0,29099	-0,0020744	3,692	2,9297	34,998	36,003
J	3,6591	3,3681	14,224	14,32	-0,315	-0,24876	3,8817	3,0898	45,09	30,588

3.3.2. Caracterização Mecânica

Foram efetuados testes de dureza e determinado o módulo de Young ou módulo de elasticidade. Realizaram-se ensaios de nanoindentação, aplicando uma carga máxima de 3 mN, de modo a evitar a influência do substrato. Na figura 3.58 é apresentado um exemplo da curva de carga-descarga de um dos ensaios de nanoindentação realizados neste estudo.

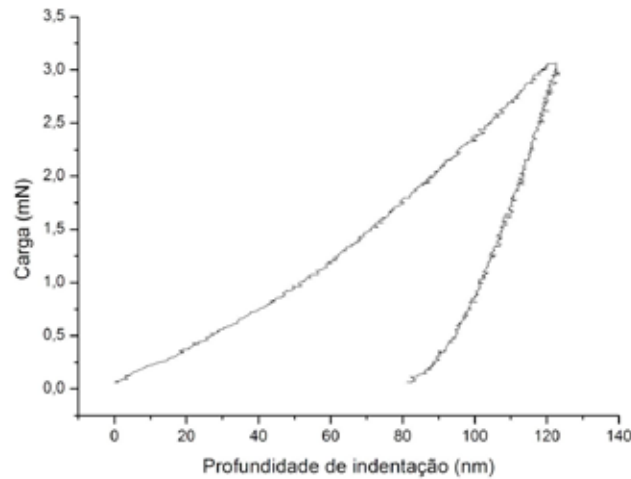


Figura 3.58 – Curva de carga-descarga exemplificativa.

Os resultados dos ensaios de nanoindentação dos filmes de titânio puro e com zircônio são apresentados na tabela 3.10 e na figura 3.59. Estes filmes foram depositados sobre substratos de aço ($E = 190\text{-}210$ GPa). Para cada filme fino foram efetuados cerca de 50 ensaios, sendo o desvio padrão associado aos valores de dureza bastante inferior a 10%, como requerido para este tipo de ensaio.

Tabela 3.10 – Dureza e módulo de Young de filmes Ti-(Zr) depositados sobre aço.

	Profundidade de contacto da indentação (nm)	Dureza (GPa)	Módulo de Young (GPa)
Ti	120	$5,3 \pm 0,41$	179 ± 9
Ti15Zr	113	$5,9 \pm 0,20$	189 ± 6
Ti20Zr	105	$6,6 \pm 0,28$	172 ± 8

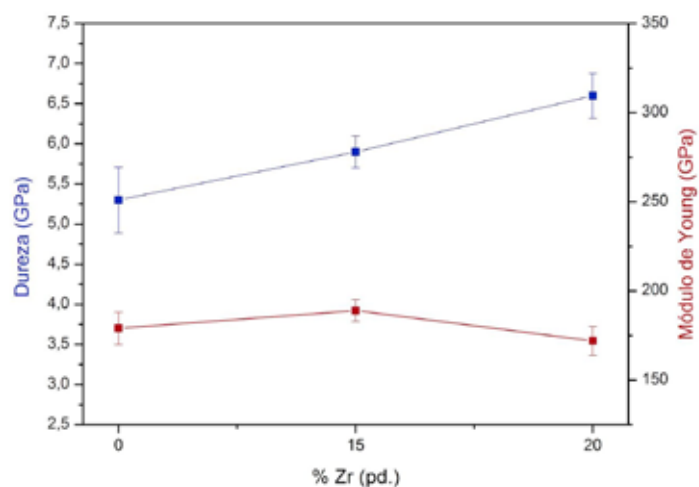


Figura 3.59 – Dureza e módulo de Young em função do teor de zircônio.

3.3.3. Caracterização do Potencial Biológico *in vitro*

3.3.3.1. Potencial Zeta

Os valores de potencial zeta das superfícies de titânio polidas e revestidas com filmes Ti-(Zr) e do filme fino mais rico em zircônio depositado sobre um substrato de aço constam da tabela 3.11. Para o efeito, foi utilizado um eletrólito de KCl, a 1 mM e pH próximo de 7. Os valores apresentados correspondem à média de 8 passagens do eletrólito, 4 em cada direção. Estes ensaios não foram realizados em superfícies SLA.

Tabela 3.11 – Valores de Potencial Zeta e de pH médio das superfícies revestidas com Ti e Ti-Zr.

Filme fino	Potencial Zeta (mV)	pH médio
Ti	-72 ± 3,0	6,8
Ti15Zr	-31 ± 0,8	6,9
Ti20Zr	-58 ± 2,9	6,8
Ti15Zr SS	-33 ± 5,5	6,7

Os resultados apresentados são todos negativos; o substrato não parece influenciar a carga superficial das amostras revestidas.

3.3.3.2. Potencial biológico em solução de Hank

Após imersão das amostras em solução de Hank por períodos de 3, 7 e 28 dias, formou-se uma quantidade apreciável de precipitados de cálcio e fosfato na generalidade das amostras (Figuras 3.60 a 3.64). A formação dos precipitados foi confirmado por análise com espectrometria de dispersão de energia. Os gráficos 3.6 e 3.7 mostram a variação do Ca e do P ao longo dos dias de imersão por cada superfície investigada, enquanto que na tabela 3.12 são apresentadas as médias dos valores encontrados em cada amostra.

Os dados de EDS para algumas superfícies são apresentados nas figuras 3.65, 3.66 e 3.67 onde: nas superfícies com Zr (maciço ou filme fino) ocorre sobreposição do pico Zr e P; em todas as superfícies são visíveis os picos do Ti, existindo também elementos em quantidades vestigiais principalmente na superfície cp Ti SLA. Os restantes dados de EDS são apresentados em anexo.

Tabela 3.12 – Resultados da análise por EDS da formação de precipitados de Ca e P (% atômica) aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank das superfícies cp Ti SLA, TiZr e os filmes de 1 μm R545 Ti25Zr, R546 Ti20Zr e R547 Ti15Zr depositados sobre substratos cp Ti SLA por pulverização catódica.

cp Ti SLA

	3 Dias	7 Dias	28 Dias
Cálcio	<4,6 at.%	<5,9 at.%	\approx 7,6 at.%
Fosfato	<3,2 at.%	<4 at.%	\approx 5,2 at.%

TiZr

	3 Dias	7 Dias	28 Dias
Cálcio	<3,4 at.%	<7,8 at.%	\approx 11,5 at.%
Fosfato	<1,1 at.%	<4,1 at.%	\approx 8,7 at.%

R545 (25 wt.% Zr)

	3 Dias	7 Dias	28 Dias
Cálcio	<3,7 at.%	<8,5 at.%	\approx 12,2 at.%
Fosfato	<1,7 at.%	<4,8 at.%	\approx 14 at.%

R546 (20 wt.% Zr)

	3 Dias	7 Dias	28 Dias
Cálcio	<3,7 at.%	<3,7 at.%	\approx 9,5 at.%
Fosfato	<0,8 at.%	<0,9 at.%	\approx 3,8 at.%

R547 (15 wt.% Zr)

	3 Dias	7 Dias	28 Dias
Cálcio	<10,9 at.%	<9,4 at.%	\approx 9,4 at.%
Fosfato	<5 at.%	<6,2 at.%	\approx 3 at.%

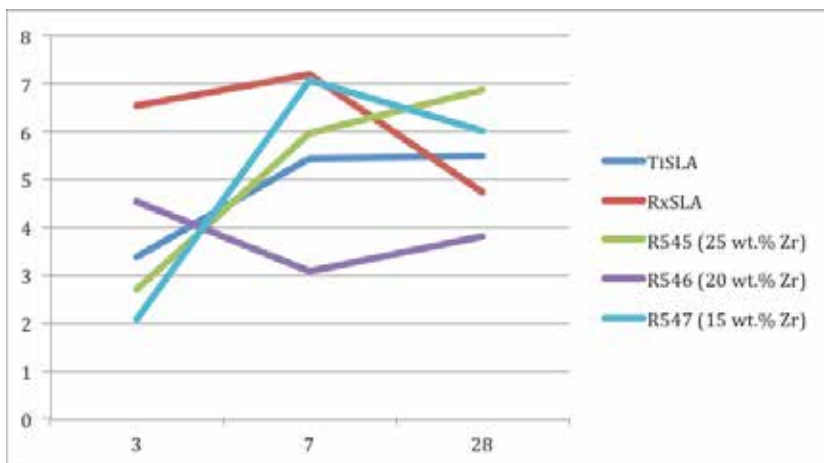


Gráfico 3.6 – Evolução da formação de precipitados de Ca aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank das superfícies cp Ti SLA, TiZr e os filmes de 1 µm R545 Ti25Zr, R546 Ti20Zr e R547 Ti15Zr depositados sobre substratos cp Ti SLA por pulverização catódica.

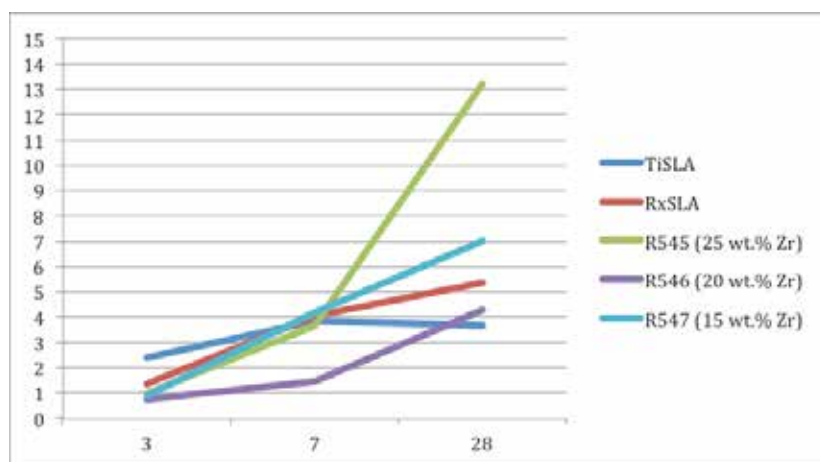


Gráfico 3.7 – Evolução da formação de precipitados de P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank das superfícies cp Ti SLA, TiZr e os filmes de 1 µm R545 Ti25Zr, R546 Ti20Zr e R547 Ti15Zr depositados sobre substratos cp Ti SLA por pulverização catódica.

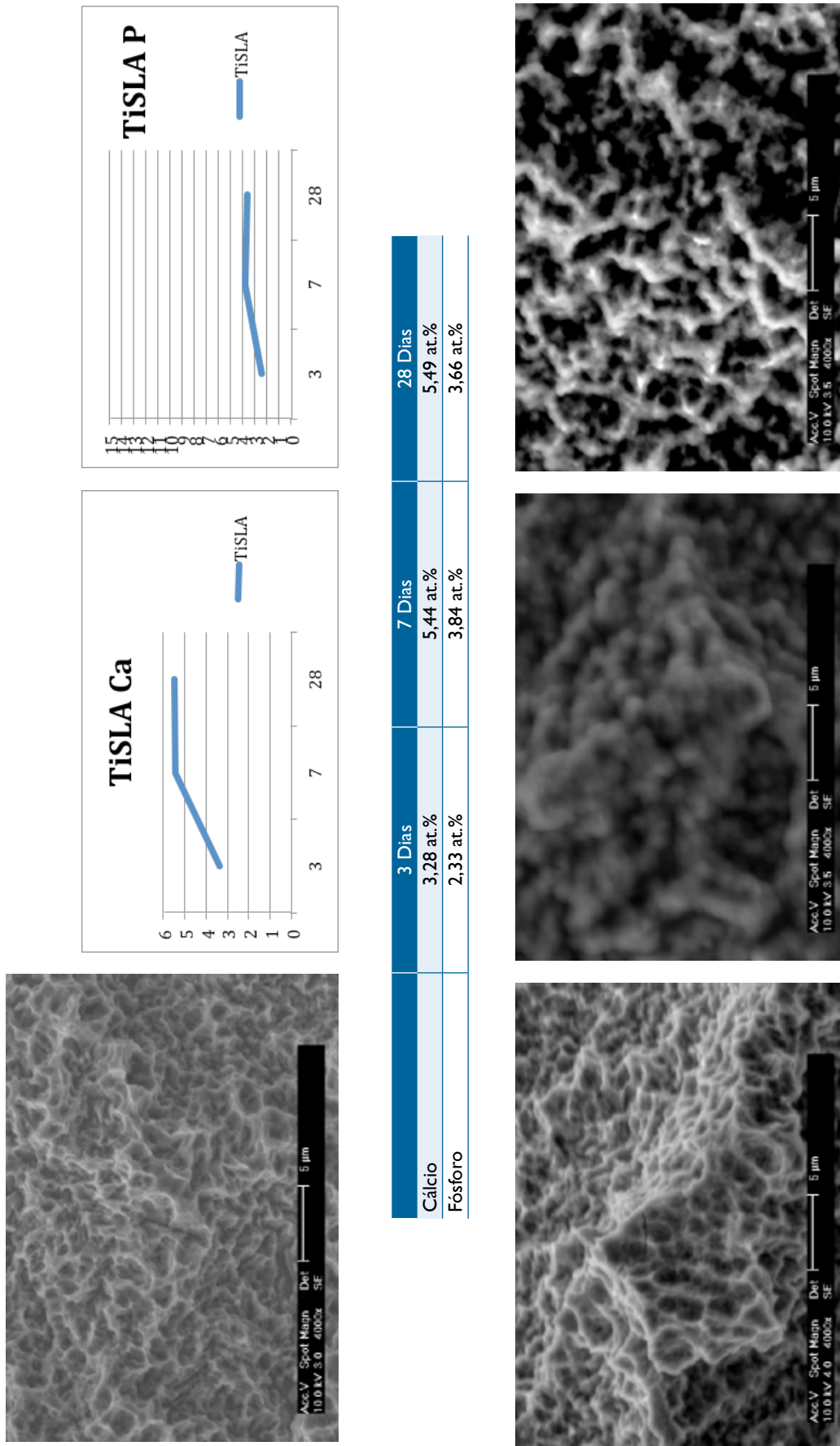


Figura 3.60 – Formação de precipitados de Ca e P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank de amostras cp Ti SLA determinada após análise por espectrometria de dispersão de energia (EDS) ; micrografias de SEM das superfícies antes de deposição, 3, 7 e 28 dias com aumento x4000.

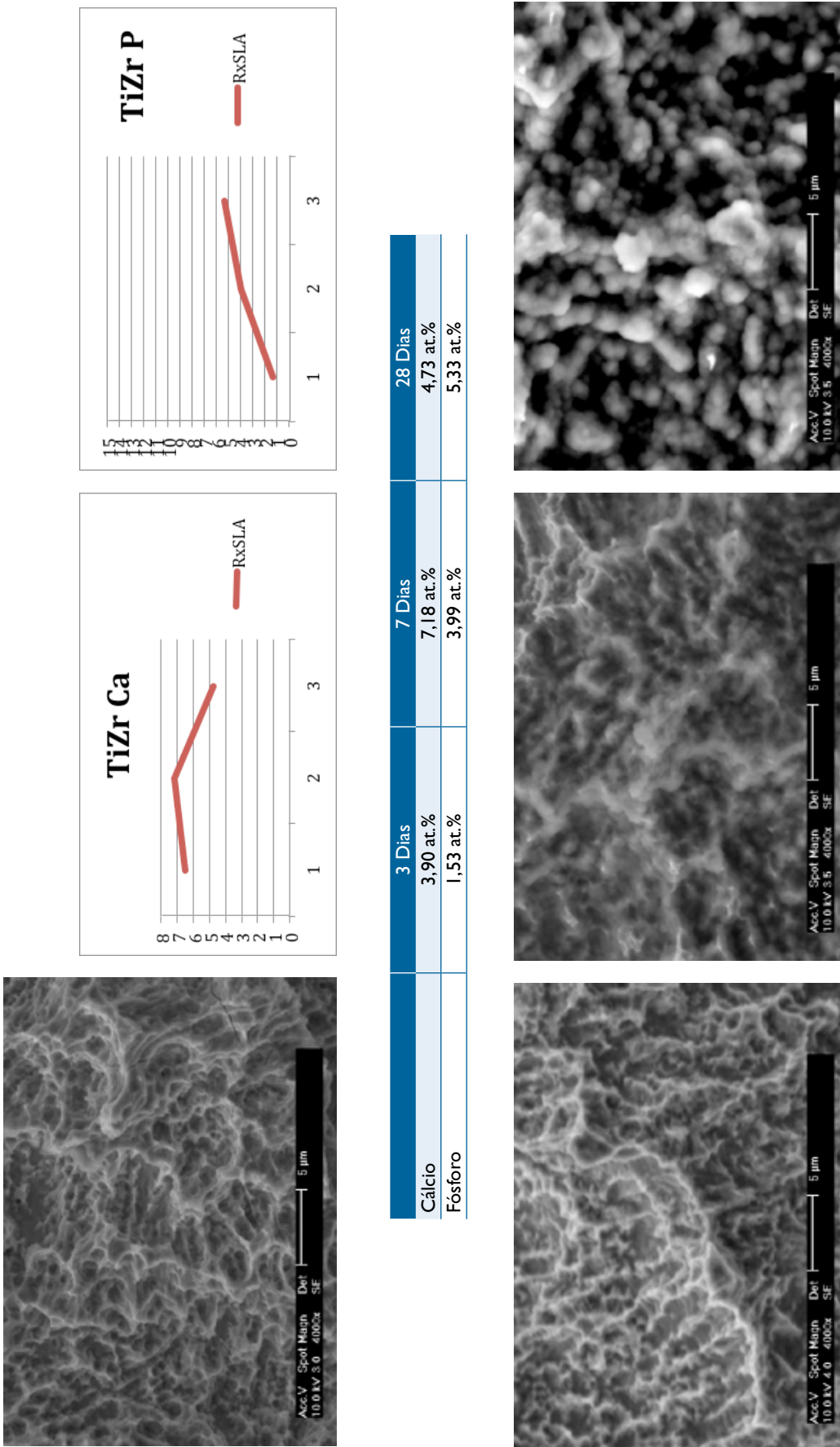


Figura 3.61 – Formação de precipitados de Ca e P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank de amostras TiZr determinada após análise por espectrometria de dispersão de energia (EDS) ; micrografias de SEM das superfícies antes de deposição, 3, 7 e 28 dias com aumento x4000.

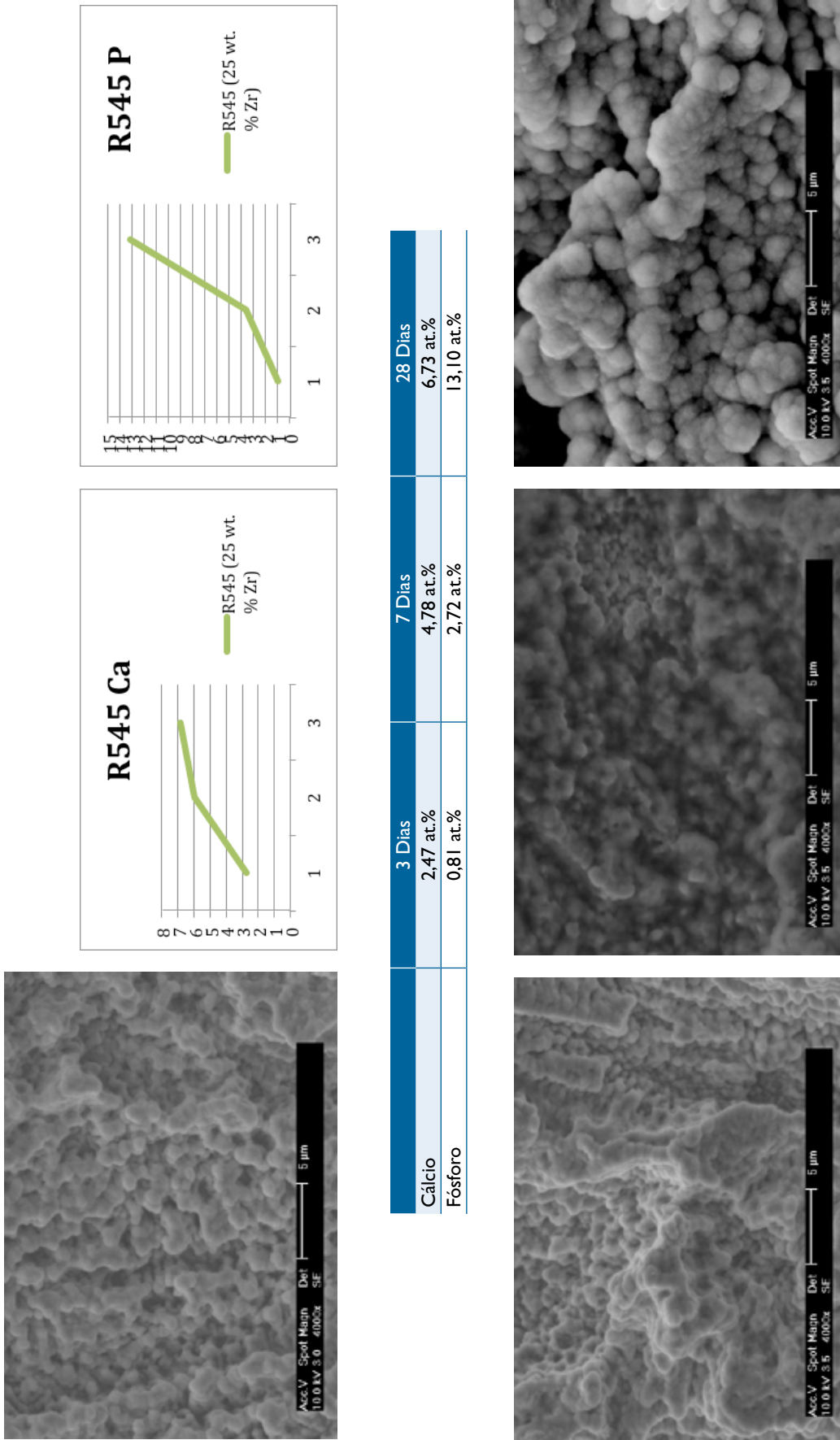


Figura 3.62 – Formação de precipitados de Ca e P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank de amostras de cp Ti SLA revestidas por pulverização catódica com o filme de 1 µm de espessura Ti25Zr R545; determinação por espectrometria de dispersão de energia (EDS) ; micrografias de SEM das superfícies antes de deposição, 3, 7 e 28 dias com aumento x4000.

