ANÁLISE MICROESTRUTURAL E MECÂNICA DE REVESTIMENTO BIOMIMÉTICO EM IMPLANTES DE TITÂNIO PÓS INSTALAÇÃO

Marcelo Ferreira da Silva, 1, mdsodonto@yahoo.com.br, ORCID 0000-0002-3053-3970
Andreza Menezes Lima, 5, andreza.menezes@int.gov.br, ORCID 0000-0002-5086-6051
Flavio Rodrigues Ferreira Alves,3, flavio.alves@unigranrio.edu.br, ORCID 0000-0002-9922-8202
Fabiano Luiz Heggendorn, 2, fabiano.heggdorn@unigranrio.edu.br, ORCID 0000-0002-2687-0165
Alexandre Antunes Ribeiro, 4, alexandre.antunes@int.gov.br, ORCID 0000-0002-5299-4241

RESUMO

Diferentes tipos e metodologias de tratamento superficial são empregados para alterar a topografia e a composição química de implantes dentários de titânio com a finalidade de melhorar as características de biocompatibilidade. Entretanto, durante a instalação ocorrem forças principalmente de compressão e cisalhamento, que podem gerar danos à superfície, levando à liberação de substâncias químicas e/ou partículas metálicas citotóxicas que causam periimplantite ou a perda do implante. **Objetivo**. O propósito deste estudo foi analisar implantes dentais com revestimento de fosfato de cálcio depositado por método biomimético (Bio-CaP), antes e após a instalação em estruturas ósseas *in vitro* e *ex-vivos,* investigando a integridade do revestimento após a inserção no leito ósseo fresado. **Materiais e métodos**. Foram analisados implantes dentários de titânio com 3 diferentes macrogeometrias e com revestimento Bio-CaP, totalizando 03 amostras. Os implantes com revestimento Bio-CaP se referem às amostras experimentais revestidas com fosfato de cálcio (CaP) pelo método biomimético por 21 dias. Os implantes com revestimento Bio-CaP foram instalados em corpos de prova ósseos (CPBone) modelo *ex vivo* bovino. Todos os implantes foram caracterizados superficialmente através de difração de raios X (DRX) e espectrometria por energia dispersiva (EDS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e FIB. **Resultados:** Foram caracterizados microestruturalmente as diferentes superfícies com e sem revestimento de Bio-CaP. Em adição, foi feito uma mensuração dos implantes com revestimento de Bio-CaP após a instalação em osso bovino, para verificar o comportamento mecânico desta superfície em contato com o osso. Conclusão: O desempenho mecânico do revestimento biomimético mostrou-se muito satisfatório após instalação em osso de alta densidade.

Palavras-chave: titânio; fosfato de cálcio; revestimento; método biomimético; implante dental; biomateriais.

1 Introdução

O implante dentário é atualmente uma das melhores alternativas para reposição dos dentes ausentes e com prognóstico bastante favorável. As constantes pesquisas e mudança na superfície dos implantes dentários contribuem para elevadas taxas de sucesso nos tratamentos reabilitadores mundialmente.

Alterações na macro e microestrutura dos implantes foram feitas com diversas finalidades como: acelerar a osseointegração; uso em áreas com baixa densidade e implantações imediatas. Atualmente existem variadas superfícies de implantes para serem aplicadas em diversas situações e uma das mais promissoras é o tratamento de superfície biomimético.

As alterações topográficas na superfície dos implantes dentais, com diferentes tratamentos, objetivam acelerar a formação óssea, influenciando diretamente o comportamento das células em termos de adesão, proliferação e diferenciação. Neste contexto, diferentes modificações macroestruturais e microestruturais no *design* dos implantes dentários são disponibilizadas no mercado.

Este trabalho visou analisar implantes comerciais da marca S.I.N., (São Paulo, Brasil) sem tratamento de superfície submetidos ao tratamento de superfície biomimética para deposição de revestimento de fosfato de cálcio.

2 Materiais e Métodos

O Projeto de pesquisa foi submetido ao comitê de ética e pesquisa em animais da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), sob o número CEUA 059/2023.

Foram utilizados 10 corpos de provas (CPs) ósseos obtidos de 05 costelas bovinas comercializados em rede de supermercados varejista (Mercado DELLI LTDA, SITUADO EM AVENIDA PRESIDENTE VARGAS, 189, DUQUE DE CAXIAS, RJ – CNPJ 34.128.741/0001-74).

As costelas bovinas foram seccionadas no plano transversal com discos de corte diamantado (Cortag; Mogi Mirim/SP – BRASIL). Em seguida, os CPs foram seccionados longitudinalmente com ± 2 mm de profundidade, originando uma canaleta para orientar a fratura no CP, para o desprendimento dos implantes, após a sua inserção.

2.1 **Implantes e Superfícies Avaliadas**

Para este estudo foram utilizados implantes usinados (sem tratamento de superfície) de 3,5 mm x 10 mm com macrogeometrias do tipo Unitite, Strong e Epikut de conexão protética do tipo Cone Morse (CM) da marca comercial S.I.N (São Paulo, SP, Brasil). Inicialmente foram avaliadas as macrogeometrias e os preparos de superfície dos seguintes implantes dentários.

Implantes sem tratamento de superfície (ISTT): foram utilizados em um total 27 implantes, onde em um primeiro momento foram utilizados 3 implantes (1 de cada grupo) para análise quanto a sua microestrutura superficial, para análise comparativa. O restante, ou seja, 24 implantes, das linhas de produção Strong (n: 8), Epikut (n: 8) e Unitite (n: 8), foram submetidos ao tratamento químico e térmico e novamente foram retirados 3 implantes, 1 de cada grupo, para caracterização. Os demais (n: 21) foram utilizados para deposição do revestimento de fosfato de cálcio por método biomimético (Bio-CaP).

O implante Unitite comercial é disponibilizado em três diâmetros, *compact*, *slim* e *prime*, nesta pesquisa, todos os implantes utilizados foram prime, a fim de facilitar a nomenclatura, no grupo ISTT o descreveremos apenas Unitite, e não Unitite prime.

Os grupos ISTT, dos implantes sem tratamento de superfície, removidos das linhas de produção Strong, Epikut e Unitite, foram submetidos à modificação de superfície, através do seguinte protocolo descrito abaixo.

2.2 **Tratamento Químico e Térmico de Superfície (TSQT)**

Os grupos ISTT, foram submetidos a um tratamento de superfície químico e térmico (TSQT), para então seguirem para o processo de revestimento biomimético em solução saturada com íons de fosfato e cálcio por 21 dias (RIBEIRO *et al*., 2013).

Inicialmente, os implantes foram limpos em ultrassom com detergente neutro (Extran) e água destilada, por 10 min, posteriormente foram lavados com água destilada e acetona e depois seguiram para acondicionamento em estufa a 60ºC por 60 minutos. Na figura abaixo podemos visualizar a etapa de limpeza das amostras antes do tratamento químico e térmico (Figura 1).

Figura 1 - Limpeza das amostras. Seleção dos implantes (a) seguido pela limpeza em ultrassom (B e C) e posteriormente secos em estufa (D).

Em seguida, os implantes foram submetidos ao TSQT realizado com NaOH 1M, em autoclave (reator) acondicionada em estufa à 130ºC por 24h, visando à ativação da superfície do titânio e assim promovendo a formação do composto de titanato de sódio. Em seguida, a solução com NaOH foi drenada, os implantes foram removidos da autoclave e acondicionados em placa de vidro para secagem em estufa a 200ºC por 60 minutos (RIBEIRO *et al*., 2013).

Na figura abaixo podemos visualizar os implantes após serem submetidos ao TQT (Figura 2).

