

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÕES DE SUPERFÍCIES
ANTIMICROBIANAS E BIOATIVAS SOBRE TITÂNIO”

Karina Marchi Zaniolo*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: FÍSICO-
QUÍMICA.

Orientadora: Sonia Regina Biaggio

* bolsista CNPq

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karina Marchi Zaniolo, realizada em 19/07/2019:

Profa. Dra. Sonia Regina Biaggio Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Rodrigo Del Río Quero
PUC-Chile

Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi
UNESP

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
EMBRAPA

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

O tempo é ladrão da memória. (Torre Negra – Stephen King)

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

A meus pais, Santo Zaniolo e Ermelinda Marchi Zaniolo e irmãs, feiosa 1 - Larissa Marchi Zaniolo (obrigada por ter corrigido minha introdução com tanto carinho =P) e feiosa 2 - Melissa Marchi Zaniolo, por todo suporte sem o qual eu não teria conseguido nada, e por sempre me lembrarem que as portas estão abertas.

A meus filhos, Morgana (*in memoriam*), Sansa, Monstro e Ayra, por serem minha fonte de energia.

À minha orientadora, Profa. Sonia Regina Biaggio, pela oportunidade, orientação, conselhos, paciência e ajuda não só no âmbito acadêmico como também no pessoal. E pelo exemplo que é como Protetora dos animais da UFSCar, em particular, e de todos os outros de forma geral.

Aos professores do LaPE (Laboratório de Pesquisas em Eletroquímica) Romeu C. Rocha-Filho, Nerilso Bocchi e José Mario de Aquino pela ajuda e discussões sobre o trabalho.

Ao Prof. Clóvis Oliveira de Souza, do DMP – UFSCar, pelos ensinamentos durante a disciplina de Microbiologia e pela parceria que possibilitou que os testes antimicrobianos fossem realizados. Agradeço também a técnica Zélia por toda ajuda durante esses testes e a todos os alunos do laboratório, em especial a Anael e ao Danone, pela receptividade.

Ao Prof. Edenir R. Pereira Filho do DQ – UFSCar por ter permitido que eu utilizasse o ICP de seu laboratório e aos alunos Raquel e Daniel por terem realizado as medidas e pela simpatia.

Ao Prof. Luis Henrique C. Mattoso da EMBRAPA – São Carlos por ter permitido que eu utilizasse o equipamento para eletrofiliação na EMBRAPA e pela doação do polímero utilizado, e a seu aluno Rodrigo por ter me ensinado a operar o equipamento e a preparar a solução do polímero.

Ao Dr. Nilson Tadeu Camarinho de Oliveira pelos ensinamentos sobre a soldagem e embutimento do eletrodo de trabalho.

Ao Dr. Fabio Plotegher por ter me ajudado a realizar as medidas de Ângulo de Contato na EMBRAPA.

À EMBRAPA, por permitir que alunos externos possam realizar medidas nos equipamentos de seu domínio.

Ao Prof. Joni A. Cirelli, da UNESP – Araraquara e suas alunas Fernanda, Mariana e Flávia, pela parceria que permitiu que os testes de biocompatibilidade fossem realizados. Às meninas também fica meu agradecimento pela receptividade no dia a dia do laboratório.

Ao Prof. Valtencir Zucolotto do IF – USP São Carlos por ter cedido seu laboratório para que eu pudesse fazer as medidas de DLS e de potencial zeta da solução de nanopartículas; à técnica Bruna, por ter realizado as medidas e me ensinado a utilizar o equipamento; e a todos do laboratório, em especial a Bianca e a Paula, pelo acolhimento e conselhos.

A todos os professores do Departamento de Química da UFSCar, que de algum modo contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao técnico em vidraria Ademir e ao torneiro mecânico Edilson, pela paciência, ideias, diálogos e confecção das células e eletrodos que tornou este trabalho viável e pela amizade construída no decorrer desses 7 anos de UFSCar. Em especial ao Ademir, por todo apoio e conselhos em meus momentos de dificuldade.

Ao Bernardes, funcionário da Equitron, pela atenção, simpatia e eficiência na prestação de serviço.

Aos colegas e amigos do LaPE, Ricardo (Ricas), Pamela, Daiane, Vanessa, Diego, Adriana, Naihara, Isaac, Paulo, Paula, Kallyni, Rogério, Carlos André, Samuel, João Pedro, Yves, Carlos Henrique, Nicolay, Laís (*in memoriam*), Yeison, Irã, Jussara, Yohana, Jhonys, Juliana, Marcos e Gabriel, por toda ajuda, atenção e paciência.