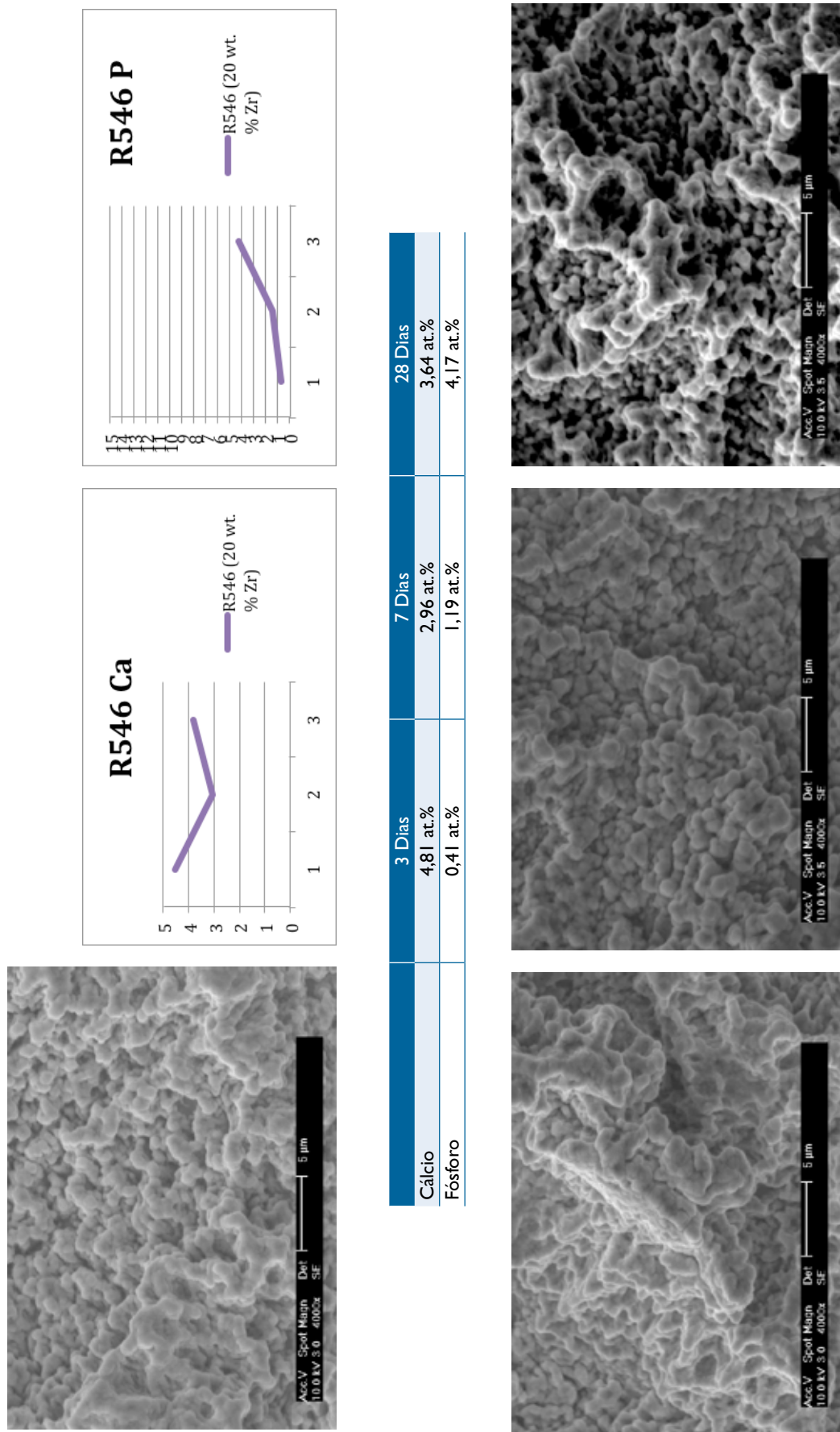


Figura 3.63 – Formação de precipitados de Ca e P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank de amostras de cp Ti SLA revestidas por pulverização catódica com o filme de 1 µm de espessura Ti20Zr R546; determinação por espectrometria de dispersão de energia (EDS); micrografias de SEM das superfícies antes de deposição, 3, 7 e 28 dias com aumento x4000.

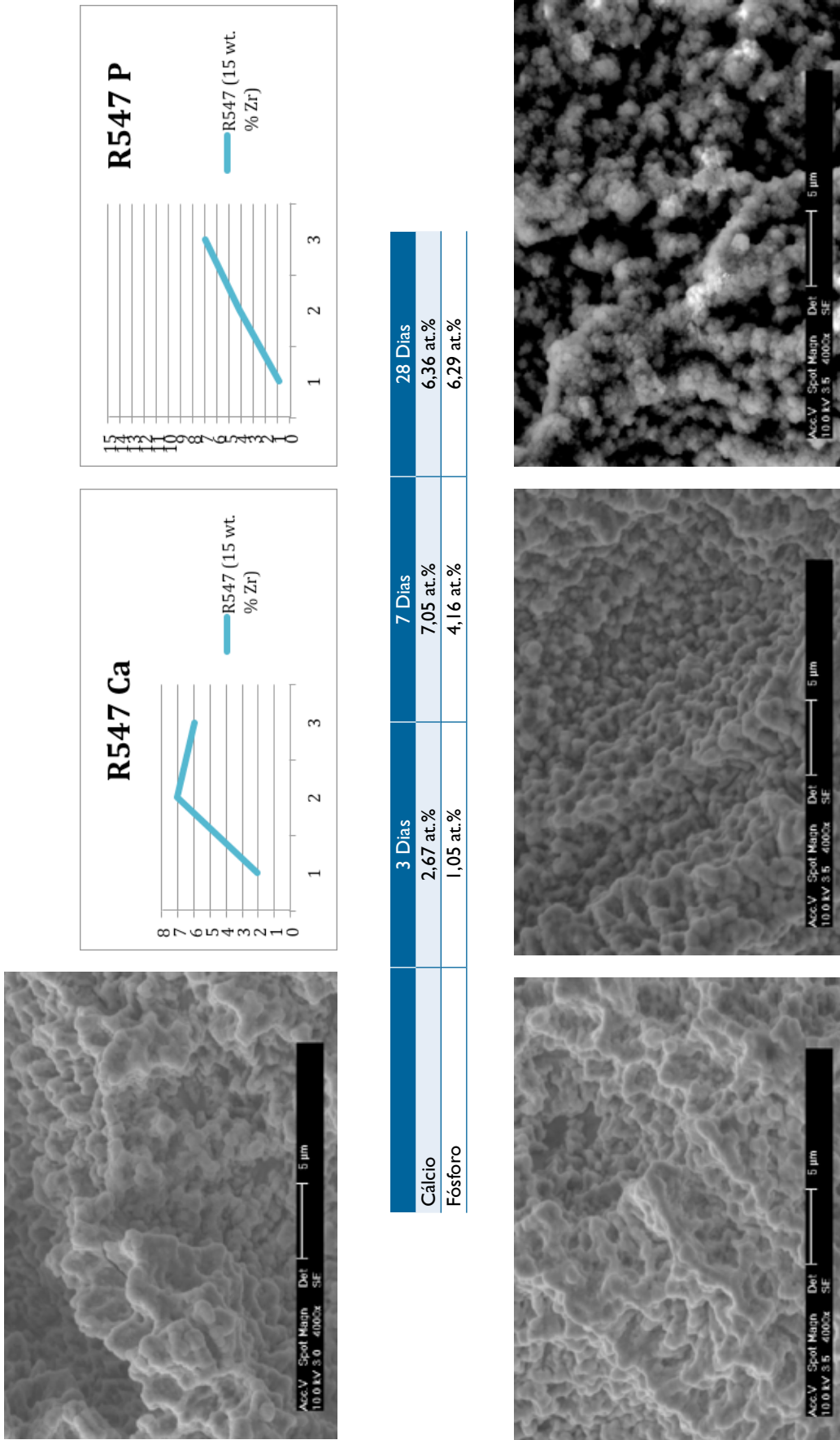


Figura 3.64 – Formação de precipitados de Ca e P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank de amostras de cp Ti SLA revestidas por pulverização catódica com o filme de 1 µm de espessura Ti15Zr R547; determinação por espectrometria de dispersão de energia (EDS) ; micrografias de SEM das superfícies antes de deposição, 3, 7 e 28 dias com aumento x4000.

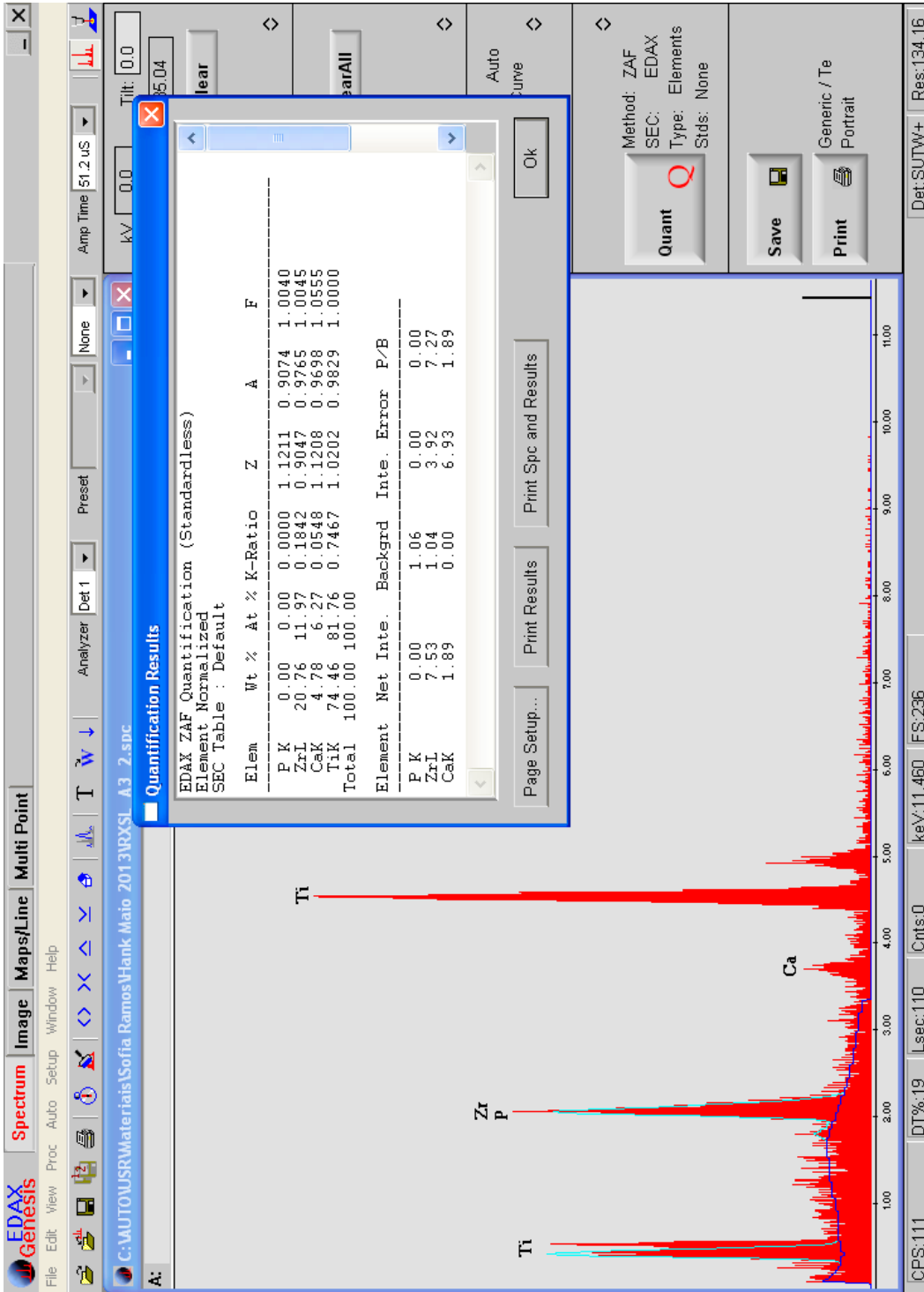


Figura 3.65 – TiZr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície TiZr após 3 dias de inserção em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

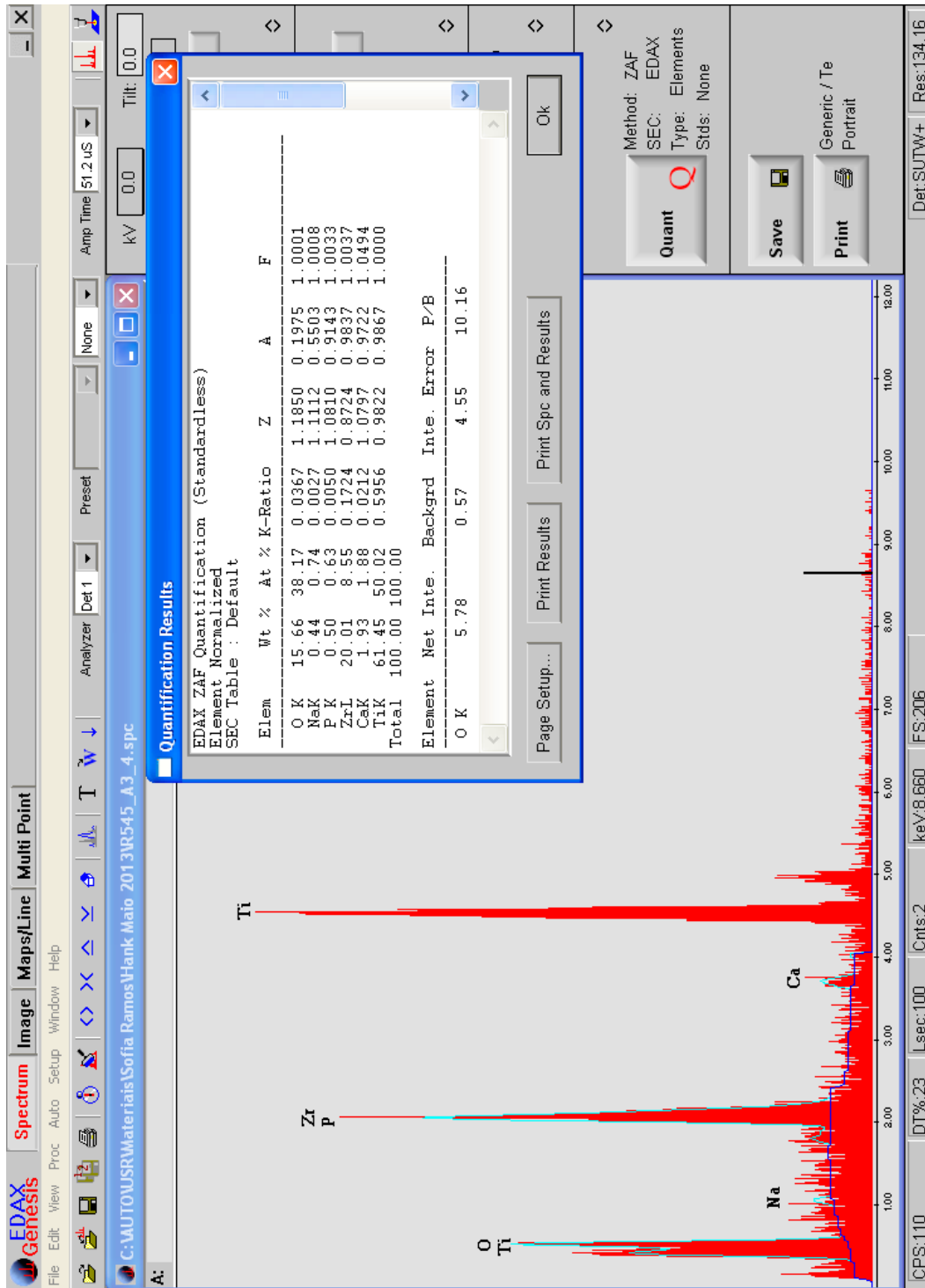


Figura 3.66 – R545 Ti25Zr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme R545 Ti25Zr após 3 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

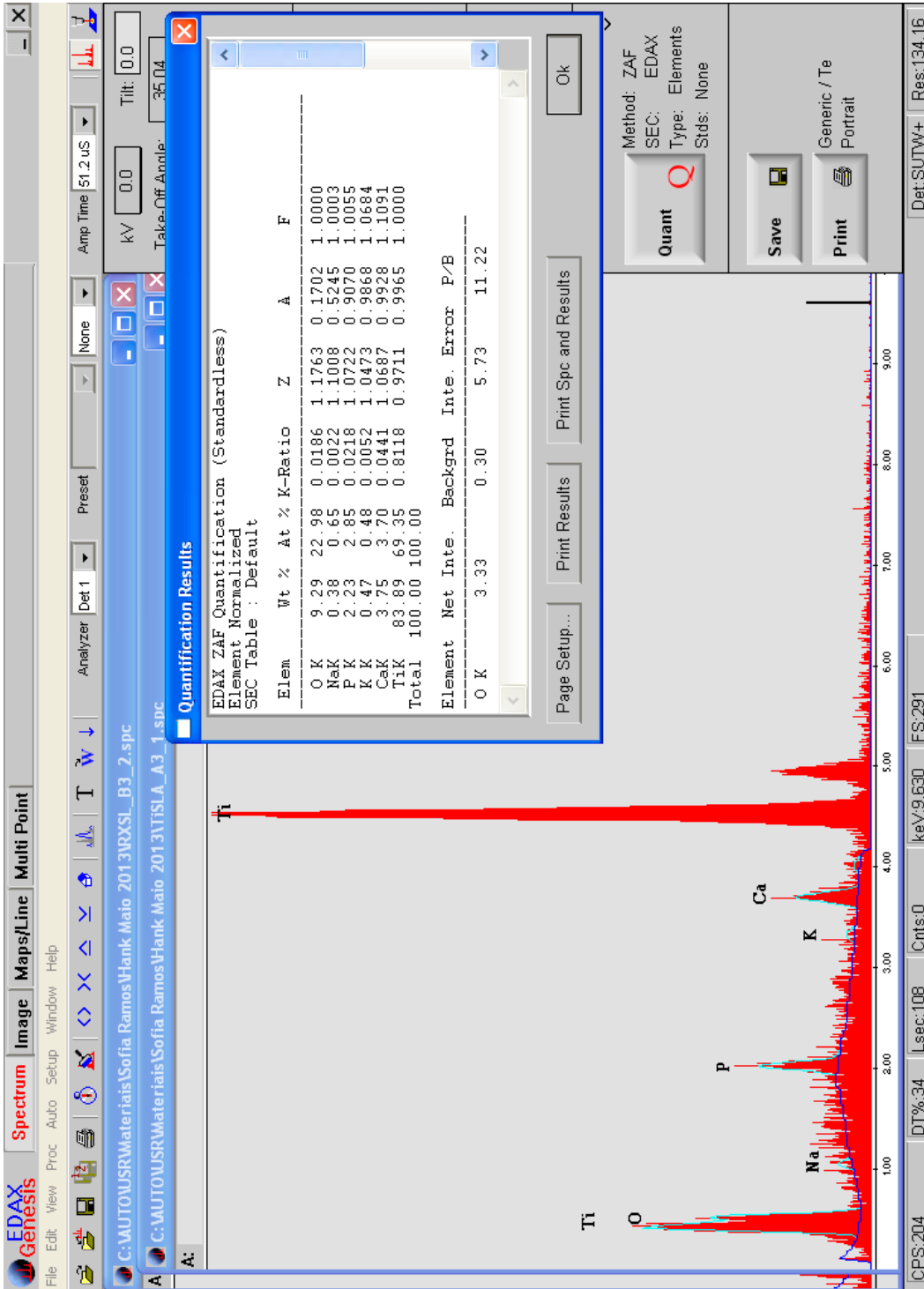


Figura 3.67 – cp Ti SLA 3 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície cp Ti SLA após 3 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, P e Ca; identificação de Na e K; composição química após análise por EDS.

3.4. Culturas celulares

As figuras XYZ mostram imagens de fotomicrografias obtidas com microscopia confocal laser da cultura células osteoblásticas MG63 sobre as diferentes amostras. As células espalharam-se bem sobre todas as superfícies, contudo visualizavam-se melhor na superfície cp Ti SLA; nesta superfície apresentavam melhor caracterização citoplasmática e estavam mais distendidas e mais espalhadas.



Figura 3.68 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre superfície maciça TiZr com tratamento SLA obtidas por microscopia confocal laser ao dia 1, dia 3 e dia 7 após início da cultura: marcação do citoesqueleto (verde) e núcleo (vermelho).

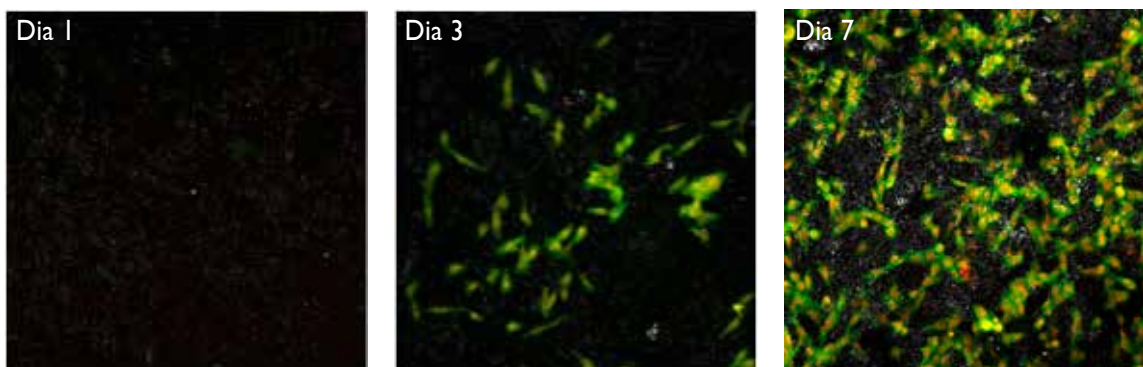


Figura 3.69 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre filme fino R550 obtidas por microscopia confocal laser ao dia 1, dia 3 e dia 7 após início da cultura: marcação do citoesqueleto (verde) e núcleo (vermelho).

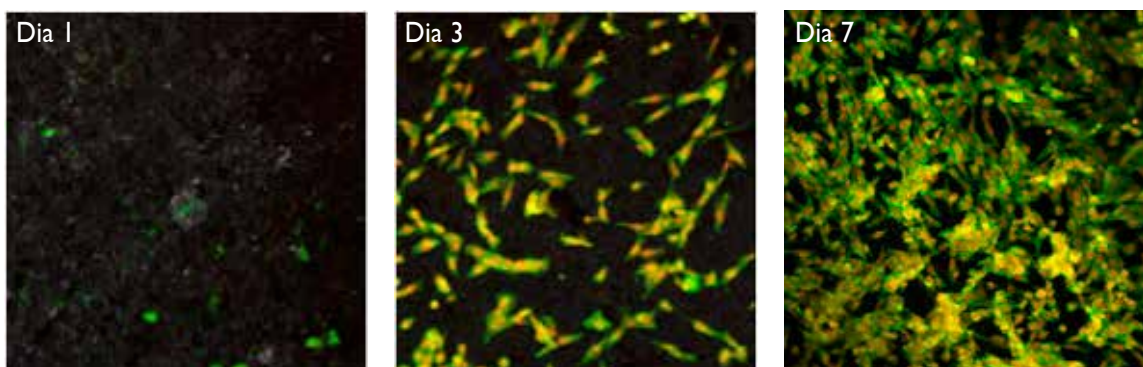


Figura 3.70 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre superfície Ti com tratamento SLA obtidas por microscopia confocal laser ao dia 1, dia 3 e dia 7 após início da cultura: marcação do citoesqueleto (verde) e núcleo (vermelho).