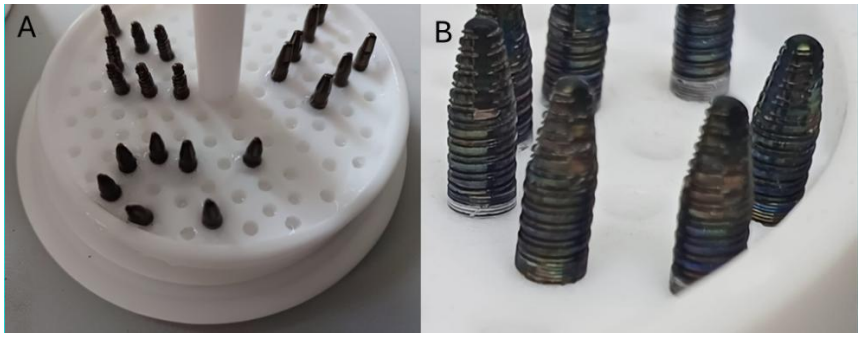


Figura 2 – Implantes após o tratamento químico e térmico. Implantes no porta amostras da autoclave (A) e fotomicrografia dos implantes em maior aumento (B), percebe-se a mudança visível da superfície.

2.3 **Preparo da Solução Simplificada (SS) para Deposição do Revestimento de Fosfato de Cálcio**

Nesta primeira etapa foi preparada a Solução Simplificada (SS) com base em trabalho de RIBEIRO *et al*., (2013), obedecendo a seguinte composição (g./l.) diluídas em água milliQ: $CaCl_2$ / $2H_2O$ (0.37 g/l) e Na_2HPO_4 / $2H_2O$ (0.36 g/l).

A solução foi preparada sob agitação constante a 37ºC por 10 minutos, até a completa homogeneização. O pH foi ajustado para pH 7 com o auxílio de um pHmetro sendo adicionado $Ca(OH)_2$ quando acidificado ou HCl 1M quando básico. Ao concluir a mistura da SS, esta foi transferida para um balão volumétrico e completado com água destilada até completar um litro. Esta SS foi armazenada em um frasco plástico (polietileno) para evitar precipitação do material.

A figura 3 demonstra cada etapa da preparação da SS utilizada para depositar o revestimento de fosfato de cálcio pelo método biomimético sobre a superfície dos implantes submetidos ao TSQT previamente.

Figura 3 - Preparo da solução simplificada. Solução de $CaCl_2$•$2H_2O$ (A); solução de Na_2HPO_4-$2H_2O$ (B), mistura dos reagentes mantida sob agitação magnética sob controle de temperatura (C) e solução final (D).

2.4 **Deposição do revestimento de fosfato de cálcio pelo método biomimético**

Em sequência, os implantes foram imersos na SS dentro da autoclave. A fim de garantir a não saturação da solução, as soluções SS foram trocadas a cada 2 dias, até completar o 21º dia em estufa a 37°C.

Terminado o período de deposição de 21 dias do filme biomimético, os implantes com revestimento de fosfato de cálcio (Bio-CaP) foram lavados com água destilada para eliminação dos reagentes precursores que não reagiram, secos em temperatura ambiente e colocados em dessecador (fig. 4) com controle de umidade e temperatura, até o momento da utilização.

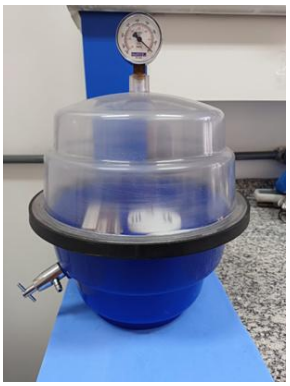


Figura 4 - Dessecador com os implantes dentais revestidos com fosfato de cálcio depositado pelo método biomimético (Bio-CaP).

2.5 **AVALIAÇÃO PRÉVIA DE SUPERFÍCIES**

2.5.1 **Difração de raios X com incidência rasante (GIXRD)**

Por se tratar de uma fina camada superficial, foi empregada uma técnica em que os raios incidentes são de baixo ângulo (rasante), permitindo uma melhor caracterização das amostras que tiveram suas superfícies modificadas.

A varredura das amostras se deu no intervalo 2θ de 20° a 90°, sendo empregado um passo de 0,1º por segundo e tempo de leitura de 4 segundos, o ângulo de incidência empregado foi de 3º. Para a identificação das fases cristalinas presentes nos difratogramas de DRX, foram utilizadas as fichas de padrões contidas no ICDD – *International Center for Diffraction Data* (2000 e 2004). Foram analisados 9 implantes sendo: 3 ISTT, 3 TSQT e 3 Bio-CaP contemplando as diferentes macrogeometrias.

2.5.2 **Microanálise elementar**

Posteriormente os mesmos espécimens seguiram para a etapa de microanálise química elementar em microscópio eletrônico de varredura, possibilitando a determinação da composição química elementar qualitativa e semiquantitativa dos espécimens e descritiva, através das imagens obtidas no MEV-FEG. Nesta etapa, foram analisados 2 campos de interesse em 2 regiões no terço apical dos implantes, no topo de rosca (TR) e na Câmara de Compensação (CC). Para esta etapa foi utilizado um implante de cada grupo.

Os implantes Bio-CaP seguiram para a análise no MEV-FIB utilizando a Técnica de Feixe de Íons Focalizado para realização de corte em trincheira, com o feixe de íons (Ga+), a uma profundidade de 5 µm, na superfície da CC e da TR, variando a inclinação da superfície das amostras entre 52º e 64º em relação ao eixo do feixe de elétrons. Em cada região de interesse, CC e TR, foram realizadas 5 medições da espessura do revestimento.

Como preparo prévio, foi realizada a metalização das amostras com um filme de platina (Pt) de 15 µm de espessura com um aparelho EMITECH K550X, a fim de tornar a superfície condutora, delimitar a região a ser avaliada e proteger a superfície durante o processo de preparo (desgaste), com o objetivo de preservar a camada do revestimento a ser avaliada.

2.6 **INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES DENTAIS EM SUPERFÍCIES ÓSSEAS**

2.6.1 **Instalação de implantes com revestimento de Bio-CaP**

Nesta etapa, todos os implantes dentais com revestimento de Bio-CaP foram instalados nos CPs ósseos (CPsBone) (Tab. 1). As perfurações nos CPsBone foram realizadas a uma velocidade rotacional entre 800 a 1.200 RPM com torque controlado de 25 a 60N e motor cirúrgico, que fornece o torque em que o implante foi inserido. As sequências de fresagens foram realizadas como preconizada pela empresa, sob irrigação constante com água destilada. Um único operador, especialista em implantodontia, realizou a instalação dos implantes nos CPs, a nível infra ósseo entre 1,5 e 2,5 mm. Nos espécimens onde o torque excedeu 60 N, as instalações foram complementadas manualmente com o auxílio de um torquímetro.

Tabela 1 – Grupos utilizados no ensaio de instalação dos implantes dentais com revestimento de fosfato de cálcio depositado por método biomimético (Bio-CaP).

Grupos amostrais	Número de implantes dentais utilizados para instalação	Número de CPsBone utilizados
Bio-CaP/Strong.	n = 3	n = 3
Bio-CaP/Epikut.	n = 3	n = 3
Bio-CaP/Unitite.	n = 3	n = 3

Após as instalações, todos os CPsBones com os implantes instalados foram acondicionados a -18 ºC.

2.6.2 **Remoção dos implantes com revestimento de Bio-CaP dos corpos de prova ósseos**

Em sequência, os implantes com revestimento de Bio-CaP foram separados dos CPsBone, a partir da linha guia de fratura no osso, realizada previamente para facilitar a sua remoção. Os implantes foram rinsados com água destilada, secos e enviados para o FIB.

Na figura 5 abaixo, podemos avaliar as imagens das alturas e espessuras dos CPs (Fig. 5 A e A1), dos implantes sendo instalados no CP (Fig. 5 B) e da separação dos implantes dos CPs (Fig. 5 C e C1). Posteriormente à remoção, os implantes com revestimento de Bio-CaP foram rinsados com água destilada para a remoção do excesso de matéria orgânica (Fig. 5 D) e, em seguida, secos em estufa a 60°C por 60 minutos.