Em especial, não poderia deixar de agradecer um pouco mais a alguns “humaninhos” que me ajudaram muito nesses últimos anos. À Naihara por toda ajuda acadêmica, mesmo sendo de outra área, e, principalmente por ouvir tantos casos e acasos, mesmo que por muitas vezes eu não tenha sido muito coerente. Ao Ricas, por ser sempre um amigo muito franco e mesmo me julgando sempre me ouvindo. Ao Diego, por me permitir entrar nesse mundo privado que é seu universo, obrigada por ser um amigo tão querido. À Van, por ser tão luz e por mesmo sendo tão iluminada ser tão incrível que não ofusca quem está ao seu redor, muito pelo contrário, compartilha seu brilho, te admiro! À Paula, por ser a menina do mundo bolha que eu mais adoro nesse mundo! Obrigada por sempre ter me ouvido e mesmo sendo contra minhas atitudes nunca ter deixado de estar ao meu lado. Ao Isaac, por ser o Colombiano mais malandro e mais gente boa que eu conheci, obrigada “Jovem” por toda paciência e conselhos acadêmicos e pessoais. Agradeço também ao Carlos André e aos “novos” Lapeanos Irã e Yeison por toda paciência e auxílio “técnico” por mais bobos ou complexos que tenham sido, me ajudaram muito! Obrigada a todos vocês, por me fazerem acreditar que, com ou sem conserto, esse mundo vale a pena!

Aos colegas do GEP, Renan e Andrew, pela ajuda e paciência.

Aos amigos do LIEC, Moisés, Thales e Francisco, por toda ajuda com as análises por DRX, TEM e DLS; e, por terem toda paciência do mundo comigo em todos os âmbitos.

Ao Gabriel Scatena (Guerra), por ter me “incentivado” a fazer as sínteses das nanopartículas de prata; e por ter tido compaixão nos momentos tristes, tranquilidade nos confusos e tolerância nos difíceis. Agradeço também por todo o tempo compartilhado, por me alimentar, por tentar me entender e principalmente por não desistir de ser um humano melhor.

Aos órgãos de fomento CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e CAPES, pelo auxílio à pesquisa no Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E, a todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
3mL	Anodizado(a) com deposição de 3mL da solução de NpAg
3mLPLA	Anodizado(a) com deposição de 3mL da solução de NpAg e PLA
5V	Anodizado(a) com prata eletrodepositada
ABIMO	Associação Brasileira de Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios
An	Anodizado(a)
AnPLA	Anodizado(a) com recobrimento com PLA
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apex-Brasil	Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSA	Albumina de soro bovino
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DRX	Difratometria de raios X
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva de raios X
FBS	Soro fetal bovino
HAp	Hidroxiapatita
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JCPDS	Joint Commitee on Powder Diffraction Standards
MAO	Oxidação por Micro-Arco
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MH	Müeller Hinton
NIH	National Institutes of Health
NpAg	Nanopartículas de prata
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PDF	Powder Diffraction File
PEG	Poli (etileno glicol)
PLA	Poli (ácido lático)
Pol	Polido(a)
Ti cp	Titânio comercialmente puro