No final do dia 1 de cultura não havia diferença no número médio de células aderidas e/ou viáveis. O ensaio da resazurina baseia-se na avaliação da atividade mitocondrial das células em cultura, para avaliar o seu estado proliferativo e viabilidade. Ao final do dia 4 e do dia 7 de cultura o número de células viáveis e em estado proliferativo era significativamente diferente entre as superfícies (Gráfico 3.8 e Tabela 3.8). Significativamente mais células estavam aderidas e viáveis no dia 4 e 7 na superfície do filme fino Ti15Zr R550 do que na superfície TiZr ($p < 0.05$). Também significativamente mais células viáveis foram encontradas na superfície cp Ti SLA aos dias 4 e 7 quando comparadas com a superfície Ti15Zr R550.

As fotomicrografias das figuras 3.68, 3.69 e 3.70 mostram efetivamente células melhor aderidas e conformadas nas superfícies Ti15Zr R550 e cp Ti SLA do que na superfície TiZr, onde as células parecem não proliferar. A ausência de marcação do citoesqueleto (verde) e do núcleo (vermelho) revela o seu estado de baixa atividade. Tanto as células sobre a superfície Ti15Zr R550 como cp Ti SLA se apresentam ao dia 7 de cultura bem aderidas e conformadas, com marcação clara de citoesqueleto e núcleo traduzindo um estado bastante ativo e viável; no substrato cp Ti SLA para além de em maior número, também se apresentam mais uniformemente distribuídas.

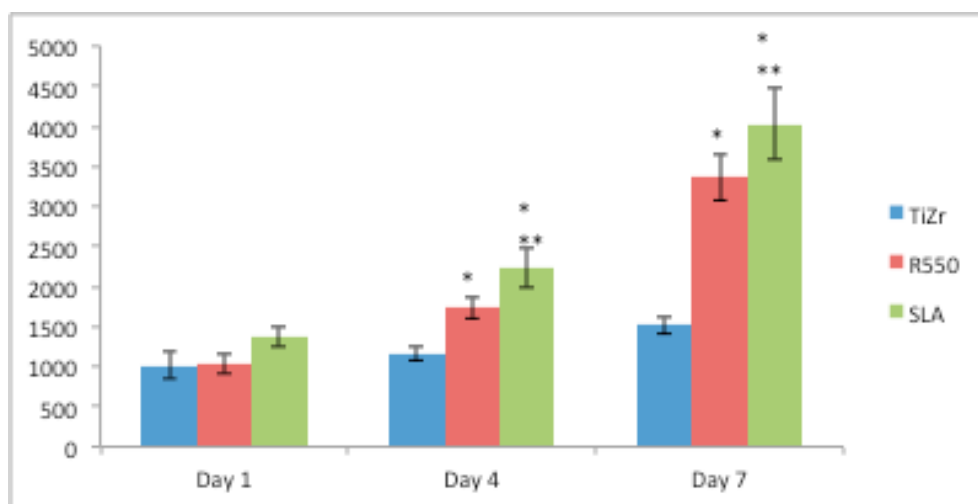


Gráfico 3.8 – Resultados do ensaio da resazurina para viabilidade/proliferação de células osteoblásticas MG-63 sobre superfícies TiZr maciço com tratamento SLA, filme TiZr15 R550 e superfície Ti com tratamento SLA. * significativamente diferente de TiZr maciço para $p < 0.05$; ** significativamente diferente de R550 para $p < 0.05$.

Tabela 3.13 – Resultados do ensaio da resazurina para viabilidade/proliferação de células osteoblásticas MG-63 sobre superfícies TiZr maciço com tratamento SLA, filme TiZr15 R550 e superfície Ti com tratamento SLA. * significativamente diferente de TiZr maciço para $p < 0.05$; ** significativamente diferente de R550 para $p < 0.05$.

	Day 1	Day 4	Day 7	Standard error		
TiZr	1015,047188	1160,746606	1511,511312	176,6900662	81,17412488	100,4433162
R550	1035,671622	1734,809955	3356,458522	122,4887558	132,1778244	279,5407339
SLA	1366,634777	2227,995475	4023,78733	128,4041685	254,1530718	444,2173885

No TiZr apenas algumas células aderem e acabam por morrer com o tempo de cultura. No R550, as células proliferam ao longo do tempo e mantêm uma morfologia característica da população celular. No SLA a proliferação é superior, verifica-se uma maior densidade celular ao dia 3 e dia 7, comparativamente ao R550. A morfologia é adequada e semelhante à verificada no R550.

3.4. DISCUSSÃO

A liga de Titânio e Zircônio, TiZr, como biomaterial para implantes tem pouco tempo de utilização clínica. Quando surgiu no mercado foi comercializada com o nome Roxolid® e com tratamento de superfície SLActive®. A melhoria das propriedades mecânicas e os bons resultados da osteointegração quando comparados com a referência cp Ti grau 4 SLActive®, em estudos pré-clínicos, prometiam um desempenho clínico com elevadas taxas de sucesso, o que, apesar do curto espaço de tempo de uso clínico, parece ser uma realidade (Bernhard et al. 2009; Chiapasco et al. 2011; Gottlow et al. 2012).

A razão de um novo biomaterial para implantes advinha da segurança acrescida em termos biomecânicos aportada pelo novo biomaterial, sem que esse fosse porém um problema importante dos implantes de cp Ti de diâmetro regular (Pjetursson et al. 2012). Contudo, face ao número de casos com compromisso ósseo (menos volume ósseo) e que necessitam de terapias regeneradoras ósseas prévias ou simultâneas para permitir a colocação, geralmente de um implante de diâmetro regular e na perspectiva de que um implante de diâmetro reduzido possa oferecer as mesmas potencialidades de reabilitação recurso a essas as etapas regeneradoras, isso seria uma vantagem para os pacientes (Lang et al. 2007; Al-Nawas et al. 2014).

A questão levantou-se, então qual seria a importância da composição química no desempenho biológico deste biomaterial? As propriedades biomecânicas não as questionamos, assim como a topografia que era a mesma dos implantes de cp Ti SLActive®, restando a modificação da composição química como possível responsável deste desempenho e como nossa hipótese de trabalho.

No nosso projeto a primeira etapa destina-se ao desenvolvimento, otimização e implementação dos procedimentos, que permitam avaliar a variação da composição química de forma sistematizada e controlada.

A escolha da técnica de pulverização catódica ou “sputtering” deve-se ao facto desta permitir a deposição de filmes finos, até à escala do nanómetro, utilizando diferentes materiais e sobre diversos substratos, sendo simultaneamente simples e versátil. A pulverização catódica em modo magnetron é uma variante da técnica de deposição física em fase de vapor, com uma excelente performance quando comparada com outros processos. Os filmes produzidos são muito estáveis, homogêneos na sua composição, resistentes à fricção e corrosão, densos, formam multicamadas nanométricas e com características “feature-less”, isto é, praticamente sem morfologia própria e seguindo a morfologia do substrato (Ramos et al. 2006; Fernandes et al. 2012; Ramos & Vieira 2012). A técnica de pulverização catódica já tinha sido usada por diversos autores essencialmente para a

deposição de filmes com espessura $< 0,1 \mu\text{m}$ de hidroxiapatite (Ong et al. 2002; Y. Yang et al. 2003; Mohammadi et al. 2004; Yonggang et al. 2007). A mesma técnica foi usada por outros autores para a deposição de outros materiais como nitrato de titânio (TiNO_x) (Durual et al. 2010) e titânia (Ballo et al. 2012), em ambos os casos com espessuras nanométricas. Os diferentes materiais depositados confirmam a sua versatilidade e aplicabilidade.

As primeiras deposições efetuadas visaram determinar com exatidão a relação entre os parâmetros de deposição e as características dos filmes obtidos. A variação apenas do tempo de deposição, de 30 minutos para 15 minutos, permitiu obter filmes com espessura de $2 \mu\text{m}$ e $1 \mu\text{m}$, respetivamente, mas igualmente compactos, de estrutura colunar e bem aderidos ao substrato. A boa adesão ao substrato é vista na Figura Secção Transv a) e b) em que os filmes apenas se destacaram parcialmente do substrato após fratura do mesmo. O crescimento colunar é explicado pelo modelo de Thornton para condições idênticas e a não ocorrência de porosidade ou vazios é devido à suficiente energia dos adátomos, que assim podem percorrer a superfície e distribuir-se uniformemente. Os filmes apresentam uma morfologia de transição tipo T com elevada compactidade (Ramos 2002). A nano rugosidade é o único aspeto morfológico da superfície, pelo que se espera que ambos os filmes façam corresponder a morfologia superficial à morfologia do substrato. Contudo, a deposição do filme fino de Ti de $2 \mu\text{m}$ de espessura sobre substratos de cp Ti grau 4 com tratamento SLA. O filme fino mostrou que se deposita preferencialmente a partir dos microporos existentes, formando aglomerados de forma esférica, em contraposição ao filme fino de Ti de $1 \mu\text{m}$ que praticamente deixa a topografia do SLA inalterada. Durual (Durual et al. 2010) e Ballo (Ballo et al. 2012) não referem alteração de morfologia para os filmes depositados, quer sobre uma superfície moderadamente rugosa como o SLA, quer sobre uma superfície minimamente rugosa como a superfície maquinada. Para além disso, é também referido um aumento da espessura dos filmes formados de 110 nm para 1400 nm com o aumento do tempo de deposição de 2 minutos para 30 minutos. A superfície dos filmes de Ti formados apresentavam também nanorugosidade (Ballo et al. 2012) semelhante à que verificamos no nosso estudo, característica resultante do processo de deposição por pulverização catódica.

A variação da composição química nos filmes, ou melhor, o ajuste da composição química à composição da liga TiZr foi efetuado com deposição de filmes TiZr de $1 \mu\text{m}$ de espessura (agora que estavam determinadas as condições de deposição para o fazer e que sabíamos respeitaria a topografia do substrato e garantiria compactidade). Para conseguirmos a composição química adequada nos filmes de TiZr com co-deposição de Ti e Zr usámos apenas um único alvo, um alvo composto, de Ti com insertos circulares (pastilhas) de Zr. Este modelo experimental já usado antes por Ramos (Ramos 2002) e Duarte (Duarte et al. 2012) permite maximizar o aproveitamento dos materiais por colocação dos materiais nas zonas que sofrem maior taxa de ejeção; para além disso, por usarmos apenas um alvo há menor possibilidade de variação do campo magnético e por isso maior estabilidade e uniformidade durante o processo de deposição. A composição química destes filmes foi avaliada por microsonda electrónica (EPMA). Uma vez que na análise por EPMA, espessuras da ordem de $1 \mu\text{m}$ não são suficientes para evitar a influência do substrato, foram produzidos filmes nas mesmas condições, mas ligeiramente mais espessos.

A metodologia adotada para introdução de zircônio nos filmes de titânio revelou-se eficaz. Com efeito, aumentando o número de pastilhas (cerca de 80) seria possível atingir composições químicas aproximadamente equiatómicas. O objetivo seria produzir filmes com percentagens de zircônio entre 15 e 20 % pd., o que se aproximaria dos 13-17% de Zr da liga Roxolid® de TiZr (Bernhard et al. 2009). Os resultados de microsonda da Tabela XPTO são bastante próximos dos valores esperados, sendo que o filme fino Ti-14Zr ficou com um ligeiro défice em Zr, podendo ser facilmente corrigido com a colocação de mais uma pastilha deste na zona de maior erosão do alvo de titânio. Assim, para a obtenção de um filme fino TiZr com 15% de Zr, nas condições deste estudo, teremos de colocar 11 pastilhas de Zr no alvo composto de Ti.

De acordo com Ho (Ho et al. 2008) e Correa (Correa et al. 2014) a composição química das ligas TiZr em solução substitucional é acompanhada por um aumento da densidade, quando comparada com a densidade do cp Ti (4,51 g/cm³), devido à maior densidade do Zr (6,50 g/cm³). Apresenta uma estrutura cristalina em que os padrões de difração de raios-X revelam apenas a presença de picos coincidentes com a fase alfa, não existindo qualquer pico de fase beta ou fases intermediárias, o que mostra uma completa solução sólida para ambas as fases.

O sistema TiZr apresenta imiscibilidade total, tanto para fase β , de alta temperatura, como para a fase α , de baixa temperatura, não havendo formação de novas fases. Devido ao maior raio atômico do zircônio (0,162 nm) em comparação com o do titânio (0,147 nm), a introdução deste metal na rede do titânio provoca uma distorção da rede, que resulta num aumento das distâncias interplanares o que, de acordo com a equação de Bragg, se traduz numa diminuição dos ângulos de difração. De facto, como se pode verificar nos difractogramas de raios X, com a introdução de zircônio os picos de difração são deslocados para a esquerda no sentido dos menores ângulos. Este desvio é tanto mais acentuado, quanto maior o teor de zircônio na solução sólida substitucional. No titânio maciço, e de acordo com a ficha padrão, o plano (1.01) é o de maior intensidade; porém, quando depositado por pulverização catódica o titânio apresenta frequentemente uma orientação preferencial segundo o plano (0.02). Com a introdução de zircônio os filmes apresentam uma orientação preferencial segundo plano (1.00), cujo pico se torna o mais intenso. O Zr desempenha um papel neutro na liga com Ti, não sendo um elemento estabilizador da fase α como o Al ou da fase β como o V. O facto de o Zr apresentar propriedades sobreponíveis ao Ti e de ter uma transformação alotrópica similar, com uma temperatura de transição de fase semelhante, i.e., apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp), chamada de fase alfa (α -Zr). Acima da temperatura de transição de fase a sua estrutura passa a ser cúbica de corpo centrado (ccc), a fase beta (β -Zr), permite formar ligas com estrutura monofásica α muito homogênea (Ikarashi et al. 2005; Bernhard et al. 2009).

A avaliação em SEM dos filmes Ti15Zr com 1 μ m de espessura mostra morfologia bastante aproximada à do substrato de cp Ti grau 4 SLA, ainda que se note algum apagamento da morfologia, ou seja, aparentemente após deposição é possível manter a macro e microrugosidade superficial. De modo a verificar a efetividade de revestimento da superfície rugosa SLA, foram efetuadas análises de espectroscopia de dispersão de energia utilizando o sistema EDS acoplado ao SEM. Para tal, foram feitas análises pontuais nos picos e vales mais profundos da superfície revestida. De acordo com os resultados EDS foi possível detectar a presença de zircônio, mesmo nos vales mais profundos (cerca de 6 % pd.), o que indica que, mesmo sem perfeição, o filme fino reveste a totalidade da superfície. Nos picos, como é de esperar, a quantidade de zircônio encontrada é maior e, próxima da determinada por EPMA. Contudo, devemos realçar que as quantidades de titânio, sobretudo nos vales, podem estar sobrevalorizadas atendendo ao facto de que o revestimento é fino e, por isso, poderá ocorrer influência do substrato nos valores de composição química determinados por EDS. Como o substrato é de titânio, a quantidade relativa deste metal é maior do que a quantidade real presente no filme fino, sobretudo nos vales onde o substrato vai ter maior influência.

Com vista a melhorar o revestimento desta superfície, é possível variar os parâmetros de deposição, nomeadamente a temperatura de deposição e a polarização do substrato. Em alternativa, os filmes poderão ser depositados por pulverização catódica sobre substratos polidos a diamante, como aliás é prática comum, e posteriormente proceder ao tratamento de superfície desejado. Estas possibilidades serão analisadas de seguida.

A otimização da qualidade dos filmes pode ser alcançada fazendo variar parâmetros de deposição como a polarização e a temperatura de deposição. A polarização dos substratos, Vs, promove o bombardeamento do filme fino em crescimento, conferindo maior energia aos adátomos, logo maior mobilidade, evitando que

estes “congelem” ao atingir a superfície dos substratos. Assim, o revestimento de superfícies rugosas deverá ser mais eficaz para maiores valores absolutos de Vs. Nesse sentido foi depositado um filme fino Ti15Zr, com a polarização alterada de -40 V para -70 V e para compensar o decréscimo de espessura resultante do aumento do bombardeamento do filme fino em crescimento, o tempo de deposição foi ligeiramente incrementado. Porém, o aumento da polarização do substrato para -70 V não produziu o efeito desejado, observando-se a formação de uns aglomerados, os quais foram posteriormente analisados por EDS, sem nenhuma diferença significativa ter sido encontrada quanto à composição química. Face aos resultados conseguidos, foi ainda testada uma polarização do substrato de -100 V, mas com poucas melhorias em relação à tentativa com -70 V, pelo que a polarização inicial de -40 V foi considerada como a mais adequada e adotada no restante protocolo do estudo.

O aumento da temperatura de deposição com a troca para o porta-substratos de aço não só não teve o efeito pretendido, com uma alteração notória da morfologia, como foi observado o aparecimento de fissuras. A menor capacidade de dissipação de energia do porta-substratos de aço conduz à retenção de mais energia junto dos substratos, com o consequente aumento de temperatura durante a deposição. No entanto, a origem destas fissuras não se deve apenas ao aumento da temperatura de deposição, uma vez que também foram encontradas fissuras em discos SLA não revestidos.

A análise da topografia foi efectuada por avaliação da rugosidade superficial 2D com rugosímetro Perthen com cabeça laser e por avaliação 3D dos parâmetros espaciais da rugosidade com microscópio ótico de elevada resolução, com variação de foco Microscópio ótico de focagem infinita Infinite Focus, conjuntamente com o módulo de medição da textura superficial (Surface Texture Measurement), que permite obter medições mais complexas e mais detalhadas da superfície. A recomendação de diferentes autores (Wennerberg & Albrektsson 2000; Wieland et al. 2001; Mazor & Cohen 2003; Nawas & Götz 2003; Kohles et al. 2004; Wennerberg & Albrektsson 2009; Wennerberg & Albrektsson 2010) vai no sentido de que a avaliação topográfica de uma superfície seja efectuada por forma a ser representativa de toda a superfície e que a caracterização deva incluir parâmetros 2D (perfil) e 3D (área/superfície). Apesar dos parâmetros topográficos 2D do perfil serem os mais habitualmente referidos, para caracterizar uma superfície atual é recomendável incluir parâmetros 3D de superfície, com descrição de parâmetros de altura, espaço e híbridos. A aplicabilidade dos instrumentos de medição óticos na investigação em biomateriais deve proteger a superfície do contacto promovido por outro tipo de instrumentos; contudo, apesar de normalmente mais rápidos e apresentarem muito boa resolução, podem apresentar problemas com a reflectância das superfícies, que em excesso ou defeito, pode perturbar a medição e formação da imagem.

A rugosidade referida para o filme fino R492 de Ra 3,44 μm é uma rugosidade elevada e representa um aumento da rugosidade inicial do cp Ti que lhe serviu de substrato. Isso pode ser explicado pelo facto do revestimento apresentar elevada espessura (2 μm) e pelo crescimento colunar (anteriormente explicado) característicos destes filmes. No entanto, não foi isso que aconteceu com os filmes de Ti15Zr de 1 μm de espessura, onde se verificou apenas um atenuar das características da superfície SLA, mas sem significado na espessura Sa registada. Isto está demonstrado nos gráficos 3.2 e 3.3 para a diferença de Sa antes e depois de deposição, assim como na tabela 3.8. O mesmo se pode constatar no histograma da distribuição referente às medições da rugosidade Sa e no mapa de pseudo-cores, com maior frequência da rugosidade intermédia; atenua um pouco nos vales mais profundos (redução das cores azuis e vermelhas) e acentua um pouco nos picos (cores amarela e laranja). Mais do que o valor absoluto da rugosidade registada, a qual apresenta grande variabilidade na literatura na dependência de técnicas e equipamentos diferentes, importa registar que o aumento não foi significativo de forma a alterar a importante topografia SLA. Durual (Durual et al. 2010) refere exatamente o mesmo comportamento para os filmes finos depositados sobre uma superfície SLA e

refere ter encontrado um valor Ra 4 μm para a produção industrial da superfície SLA. É de realçar o facto de o revestimento com filmes Ti15Zr de 1 μm ter resultado num aumento da área disponível para as etapas de osteointegração. De facto, como registado nos gráfico 3.5 e tabela 3.8, verificou-se um aumento dos valores Sdr após o revestimento, o que segundo Wennerberg (Wennerberg & Albrektsson 2009; Wennerberg & Albrektsson 2010) e Albrektsson (Albrektsson & Wennerberg 2004b) é um parâmetro importante das superfícies atuais. O aumento da rugosidade média pode explicar este facto, mas a existência de uma nano topografia nestes filmes, registada quando observados com SEM, pode também ter contribuído para isso. A deposição por pulverização catódica de filmes é referida como responsável por criar superfícies com nano rugosidade (Durual et al. 2010; Ballo et al. 2012), característica deste tipo de procedimento. Essa é também uma característica atualmente reconhecida à superfície SLActive, que apresenta nano estruturas formadas na superfície exterior da camada de hidretos e se reorganiza durante o armazenamento em solução 0,9% NaCl (Wennerberg et al. 2012; Wennerberg et al. 2013), quer para superfícies de cp Ti quer para superfícies TiZr Roxolid®. Desta forma conseguimos estabelecer procedimentos e um processo que permite de forma controlada e reproduzível mimetizar a superfície TiZr Roxolid® SLActive, tanto do ponto de vista da composição química como do ponto de vista da topografia, micro e nano.

As propriedades mecânicas dos filmes estão dependentes também do substrato sobre os quais são depositados. Ainda assim, devemos ter em atenção o princípio de a dureza de revestimentos é sempre superior à do mesmo material em maciço, devido à diminuição do tamanho de grão e à eventual presença de defeitos nos filmes, produzidos por pulverização catódica. Contudo, como o módulo de elasticidade é uma propriedade intrínseca dos materiais, o mesmo material sob a forma de maciço e sob a forma de filme fino deverá apresentar o mesmo comportamento.

Assim, a introdução de Zr nos filmes deverá também resultar num aumento do valor de dureza. Este endurecimento, que poderá ser benéfico para algumas aplicações biomédicas, resulta da presença de Zr em solução sólida como constatado na análise estrutural.

Nas ligas de TiZr à medida em que o teor de Zr aumenta, assim aumentam as propriedades mecânicas da liga, como a resistência, a recuperação elástica e a dureza. De acordo com o diagrama de equilíbrio de fases o Ti e o Zr são completamente miscíveis e não se forma qualquer outro composto intermetálico, pelo que qualquer melhoria das propriedades mecânicas resulta de um reforço de fases em solução sólida (Ho et al. 2008; Bernhard et al. 2009).

Segundo Correa (Correa et al. 2014) a oxidação do Ti nas ligas está ligada simultaneamente à oxidação do oxigénio no metal e à escala de formação de óxidos, por isso a solução sólida do oxigénio na liga Ti pode desencadear o mecanismo de endurecimento. No caso das ligas TiZr a distorção da rede cristalina e a restrição de deslocamento provocada pelo Zr substitucional podem produzir o reforço em solução sólida. Contudo, devido à completa solubilidade em solução sólida do Zr, o endurecimento em solução sólida da fase alfa coadjuvado por uma microestrutura fina parecem explicar melhor o aumento de dureza das ligas de TiZr com o aumento do teor de Zr (Ho et al. 2008).