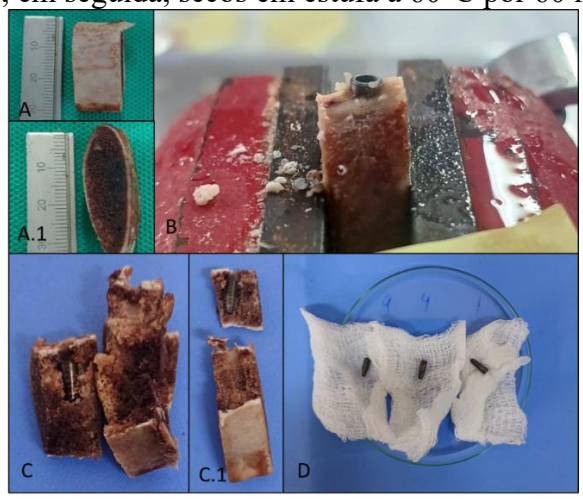


Figura 5 - Sequência de instalação dos implantes com revestimento de Bio-CaP em osso bovino. CPsBone face cortical (A) e medular (A1). Momento de instalação dos implantes Bio-CaP (B), da secção óssea (C e C.1) e após a remoção dos implantes (D).

3 Resultados

3.1 **Micro topografia**

3.1.1 **SUPERFÍCIES BIOMIMÉTICAS**

Inicialmente a topografia das superfícies dos implantes do grupo controle (ISTT/Epikut, ISTT/Strong e ISTT/Unitite), sem tratamento de superfície químico e térmico e sem revestimento de fosfato de cálcio, cedidos pela empresa S.I.N., foram avaliados por MEV-EDS. As eletromicrografias revelaram a ausência de modificações de superfície, demonstrando ranhuras de usinagem e microcavitações em cada grupo avaliado (Fig. 6). A análise elementar no EDS revelou a presença de Ti (100%) em todos os grupos controle, na região de câmara de compensação e no topo das roscas (Tab. 2), sugerindo que o processo de limpeza em ultrassom utilizado foi eficiente.

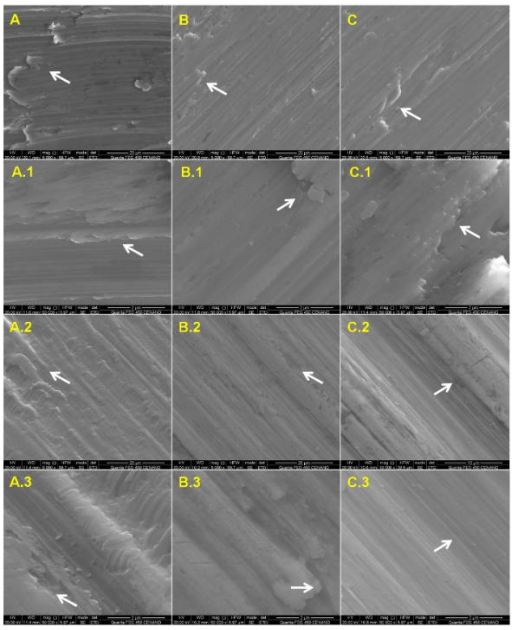
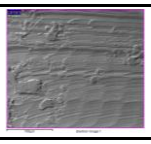
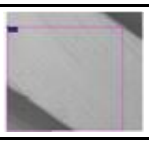
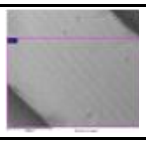
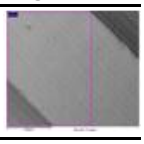


Figura 6 – Implantes sem tratamento químico e térmico e sem revestimento. ISTT/Epikut (A – A.3), ISTT/Strong (B – B.1) e ISTT/Unitite (C - C.1). As setas brancas indicam ranhuras de usinagem na região da câmara de compensação (A, A.1, B, B.1, C e C.1) e na região das roscas (A.2, A.3, B.2, B.3, C.2 e C.3).

Tabela 2 - Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x da superfície dos grupos controle.

Elemento químico %	ISTT/Epikut		ISTT/Unitite		ISTT/Strong	
						

	Câmara de cicatrização	Roscas	Câmara de cicatrização	Roscas	Câmara de cicatrização	Roscas
Ti	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

3.1.2 **Tratamento de superfície químico e térmico (TSQT)**

Inicialmente, para a modificação de superfície dos implantes, foi realizado o método de TSQT, que possibilitou a formação de uma camada de titanato de sódio ($Na_2Ti_3O_7$) na superfície dos grupos TSQT/Epikut, TSQT/Strong e TSQT/Unitite pela ação do reagente NaOH sob temperatura, a qual é caracterizada pelo aspecto de uma microtextura nas imagens A.2, A.3, A.5, A.6 (TSQT/Epikut), B.2, B.3, B.5, B.6 (TSQT/Strong), C.2, C.3, C.5 e C.6 (TSQT/Unitite) da Figura 7.

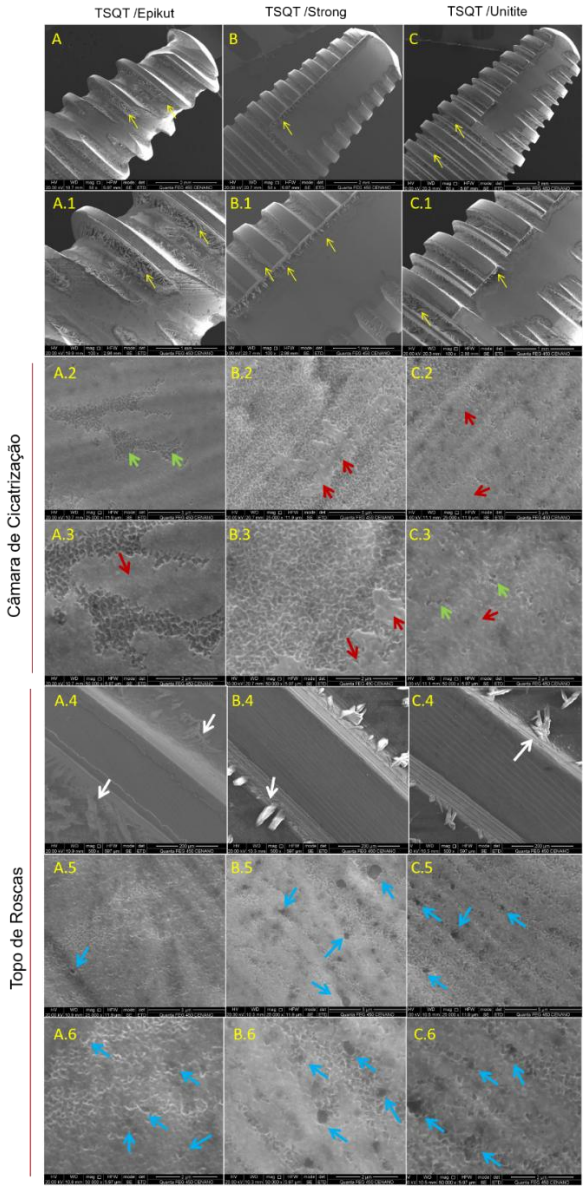


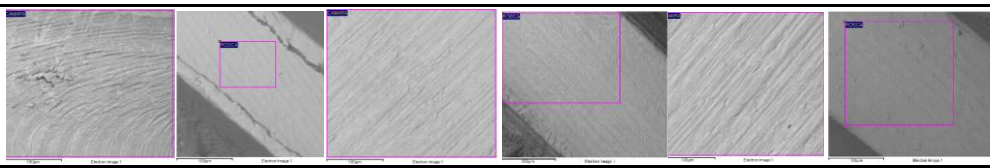
Figura 7 – Implantes TSQT/Epikut, TSQT/Strong e TSQT/Unitite. Eletromicrografia dos implantes (A, A1, B, B.1, C e C.1), da região de câmara de cicatrização (A.2, A.3, B2, B3, C2 e C3) –e de topo de rosca (A.4 - A.6, B4 – B6 e C4 – C6), respectivamente.