Lista de tabelas

TABELA 1 - Composição química do Ti cp de acordo com a norma ASTM F67-13.	8
TABELA 2 - Propriedades mecânicas do Ti cp de acordo com a norma ASTM F67-13. Adaptado ⁵³	8
TABELA 3 – Principais estratégias usadas para funcionalização de superfícies de biomateriais, efeitos desejáveis e indesejáveis. Adaptado ³³	10
TABELA 4 - Soluções utilizadas para os processos de anodização do Ti cp por MAO.	32
TABELA 5 - Composição e pH da solução tampão fosfato-salina (PBS).....	33
TABELA 6 - Condições investigadas para o processo de anodização do Ti cp por MAO.	34
TABELA 7 - Condições utilizadas na síntese de nanopartículas de prata (NpAg).	34
TABELA 8 - Diferentes métodos de deposição de prata sobre Ti anodizado por MAO.	37
TABELA 9 - Parâmetros selecionados para produção de uma superfície de óxido de titânio altamente porosa sobre titânio, via anodização por MAO.	55
TABELA 10 – Métodos de deposição de prata em Ti anodizado. (+) representa um recobrimento homogêneo e/ou significativo e (-) não homogêneo e/ou significativo.	64
TABELA 11 – Condições de deposição de Ag sobre Ti anodizado que foram significativas e/ou homogêneas.	65
TABELA 12 - Parâmetros das deposições de Ag sobre o Ti anodizado das amostras selecionadas para recobrimento polimérico.	70
TABELA 13 - Parâmetros utilizados na eletrofiação do PLA para recobrimento das amostras: An, 3mL e 5V . E = coletor estático e R = coletor rotacional à 400 rpm.....	73
TABELA 14 - Redução percentual de UFC de <i>S. aureus</i> segundo a norma JIS 2801 (2012) das amostras An, 5V, 5VPLA, 5V e 3mLPLA	80
TABELA 15 - Ângulos de contato de uma gota d'água, nos períodos de 10 e 90 s, sobre a superfície das amostras: 3mL, Pol, 5V, An, 5VPLA, 3mLPLA e AnPLA	83
TABELA 16 - Concentração total (em ppm) de Ag das amostras: 5V, 5VPLA, 3mL e 3mLPLA	97

Lista de figuras

FIGURA 1 - Mercado global de implantes dentários, dividido por regiões, 2016. Adaptado ¹⁸	4
FIGURA 2 - Efeito do tamanho de partículas na dissolução das NpAg ¹³⁹	21
FIGURA 3 – Representação ilustrativa do mecanismo de ação da Ag em procariontes. Adaptado ¹⁴⁹	22
FIGURA 4 – Tipos de abordagem de sínteses de nanopartículas: top-down e bottom-up. Adaptado ¹²⁷	24
FIGURA 5 - Sistema de eletrofição e seus componentes. a) bomba seringa, b) coletor aterrado, c) fonte de alta tensão e d) distância de trabalho. Adaptado ¹⁵⁸	25
FIGURA 6 – Unidade estrutural do polímero poli (ácido láctico) - PLA.....	26
FIGURA 7 - Imagem ilustrativa do eletrodo de trabalho de Ti cp utilizado na oxidação por MAO: (a) disco com 2 mm de espessura e 12,6 mm de diâmetro com contato elétrico embutido em resina e (b) visão da face inferior do eletrodo.	30
FIGURA 8 - Imagem ilustrativa do contra-eletrodo composto por anéis de platina (Pt) com contato elétrico de cobre (Cu), utilizado na anodização por MAO.	30
FIGURA 9 - Imagem ilustrativa da célula de vidro convencional utilizada nas anodizações por MAO e barra magnética utilizada para agitação. CE = contra-eletrodo; ET = eletrodo de trabalho.	31
FIGURA 10 - Esquema representativo do processo de síntese de nanopartículas de prata (NpAg).....	35
FIGURA 11. (a) Foto do sistema utilizado para produção de fibras por eletrofição: 1) bomba seringa, 2) coletor aterrado, 3) fonte de alta tensão; (b) Amostras dispostas no centro do coletor durante a eletrofição.	39
FIGURA 12 - Ângulos de contato de líquidos em superfícies sólidas: (a) superfície molhante; (b) predominantemente molhante; (c) e (d) não molhantes ¹⁶⁸	40
FIGURA 13. Esquema utilizado para realização do teste de disco-difusão. A) placas de ágar MH. B) ajuste do inóculo de <i>S. aureus</i> para 10 ⁸ UFC mL ⁻¹ . C) inoculação da placa contendo ágar MH. D) colocação dos discos de Ti na placa com as superfícies tratadas voltadas para baixo. E) halos de inibição formados após incubação.	43