Seja qual for o mecanismo implicado no aumento da dureza e resistência das ligas de TiZr, o comportamento dos filmes de TiZr depositados por pulverização catódica é semelhante. De facto, o aumento do teor de Zr nos filmes provoca um incremento no valor de dureza, mantendo relativamente constante o valor do módulo de Young. Este incremento é tanto maior quanto maior o teor de zircónio em solução sólida. O filme fino Ti20Zr foi o que apresentou o valor mais elevado de dureza, 6,6 GPa. Estes valores obtidos por ensaios de ultramicrodureza são realizados de forma a que em todos os casos a profundidade de contacto da indentação é aproximadamente 10 % da espessura do filme fino (cerca de 1 μm), ou seja, a avaliação de dureza é feita de modo a integrar o maior volume de material possível sem que ocorra integração do substrato.

Na determinação do módulo de Young para filmes depositados sobre aço os valores foram mais próximos do módulo de Young do aço austenítico, enquanto que ao utilizar um substrato de titânio (módulo de Young inferior ao do aço) o valor medido decresceu. O mesmo não aconteceu ao determinar a dureza, pelo que os valores do módulo de Young parecem depender mais do substrato. Com efeito, de acordo com resultados de simulação numérica, no caso da determinação do módulo de elasticidade de filmes através de ensaios dinâmicos de dureza há influência do substrato, mesmo para profundidades de indentação da ordem de 5% da espessura do filme fino. Assim, os valores de módulo de Young determinados neste estudo poderão estar ligeiramente aumentados devido à influência do substrato de aço e que, na realidade, apresentariam um módulo de elasticidade mais baixo sem essa influência. Um módulo de Young baixo poderá ser vantajoso se tivermos em consideração a teoria de sobrecarga ou pré-esforço – “stress shielding” – ósseo e se por isso quisermos aproximar os valores do módulo de Young do biomaterial e do osso para uma transferência de carga mais homogênea (C. H. Park et al. 2010; Özcan & Hämmerle 2012; Bauer et al. 2013; Gepreel & Niinomi 2013).

O comportamento biológico dos biomateriais depende de como se estabelece a interface inicial com o hospedeiro. É um processo no qual participam muitas variáveis, mas no qual as características da superfície do biomaterial tem um papel fundamental. A adsorção de proteínas plasmáticas ou a capacidade de fixar e precipitar alguns iões, e a forma como participam nos processos de osteointegração, determinam as etapas iniciais da integração óssea e estabelecem o futuro do biomaterial no organismo (Tomisa et al. 2011; Terheyden et al. 2012), ou como diz Steinemann (Steinemann 1998) a osteointegração é um grande puzzle.

A avaliação das características físicas da superfície como a energia de superfície e a carga traduz o estado de afinidade para absorção em que a superfície se encontra, isto é, para interagir com o meio (Ferraz et al. 2001; Albrektsson & Wennerberg 2004b). A medição do potencial Zeta de uma superfície e da formação de precipitados de fosfato de cálcio na superfície são duas formas de quantificar o potencial “reativo” da superfície. De facto, a proliferação e distribuição celular são fortemente influenciadas pela adsorção de proteínas, que por sua vez depende de características da superfície, como a carga superficial (J. Sela et al. 2000; M. N. Sela et al. 2007; Kohavi et al. 2012). Os resultados apresentados para a medição do potencial Zeta nas superfícies testadas foram todos negativos; o filme fino Ti15Zr apresentou um potencial Zeta menos negativo do que o filme fino Ti20Zr, enquanto que a superfície de Ti apresentou um valor ainda mais negativo. O ponto de carga zero para a titânia é $\text{pH}=6$ e para a zircónia é $\text{pH}=9$, o que significa que ambos os materiais estarão carregados negativamente, um mais do que o outro, próximo da neutralidade (Steinemann 1998). Assim, a introdução de mais Zr no filme fino deveria efetivamente tornar o potencial ainda mais negativo; porém, o potencial tão negativo do Ti (maciço) só se pode explicar pelas condições de superfície que, ao apresentar menor rugosidade em relação ao filme fino e por estar polida, influencia na molhabilidade da superfície (Rupp et al. 2011). O substrato não pareceu influenciar a carga superficial das amostras revestidas. De facto, os potenciais zeta determinados para filmes Ti15Zr, depositados sobre aço e sobre titânio foram idênticos. Tal como o substrato, também a variação das condições de deposição, nomeadamente da polarização do substrato e da temperatura de deposição, não alterou de forma significativa a carga superficial. As características dos filmes depositados foram as mesmas, o que realça o importante papel da composição química e rugosidade na determinação da energia superficial e molhabilidade (Rupp et al. 2011; Gittens et al. 2014).

A imersão das amostras (cp Ti, TiZr e filmes TiZr) em solução de Hank mostrou a reatividade e a bioatividade de todas as superfícies *in vitro* ao formarem uma camada de precipitados de fosfato de cálcio ao longo do período de imersão. A formação dos precipitados foi confirmada morfológicamente por SEM e avaliada qualitativa e quantitativamente por espectrometria de dispersão de energia (EDS). Apesar de alguns materiais depositados por pulverização catódica necessitarem de tratamento térmico para melhorar a sua cristalinidade e expressar bioatividade *in vitro* (Yonggang et al. 2007), os filmes de TiZr por nós usados demonstraram possuir

essas características desde a deposição e mostraram excelente bioatividade *in vitro*. Todas as superfícies usadas demonstraram o mesmo padrão de formação de precipitados, primeiro formando os precipitados de cálcio e com alguma latência os precipitados de fosfato; no entanto, com o passar dos dias de observação, a relação Ca/P evolui para a estequiometria da HA por ser esta a forma mais estável dos precipitados de fosfato de cálcio (Yonggang et al. 2007; X. Chen et al. 2008; M. H. Kim et al. 2011). As amostras de TiZr ou dos Filmes TiZr todas apresentaram um valor elevado para os fosfatos que resulta de dificuldade de leitura por sobreposição dos picos do Zr e do P no espectro de EDS. Essa dificuldade não foi encontrada na leitura do substrato cp Ti SLA e por isso a percentagem do elementos dos precipitados Ca e P deve ser mais próximo do correcto. De qualquer forma o comportamento do filme fino Ti15Zr foi sobreponível ao do TiZr em maciço.

3.5. CONCLUSÕES

Considerando os limites do estudo apresentado, podemos referir as seguintes conclusões:

- a técnica de pulverização catódica em modo magnetrão permite desenvolver filmes finos de forma controlada, os quais podem ser utilizados para estudos *in vitro* e *in vivo* valiosos para avaliação entre as características da superfície e os processos de cicatrização óssea e biocompatibilidade.
- o método desenvolvido permitiu desenvolver um filme fino TiZr com composição química controlada e características “featured-less”, i.e., sem variação topográfica;
- o difractograma dos filmes TiZr evidenciou o padrão característico da estrutura monofásica alfa, com deslocamento da estrutura da malha cristalina devido ao à introdução do Zr com maior raio atômico;
- em função das variações das condições de deposição testadas, potencial, alteração do substrato e tempo de deposição as condições otimizadas foram: polarização -40 V; tempo de deposição 15 minutos; porta-substratos de cobre;
- para atingir o teor de 15% wt de Zr no filme fino é necessário utilizar 11 pastilhas (insertos) de Zr no alvo composto de Ti;
- existe e foi também determinada a relação entre o número de pastilhas de Zr e a concentração de Zr nos filmes, podendo ser usada em trabalhos futuros;
- os filmes com a espessura de 1 μm permitem manter a topografia do substrato praticamente inalterada;
- os filmes com a espessura de 1 μm ao serem depositados sobre um substrato de cp Ti SLA contribuíram para aumentar a superfície disponível da amostra;
- os filmes produzidos apresentam uma topografia com características nanométricas que condicionam as propriedades biológicas;
- os filmes produzidos não apresentaram efeitos citotóxicos nas células osteoblásticas MG63
- o modelo presente, podendo ser otimizado, permitirá avaliar a importância dos diferentes elementos do filme fino no potencial biológico;

Capítulo IV. Resumen

Os biomateriais têm-se desenvolvido em face da necessidade de satisfazer uma procura clínica cada vez mais exigente alargando os limites de utilização. Reconhecendo no Titânio excelentes propriedades mas também algumas limitações, essencialmente biomecânicas, a solução tem passado pelo desenvolvimento de algumas ligas de Titânio. A mais recente liga de Titânio desenvolvida uma liga de Titânio e Zircónio (TiZr) apresenta um reforço das propriedades biomecânicas em relação ao Titânio e uma osteointegração similar ou melhor do que o “gold standard” dos implantes atuais. As suas propriedades e características específicas como a composição química, a topografia estruturada e a energia de superfície são apontadas como favorecedoras da osteointegração, proporcionando uma cicatrização óssea mais rápida e estável.

Neste contexto surgiu o nosso estudo, para desenvolver uma metodologia, controlada e reproduzível, que pudesse replicar as características do novo biomaterial e esclarecer *in vitro* de que forma participam nos processos de osteointegração. Para além disso, permitiu-nos também pesquisar outras formulações em relação com estas propriedades e características que pudessem ser majorativas para as etapas de cicatrização óssea.

O nosso estudo decorreu em três etapas:

- 1) o desenvolvimento e otimização de processos e procedimentos para a elaboração do material;
- 2) a elaboração controlada e reproduzível do material;
- 3) a avaliação da sua bioatividade e biocompatibilidade *in vitro*.

Usamos a técnica de pulverização catódica (“sputtering”) em modo magnetron, para a produção de filmes finos de espessura sub-micrométrica e composição química controlada. A aplicação simultânea de técnicas de análise da composição, estrutura e morfologia dos filmes produzidos permitiu-nos otimizar os procedimentos por forma a mimetizarmos as características do biomaterial em análise comparativa. Assim, as condições otimizadas de deposição foram estabelecidas em:

- tempo de deposição 15 minutos;
- polarização do substrato -40 V;
- porta substratos em cobre;
- velocidade de rotação do substrato 23 rpm;
- número de pastilhas de Zircónio do alvo composto de Titânio com Zircónio - 11 pastilhas.

Estas condições permitiram elaborar um filme de TiZr com 1 mm de espessura, com cerca de 15% em peso de Zircónio e com características “feature less” que não alteravam a topografia do substrato.

No seguimento do estudo utilizámos então estas condições para elaborarmos de forma controlada e reprodutível os filmes de TiZr sobre substratos de TiZr maciço e com tratamento de superfície SLA (Sandblasted, Large grit, Acid etched). Produzimos 2 filmes distintos:

- filme TiZr com 15% em peso de Zircônio e 1 mm de espessura;
- filme TiZr com 7% em peso de Zircônio e 1 mm de espessura.

A análise da composição com EDS (espectrometria de dispersão de energia) permitiu qualificar e quantificar a presença dos elementos Titânio e Zircônio nas referidas proporções. A análise topográfica com microscópio de alta resolução de variação de foco infinita confirmou a manutenção de uma topografia similar das amostras revestidas com os filmes, traduzindo uma influência não significativa dos mesmos sobre a topografia.

A bioatividade *in vitro* foi avaliada através do potencial da energia da superfície e formação de precipitados de fosfato de cálcio, enquanto que a citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro* foram avaliadas com cultura celular de células osteoblásticas MG63 em contacto direto sobre os biomateriais.

O potencial Zeta da energia de superfície revelou a existência de uma energia de superfície relativamente elevada em valor absoluto, mas de carga negativa, e que aumenta com o aumento do teor em Zircônio, de acordo com a carga negativa do Zircônio em pH neutro; ambos os factores são favorecedores de uma bioatividade elevada na interface da superfície do material. A formação de precipitados de fosfato de cálcio ocorreu em todas as superfícies de forma significativa e seguindo o padrão descrito: na formação inicial há maior número de precipitados de cálcio e só depois se formam os precipitados de fósforo, como também na aproximação à relação estequiométrica mais estável próxima da hidroxiapatite.

O comportamento dos filmes de TiZr com 15% de Zircônio seguiu o comportamento das amostras de TiZr maciço. A citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro* mostrou que no final do dia 1 de cultura não havia diferença no número médio de células aderidas e/ou viáveis, baseado no ensaio da resazurina que, através da actividade mitocondrial das células em cultura, avalia o seu estado proliferativo e a sua viabilidade. Ao final do dia 4 e dia 7 de cultura o número de células viáveis e em estado proliferativo era significativamente diferente entre as superfícies. Significativamente mais células estavam aderidas e viáveis no dia 4 e 7 na superfície do filme Ti15Zr R550 do que na superfície TiZr ($p < 0.05$) e também significativamente mais células viáveis foram encontradas na superfície cp Ti SLA aos dia 4 e 7 quando comparadas com a superfície Ti15Zr R550. Este comportamento deverá ser atribuído por um lado à falta de estruturas nanométricas na superfície SLA do TiZr, pois elas existem apenas no SLActive (forma comercializada desta superfície), e por outro à existência das mesmas nos filmes TiZr e à nano textura dos filmes, como comprovado morfologicamente por SEM.

Assim do nosso estudo, considerando os limites do mesmo e atendendo às condições em que se realizou, concluímos:

- a técnica de pulverização catódica em modo magnetron permite desenvolver filmes finos de forma controlada, os quais podem ser utilizados para estudos *in vitro* e *in vivo* de avaliação entre as características da superfície e os processos de cicatrização óssea e biocompatibilidade.
- o método desenvolvido permitiu desenvolver um filme fino TiZr com composição química controlada e características “featured-less”, i.e., sem variação topográfica;
- os filmes com a espessura de 1 μm ao serem depositados sobre um substrato de cpTi SLA contribuíram para aumentar a superfície disponível da amostra;
- os filmes produzidos apresentam uma topografia com características nanométricas que condicionam as propriedades biológicas;
- os filmes produzidos não apresentaram efeitos citotóxicos nas células osteoblásticas MG63;
- o modelo presente, podendo ser otimizado, permitirá avaliar a importância dos diferentes elementos do filme no potencial biológico;
- o modelo presente permitirá desenvolver superfícies para avaliar a importância das diferentes características das superfícies *in vivo*.

Capítulo V. Abstract

Biomaterials have been developed due to the need to satisfy an increasing clinical demand, pushing the boundaries of their use. Recognizing Titanium's excellent properties but also some limitations, mainly biomechanical, solutions have passed through the development of some titanium alloys. The latest developed titanium alloy, an alloy of Titanium and Zirconium (TiZr) shows an increase of the biomechanical properties relative to titanium, and osseointegration similar or better than the "gold standard" of the present implants. Their specific properties and characteristics such as chemical composition, structured topography and energy surface are identified as promoters of osseointegration, providing a faster and more stable bone healing.

In this context, appears our study, to develop a controlled and reproducible methodology, which could replicate the characteristics of the new biomaterial and clarify in vitro how it participates in the process of osseointegration. Furthermore, it has enabled us to research other formulations in relation to these properties and characteristics that could be of more value concerning the stages of bone healing.

Our study consisted of three stages:

- 1) development and optimization of processes and procedures for the preparation of the material;
- 2) controlled and reproducible preparation of the material;
- 3) in vitro evaluation of their bioactivity, cytotoxicity and biocompatibility.

Sputtering technique in magnetron mode was used for producing thin films of sub-micron thickness and controlled chemical composition. The simultaneous application of techniques for analyzing the composition, structure and morphology of the produced films allowed us to optimize procedures and mimic the characteristics of the biomaterial in comparative analysis. Thus, the optimized conditions of deposition were set at:

- deposition time 15 minutes;
- substrate polarization -40 V;
- copper substrate supports;
- rotational speed of the substrate 23 rpm;
- number of Zirconium tablets from target compound Titanium Zirconium - 11 tablets.

These conditions permitted a TiZr thin film 1 μm thick, with about 15% weight of zirconium and with characteristics "feature less" that do not alter the topography of the substrate.

Continuing our study we then used these conditions to elaborate in a controlled and reproducible manner TiZr films on bulk TiZr substrates with SLA surface treatment (Sandblasted, Large grit, Acid etched). We produced two different films:

- TiZr film 15% weight of zirconia and 1 μm thick;
- TiZr film 7% weight of zirconia and 1 μm thick.

The composition analysis with EDS (energy dispersive spectroscopy) allowed to qualify and quantify the presence of the titanium and zirconium components in these proportions. The topographic analysis with high resolution microscope of infinite focus variation, confirmed the maintenance of a similar topography of the samples coated with films, meaning it had an insignificant influence on the topography.

The in vitro bioactivity was assessed using the surface energy's potential and the formation of precipitates of calcium phosphate, whereas in vitro cell viability and cytotoxicity were assessed using of MG63 osteoblast cell cultures in direct contact with biomaterials.

The Zeta potential of surface energy has revealed the existence of a relatively high surface energy as an absolute value, but having a negative charge, which increases with increasing zirconia content, in accordance with the negative charge of zirconium at neutral pH; both factors favor a high bioactivity in the material surface interface. The formation of precipitates of calcium phosphate occurred on all surfaces in a substantial manner following the pattern described: the initial formation contains a higher number of calcium precipitates and only later phosphorus precipitates formed, also on the approach to a ratio close to hydroxyapatite.

The behavior of TiZr films with 15% zirconia followed the behavior of the solid TiZr samples. Cytotoxicity and cell viability in vitro showed that at the end of day 1 of culture there was no difference in the average number of adhered and / or viable cells, based on resazurin test of the mitochondrial activity of cells in culture, evaluates its proliferative status and viability. At the end of day 4 and day 7 of culture the number of viable cells and proliferating states was significantly different between the surfaces. Significantly more cells were attached and viable on day 4 and 7 on the film surface Ti15Zr R550 than on the TiZr surface ($P < 0.05$) and also significantly more viable cells were found on the surface cpTi SLA the 4th and day is 7th as compared to the surface Ti15Zr R550. This behavior should be attributed on one hand to the lack of nanoscale structures on the SLA surface of TiZr, because they exist only on SLActive (marketed form of this surface), and on the other hand, the existence of the same structures in TiZr films and nano texture of the films, as morphologically confirmed by SEM.

Thus in our study, considering the limits of the same and given the conditions in which it was performed, we conclude:

- sputtering technique in magnetron mode allows thin films to develop in a controlled manner, which can be used for in vitro and in vivo assessment of the surface characteristics and the process of bone healing and biocompatibility;
- the method developed allowed TiZr to develop a thin film with controlled chemical composition and characteristics "featured-less", that is, without topographic variation;
- thin films with a thickness of 1 μm when deposited on a substrate of cpTi SLA contributed to increase the available surface of the sample;
- thin films produced exhibit a topography with nanometric features that condition the biological properties;
- thin films produced showed no cytotoxic effects on osteoblastic MG63 cells;
- present model, can be optimized, allowing to assess the importance of different elements of the film on the biological potential;
- present model will allow to develop surfaces to assess the importance of the different characteristics of the surfaces in vivo.

Capítulo VI. Bibliografía

- Abrahamsson, I. et al., 2012. Deposition of nanometer scaled calcium-phosphate crystals to implants with a dual acid-etched surface does not improve early tissue integration. *Clinical Oral Implants Research*, 24(1), pp.57–62.
- Abrahamsson, I., Albouy, J.-P. & Berglundh, T., 2008. Healing at fluoride-modified implants placed in wide marginal defects: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 19(2), pp.153–159.
- Al-Nawas, B. et al., 2014. A prospective non-interventional study to evaluate survival and success of reduced diameter implants made from titanium-zirconium alloy. *Journal of Oral Implantology*, p.140325152344002.
- Albrektsson, T. & Sennerby, L., 1990. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *The International journal of prosthodontics*, 3(1), pp.30–41.
- Albrektsson, T. & Wennerberg, A., 2004a. *Oral Implant Surface: Part 2—Review Focusing on Clinical Knowledge of Different Surfaces*, The Int. Journal of Prosthodontics.
- Albrektsson, T. & Wennerberg, A., 2004b. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and *in vivo* responses to them. *The International journal of ...*
- Albrektsson, T. et al., 2014. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(2), pp.155–165.
- Albrektsson, T. et al., 1986. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1(1), pp.11–25.
- Albrektsson, T., Sennerby, L. & Wennerberg, A., 2008. State of the art of oral implants. *Periodontology 2000*, 47(1), pp.15–26.
- Andreiotelli, M., Wenz, H.J. & Kohal, R.-J., 2009. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clinical Oral Implants Research*, 20(s4), pp.32–47.
- Att, W. et al., 2007. Effect of supramicron roughness characteristics produced by 1- and 2-step acid etching on the osseointegration capability of titanium. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22(5), pp.719–728.
- Bachle, M. et al., 2007. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, 18(1), pp.53–59.

- Ballarre, J. et al., 2008. Electrochemical evaluation of multilayer silica–metacrylate hybrid sol–gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel. *Surface and Coatings Technology*, 203(1-2), pp.80–86.
- Ballo, A.M. et al., 2012. Bone response to physical-vapour-deposited titanium dioxide coatings on titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 24(9), pp.n/a–n/a.
- Balloni, S. et al., 2009. Effects of titanium surface roughness on mesenchymal stem cell commitment and differentiation signaling. *international journal of oral maxillofac implants*.
- Bang, S.-M. et al., 2013. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 25(7), pp.831–837.
- Barão, V.A.R. et al., 2012. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. *Clinical Oral Implants Research*, 23(9), pp.1055–1062.
- Barter, S., Stone, P. & Brägger, U., 2011. A pilot study to evaluate the success and survival rate of titanium-zirconium implants in partially edentulous patients: results after 24 months of follow-up. *Clinical Oral Implants Research*, 23(7), pp.873–881.
- Bauer, S. et al., 2013. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, 58(3), pp.261–326.
- Becker, M.J., 1999. Ancient“ dental implants”: a recently proposed example from France evaluated with other spurious examples. ... *International journal of oral & maxillofacial implants*.
- Bell, B.F. et al., 2011. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clinical Oral Implants Research*, 22(8), pp.865–872.
- Berglundh, T. et al., 2007. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), pp.147–152.
- Berglundh, T. et al., 2003. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), pp.251–262.
- Bernhard, N. et al., 2009. *The binary TiZr Alloy—a newly developed Ti alloy for use in dental implants*, Forum Implantol.
- Bornstein, M.M. et al., 2005. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. *Clinical Oral Implants Research*, 16(6), pp.631–638.
- Bosshardt, D.D. et al., 2011. The role of bone debris in early healing adjacent to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in man. *Clinical Oral Implants Research*, 22(4), pp.357–364.
- Braddock, M. et al., 2001. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News in Physiological Sciences*, 16, pp.208–213.
- Bressan, E. et al., 2013. Nanostructured Surfaces of Dental Implants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), pp.1918–1931.
- Brett, P.M. et al., 2004. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*, 35(1), pp.124–133.
- Brunette, D.M., 1988. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 3(4), pp.231–246.
- Brunski, J.B., Puleo, D.A. & Nanci, A., 2000. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 15(1), pp.15–46.