Ao comparar as superfícies entre os grupos, as imagens sugeriram a presença de microestruturas na forma de microagulhas, as quais são características do titanato de sódio (RIBEIRO *et al*., 2013), acumuladas nas regiões de flancos das roscas (setas amarelas) nos grupos TSQT/Epikut (Fig.10 A e A.1), TSQT/Strong (Fig.7 B e B.1) e TSQT/Unitite (Fig.7 C e C.1).

Ao analisar a região de CC foi possível verificar uma maior área da camada de titanato de sódio com microtextura (Fig.7 B2 e B3) sobre a superfície do grupo TSQT/Strong. Já nos grupos TSQT/Epikut e TSQT/Unitite, foi possível verificar áreas com camadas densas sem microporosidade (Fig.7 A.2, A.3, C.2 e C.3, setas vermelhas), recobrindo a maior parte das superfícies, sugerindo estar sobrepostas à microtextura com microporos isolados expostos (Fig. 10 C.3, setas verdes). Já a análise da região de TR demonstrou a presença de estruturas cristalinas nas regiões de flange dos três implantes (Fig.7 A.4, B.4 e C.4, setas brancas), enquanto na região de TR foi verificada a presença de uma cobertura microporosa nos três grupos (Fig.7 A.5, A.6, B.5, B.6, C.5 e C.6, setas azuis).

Os resultados da microanálise elementar por MEV-EDS da superfície dos grupos TSQT/Epikut, TSQT/Strong e TSQT/Unitite são apresentados na Tabela 3. Os elementos O, Na e Ti possibilitaram indicar a formação bem-sucedida de titanato de sódio (Na_2TiO_3). Por outro lado, a presença do elemento Ca em todas as amostras sugeriu uma contaminação proveniente de fonte desconhecida (armazenamento, manipulação, porta amostra contaminado etc.).

Tabela 3 - Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x da superfície dos grupos expostos ao TSQT.

Regiões de interesse analisadas		Epikut		Strong		Unitite	
		Câmara de compensação	Topo de Roscas	Câmara de compensação	Topo de Roscas	Câmara de compensação	Topo de Roscas
	TSQT						
Elemento químico %		**TSQT**	**TSQT**	**TSQT**	**TSQT**	**TSQT**	**TSQT**
	C	2.59	1.92 / 1.70	1.74	2.48	2.49	2.55
	O	36.41	31.98	34.46	37.48	36.68	39.33
	Na	7.90	5.70	4.94	7.41	5.65	7.62
	Ca	0.24	0.24	0.25	0.26	0.26	0.25
	Ti	52.71	59.77	58.47	52.29	54.91	50.23

3.1.3 **Formação de superfície biomimética de fosfato de cálcio**

O protocolo desenvolvido por RIBEIRO *et al*. (2013), utilizando SS como percursor, foi capaz de formar o revestimento biomimético de fosfato de cálcio (Bio-CaP) nos três grupos de implantes com macrogeometrias distintas. Os implantes, agora com o revestimento Bio-CaP, grupo Bio-CaP/Epikut (Fig.8 A-A3), Bio-CaP/Strong (Fig.8 B-B3) e Bio-CaP/Unitite (Fig.8 C-C3), na região de CC dos implantes, apresentaram formações dispersas de aglomerados do revestimento (Fig.8 A, B e C, setas amarelas), devido ao caráter de precipitação heterogênea do processo biomimético. Já a região de TR apresentou uma distribuição homogênea do filme de fosfato de cálcio exibindo, porém, alguns aglomerados dispersos na superfície (Fig.8 A2, B2 e C2, setas amarelas) e microporosidades de diferentes

tamanhos (Fig.8 A2, A.3, B2, B.3, C.2 e C.3, setas azuis). Em maior aumento foi possível verificar uma microestrutura do tipo laminar (plate-like) característica do fosfato de octacálcio – OCP (IIJIMA *et al.*, 2018) distribuídas uniformemente ao longo de toda a superfície, na CC (Fig.8 A.1, B.1 e C.1) e no TR (Fig.8 A.3, B.3 e C.3 e Fig. 9).

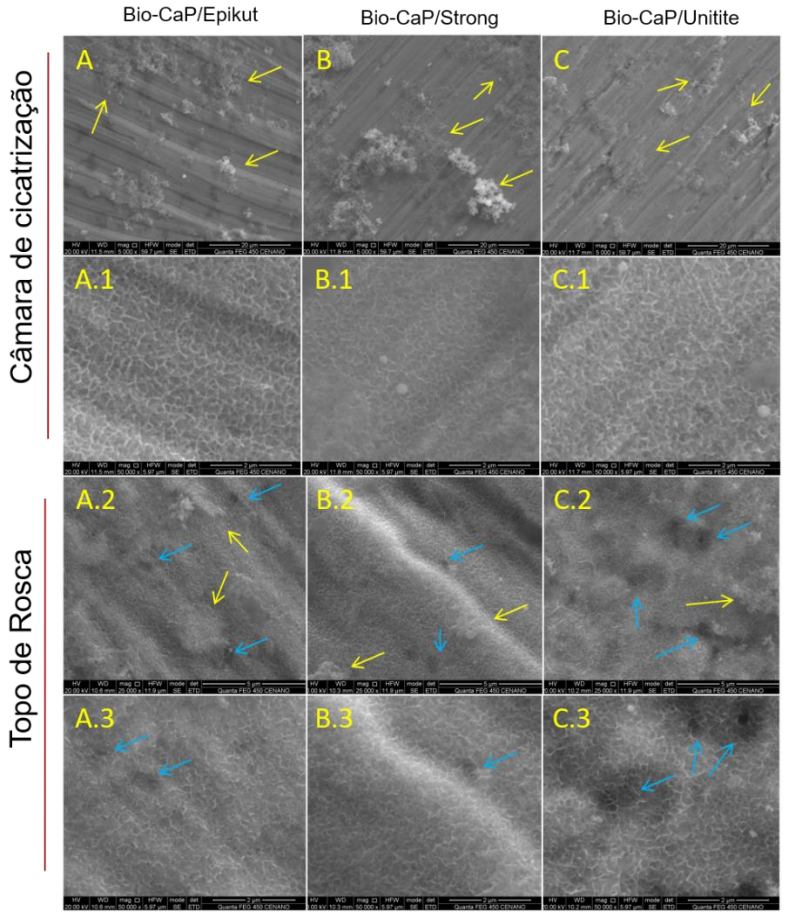


Figura 8 – Imagens de MEV-FEG dos implantes experimentais com revestimento de Bio-CaP. Grupo Bio-CaP/Epikut (A - A.3), Bio-CaP/Strong (B - B–3) e Bio-CaP/Unitite (C - C.3) demonstrando na região de CC (A, A.1, B, B.1, C e C.1) e de TR (A.2, A.3, B.2, B.3, C.2 e C.3) o revestimento biomimético. Visualiza-se a microestrutura laminar (plate-like) característica do fosfato de octacálcio (Fig. 8 A.1, A.3, B.1, B.3, C.1 e C.3 e Fig. 9) distribuídas uniformemente pela superfície da CC e no TR.

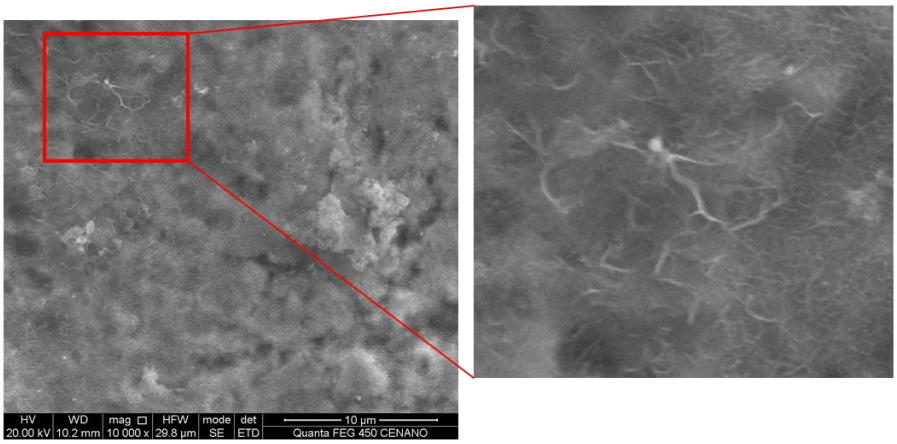
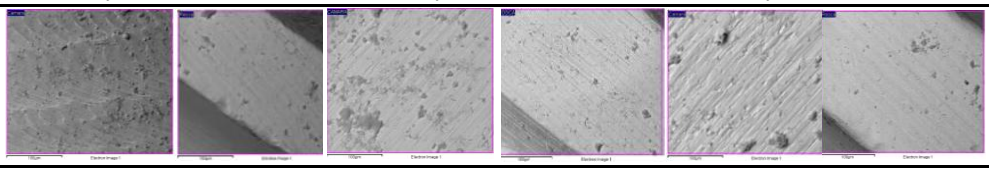


Figura 9 – Destaque da microestrutura do tipo laminar (*plate-like*) característica do fosfato de octacálcio disposta na superfície do revestimento biomimético de Bio-CaP.

A análise no MEV-EDS da microestrutura superficial demonstrou a formação do nanorrevestimento biomimético por meio da presença dos elementos Ca e P nos três grupos (Bio-CaP/Strong, Bio-CaP/Unitite e Bio-CaP/Epikut) (**Tab.4**). Na **Tab. 4** foi identificada uma contaminação com Ca em todas as amostras a partir de fonte desconhecida. Na comparação dos resultados da **Tab. 3** com os da **Tab. 4**, observa-se um aumento neste percentual de Ca nas diferentes macrogeometrias apresentadas de cada grupo (**Fig. 8**), reforçando a evidência da formação do revestimento biomimético de Bio-CaP. Dentre os elementos químicos identificados nos grupos dos implantes TSQT, o Na permaneceu presente Bio-CaP/Strong (**Tab. 4**) em menor concentração, quando comparada à amostra TSQT/Strong (**Tab. 3**), devido ao enxague ineficiente após a etapa de imersão da solução Simplificada.

Tabela 4 - Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x da superfície dos implantes com revestimento biomimético de Bio-CaP.

Regiões de interesse analisadas		Epikut		Strong		Unitite	
		Câmara de cicatrização	Topo de roscas	Câmara de cicatrização	Topo de roscas	Câmara de cicatrização	Topo de roscas
	Bio-CaP						
Elemento químico %		**Bio-CaP**	**Bio-CaP**	**Bio-CaP**	**Bio-CaP**	**Bio-CaP**	**Bio-CaP**
	C	1.95	1.70	2.02	1.51	2.21	1.08
	O	32.12	30.70	28.68	25.53	27.66	24.38
	Na	-	-	0.39	0.59	-	-
	Ca	0.70	0.79	1.39	0.70	0.82	0.47
	Ti	64.93	66.33	66.67	71.30	68.88	73.88
	P	0.29	0.48	0.85	0.37	0.43	0.19

3.2 MICRO / NANO CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE BIOMIMÉTICA DE FOSFATO DE CÁLCIO (Bio-CaP) PREVIA E APÓS INSTAÇÃO ÓSSEA

A microestrutura, espessura e a interface dos revestimentos de Bio-CaP (Fig.9) foram analisadas por MEV-FIB, possibilitando uma comparação entre eles.

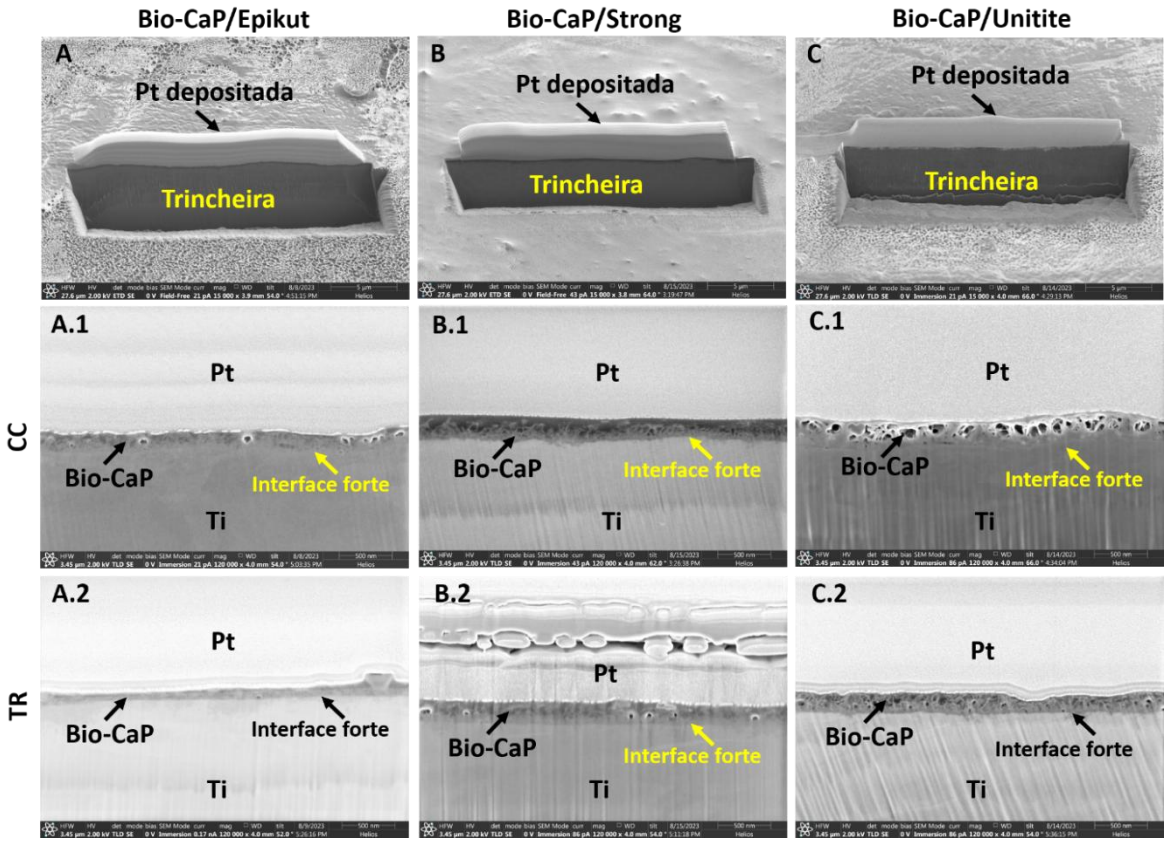


Figura 9 – Microanálise de espessura por MEV-FIB do revestimento biomimético de Bio-CaP nas regiões de CC e vale de TR: Bio-CaP/Epikut (A, A.1 e A.2), Bio-CaP/Strong (B, B.1 e B.2), Bio-CaP/Unitite (C, C.1 e C.2). As imagens demonstram a trincheira realizada, a estrutura microporosa dos revestimentos e a forte interface entre a superfície metálica e o revestimento de Bio-CaP, indicando adesão química satisfatória sem a presença de vazios ou defeitos de deposição.