- Buser, D. et al., 2004. Enhanced Bone Apposition to a Chemically Modified SLA Titanium Surface. *Journal of Dental Research*, 83(7), pp.529–533.
- Buser, D. et al., 1998. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ...*
- Cannizzaro, G. et al., 2010. Immediate occlusal versus non-occlusal loading of single zirconia implants. A multicentre pragmatic randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol*, 3(2), pp.111–120.
- Chang, P.-C., Lang, N.P. & Giannobile, W.V., 2010. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants. *Clinical Oral Implants Research*, 21(1), pp.1–12.
- Chen, H.-T. et al., 2013. Microscopic observations of osteoblast growth on micro-arc oxidized β titanium. *Applied Surface Science*, 266, pp.73–80.
- Chen, X. et al., 2008. Effect of surface roughness of Ti, Zr, and TiZr on apatite precipitation from simulated body fluid. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), pp.378–387.
- Chiapasco, M. et al., 2011. Titanium-zirconium alloy narrow-diameter implants (Straumann Roxolid[®]) for the rehabilitation of horizontally deficient edentulous ridges: prospective study on 18 consecutive patients. *Clinical Oral Implants Research*, 23(10), pp.1136–1141.
- Chowdhary, R. et al., 2011. Biomechanical evaluation of macro and micro designed screw-type implants: an insertion torque and removal torque study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 24(3), pp.342–346.
- Chowdhary, R. et al., 2013. The osseointegration stimulatory effect of macrogeometry-modified implants: a study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research*, 25(9), pp.1051–1055.
- Cochran, D.L. et al., 1998. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 40(1), pp.1–11.
- Cochran, D.L.D. et al., 1996. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clinical Oral Implants Research*, 7(3), pp.240–252.
- Collaert, B., Wijnen, L. & De Bruyn, H., 2011. A 2-year prospective study on immediate loading with fluoride-modified implants in the edentulous mandible. *Clinical Oral Implants Research*, 22(10), pp.1111–1116.
- Correa, D.R.N. et al., 2014. The effect of the solute on the structure, selected mechanical properties, and biocompatibility of Ti–Zr system alloys for dental applications. *Materials Science & Engineering C*, 34(C), pp.354–359.
- Cremasco, A. et al., 2011. Effects of alloying elements on the cytotoxic response of titanium alloys. *Materials Science & Engineering C*, 31(5), pp.833–839.
- Crubézy, E. et al., 1998. False teeth of the Roman world. *Nature*, 391(6662), pp.29–29.
- Damen, J.J., Cate, Ten, J.M. & Ellingsen, J.E., 1991. Induction of calcium phosphate precipitation by titanium dioxide. *Journal of Dental Research*, 70(10), pp.1346–1349.
- Davies, J.E., 2007. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 28(34), pp.5058–5067.
- Davies, J.E., 1996. *In vitro* modeling of the bone/implant interface., 245(2), pp.426–445. Available at: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q/abstract).
- Davies, J.E., 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), pp.932–949.

- Davies, J.E. et al., 2013. The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface. *Biomaterials*, 34(14), pp.3535–3546.
- Davies, J.E. et al., 2014. Topographic scale-range synergy at the functional bone/implant interface. *Biomaterials*, 35(1), pp.25–35.
- Detsch, R. & Boccaccini, A., 2014. The role of osteoclasts in bone tissue engineering., pp.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.1851>.
- Donos, N. et al., 2011. Gene expression profile of osseointegration of a hydrophilic compared with a hydrophobic microrough implant surface. *Clinical Oral Implants Research*, 22(4), pp.365–372.
- Duarte, L.I. et al., 2012. Diffusion bonding of gamma-TiAl using modified Ti/Al nanolayers. *Journal of Alloys and Compounds*, 536, pp.S424–S427.
- Durual, S. et al., 2010. Titanium nitride oxide coating on rough titanium stimulates the proliferation of human primary osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research*, 22(5), pp.552–559.
- Eisenbarth, E. et al., 2004. Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*, 25(26), pp.5705–5713.
- Ellingsen, J.E., Thomsen, P. & Lyngstadaas, S.P., 2006. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 41, pp.136–156.
- Fernandes, C.M., Senos, A.M.R. & Vieira, M.T., 2012. Versatility of the sputtering technique in the processing of WC–Fe–Ni–Cr composites. *Surface and Coatings Technology*, 206(23), pp.4915–4921.
- Ferraz, M.P. et al., 2001. Effect of chemical composition on hydrophobicity and zeta potential of plasma sprayed HA/CaO-P2O5 glass coatings. *Biomaterials*, 22(23), pp.3105–3112.
- Frank, M.J., Walter, M.S., Bucko, M.M., et al., 2013a. Polarization of modified titanium and titanium–zirconium creates nano-structures while hydride formation is modulated. *Applied Surface Science*, 282, pp.7–16.
- Frank, M.J., Walter, M.S., Lyngstadaas, S.P., et al., 2013b. Hydrogen content in titanium and a titanium–zirconium alloy after acid etching. *Materials Science & Engineering C*, 33(3), pp.1282–1288.
- Ganeles, J. et al., 2008. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clinical Oral Implants Research*, 19(11), pp.1119–1128.
- Gepreel, M.A.-H. & Niinomi, M., 2013. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 20(C), pp.407–415.
- Gittens, R.A. et al., 2014. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomaterialia*, 10(7), pp.2907–2918.
- Gotfredsen, K. et al., 1991. Histological and histomorphometrical evaluation of tissue reactions adjacent to endosteal implants in monkeys. *Clinical Oral Implants Research*, 2(1), pp.30–37.
- Gotfredsen, K. et al., 1992. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂hyphen;blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 3(2), pp.77–84.
- Gottlow, J. et al., 2012. Evaluation of a new titanium-zirconium dental implant: a biomechanical and histological comparative study in the mini pig. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(4), pp.538–545.

- Gómez-Florit, M. et al., 2014. Human gingival fibroblasts function is stimulated on machined hydrided titanium zirconium dental implants. *Journal of Dentistry*, 42(1), pp.30–38.
- Gruber, R. et al., 2008. Bone cell responsiveness to growth and differentiation factors under hypoxia *in vitro*. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23(3), pp.417–426.
- Gutwein, L.G. & Webster, T.J., 2004. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials*, 25(18), pp.4175–4183.
- Hamlet, S. et al., 2012. The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression. *Clinical Oral Implants Research*, 23(5), pp.584–590.
- HAN, C.H. et al., 1998. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clinical Oral Implants Research*, 9(1), pp.1–10.
- Hansson, S., 2003. A conical implant-abutment interface at the level of the marginal bone improves the distribution of stresses in the supporting bone. An axisymmetric finite element analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), pp.286–293.
- Hansson, S. & Norton, M., 1999. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *Journal of Biomechanics*, 32(8), pp.829–836.
- Hawking, S., 2001. *The Universe in a Nutshell* 0 ed., Bantam Press. Available at: <http://www.amazon.com/The-Universe-Nutshell-Stephen-Hawking/dp/0593048156%3FSubscriptionId%3D1V7VTJ4HA4MFT9XBJIR2%26tag%3Dmekentosjcom-20%26linkCode%3Dxm2%26camp%3D2025%26creative%3D165953%26creativeASIN%3D0593048156>.
- Hempel, U. et al., 2010. Response of osteoblast-like SAOS-2 cells to zirconia ceramics with different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, 21(2), pp.174–181.
- Hirakawa, Y. et al., 2012. Accelerated bone formation on photo-induced hydrophilic titanium implants: an experimental study in the dog mandible. *Clinical Oral Implants Research*, 24(A100), pp.139–144.
- Ho, W.-F. et al., 2008. Structure, mechanical properties, and grindability of dental Ti–Zr alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(10), pp.3179–3186.
- Hobdell, M. et al., 2003. Global goals for oral health 2020. *International Dental Journal*, 53(5), pp.285–288.
- Hoffmann, O. et al., 2007. The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. ... *maxillofacial implants*.
- Ikarashi, Y. et al., 2005. Improved biocompatibility of titanium-zirconium (Ti-Zr) alloy: tissue reaction and sensitization to Ti-Zr alloy compared with pure Ti and Zr in rat implantation study. *Materials*
- Isa, Z.M.Z. et al., 2006. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 21(2), pp.203–211.
- Ivanoff, C.-J. et al., 2003. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(3), pp.341–348.
- Kasemo, B. & Lausmaa, J., 1988. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 3(4), pp.247–259.

- Kämmerer, P.W. et al., 2011. Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetic titanium surface modifications *in vitro*. *Clinical Oral Implants Research*, 23(4), pp.504–510.
- Keller, J.C. et al., 1990. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 5(4), pp.360–367.
- Keller, T.F. et al., 2013. Facets of protein assembly on nanostructured titanium oxide surfaces. *Acta Biomaterialia*, 9(3), pp.5810–5820.
- Kim, B.-S. & Lee, J., 2014. Enhanced bone healing by improved fibrin-clot formation via fibrinogen adsorption on biphasic calcium phosphate granules. *Clinical Oral Implants Research*, pp.n/a–n/a.
- Kim, M.H. et al., 2011. Effect of Biomimetic Deposition on Anodized Titanium Surfaces. *Journal of Dental Research*, 90(6), pp.711–716.
- Klein, M.O., Bijelic, A., et al., 2010a. Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. *Clinical Oral Implants Research*, 21(6), pp.642–649.
- Klein, M.O., Kämmerer, P.W., et al., 2010b. Modulation of platelet activation and initial cytokine release by alloplastic bone substitute materials. *Clinical Oral Implants Research*, 21(3), pp.336–345.
- Klokkevold, P.R. et al., 1997. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research*, 8(6), pp.442–447.
- Kodama, T. et al., 2008. Bone formation on apatite-coated titanium incorporated with bone morphogenetic protein and heparin. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23(6), pp.1013–1019.
- Kohavi, D. et al., 2012. Wettability versus electrostatic forces in fibronectin and albumin adsorption to titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 24(9), pp.n/a–n/a.
- Kohles, S.S. et al., 2004. Direct assessment of profilometric roughness variability from typical implant surface types. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 19(4), pp.510–516.
- Kojima, H. & Uemura, T., 2005. Strong and Rapid Induction of Osteoblast Differentiation by Cbfa1/Ti1-1 Overexpression for Bone Regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), pp.2944–2953.
- Kumar, A.M. et al., 2014. Evaluation of chemically modified Ti–5Mo–3Fe alloy surface: Electrochemical aspects and *in vitro* bioactivity on MG63 cells. *Applied Surface Science*, 307, pp.52–61.
- Lai, H.-C. et al., 2009. Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 20(3), pp.247–253.
- Lang, N.P. et al., 2011. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 22(4), pp.349–356.
- Lang, N.P. et al., 2007. Immediate implant placement with transmucosal healing in areas of aesthetic priority: A multicentre randomized-controlled clinical trial I. Surgical outcomes. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), pp.188–196.
- Le Guéhennec, L. et al., 2007. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), pp.844–854.

- Leinenbach, C. & Eifler, D., 2009. Influence of oxidation treatment on fatigue and fatigue-induced damage of commercially pure titanium. *Acta Biomaterialia*, 5(7), pp.2810–2819.
- Li, D. et al., 2002. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 60(2), pp.325–332.
- Lim, Y.J. et al., 2001. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 16(3), pp.333–342.
- Liu, Y., de Groot, K. & Hunziker, E.B., 2005. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. 36(5), pp.745–757.
- London, R.M. et al., 2002. Histologic comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact *in vivo* in rabbits. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(3), pp.369–376.
- Lumbikanonda, N. & Sammons, R., 2001. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 16(5), pp.627–636.
- Lutz, R. et al., 2010. Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. *Clinical Oral Implants Research*, 21(7), pp.726–734.
- Mamalis, A.A. & Silvestros, S.S., 2010. Analysis of osteoblastic gene expression in the early human mesenchymal cell response to a chemically modified implant surface: an *in vitro* study. *Clinical Oral Implants Research*, 22(5), pp.530–537.
- Mareci, D. et al., 2014. Effect of acidic fluoride solution on the corrosion resistance of ZrTi alloys for dental implant application. *Corrosion Science*, 87(C), pp.334–343.
- Mazor, Z. & Cohen, D.K., 2003. Preliminary 3-dimensional surface texture measurement and early loading results with a microtextured implant surface. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(5), pp.729–738.
- Meirelles, L. et al., 2011. A novel technique for tailored surface modification of dental implants - a step wise approach based on plasma immersion ion implantation. *Clinical Oral Implants Research*, 24(4), pp.461–467.
- Meirelles, L. et al., 2008. Effect of Hydroxyapatite and Titania Nanostructures on Early *In vivo* Bone Response. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 0(0), pp.080411085817500–???
- Meirelles, L. et al., 2007. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 18(3), pp.326–332.
- Mendes, V.C., Moineddin, R. & Davies, J.E., 2007. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials*, 28(32), pp.4748–4755.
- Mendonça, G. et al., 2008. Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28), pp.3822–3835.
- Meyer, U. et al., 2006. Fast element mapping of titanium wear around implants of different surface structures. *Clinical Oral Implants Research*, 17(2), pp.206–211.
- Meyer, U. et al., 2004. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials*, 25(10), pp.1959–1967.

- Mishnaevsky, L., Jr et al., 2014. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development. *Materials Science & Engineering R*, 81, pp.1–19.
- Mohammadi, S. et al., 2004. Long-term bone response to titanium implants coated with thin radiofrequency magnetron-sputtered hydroxyapatite in rabbits. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 19(4), pp.498–509.
- Monjo, M. et al., 2008. *In vivo* expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials*, 29(28), pp.3771–3780.
- Morra, M. et al., 2003. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: I. Surface analysis. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(1), pp.40–45.
- Morton, D. et al., 2010. Early Loading after 21 Days of Healing of Nonsubmerged Titanium Implants with a Chemically Modified Sandblasted and Acid-Etched Surface: Two-Year Results of a Prospective Two-Center Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 12(1), pp.9–17.
- Mustafa, K. et al., 2001. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical Oral Implants Research*, 12(5), pp.515–525.
- Mustafa, K. et al., 2000. Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 11(2), pp.116–128.
- Nawas, Al, B. & Götz, H., 2003. Three-Dimensional Topographic and Metrologic Evaluation of Dental Implants by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 5(3), pp.176–183.
- Nayab, S. et al., 2003. Adhesion of bone cells to ion-implanted titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(11), pp.991–997.
- Olefjord, I. & Hansson, S., 1993. Surface analysis of four dental implant systems. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 8(1), pp.32–40.
- Oliva, J., 2010. Five-year success Rate of 831 Consecutively placed Zirconia Dental Implants in Humans: A comparison of three Different Rough surfaces, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*.
- Omar, O. et al., 2009. Integrin and chemokine receptor gene expression in implant-adherent cells during early osseointegration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(3), pp.969–980.
- Ong, J.L., Bessho, K. & Carnes, D.L., 2002. Bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite and radiofrequency-sputtered calcium phosphate implants *in vivo*. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(4), pp.581–586.
- Ong, J.L., Carnes, D.L. & Bessho, K., 2004. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants *in vivo*. *Biomaterials*, 25(19), pp.4601–4606.
- Osathanon, T. et al., 2011. Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *Journal of Oral Science*, 53(1), pp.23–30.
- Osório, A.B., 2014. *Gestos e Materiais: Uma abordagem interdisciplinar sobre Cerâmicas com decorações brunidas de Bronze final/ idade do ferro*,
- Özcan, M. & Hämmerle, C., 2012. Titanium as a Reconstruction and Implant Material in Dentistry: Advantages and Pitfalls. *Materials ...*, 5(12), pp.1528–1545.

- Özkurt, Z. & Kazazoglu, E., 2011. Zirconia Dental Implants: A Literature Review. *Journal of Oral Implantology*, 37(3), pp.367–376.
- Pang, K.-M. et al., 2012. Clinical outcomes of magnesium-incorporated oxidised implants: a randomised double-blind clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 25(5), pp.616–621.
- Park, C.H. et al., 2010. Improved pre-osteoblast response and mechanical compatibility of ultrafine-grained Ti-13Nb-13Zr alloy. *Clinical Oral Implants Research*, 22(7), pp.735–742.
- Park, I.S. et al., 2008. Biomimetic apatite formation and biocompatibility on chemically treated Ti-6Al-7Nb alloy. *Surface and Interface Analysis*, 40(1), pp.37–42.
- Park, J.-W., Kwon, T.-G. & Suh, J.-Y., 2012. The relative effect of surface strontium chemistry and super-hydrophilicity on the early osseointegration of moderately rough titanium surface in the rabbit femur. *Clinical Oral Implants Research*, 24(6), pp.706–709.
- Park, J.Y. & Davies, J.E., 2000. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 11(6), pp.530–539.
- Park, J.Y., Gemmell, C.H. & Davies, J.E., 2001. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*, 22(19), pp.2671–2682.
- Park, Y.-J. et al., 2013. Cytocompatibility of pure metals and experimental binary titanium alloys for implant materials. *Journal of Dentistry*, 41(12), pp.1251–1258.
- Perrin, D. et al., 2002. Bone response to alteration of surface topography and surface composition of sandblasted and acid etched (SLA) implants. *Clinical Oral Implants Research*, 13(5), pp.465–469.
- Petersen, P.E. & Ogawa, H., 2005. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, 76(12), pp.2187–2193.
- Petersen, P.E. & Yamamoto, T., 2005. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33(2), pp.81–92.
- Pjetursson, B.E. et al., 2012. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clinical Oral Implants Research*, 23(s6), pp.22–38.
- Placko, H.E. et al., 2000. Surface characterization of titanium-based implant materials. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 15(3), pp.355–363.
- Protivínský, J. et al., 2007. Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell behavior. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22(4), pp.542–550.
- Puckett, S., Pareta, R. & Webster, T.J., 2008. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ...*
- Puleo, D.A.D. & Nanci, A.A., 1999. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), pp.2311–2321.
- Quirynen, M. et al., 2014. Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, pp.n/a–n/a.

- Raines, A.L. et al., 2010. Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy. *Biomaterials*, 31(18), pp.4909–4917.
- Ramos, A.S., 2002. *Comportamento mecânico e químico de filmes do sistema Ti-Al-(M)*,
- Ramos, A.S. & Vieira, M.T., 2012. Intermetallic compound formation in Pd/Al multilayer thin films. *META*, 25, pp.70–74.
- Ramos, A.S. et al., 2006. Nanometric multilayers: A new approach for joining TiAl. *Intermetallics*, 14(10-11), pp.1157–1162.
- Reyes, C.D. et al., 2007. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials*, 28(21), pp.3228–3235.
- Rocuzzo, M. et al., 2001. Early loading of sandblasted and acid-etched (SLA) implants: a prospective split-mouth comparative study. *Clinical Oral Implants Research*, 12(6), pp.572–578.
- Rosa, A.L. & Beloti, M.M., 2003. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clinical Oral Implants Research*, 14(1), pp.43–48.
- Rothschild, L., 2003. *Evolution on Planet Earth*
- Rupp, F. et al., 2014. A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. *Acta Biomaterialia*, 10(7), pp.2894–2906.
- Rupp, F., Scheideler, L. & Eichler, M., 2011. Wetting behavior of dental implants. ... & *maxillofacial implants*.
- Sagan, C., 2013. *Cosmos*. Ballantine Books, pp.1–249.
- Salvi, G.E. & Lang, N.P., 2001. Changing paradigms in implant dentistry. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 12(3), pp.262–272.
- Saulacic, N. et al., 2012. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. *Eur Cell ...*
- Sawase, T. et al., 2001. Application of oxygen ion implantation to titanium surfaces: effects on surface characteristics, corrosion resistance, and bone response. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 3(4), pp.221–229.
- Sawase, T. et al., 2008. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants Research*, 19(5), pp.491–496.
- Schliephake, H. et al., 2009. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: calcium phosphate coatings. *Clinical Oral Implants Research*, 20(1), pp.38–44.
- Schliephake, H. et al., 2002. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 13(3), pp.312–319.
- Schupbach, P. et al., 2005. The human bone-oxidized titanium implant interface: A light microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive x-ray study of clinically retrieved dental implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 7 Suppl 1, pp.S36–S43.
- Schwartz, Z., Lohmann, C.H. & Oefinger, J., 1999. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Advances in Dental ...*
- Sela, J. et al., 2000. Primary Mineralization At the Surfaces of Implants. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(4), pp.423–436.

- Sela, M.N. et al., 2007. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 18(5), pp.630–638.
- Sennerby, L. et al., 2005. Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 7 Suppl 1, pp.S13–20.
- Shalabi, M.M. et al., 2006. Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review. *Journal of Dental Research*, 85(6), pp.496–500.
- Shapira, L. et al., 2009. Effect of a niobium-containing titanium alloy on osteoblast behavior in culture. *Clinical Oral Implants Research*, 20(6), pp.578–582.
- Sheiham, A., 2005. Oral health, general health and quality of life. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), p.644.
- Shi, L. et al., 2007. Shape optimization of dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22(6), pp.911–920.
- SOLLAZZO, V. et al., 2008. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration *in vivo*. *Dental Materials*, 24(3), pp.357–361.
- Spyrou, P. et al., 2002. Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Clinical Oral Implants Research*, 13(6), pp.623–630.
- Stanford, C.M., 2008. Surface modifications of dental implants. *Australian Dental Journal*, 53(s1), pp.S26–S33.
- Stájer, A. et al., 2008. Corrosive effects of fluoride on titanium: Investigation by X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, and human epithelial cell culturing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A(2), pp.450–458.
- Steinemann, S.G., 1998. Titanium — the material of choice? *Periodontology 2000*, 17(1), pp.7–21.
- Stenport, V.F. & Johansson, C.B., 2008. Evaluations of Bone Tissue Integration to Pure and Alloyed Titanium Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 10(3), pp.191–199.
- Sul, Y.-T., Johansson, C.B. & Albrektsson, T., 2002a. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(5), pp.625–634.
- Sul, Y.-T., Johansson, C.B., Kang, Y., et al., 2002b. Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and phosphoric acid incorporation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 4(2), pp.78–87.
- Sul, Y.-T.Y., Byon, E.E. & Wennerberg, A.A., 2008. Surface characteristics of electrochemically oxidized implants and acid-etched implants: surface chemistry, morphology, pore configurations, oxide thickness, crystal structure, and roughness. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23(4), pp.631–640.
- Sul, Y.T. et al., 2005. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. ... *journal of oral & ...*
- Sykaras, N. et al., 2000. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 15(5), pp.675–690.
- Taborelli, M.M. et al., 1997. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clinical Oral Implants Research*, 8(3), pp.208–216.

- Terheyden, H. et al., 2014. Inflammatory reaction - communication of cells. *Clinical Oral Implants Research*, 25(4), pp.399–407.
- Terheyden, H. et al., 2012. Osseointegration - communication of cells. *Clinical Oral Implants Research*, 23(10), pp.1127–1135.
- Testori, T. et al., 2002. A multicenter prospective evaluation of 2-months loaded Osseotite® implants placed in the posterior jaws: 3-year follow-up results. *Clinical Oral Implants Research*, 13(2), pp.154–161.
- Tomisa, A.P. et al., 2011. Nanotechnology approaches to improve dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 26 Suppl, pp.25–29.
- Tschernitschek, H., Borchers, L. & Geurtsen, W., 2005. Nonalloyed titanium as a bioinert metal--a review. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 36(7-8), pp.523–530.
- Valencia, S., Gretzer, C. & Cooper, L.F., 2009. Surface nanofeature effects on titanium-adherent human mesenchymal stem cells. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24(1), pp.38–46.
- Vallés, G. et al., 2008. Rutile and titanium particles differentially affect the production of osteoblastic local factors. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(2), pp.324–336.
- Variola, F. et al., 2011. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale*, 3(2), pp.335–353.
- Variola, F. et al., 2008. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials*, 29(10), pp.1285–1298.
- Velasco-Ortega, E. et al., 2010. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 702(1), pp.17–23.
- Vlacic-Zischke, J. et al., 2011. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGFβ/BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*, 32(3), pp.665–671.
- Wang, C.C. et al., 2008. Effects of nano-surface properties on initial osteoblast adhesion and Ca/P adsorption ability for titanium alloys. *Nanotechnology*, 19(33), p.335709.
- Webster, T.J. & Eijofor, J.U., 2004. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, 25(19), pp.4731–4739.
- Wen, B. et al., 2014. The osseointegration behavior of titanium-zirconium implants in ovariectomized rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 25(7), pp.819–825.
- Wennerberg, A. & Albrektsson, T., 1993. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. ... & maxillofacial implants.
- Wennerberg, A. & Albrektsson, T., 2009. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20(s4), pp.172–184.
- Wennerberg, A. & Albrektsson, T., 2010. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24(1), pp.63–74.
- Wennerberg, A. & Albrektsson, T., 2000. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 15(3), pp.331–344.