3.2.1 **Análise estatística de espessura da superfície biomimética de fosfato de cálcio (Bio-CaP)**

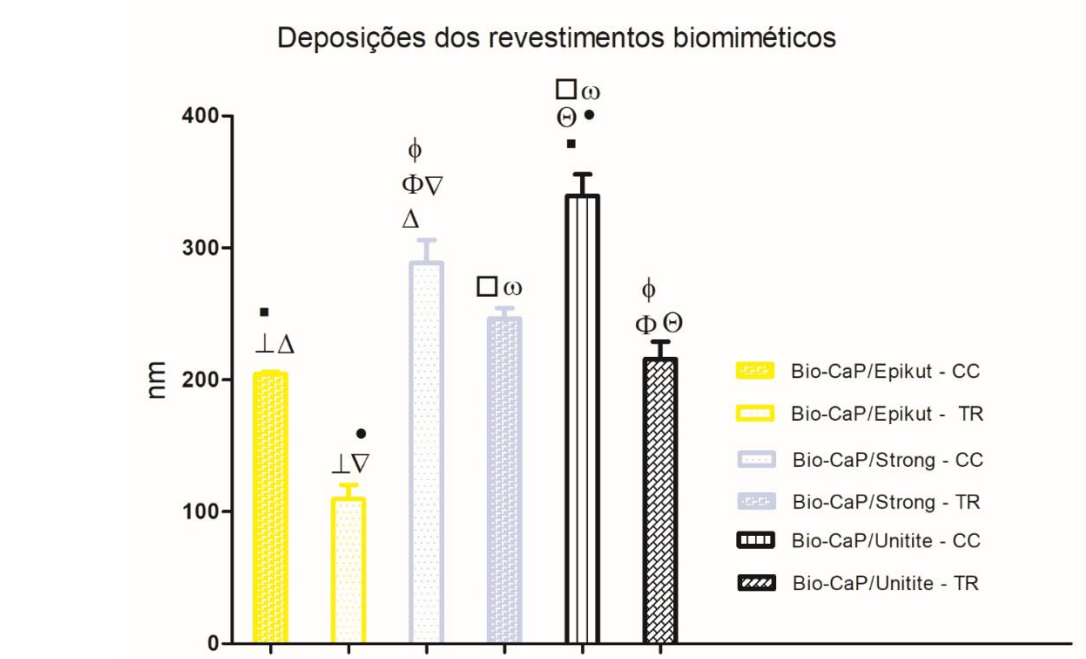
Os dados de espessura, obtidos por análise de imagens de MEV-FIB, dos revestimentos biomiméticos de Bio-CaP (Tab. 5) foram analisados através do software GraphPad Prisma 5.01 (Graph Pad Software Inc), tratados através do método da análise de variância (One-Way - ANOVA) e complementados pelo post-test de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), onde identificou-se diferença estatística ($P < 0,0001$) entre os diferentes grupos indicados no Gráfico 1.

Tabela 5 – Espessura média dos revestimentos de Bio-CaP obtida por análise de imagens de MEV-FIB antes da instalação em osso bovino.

Espessura média (nm)		
Amostra	**Região de interesse**	
	Câmara de cicatrização	Topo de rosca
Bio-CaP/Epikut	204,6 ± 3,2	109,6 ± 24,4
Bio-CaP/Strong	288,7 ± 38,4	246,2 ± 18,0

Bio-CaP/Unitite	339,5 ± 36,2	215,7 ± 29,9

Gráfico 1 – Médias das deposições dos revestimentos biomiméticos de Bio-CaP.



Em relação a região de CC e TR, quando analisados a espessura de deposições dos revestimentos biomiméticos na mesma amostra, o Bio-CaP/Epikut (CC 204,6 ± 3,2 nm e TR 109,6 ± 24,4 nm) e o Bio-CaP/Unitite (CC 339,5 ± 36,2 nm e TR 215,7 ± 29,9 nm) revelaram diferença estatística significante entre estas regiões.

A diferença de espessura de revestimentos de CaP depositados em superfícies de titânio pelo método biomimético era esperada, devido ao seu caráter intrínseco de deposição heterogênea. Essa diferença na espessura pode ser intensificada pelo grau de exposição de cada região do implante à solução SS. Assim, a posição dos implantes na etapa de deposição pode influenciar a espessura dos revestimentos depositados, ou seja, as regiões que ficaram em maior contato a solução SS apresentaram revestimentos com maior espessura e aquelas que ficaram em menor contato apresentaram menor espessura.

As eletromicrografias no MEV-FIB dos implantes após a instalação revelaram a presença do revestimento de Bio-CaP por toda a superfície, mesmo após a instalação em osso nas três macrogeometrias analisadas, demonstrando uma boa resistência à adesão. Porém, a nanoestrutura do Bio-CaP mostrou ter sofrido alterações em sua superfície, apresentando áreas fortemente densas, sugerindo uma compactação devido às forças compressivas, de tensão e corte, geradas durante as implantações.

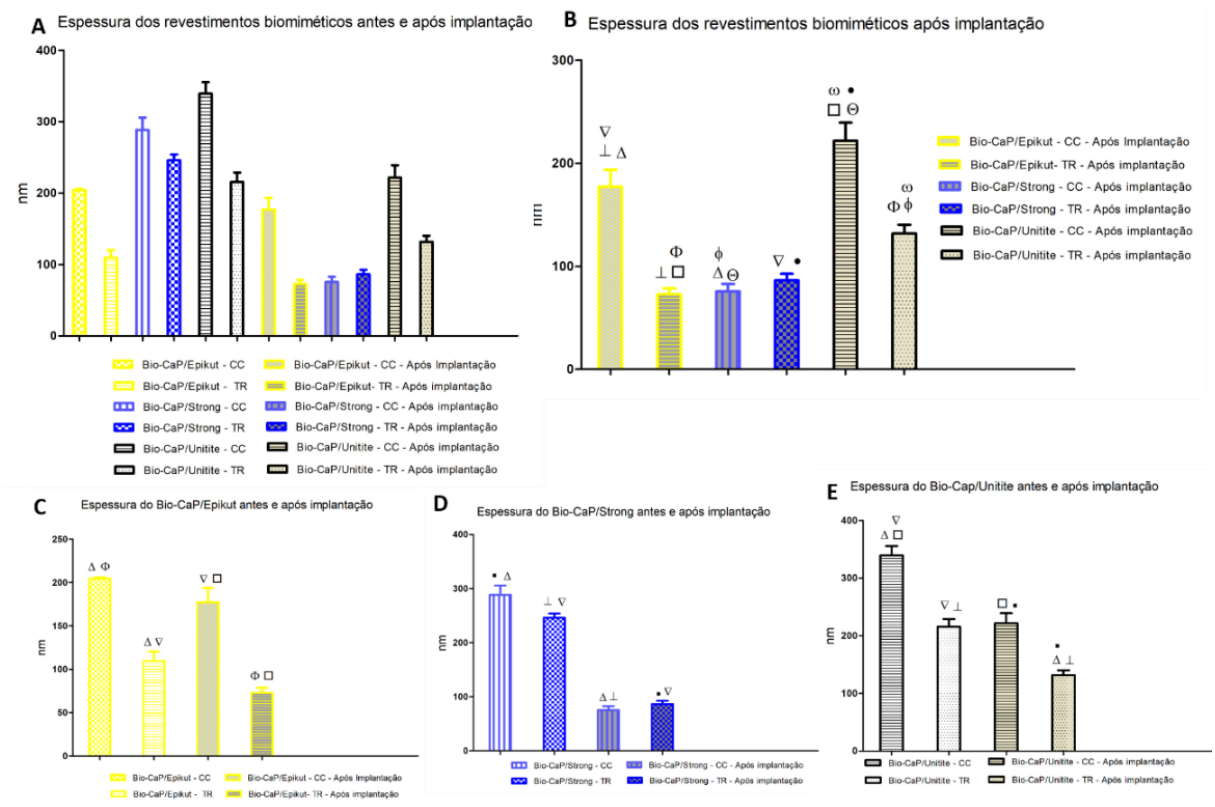
Os dados de espessura, obtidos por análise de imagens de MEV-FIB, dos revestimentos biomiméticos de Bio-CaP após as implantações revelaram uma redução da espessura em todas as macrogeometrias, nas duas regiões analisadas, TR e CC (Tab. 6). A análise estatística através do software GraphPad Prisma 5.01 (Graph Pad Software Inc), pelo método da análise de variância (One-Way - ANOVA) e complementados pelo post-test de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), identificou-se diferença estatística ($P < 0,0001$) entre os diferentes implantes e regiões de análise (TR e C) após a implantação, indicados no Gráfico 2.B. A maior espessura de revestimento após implantação foi a do

implante Bio-CaP/Unitite CC. O mesmo padrão de maior espessura de filme biomimético na CC quando comparada ao TR se manteve nos grupos Bio-CaP/Epikut e Bio-CaP/Unitite após a implantação, com maior espessura de filme no CC. Já no Bio-CaP/Strong após a implantação, a relação de espessura entre CC e TR revelada na análise prévia implantação foi invertida.