- Wennerberg, A. et al., 1997. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 12(4), pp.486–494.
- Wennerberg, A. et al., 1995. A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, 6(1), pp.24–30.
- Wennerberg, A. et al., 2013. Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. *Clinical Oral Implants Research*, 25(9), pp.1041–1050.
- Wennerberg, A. et al., 2012. Spontaneously formed nanostructures on titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 24(2), pp.203–209.
- Wennerberg, A. et al., 2004. Titanium release from implants prepared with different surface roughness. An *in vitro* and *in vivo* study. *Clinical Oral Implants Research*, 15(5), pp.505–512.
- Wenz, H.J. et al., 2008. Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *The International journal of prosthodontics*, 21(1), pp.27–36.
- Wieland, M. et al., 2001. Wavelength-dependent roughness: a quantitative approach to characterizing the topography of rough titanium surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 16(2), pp.163–181.
- Wilmowsky, von, C., Bauer, S. & Roedel, S., 2012. The diameter of anodic TiO₂ nanotubes affects bone formation and correlates with the bone morphogenetic protein-2 expression *in vivo*. *Clinical Oral ...*
- world health organization, 2013. EN_WHS2013_Full-1. pp.1–172.
- world health organization, 2012. The health-care challenges posed by population ageing. *Bulletin of the World Health Organization*, 90(2), pp.82–83.
- Xu, B. et al., 2009. Osterix Enhances BMSC-associated Osseointegration of Implants. *Journal of Dental Research*, 88(11), pp.1003–1007.
- Yang, C.-H. et al., 2011. Effect of oxygen plasma immersion ion implantation treatment on corrosion resistance and cell adhesion of titanium surface. *Clinical Oral Implants Research*, 22(12), pp.1426–1432.
- Yang, Y. et al., 2003. Influence of Post-deposition Heating Time and the Presence of Water Vapor on Sputter-coated Calcium Phosphate Crystallinity. *Journal of Dental Research*, 82(10), pp.833–837.
- Yao, Y. et al., 2014. Microstructural evolution and mechanical properties of Ti–Zr beta titanium alloy after laser surface remelting. *Journal of Alloys and Compounds*, 583(C), pp.43–47.
- Yonggang, Y. et al., 2007. *In vitro* evaluation of different heat-treated radio frequency magnetron sputtered calcium phosphate coatings. *Clinical Oral Implants Research*, 18(3), pp.345–353.
- Zhao, G. et al., 2006. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clinical Oral Implants Research*, 17(3), pp.258–264.

Capítulo VII. Anexos

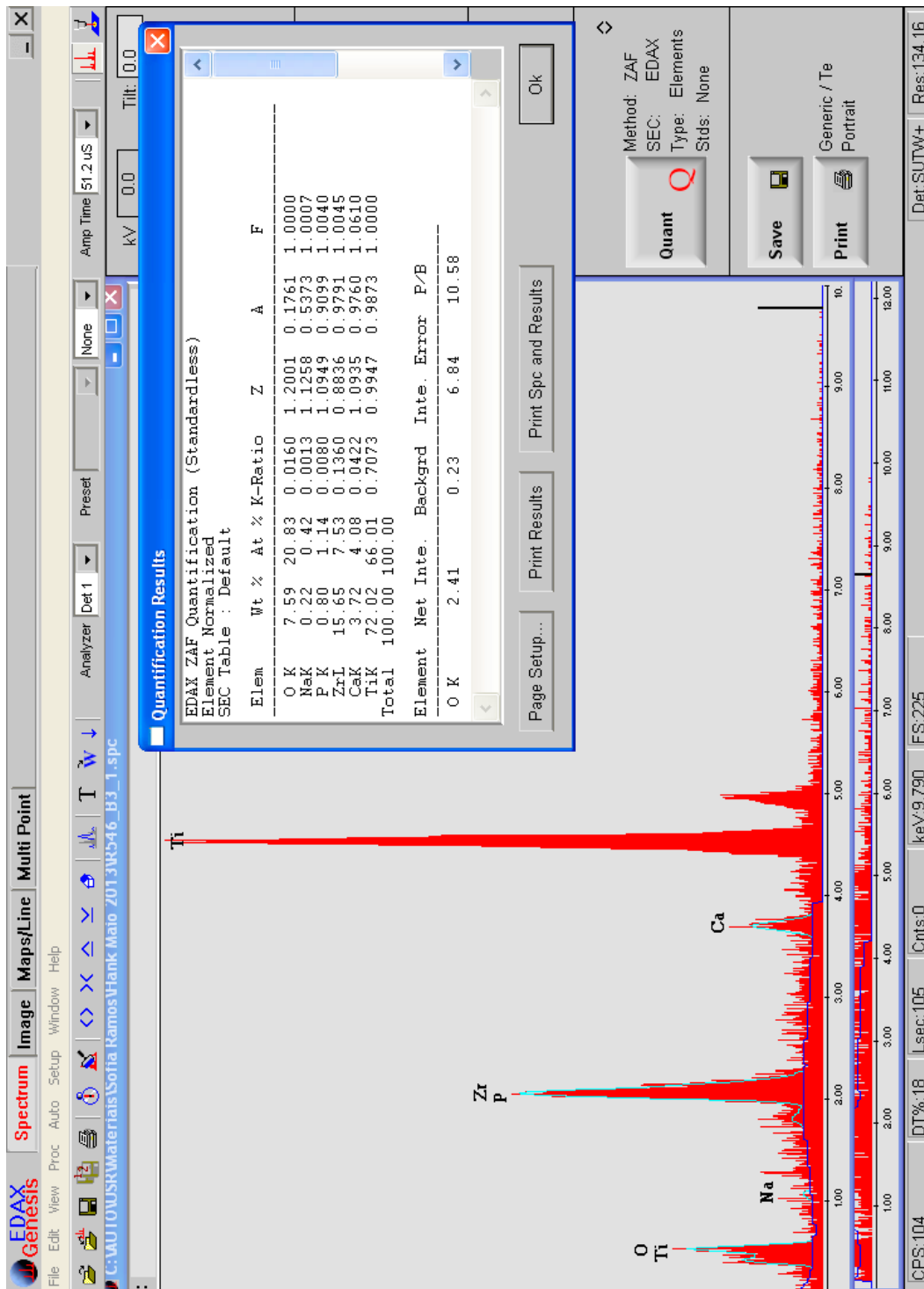


Figura 3.71 – R546 Ti20Zr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R546 Ti20Zr após 3 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

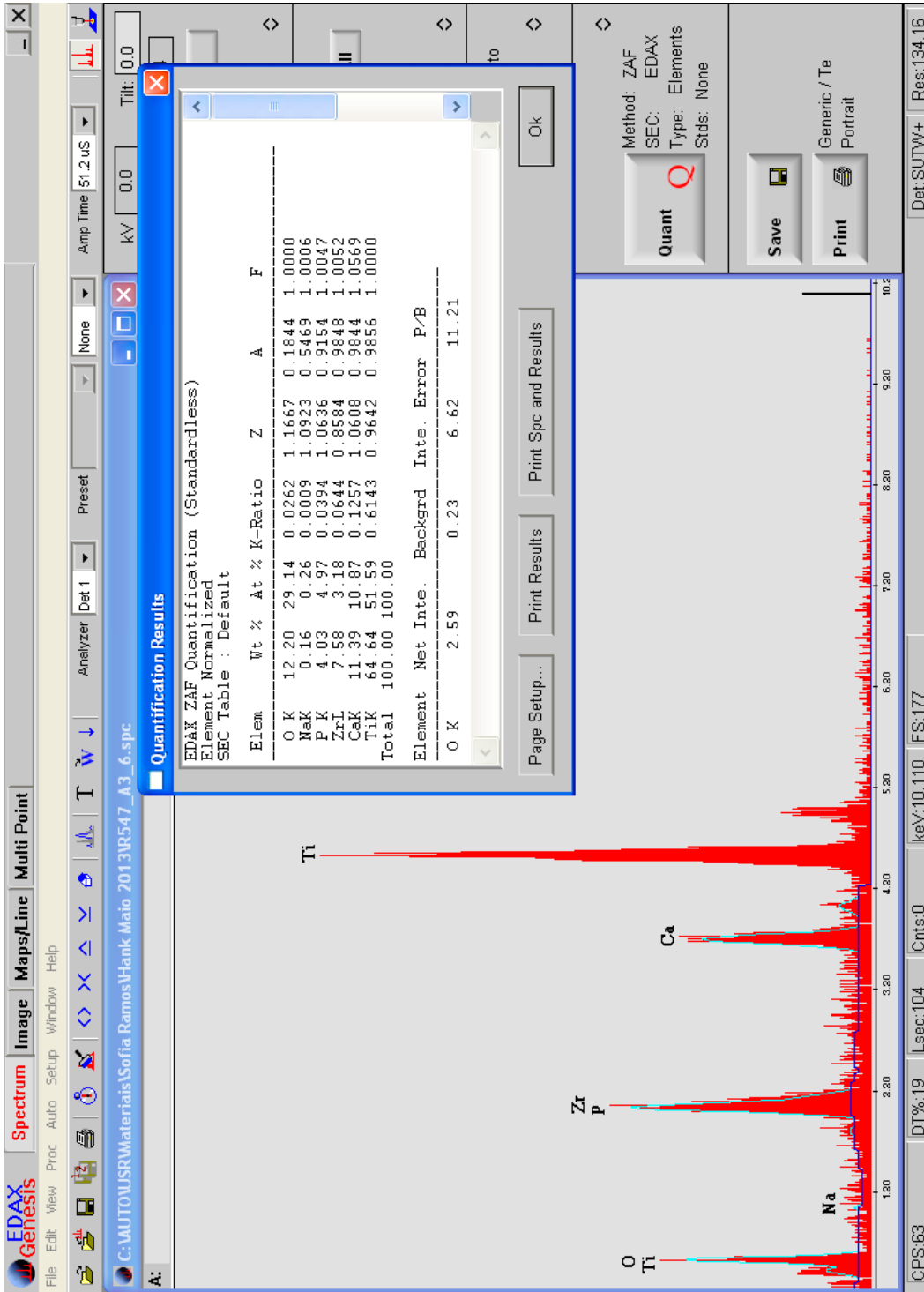


Figura 3.72 – R547Ti15Zr3 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R547Ti15Zr3 dias após 3 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

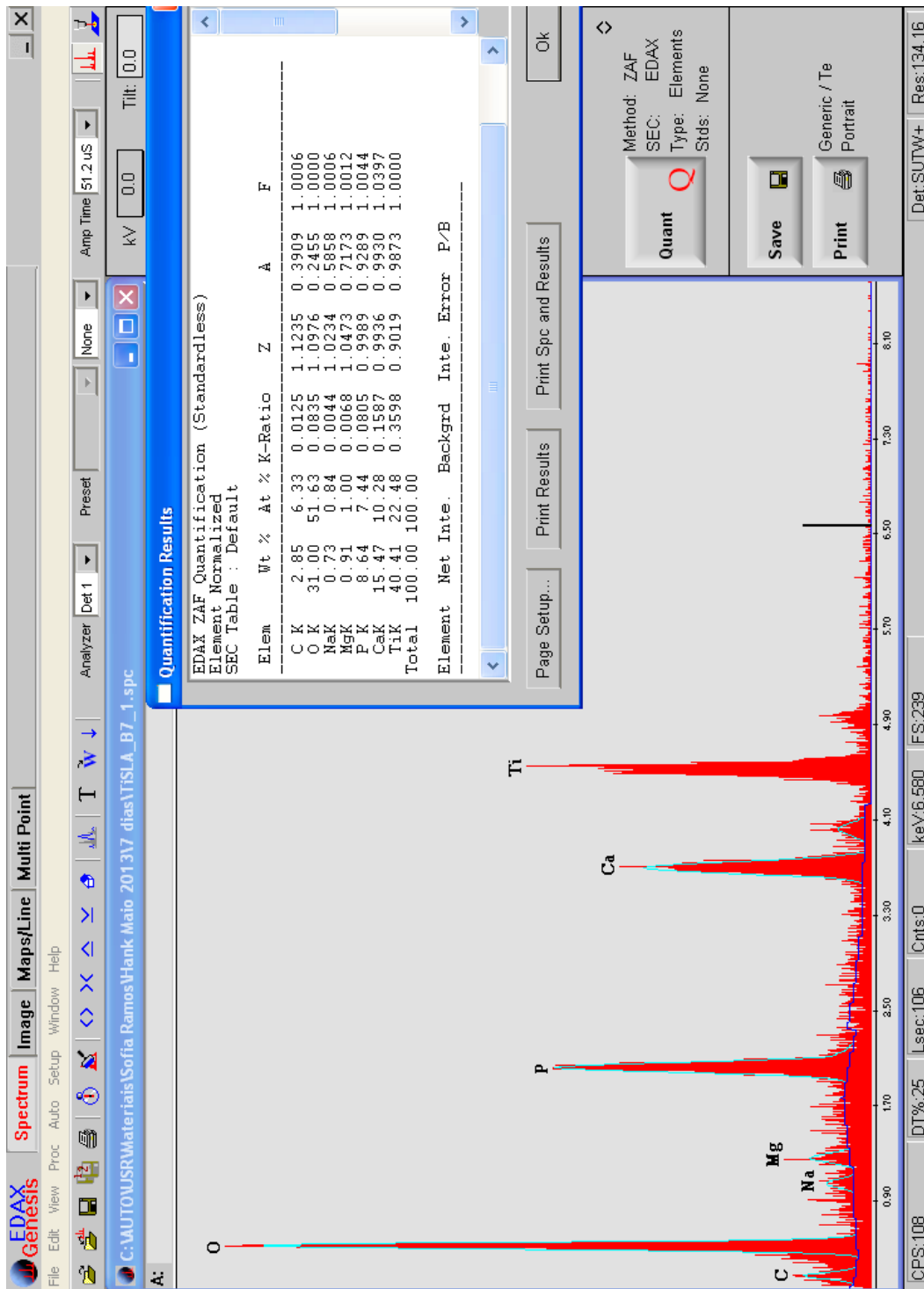


Figura 3.73 – cp Ti SLA 7 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície cp Ti SLA após 7 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, P e Ca; identificação de Na e Ke Mg; composição química após análise por EDS.

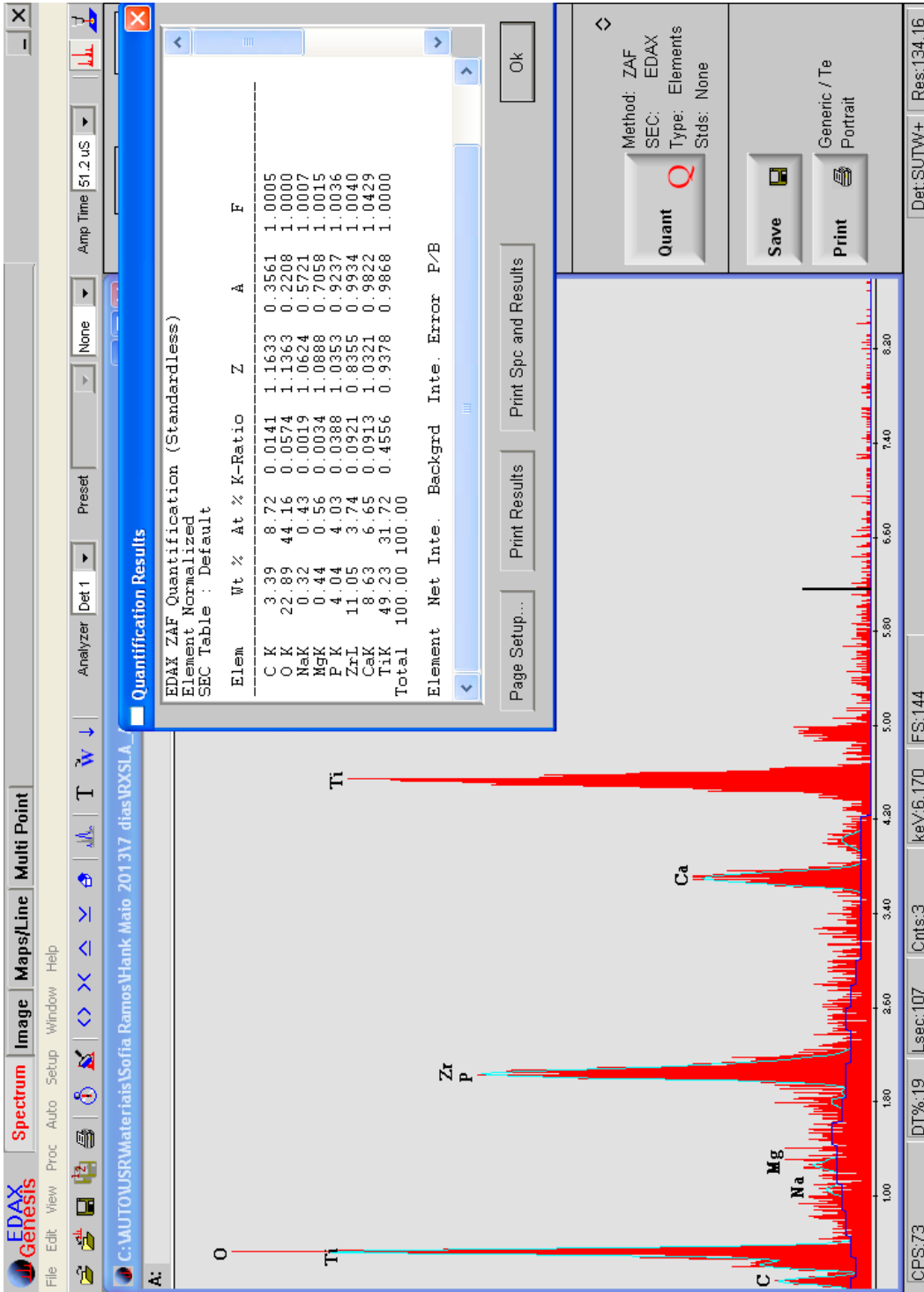


Figura 3.74 – TiZr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície TiZr após 7 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; presença de Na e Mg; composição química após análise por EDS.

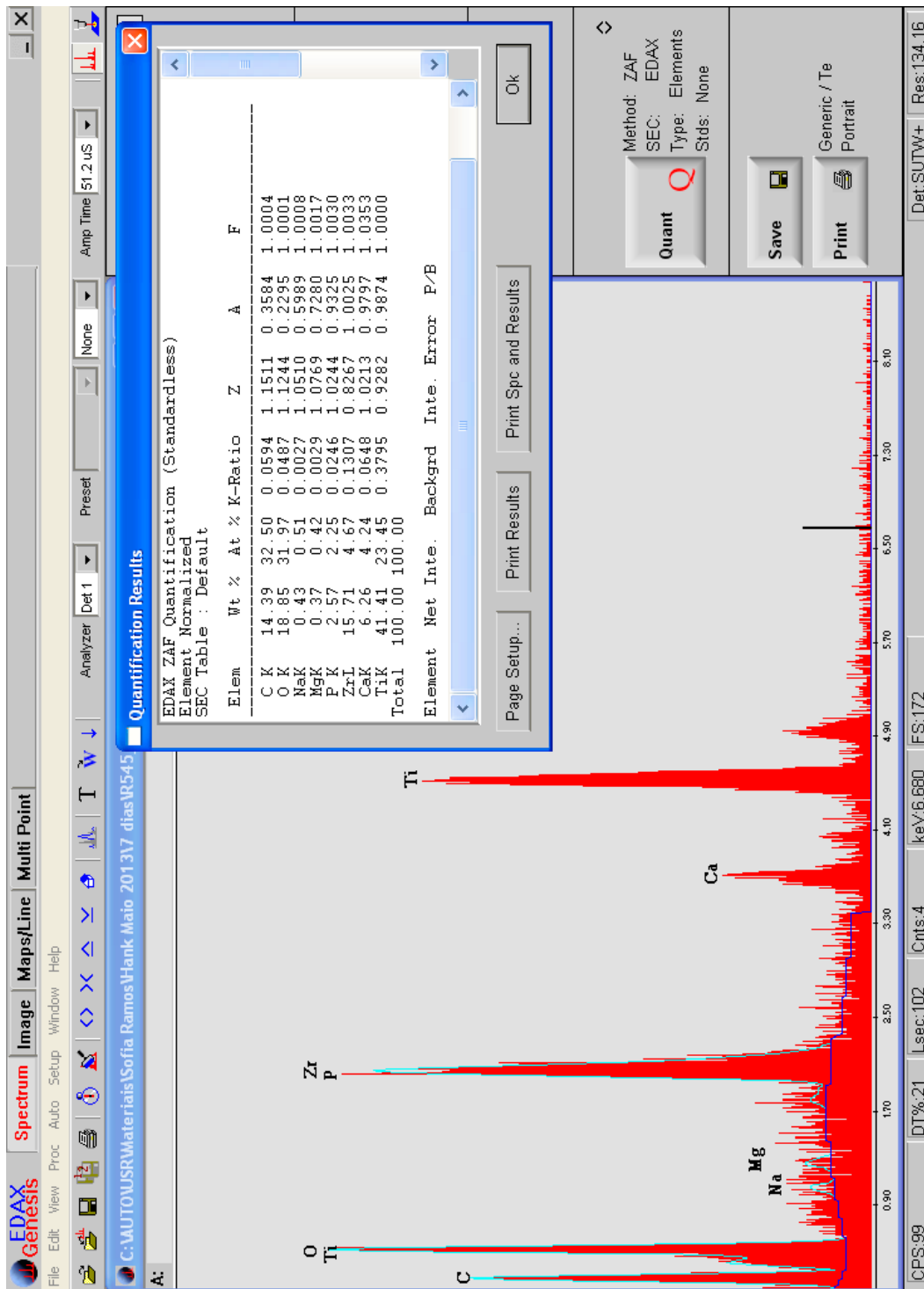


Figura 3.75 – R545 Ti25Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R545 Ti25Zr após 7 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