Tabela 6 – Espessura média dos revestimentos de Bio-CaP antes e após a implantação obtida por análise de imagens de MEV-FIB.

Espessura média (nm)		
Amostra	**Região de interesse**	
	Câmara de cicatrização	Topo de rosca
Bio-CaP/Epikut - Antes	204,6 ± 3,2	109,6 ± 24,4
Bio-CaP/Strong - Antes	288,7 ± 38,4	246,2 ± 18,0
Bio-CaP/Unitite - Antes	339,5 ± 36,2	215,7 ± 29,9
Bio-CaP/Epikut - após	185,42 ± 37,39	77,84 ± 13,75
Bio-CaP/Strong - após	81,51 ± 17,02	79,88 ± 15,97
Bio-CaP/Unitite - após	220,92 ± 36,2	126,76 ± 20,38

Gráfico 2 – Análise de espessura dos Bio-CaP após implantação. Gráfico dos Bio-CaP antes e após a implantação (A) e análise estatística da espessura dos implantes Bio-CaP após implantação (B). Análise estatística isolado por grupo, Bio-Cap/Epikut (C), Bio-Cap/Strong (D) e Bio-Cap/Unitite (E).



Ao isolar a análise estatística por grupo, o Bio-CaP/Epikut e o Bio-CaP/Unitite apresentaram diferença estítica ($p = 0,0019$ e $p < 0,0001$, respectivamente) na espessura do revestimento quando agrupadas as regiões de CC e de TR antes e após a implantação. Porém, ao comparar somente a mesma região de interesse no Bio-CaP/Epikut, verificou-se a ausência de diferença estatística, entre o CC antes e após a implantação e o TR antes e após a implantação. Contrariamente, a análise do Bio-CaP/Strong e do Bio-CaP/Unitite revelaram diferenças estatísticas ($p = 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparado o CC antes e após a implantação e entre o TR antes e após a instalação, indicando uma perda e/ou compactação significativa do revestimento nas mesmas regiões de interesse, nos diferentes momentos.

3.3 **Difração de raios-X com incidência rasante (GIXRD)**

3.3.1 **Difratogramas dos implantes dentários usinados**

Os resultados dos implantes Epikut, Unitite e Epikut são parecidos e descreveremos apenas os implantes Epikut. Podemos observar abaixo nas figuras 10 a prevalência de titânio (Ti) e óxidos de titânio nos implantes usinados antes do tratamento químico e térmico e da deposição do revestimento de Bio-CaP, no Implante Epikut (Fig. 10).

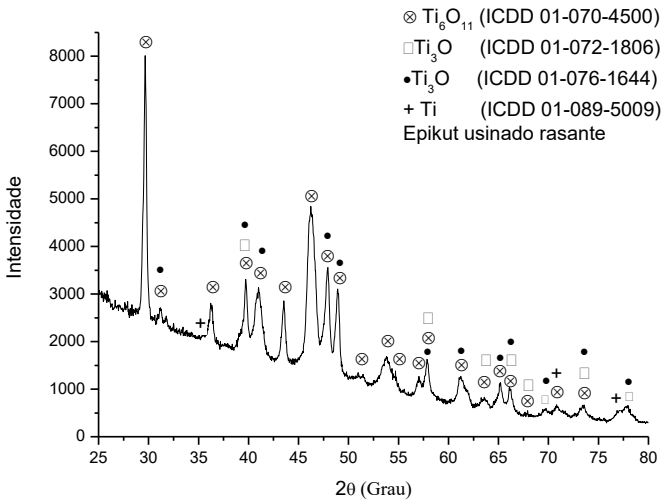


Figura 10. DRX do implante ISTT/Strong

3.3.2 **Difratogramas dos implantes dentários com tratamento químico e térmico (TSQT).**

Após o tratamento químico e térmico podemos observar além do Ti e óxidos de titânio, o surgimento da fase cristalina de titanato de sódio ($Na_2Ti_3O_7$) nos implantes TSQT/Epikut (Fig. 11).

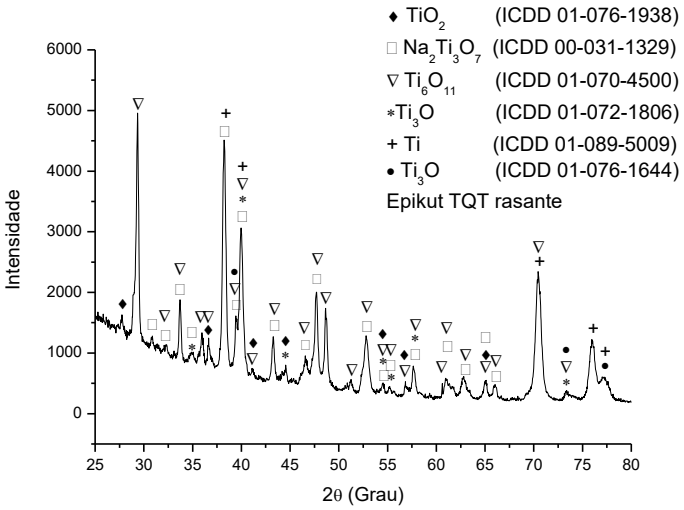


Figura 11. DRX do implante TSQT/Epikut.

3.3.3 **Difratograma dos implantes dentários com revestimento Bio-CaP**

Podemos observar no difratogramas abaixo (figuras 12) o surgimento das fases cristalinas correspondes à hidroxiapatita (HA) e o beta- fosfato tricálcico (β-TCP), além dos compostos citados anteriormente, corroborando com os resultados de EDS, onde se observa a presença dos elementos cálcio e fósforo apenas nos implantes com revestimento de Bio-CaP. Os picos de HA e β-TCP aparecem nos difratogramas com baixa intensidade possivelmente devido aos seguintes fatores: i) baixa cristalinidade; ii) pequena quantidade na superfície que é caracterizada pela fina camada depositada, alta intensidade dos picos de Ti e seus óxidos, que acabam sobrepondo aos picos dos fosfatos de cálcio.

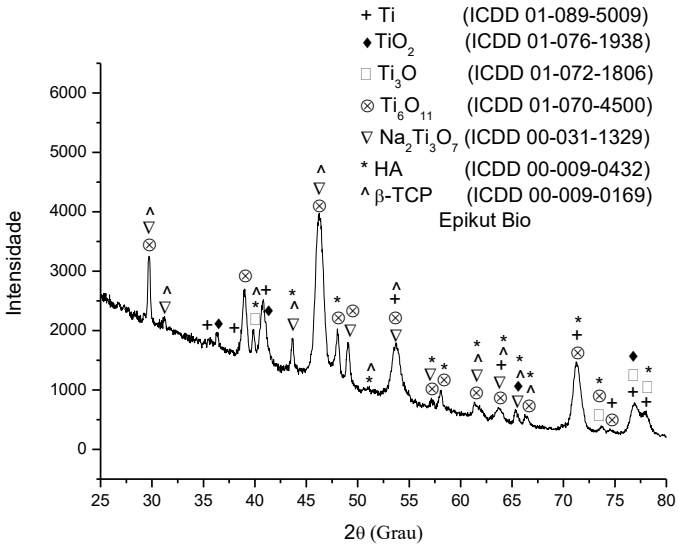


Figura 12. DRX do implante Bio-CaP/Epikut.

4 Análise e Discussão

Titanato de sódio/EDS

Em nossos achados todas as superfícies das amostras que foram submetidas ao tratamento químico e térmico verificamos a formação de cristais semelhantes a agulhas de titanato de sódio. Esta microestrutura é parecida aos titanatos de sódio observados por Ribeiro *et al*., 2013; e os cultivados em *scaffolds* 3D de Ti e NiTi por WU *et al*., 2008. O TSQT também promoveu o aumento de rugosidade em algumas amostras.