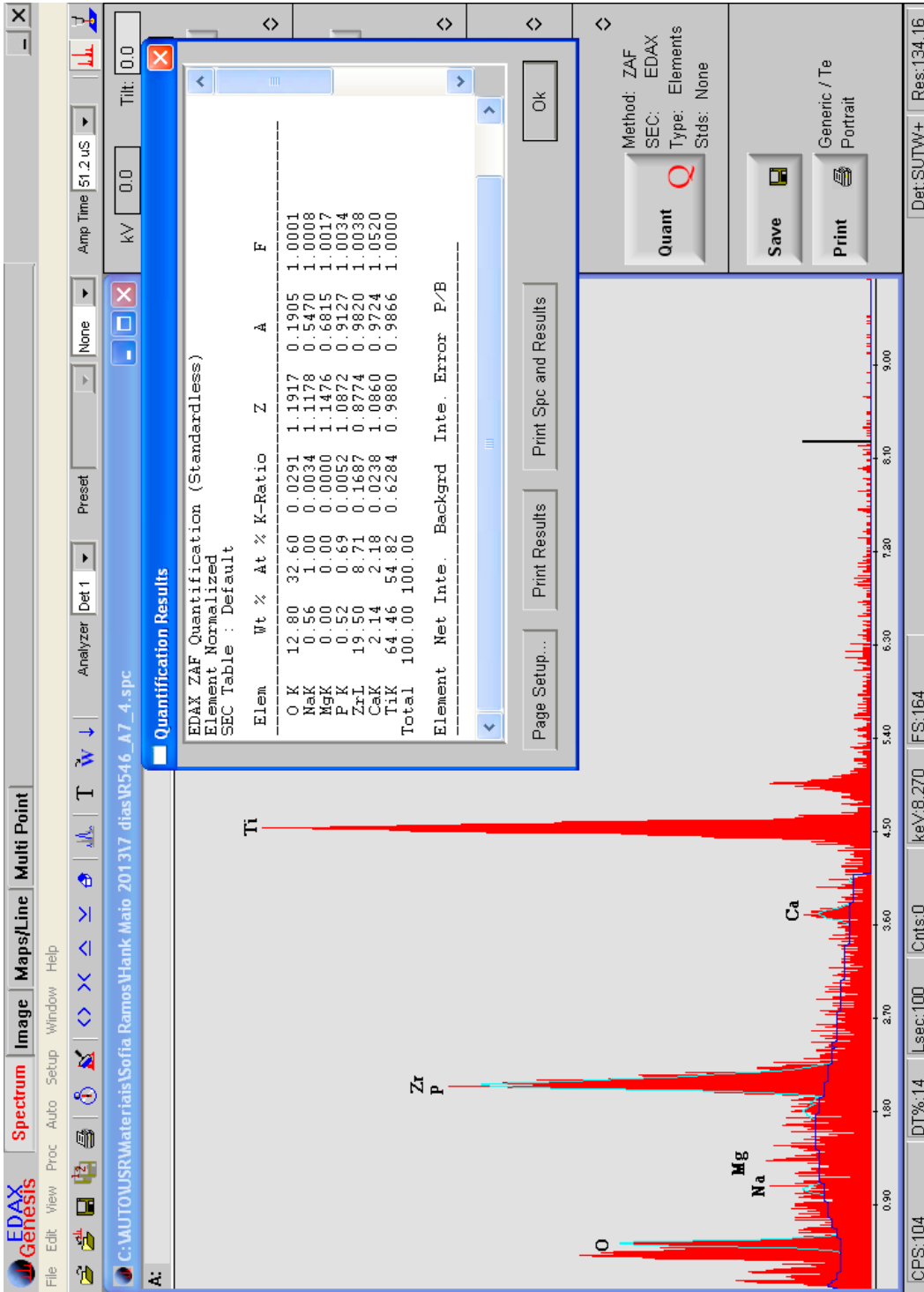


Figura 3.76 – R546 Ti20Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R546 Ti20Zr após 7 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

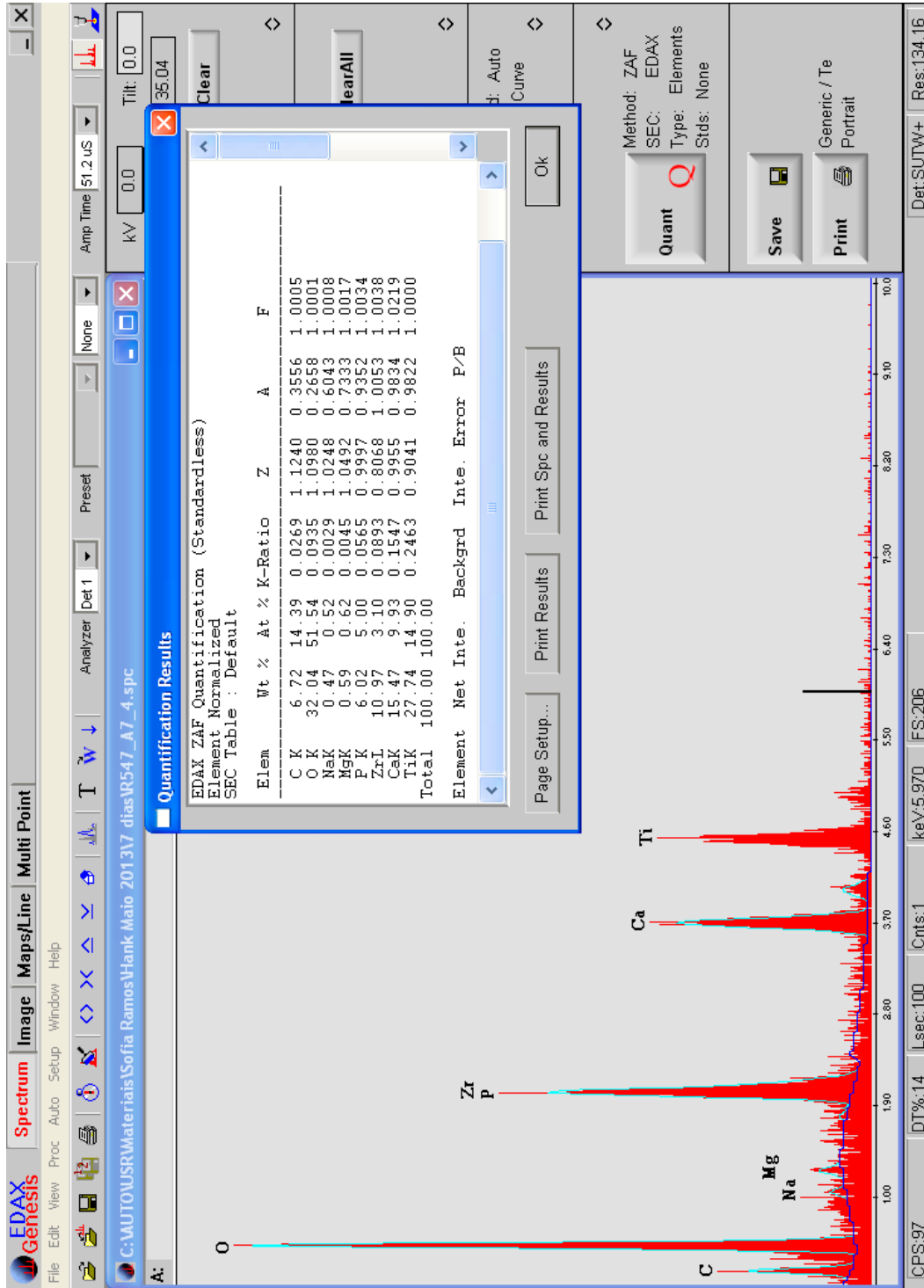


Figura 3.77 – R547Ti15Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R547Ti15Zr após 7 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

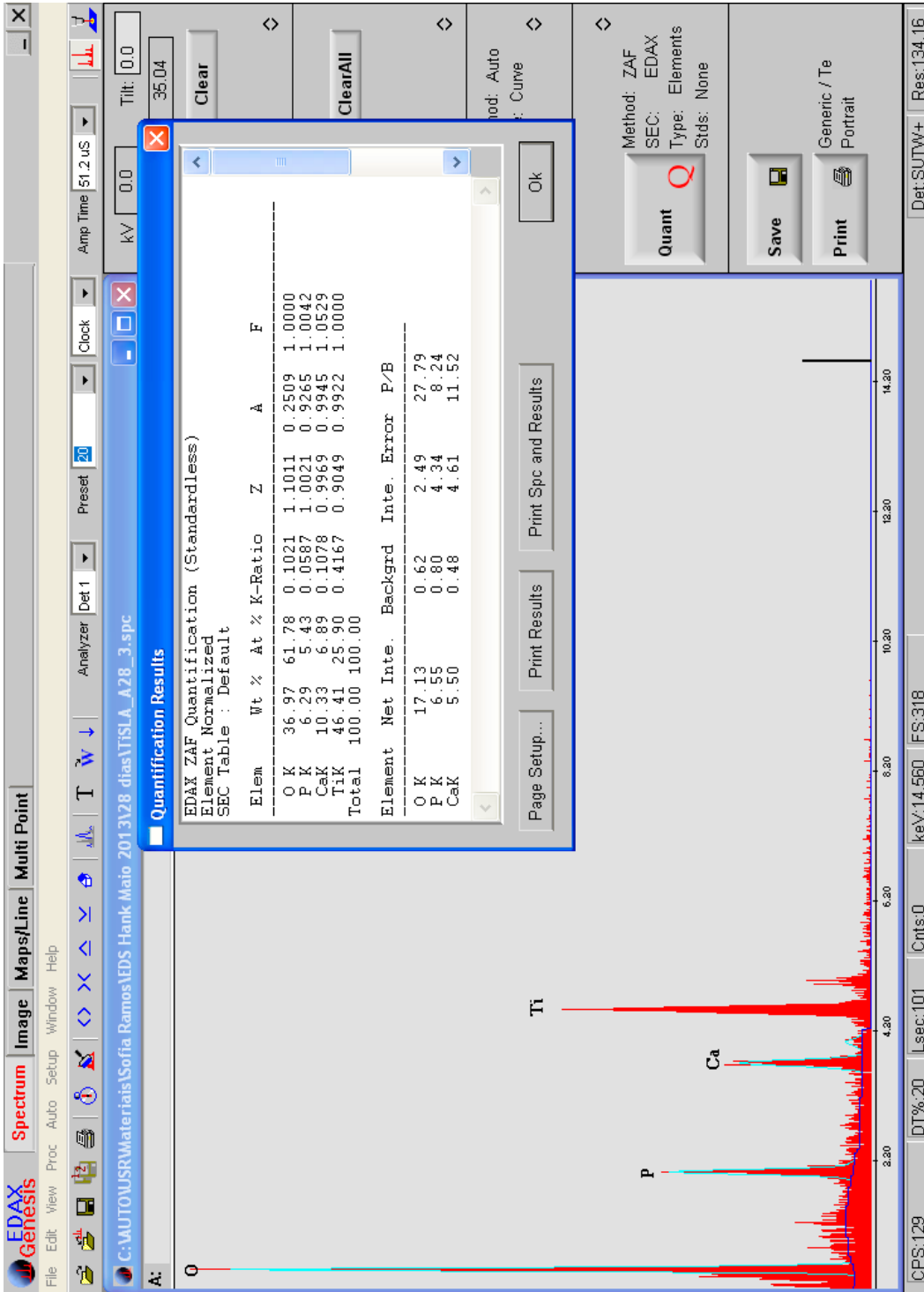


Figura 3.78 – cp Ti SLA 28 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície cp Ti SLA após 28 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, P e Ca, mais pronunciados; composição química após análise por EDS.

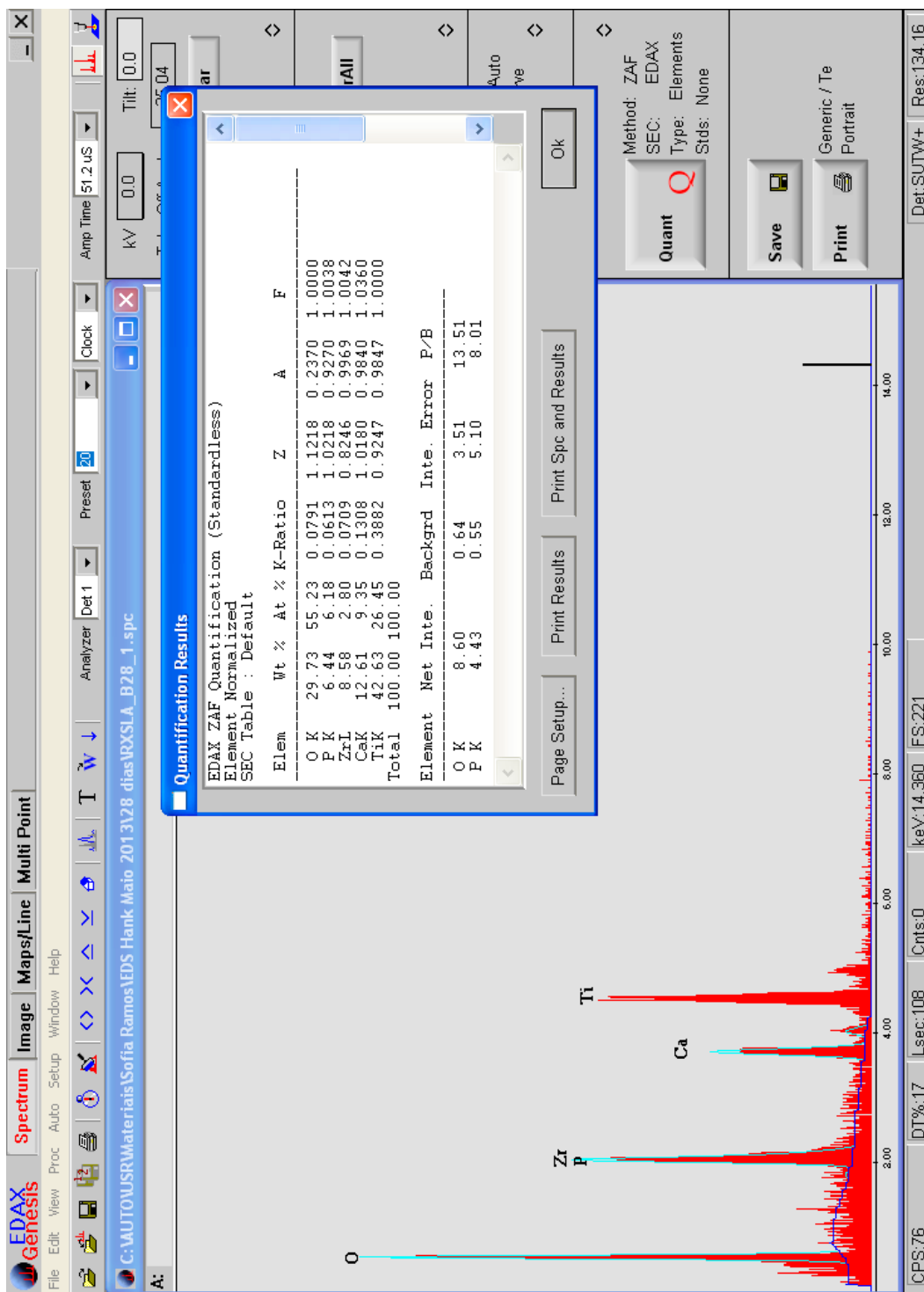


Figura 3.79 – TiZr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície TiZr após 28 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca muito fortes; composição química após análise por EDS.

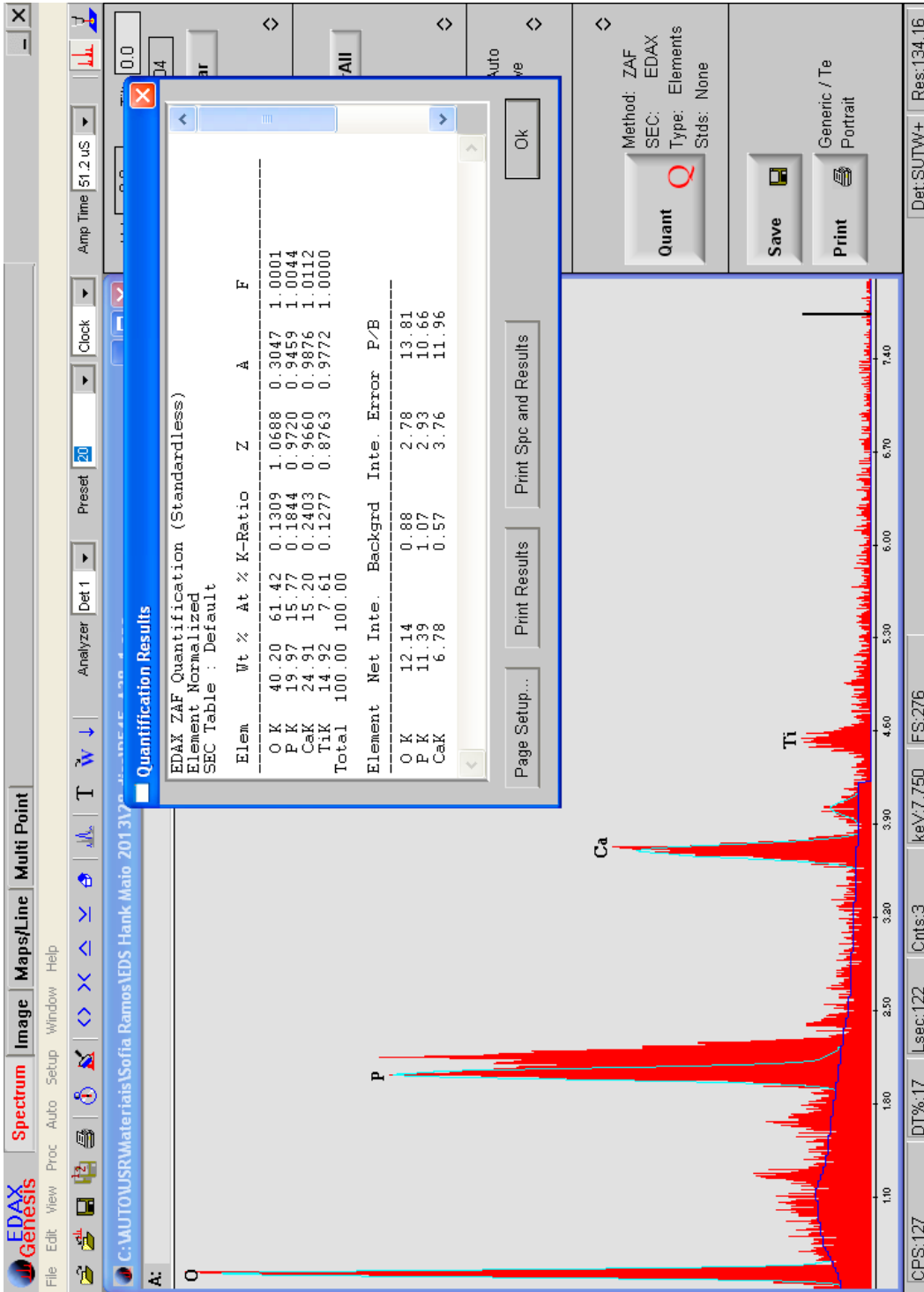


Figura 3.80 – R545 Ti25Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R545 Ti25Zr após 28 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr, P e Ca distintos; composição química após análise por EDS.

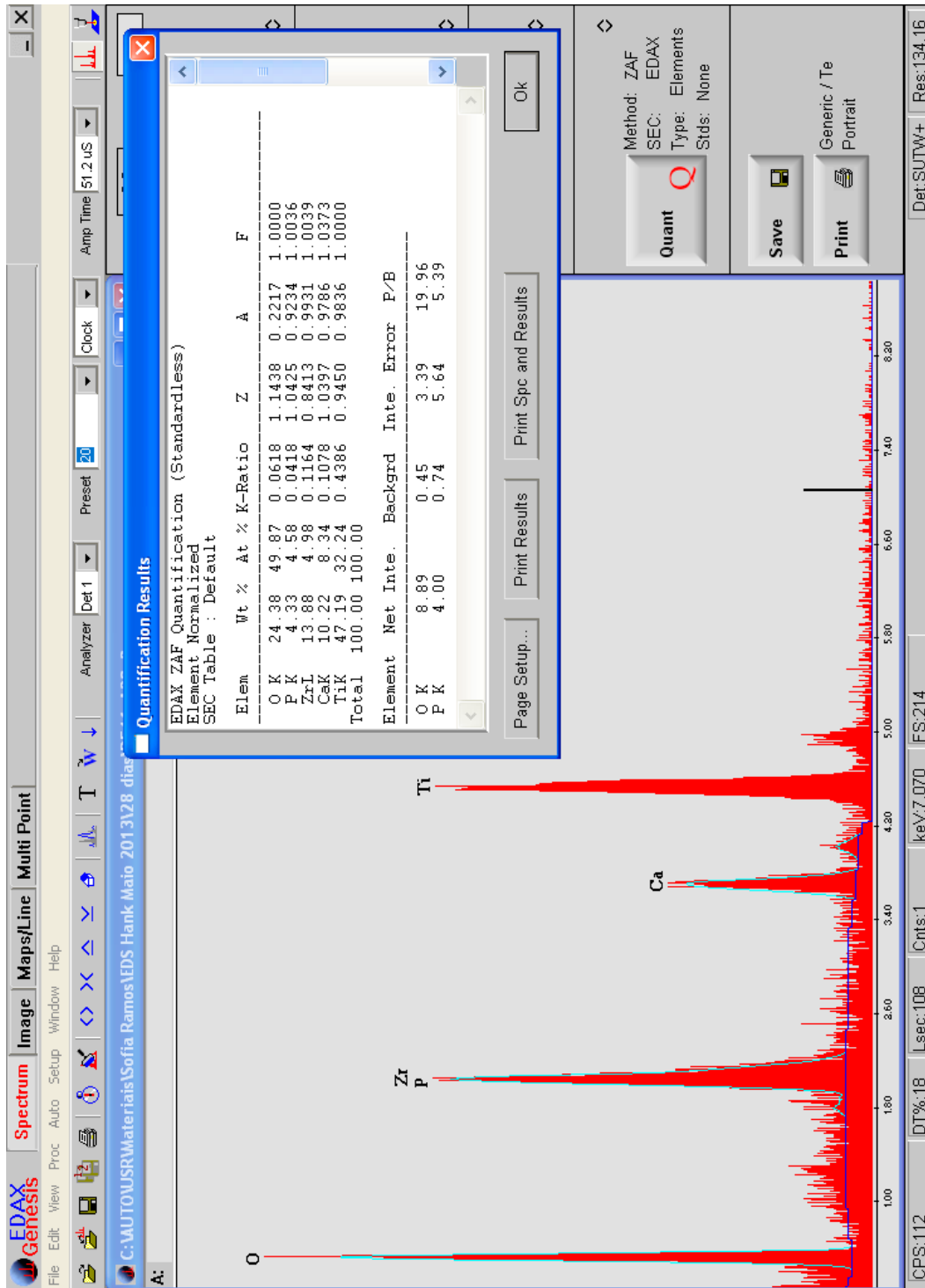


Figura 3.81 – R546 Ti20Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R546 Ti20Zr após 28 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