DRX (GIXRD)

A AH tem uma estrutura cristalina hexagonal, os maiores picos de HA nos implantes Bio-CaP foi 31,774 ficha 00-009-0432 e 31,027 na ficha 00-009 0169, os mesmos encontrados por BALTATU *et al*., 2021 e KRELLER *et al*., 2021.

Em todas as nossas análises de difração de Raio X observamos os três principais picos de titânio assim como APARICIO *et al*., 2007.

Espessura do Revestimento de HA

Em nosso estudo utilizamos uma solução simplificada por 21 dias do fluido corporal simulado descrito por KOKUBO (1998) e obtivemos uma espessura do revestimento de Hidroxiapatita na região de topo de rosca e câmara de compensação e conseguimos as maiores medias de 339,5 nm na CC do implante Unitite e 246,2 nm no TR do implante Strong, já BALTATU *et al*, 2021, utilizaram a SBF que possui uma quantidade maior de reagentes e obtiveram revestimentos uniformes como o nosso porém com espessuras de 35 µm para a amostra S1-AH, 29 µm para a amostra S2-AH e 31 µm para a amostra S3-HA. A HA possui algumas desvantagens como tenacidade a fratura, baixa resistência a tração e fragilidade (ABDULGHAFOR *et al*., 2024). A literatura não aponta qual seria o tamanho ideal do revestimento. RIBEIRO *et al*., 2013, utilizaram chapas de titânio micro e macroporoso produzidas por metalurgia do pó para o tratamento biomimético, foi utilizada SS por 7, 14 e 21 dias. Obteve valores de espessura para as amostras de 319,91 ± 151,40 nm para o CPTi-21, 217,70 ± 19,87 para o mTi-21 e 54,30 ± 11,88 para o MTi-21. Desvio padrão baixo indica uma uniformidade na espessura dos revestimentos. Uma das grandes limitações deste processo é o tempo, Resende *et al*.,2008, obtiveram a deposição de uma fina camada de fosfato de cálcio com aproximadamente 15 µm com apenas sete dias em FCS, o que foi observado em MEV/FIB. ANDRADE (1999), mostrou através deste método que é possível obter revestimentos homogêneos e sem trincas. Utilizando uma média da região de CC obtivemos uma espessura de 277,60 ± 64.16 nm, já ROCHA et al.,2011 obteve uma espessura média de 353,00 ± 20,50 ao utilizar amostras porosas produzidas pela metalurgia do pó.

BALTATU *et al*., 2021, revestiram biomimeticamente 3 ligas de Ti através de uma solução SBF. Realizaram análise de micro-indentação, com um aparelho UMTR 2M – CTR, antes e após as ligas serem revestidas. Verificaram que o módulo de Yong foi reduzido em aproximadamente 50%. Antes da deposição o valor era de 103-120 GPa e após o tratamento biomimético as ligas tiveram os seguintes valores 55,35 ± 0,3; 56,25 ± 0,2 e 56,45 ± 0,2. Esta redução é importante pois aproxima o módulo de elasticidade do implante ao osso.

FERREIRA MARTINEZ *et al*. (2018) avaliaram *in vitro,* em discos de titânio, a influência de nanocristais de hidroxiapatita depositados sobre superfícies tratadas com duplo ataque ácido, comparando com superfície tratada apenas com duplo ataque ácido. Em ambas as superfícies foram feitos cultivo celular com pré-osteoblastos por 72 horas. Observou-se uma maior viabilidade celular, aumento do colágeno tipo I e uma maior proliferação celular nas superfícies tratadas com HA quando comparadas com a superfície sem HA. Uma quantidade maior de osteopontina foi observada nas primeiras 24 horas na nanosuperfície quando comparada à superfície de controle, após 48 horas nenhuma diferença significativa foi observada.

JIMBO *et al*. (2012) avaliaram histologicamente dois grupos de implantes onde no grupo 1 os implantes foram submetidos a jateamento com posterior tratamento ácido e revestimento com HA nanométrica, enquanto no grupo 2 foi realizado o mesmo tratamento anterior sem HA. Os implantes foram inseridos em tíbias de coelhos e os pesquisadores observaram que não houve diferença histomorfométrica entre os grupos, os testes nanomecânicos ósseos mostraram uma uniformidade nas regiões avaliadas, entretanto verificaram valores maiores no grupo com tratamento revestido de hidroxiapatita quando comparado com o grupo controle.

5 Conclusões

O uso da Solução Simplificada produziu com sucesso o revestimento de fosfato de cálcio nos implantes com diferentes macrogeometrias de uma maneira homogênea.

Com base no que foi apresentado previamente e posteriormente através das caracterizações, os implantes recobertos pelo método biomimético tiveram um ótimo desempenho mecânico mesmo quando inserido em osso com alta densidade.

Agradecimentos

Os autores desse trabalho agradecem a SIN IMPLANTES, CBPF, INT e UNIGRANRIO pelo apoio e suporte para a realização deste trabalho.

Referências

Abdulghafor MA, Mahmood MK, Tassery H, Tardivo D, Falguiere A, & Lan R (2023). Biomimetic coatings in implant dentistry: A quick update. *Journal of Functional Biomaterials*, *15*(1), 15.

Andrade MC, 1999, Nucleação e Crescimento de Hidroxiapatita em Titânio. Tese de D.Sc.. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Aparicio C, Manero J M, Conde F, Pegueroles M, Planell JA, Vallet-Regi M, & Gil FJ (2007). Acceleration of apatite nucleation on microrough bioactive titanium for bone-replacing implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *82*(3), 521-529.

Baltatu MS, Sandu AV, Nabialek M, Vizureanu, P, & Ciobanu G (2021). Biomimetic deposition of hydroxyapatite layer on titanium alloys. *Micromachines*, *12*(12), 1447.

Ferreira Martinez E, Ishikawa GJ, Barboza de Lemos A, Barbosa Bezerra FJ, Sperandio M & Henrique Napimoga M (2018). Evaluation of a Titanium Surface Treated with Hydroxyapatite Nanocrystals on Osteoblastic Cell Behavior: An In Vitro Study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *33*(3).

Iijima M, Onuma K (2018). Particle-size-dependent octacalcium phosphate overgrowth on β-tricalcium phosphate substrate in calcium phosphate solution. Ceramics International, 44 (2), 2146-2157. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.167.

Jimbo R, Coelho PG, Bryington M, Baldassarri M, Tovar N, Currie F & Wennerberg A (2012). Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties. *Journal of dental research*, *91*(12), 1172-1177.

Kokubo T (1998). Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta materialia*, *46*(7), 2519-2527.

Kreller T, Sahm F, Bader R, Boccaccini AR, Jonitz-Heincke A & Detsch R (2021). Biomimetic calcium phosphate coatings for bioactivation of titanium implant surfaces: Methodological approach and in vitro evaluation of biocompatibility. *Materials*, *14*(13), 3516.

RESENDE, C.X. , DILIE, J., PLATT, G.M. et. al., 2008, “Characterization of coating produced on titanium surface by a designed solution containing calcium and phosphate ions “. Materials Chemistry and Physics. n.109, p. 429-435.

Ribeiro AA, Balestra RM, Rocha MN, Peripolli SB, Andrade MC, Pereira LC & Oliveira MV (2013). Dense and porous titanium substrates with a biomimetic calcium phosphate coating. *Applied Surface Science*, *265*, 250-256.

Rocha MND, Ribeiro AA, Andrade MCD, Pereira LC & Oliveira MVD (2011). Study of a biomimetic method for coating titanium substrates.

Wu S, Liu X, Hu T, Chu PK, Ho JPY, Chan YL & Luk KDK (2008). A biomimetic hierarchical scaffold: natural growth of nanotitanates on three-dimensional microporous Ti-based metals. *Nano Letters*, *8*(11), 3803-3808.