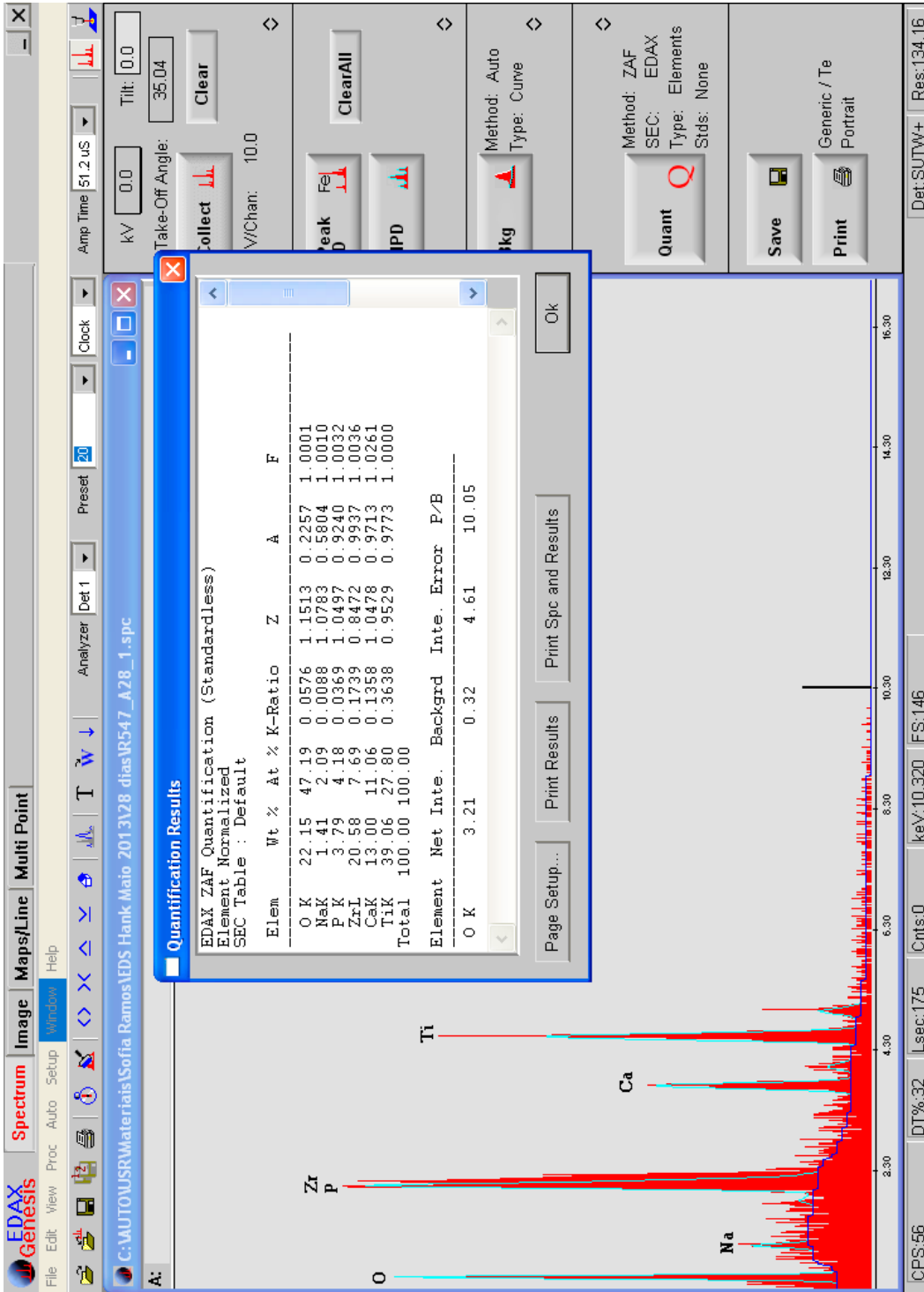


Figura 3.82 – R547 Ti15Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS da superfície do filme fino R547 Ti15Zr após 28 dias de imersão em solução de Hank; destaque para os picos de Ti, Zr/P sobrepostos e Ca; composição química após análise por EDS.

Listagem de Abreviaturas

2D – 2 dimensões
3D – 3 dimensões
ADP – adenosina difosfato
AFM – microscópio de força atómica
ALP – fosfatase alcalina
ATP – adenosina trifosfato
bFGF – factor de crescimento de fibroblastos basico
BIC – contacto osso-implante
BMP – proteína morfogenética óssea
BSP – sialoproteína óssea
ccc – estrutura cubica de corpo centrado
CoCrMo – liga de cromio cobalto molibdénio
cp Ti – titânio puro comercializado
CTGF – factor e crescimento de tecido conjuntivo
DAE – duplo ataque ácido
DCD – discreta deposição cristalina
DMSO – sulfóxido de dimetilo, solvente aprótico
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDS – espectrofotometria de dispersão energia
EGF – factor de crescimento endotelial
ELISA – teste imunoenzimático baseado na reacção antigénio- anticorpo
EPMA – microsonda electrónica de microanálise
ERK – proteina reguladora na diferenciação celular
FA – adesão focal
FDA – Food and Drugs Administration
FGF – factor de crescimento de fibroblastos
Ga – giga aeons
GAPDH – proteina gliceraldeído trifosfato desidrogenase
GP – glicoproteína
GPa – giga pascal -unidade de pressão; 1Gpa=10 000 atmosferas
HA – hidroxiapatite
hcp – estrutura cristalina hexagonal compacta

HIP – hot isostatic pressing
ICAM – molécula de adesão intercelular
IL – interleucina
iNOS – sintetase induzível do óxido nítrico
ISO – International Organization of Standardization
kV – kilovolt
LED – diodo emissor de luz
LSR – laser surface remelting
mA – miliampere
MAPK – proteína reguladora da transmissão extracelular para o núcleo
MG63 – linha de células osteoblásticas
min – minutos
ml – mililitros – unidade de volume
mm – milímetros
mM – milimolar
mN – milinewton
MPa – mega pascal
MSC – célula mesenquimatosa estaminal
nA – nanoamperes
NASA – National Aeronautics and Space Administration
nm – nanômetros
nmol – nanomolar
nN – nano newtons
OPG – osteoprotegerina
OPN – osteopontina
Ox – osterix
Pa – pascal – unidade de pressão
PBS – solução de fosfato tamponada
PCR – reação em cadeia da polimerase
PDGF – factor de crescimento das plaquetas
PEG – glicopolietileno
PF – factor plaquetar
PGE2 – prostaglandina E2
PMN – polimorfonucleares
PSZ – zircónia parcialmente estabilizada
PTH – hormona paratiróide
RANK – receptor/activador nuclear Kbeta
RANKL – receptor ligante do RANK
RGD – tripéptido (ácido argininoglicospártico)
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
RTC – randomized clinical trial
RTV – teste de torque de remoção
RUNX2 – factor de transcrição associado à diferenciação osteoblástica
Sa – medida de superfície de rugosidade independente da direcção de medição
SAM – monocamadas de auto arranjo
Saos-2 – células osteoblásticas
SBF – soro bovino fetal
Sci – índice de retenção de fluido
Sdr – medida em percentagem do alargamento da área comparado com a área total do plano de referência

SEM – microscópio electrónico de varrimento
SLA – sandblasted large grit acid etched
SMAD – proteína intracelular reguladora do crescimento
TGF – tripeptido factor de crescimento transformante
Ti-12Mo-6Zr-2Fe – liga titânio –molibdênio- zircónio
TIMPs – metalproteinases inibidoras dos tecidos
TNTZ – liga composta por beta-Ti+ Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr
TZP – zirconia tetragonal policristalizada
UV – ultra violeta
VCAM – molécula de adesão celular vascular
VEGF – factor de crescimento vascular endothelial
Vs – polarização dos substratos
XRD – difracção de raio X
Y-TZP – zircónia parcialmente estabilizada com ítria

Listagem de Figuras

Figura 1.1 – Interações entre superfície e matriz extracelular nas etapas iniciais da cicatrização óssea.....	7
Figura 1.2 – Estruturas cristalinas metálicas comuns:.....	17
Figura 1.3 – Variação do módulo do módulo de elasticidade em função do teor de zircónio.....	22
Figura 1.4 – Módulo de elasticidade de algumas ligas biomédicas.....	22
Figura 1.5 – Diagrama de equilíbrio do sistema Ti-Zr.....	23
Figura 1.6 – Exemplificação de forma, período e rugosidade.....	31
Figura 1.7 – Desenho esquemático ilustrando as áreas das espiras dos implantes que é necessário avaliar.....	32
Figura 1.8 – Ângulo de contacto.....	37
Figura 1.9 – Modificações de superfície nanométricas.....	46
Figura 2.1 – Equipamento de pulverização catódica.....	56
Figura 2.2 – Esquema ilustrativo dos componentes do equipamento de pulverização catódica.....	57
Figura 2.3 – Interações das espécies existentes dentro da câmara de vácuo durante o processo de deposição.....	58
Figura 2.4 – Interações na superfície do substrato.....	58
Figura 2.5 – Rugosímetro Mahr modelo Perthometer S4P Perthen S4P.....	59
Figura 2.6 – Microscópio ótico 3D de elevada resolução de focagem infinita - Alicona Infinite Focus.....	60
Figura 2.7 – Microsonda electrónica (EPMA – Electron Probe MicroAnalysis).....	62
Figura 2.8 – Microscópio electrónico de varrimento (SEM).....	62
Figura 2.9 – Microscópio de emissão de campo de alta resolução FEI Quanta 400FEG ESEM.....	63
Figura 2.10 – Esquema ilustrativo da difração de raios X.....	64
Figura 2.11 – Difractómetro PHILIPS modelo X’Pert.....	64
Figura 2.12 – Diagrama esquemático da dupla camada eléctrica (camada de Stern) associada ao potencial zeta.	65
Figura 2.13 – Analisador eletrocinético SuRPass, da Anton Paar.....	66
Figura 2.14 – Equipamento para nanoindentação da Micro Materials com um indentedor de diamante Berkovich.....	67
Figura 3.1 – Esquema ilustrativo das etapas de trabalho do estudo <i>in vitro</i>	76
Figura 3.2 – Alvo de Ti composto.....	77
Figura 3.3 – Disposição das áreas e sequência de medição por amostra durante a análise da topografia da superfície ...	78
Figura 3.4 – Esquema ilustrativo das etapas da fase I do estudo.....	83
Figura 3.5 – Micrografias da secção transversal de filmes de titânio.....	84
Figura 3.6 – Micrografia da secção transversal de filme de TiZr de 1 µm.....	84
Figura 3.7 – Representação em diagrama da superfície do filme fino de TiZr de 1 µm.....	85
Figura 3.8 – Micrografias superficiais do filme de titânio de 2µm depositado sobre titânio polido a diamante.....	85
Figura 3.9 – Micrografias superficiais do Ti SLA.....	86
Figura 3.10 – Micrografias superficiais do Ti SLA e do filme de titânio de 1µm.....	87
Figura 3.11 – Esquema ilustrativo das etapas da fase 2 do estudo.....	88
Figura 3.12 – Difractogramas de raios X dos filmes depositados sobre aço em função do teor de zircónio.....	89
Figura 3.13 – Micrografias superficiais do Ti SLA e do filme Ti15Zr de 1 µm depositado sobre Ti SLA.....	90
Figura 3.14 – Micrografias do filme Ti15Zr com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS de um pico.....	91
Figura 3.15 – Micrografias do filme Ti15Zr com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS de um vale.....	92
Figura 3.16 – Micrografias superficiais do filme Ti15Zr depositado sobre Ti SLA.....	93

Figura 3.17 – Micrografias do filme Ti15Zr com indicação dos locais onde foi realizada a análise EDS.....	93
Figura 3.18 – Micrografias superficiais do filme Ti15Zr depositado sobre Ti SLA (porta-substratos de aço).....	94
Figura 3.19 – Micrografias representativas dos filmes depositados variando os parâmetros de deposição.....	94
Figura 3.20 – Micrografias representativas da superfície cp Ti SLA.....	95
Figura 3.21 – Micrografias representativas da superfície cp Ti SLA. Ampliação x 1000.....	96
Figura 3.22 – Micrografias representativas da superfície cp Ti SLA e dos filmes depositados variando os parâmetros ...	97
Figura 3.23 – Esquema ilustrativo das etapas da fase 2 do estudo.....	97
Figura 3.24 – Micrografias superficiais do filme Ti15Zr de 1 µm depositado sobre Ti SLA.....	98
Figura 3.25 – Medição de espessura de filme de Ti.....	100
Figura 3.26 – Medição da rugosidade do perfil de filme R492	100
Figura 3.27 – Medição da rugosidade do perfil de amostra de cp Ti	101
Figura 3.28 – Mapa de pseudo-cores, gerado pelo Surface Texture Measurement	104
Figura 3.29 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 1	105
Figura 3.30 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 2.....	106
Figura 3.31 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 3.....	107
Figura 3.32 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 4.....	108
Figura 3.33 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 5.....	109
Figura 3.34 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 6.....	110
Figura 3.35 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 7.....	111
Figura 3.36 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 8.....	112
Figura 3.37 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 9.....	113
Figura 3.38 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 10.....	114
Figura 3.39 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 11.....	115
Figura 3.40 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 12.....	116
Figura 3.41 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 13.....	117
Figura 3.42 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 14.....	118
Figura 3.43 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 15	119
Figura 3.44 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 16.....	120
Figura 3.45 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 1m.....	121
Figura 3.46 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 2m.....	122
Figura 3.47 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra 3m.....	123
Figura 3.48 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra A.....	124
Figura 3.49 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra B.....	125
Figura 3.50 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra C.....	126
Figura 3.51 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra D.....	127
Figura 3.52 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra E.....	128
Figura 3.53 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra F.....	129
Figura 3.54 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra G.....	130
Figura 3.55 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra H.....	131
Figura 3.56 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra I.....	132
Figura 3.57 – Histogramas e dados da análise topográfica da superfície da amostra J.....	133

Figura 3.58 – Curva de carga-descarga exemplificativa.....	135
Figura 3.59 – Dureza e módulo de Young em função do teor de zircônio.....	135
Figura 3.60 – Formação de precipitados de Ca e P de amostras cp Ti SLA.....	139
Figura 3.61 – Formação de precipitados de Ca e P de amostras TiZr.....	140
Figura 3.62 – Formação de precipitados de Ca e P de amostras Ti25Zr R545.....	141
Figura 3.63 – Formação de precipitados de Ca e P de amostras Ti20Zr R546.....	142
Figura 3.64 – Formação de precipitados de Ca e P de amostras Ti15Zr R547.....	143
Figura 3.65 – TiZr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	144
Figura 3.66 – R545 Ti25Zr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	145
Figura 3.67 – cp Ti SLA 3 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	146
Figura 3.68 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre superfície maciça TiZr.....	147
Figura 3.69 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre filme fino R550.....	147
Figura 3.70 – Fotomicrografia da cultura de células MG63 sobre superfície Ti.....	147
Figura 3.71 – R546 Ti20Zr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	185
Figura 3.72 – R547 Ti15Zr 3 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	186
Figura 3.73 – cp Ti SLA 7 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	187
Figura 3.74 – TiZr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	188
Figura 3.75 – R545 Ti25Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	189
Figura 3.76 – R546 Ti20Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	190
Figura 3.77 – R547 Ti15Zr 7 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	191
Figura 3.78 – cp Ti SLA 28 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	192
Figura 3.79 – TiZr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	193
Figura 3.80 – R545 Ti25Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	194
Figura 3.81 – R546 Ti20Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	195
Figura 3.82 – R547 Ti15Zr 28 dias - espectro resultante da análise por EDS.....	196

Listagem de Gráficos

Gráfico 3.1 – Teor de zircônio (%at.) nos filmes TiZr em função do número de pastilhas.....	88
Gráfico 3.2 – Variação da rugosidade após deposição por pulverização catódica de filmes finos Ti15Zr.....	101
Gráfico 3.3 – Variação da rugosidade antes e após deposição.....	102
Gráfico 3.4 – Variação do aumento da superfície (Sdr) após deposição.....	102
Gráfico 3.5 – Variação do aumento da superfície antes e após deposição de filmes finos.....	102
Gráfico 3.6 – Evolução da formação de precipitados de Ca aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank.....	138
Gráfico 3.7 – Evolução da formação de precipitados de P aos 3, 7 e 28 dias após imersão em solução de Hank.....	138
Gráfico 3.8 – Resultados do ensaio da resazurina para viabilidade/proliferação de células osteoblásticas MG-63.....	148

Listagem de Tabelas

Tabela 1.1 – Classificação das reações tecidulares aos materiais.....	15
Tabela 1.2 – Classificação dos Materiais para Implantes Dentários.....	16
Tabela 1.3 – Aplicações dos metais como biomaterial.....	16
Tabela 1.4 – Propriedades do titânio.....	17
Tabela 1.5 – Composição química do cp titânio (cp Ti) (wt%).....	17
Tabela 1.6 – Propriedades mecânicas de biomateriais metálicos.....	19
Tabela 1.7 – Propriedades do titânio e zircônio.....	21
Tabela 1.8 – Propriedades mecânicas do TiZr.....	23
Tabela 1.9 – Propriedades mecânicas de cerâmicas usadas para aplicações biomédicas.....	26
Tabela 1.10 – Cerâmicas usadas em aplicações biomédicas.....	27
Tabela 1.11 – Classificação das superfícies segundo a rugosidade Sa.....	32
Tabela 2.1 – Características e propriedades do microscópio ótico de focagem infinita.....	61
Tabela 3.1 – Condições de Limpeza dos substratos e Condições Gerais de Deposição.....	78
Tabela 3.2 – Condições de Limpeza dos substratos e Condições Gerais de Deposição.....	83
Tabela 3.3 – Teor de zircônio (wt%/at.) nos filmes finos TiZr.....	88
Tabela 3.4 – Composição química de filmes finos Ti-Zr (% pd.).....	89
Tabela 3.5 – Composição química do filme fino Ti15Zr (Vs = -70V) avaliada por EDS (% wt.).....	93
Tabela 3.6 – Condições de deposição e características dos filmes finos depositados por pulverização catódica.....	99
Tabela 3.7 – Rugosidade de diferentes substratos.....	100
Tabela 3.8 – Rugosidade (Sa) e aumento da superfície (Sdr) de discos cp Ti SLA antes e após deposição.....	103
Tabela 3.9 – Síntese de todos os dados topográficos da superfície antes e após o revestimento.....	134
Tabela 3.10 – Dureza e módulo de Young de filmes Ti-(Zr) depositados sobre aço.....	135
Tabela 3.11 – Valores de Potencial Zeta e de pH médio das superfícies revestidas com Ti e Ti-Zr.....	136
Tabela 3.12 – Resultados da análise por EDS da formação de precipitados de Ca e P.....	137
Tabela 3.13 – Resultados do ensaio da resazurina para viabilidade/proliferação de células osteoblásticas MG-63.....	148

Capítulo VIII. Índice

Agradecimentos.....	VII
Sumário	XI
Capítulo I. Introdução	I
I.1. Osteointegração	7
I.1.1. Hemóstase	8
I.1.2. Inflamação	9
I.1.3. Proliferação.....	10
I.1.4. Remodelação.....	12
I.2. Biomaterial	15
I.2.1. Metais.....	16
I.2.1.1. Titânio	17
I.2.1.2. Ligas de Ti.....	19
I.2.1.2.a. Ligas Ti-6Al-4V	19
I.2.1.2.b. Ligas Titânio-Zircônio (TiZr).....	21
I.2.1.2.c. Outras ligas de Ti e considerações biomecânicas.....	25
I.2.2. Cerâmicas	26
I.3. Topografia	31
I.4. Molhabilidade.....	37
I.5. Tratamentos de superfície.....	39
I.5.1. Tratamentos para modificação da micro rugosidade.....	40
I.5.1.1. Jateamento	40
I.5.1.2. Ataque ácido.....	40
I.5.1.3. Jateamento e ataque ácido	41
I.5.1.4. Anodização ou Oxidação anódica	43
I.5.1.5. Projeção de plasma – “Plasma-Spraying”	44

1.5.2.Tratamentos para modificação da nano rugosidade.....	45
1.5.2.1. Compactação de nano partículas em materiais nanofásicos	46
1.5.2.2. Camadas de auto-arranjo – SAM.....	47
1.5.2.3.Tratamento químico com ácidos ou bases fortes.....	47
1.5.2.4. Deposição e revestimento	48
1.5.2.5. Litografia.....	49
1.6. Enquadramento da Problemática	51
Capítulo II. Materiais e técnicas experimentais	53
2.1. Materiais e Técnicas Experimentais	55
2.1.1. Materiais.....	55
2.1.1.1. Substratos	55
2.1.1.2. Alvos.....	55
2.1.2.Técnica de Deposição	56
2.1.2.1. Equipamento	56
2.1.2.2. O processo de Pulverização Catódica.....	57
2.1.3.Técnicas de Caracterização	59
2.1.3.1. Caracterização topográfica: Rugosimetria	59
2.1.3.1.a. Perfilometria.....	59
2.1.3.1.b.Topografia.....	59
2.1.3.2. Caracterização da composição: Microsonda eletrónica – EPMA	61
2.1.3.3. Caracterização morfológica: Microscopia eletrónica de varrimento – SEM.....	62
2.1.3.4. Caracterização estrutural: Difração de raios X – XRD (X ray diffraction)	63
2.1.3.5. Caracterização energética da superfície: Potencial Zeta (ζ).....	64
2.1.3.6. Caracterização da bioatividade - Formação de precipitados em solução de Hank	66
2.1.3.7. Caracterização da dureza superficial: Nanoindentação	66
2.1.4. Caracterização do potencial biológico: culturas celulares	68
2.1.4.1. As células	68
2.1.4.2. Caracterização da adesão celular	68
2.1.4.3. Caracterização da proliferação celular.....	68
2.1.4.4. Caracterização da atividade osteoblástica.....	68
Capítulo III. Estudo Experimental	71
3.1. Introdução e Objetivos	73
3.1.1. Objetivos.....	73
3.2. Materiais e Métodos	75
3.2.1. Preparação dos substratos.....	75
3.2.1.1. Substratos	75
3.2.1.2. Alvos	77
3.2.2. Procedimento de deposição por pulverização catódica.....	77
3.2.3. Caracterização da superfície	78

3.2.4. Avaliação da bioatividade <i>in vitro</i>	79
3.2.5. Cultura Celular	79
3.2.6. Caracterização da adesão celular	80
3.2.7. Caracterização da proliferação celular	80
3.2.8. Caracterização da atividade osteoblástica	80
3.2.9. Procedimentos analíticos e estatísticos	81
3.3. Resultados	83
3.3.1. Composição Química, Morfologia e Estrutura	83
3.3.1.1. Filmes de titânio	83
3.3.1.2. Filmes Ti-Zr	87
3.3.1.3. Variação dos parâmetros de deposição	93
3.3.1.4. Topografia	100
3.3.2. Caracterização Mecânica	135
3.3.3. Caracterização do Potencial Biológico <i>in vitro</i>	136
3.3.3.1. Potencial Zeta	136
3.3.3.2. Potencial biológico em solução de Hank	136
3.4. Culturas celulares	147
3.4. Discussão	149
3.5. Conclusões	157
Capítulo IV. Resumo	159
Capítulo V. Abstract	163
Capítulo VI. Bibliografia	167
Capítulo VII. Anexos	183
Listagem de Abreviaturas	197
Listagem de Figuras	200
Listagem de Gráficos	202
Listagem de Tabelas	203
Capítulo VIII. Índice	205