FIGURA 14. Ilustração do inóculo composto por uma suspensão de <i>S. aureus</i> sobre a amostra tratada recoberta com um filme de polietileno utilizado para aumentar a área de contato entre a amostra e a suspensão.....	44
FIGURA 15 – Amostras de Ti cp polida até lixa 600: a) Micrografia de MEV e b) Fotografia da superfície da amostra.	49
FIGURA 16 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por anodização a 200 V durante 1 e 5 min em soluções de CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 1) a 300 V e de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 2) a 200 V.....	50
FIGURA 17 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por anodização em solução tampão fosfato (solução 3) a 250 V, nos tempos: a) 1 min, b) 5 min e c) 10 min.....	51
FIGURA 18 - Micrografia de MEV da região manchada do óxido de Ti devido à incrustação de resina ao óxido durante o processo de MAO. Anodização realizada durante 1 min a 250 V em solução de K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 6).....	52
FIGURA 19 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por MAO a 250 V em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 8) a 250 V, nos tempos: a) 1 min, b) 5 min e c) 10 min.	53
FIGURA 20 - a) Micrografia de MEV do óxido de Ti crescido por MAO), a 250 V por 10 min em solução de K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 9 . b) Espectro de EDS da amostra exibida em a).....	53
FIGURA 21 - Espectro de EDS da amostra de Ti cp anodizada a 250 V por 1 min, em solução de K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ (solução 8).....	54
FIGURA 22 - Histograma dos diâmetros dos poros construídos a partir de micrografias de MEV referentes às amostras de Ti anodizadas nas condições da TABELA 9.	55
FIGURA 23 - Difrátogramas de raios X das amostras de Ti polida e anodizada a 250 V por 1 min em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$	56
FIGURA 24 - Mapeamento dos elementos Ti, O, Ca e P realizado por EDS da amostra anodizada a 250 V por 1 min em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$	57
FIGURA 25 - Micrografia de MEV em um corte transversal da amostra anodizada a 250 V por 1 min, em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$. Regiões das camadas compacta e do titânio coloridas artificialmente.	58

FIGURA 26 - Espectros de UV-Vis da solução coloidal de prata obtida com as condições de síntese de nanopartículas de prata dispostas na TABELA 7.	59
FIGURA 27 - a) Difratoograma de raios X das NpAg obtidas com as condições de síntese de nanopartículas de prata apresentadas na TABELA 7. b) Imagem de alta resolução por TEM de uma destas NpAg. c) Perfil de contraste (branco-preto) referente às áreas destacadas em amarelo em b) que correspondem aos planos cristalinos do material. .	60
FIGURA 28 - Caracterizações das NpAg obtidas com as condições de síntese apresentadas na TABELA 7: a) Espectro de UV-Vis da síntese 3 de NpAg; b) Gráfico da absorvância máxima da solução de NpAg em função do tempo; c) Gráfico do potencial zeta em função do pH da solução de NpAg.	61
FIGURA 29 - a) Micrografia de MET das NpAg obtidas com as condições de síntese apresentadas na TABELA 7. Histogramas dos diâmetros de partículas obtido por: b) imagens de MET e, c) DLS.	63
FIGURA 30 – Micrografias de MEV das superfícies com deposições de prata em Ti anodizado, inadequadas para o propósito deste trabalho: a) eletrodeposição de NpAg, b) secagem a temperatura ambiente, c) ressuspensão em EtOH e d) gotejamento de 1,2 mL sobre amostra aquecida.	64
FIGURA 31 – Micrografias de MEV das amostras de Ti anodizadas com prata eletrodepositada nos eletrólitos Ag_2SO_4 e AgNO_3 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ a -3 e -5 V nos diferentes tempos: 30 s, 1 min e 5 min.	66
FIGURA 32 – Micrografias de MEV das amostras de Ti anodizadas e com Ag depositada por gotejamento dos volumes da solução de NpAg: 3, 5, 10 e 15 mL.	67
FIGURA 33 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado com eletrodeposição de Ag em Ag_2SO_4 (S) e AgNO_3 (N) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ a -3 e -5 V nos tempos: 30 s, 1 min e 5 min. a) Foto dos halos de inibição, onde A1 = AgNO_3 _1min; Q1 = Ag_2SO_4 _30s; Q3 = Ag_2SO_4 _1min e C2 = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição de cada tratamento (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).	68
FIGURA 34 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado e com eletrodeposição de Ag em Ag_2SO_4 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 s, nos potenciais: -3 e -5 V. a) Foto dos halos de inibição, onde An = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico	

comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição dos diferentes tratamentos (não houve diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).....	69
FIGURA 35 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado e com deposição de Ag por gotejamento dos volumes: 3, 5, 10 e 15 mL. a) Foto dos halos de inibição, onde, An = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição dos diferentes tratamentos (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).	70
FIGURA 36 - Difractogramas de raios X das amostras 5V e 3mL . Condições de anodização por MAO destas amostras dispostas na TABELA 12.....	71
FIGURA 37 – Imagens de MEV e mapeamento do elemento Ag por EDS das amostras 3mL e 5V . Condições de anodização por MAO destas amostras dispostas na TABELA 12.....	72
FIGURA 38 - Fibras de PLA 10 % depositadas por 5 minutos sobre Ti anodizado. Tipo de coletor: a) estático e b) rotacional. Setas indicativas em alguns “beads”.	73
FIGURA 39 - Fibras de PLA 10 e 14 % (<i>m/m</i>) sobre Ti anodizado (An) após 10 min de eletrofiação.	74
FIGURA 40 - a) Fibras ultrafinas de PLA 14 % (<i>m/m</i>) eletrofiadas por 15 min sobre Ti anodizado. b) Histograma dos diâmetros das fibras.	75
FIGURA 41 - Teste antimicrobiano de disco-difusão com <i>S. aureus</i> das amostras An , 5VPLA e 3mLPLA	76
FIGURA 42 – Teste de atividade antimicrobiana com <i>S. aureus</i> pelo método <i>Spread-Plate</i> para amostra An (controle). Diluições: a) quadrantes superiores 10^0 e quadrantes inferiores 10^{-1} , b) quadrantes superiores 10^{-2} e quadrantes inferiores 10^{-3} e c) quadrantes superiores 10^{-4} e quadrantes inferiores 10^{-5}	77
FIGURA 43 - Testes antimicrobianos com <i>S. aureus</i> das amostras 5V , 3 mL , 5VPLA e 3mLPLA segundo a norma JIS 2801 (2012). a) método <i>Pour-Plate</i> , e, demais placas método <i>Spread Plate</i> nas diluições: b) quadrantes superiores 10^0 e quadrantes inferiores 10^{-1} , c) quadrantes superiores 10^{-2} e quadrantes inferiores 10^{-3} e d) quadrantes superiores 10^{-4} e quadrantes inferiores 10^{-5}	78
FIGURA 44 - Contagem das UFC da bactéria <i>S. aureus</i> do teste antimicrobiano segundo a norma JIS 2801 (2012) das amostras An , 5V , 5VPLA , 3 mL e 3mLPLA (*diferença estatística entre o grupo controle (An) e os demais, $p > 0,05$).	79

FIGURA 45 - Fotos das amostras de Ti com diferentes tratamentos de superfícies: Pol , An , AnPLA , 3mL , 3mLPLA , 5V e 5VPLA	81
FIGURA 46 – Imagens dos ângulos de contato de uma gota d’água, no tempo de 10s, sobre as amostras: a) 3mL , b) Pol , c) 5V , d) An , e) 5VPLA , f) 3mLPLA e g) AnPLA . 81	
FIGURA 47 – Gráfico da variação com o tempo do ângulo de contato entre uma gota d’água e as superfícies das amostras: 3mL , Pol , 5V , An , 5VPLA , 3mLPLA e AnPLA .82	
FIGURA 48 – Gráfico do teste Alamar Blue para proliferação celular sobre as amostras Pol e An ao longo de 21 dias (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).	84
Figura 49 – Gráfico da viabilidade celular realizada pelo teste Alamar Blue no período de 24 e 72 horas para as amostras: Pol , An , AnPLA , 5V , 5VPLA , 3mL e 3mLPLA (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).	85
FIGURA 50 – Fotos das amostras Pol , An , AnPLA , 5V , 5VPLA , 3mL e 3mLPLA , após 21 dias de cultivo celular, demonstrando as diferentes quantidades de formação de nódulos de mineralização extracelular (corados com vermelho de alizarina nas amostras).	86
FIGURA 51 – Formação de nódulos de mineralização extracelular das amostras Pol , An , AnPLA , 5V , 5VPLA , 3mL e 3mLPLA após 21 dias de cultivo celular (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).	86
FIGURA 52 - Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras Pol e An nos períodos: 1, 3 e 7 dias.....	88
FIGURA 53 - Micrografias de MEV das células cultivadas sobre as amostras 5V e 3mL nos períodos: 1, 3 e 7 dias.	90
FIGURA 54 - Micrografias de MEV das células cultivadas sobre as amostras AnPLA , 5VPLA e 3mLPLA nos períodos: 1, 3 e 7 dias.....	92
FIGURA 55 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras Pol e An nos períodos: 1, 3 e 7 dias.....	93
FIGURA 56 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras 5V e 3mL nos períodos: 1, 3 e 7 dias.	94
FIGURA 57 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras AnPLA , 5VPLA e 3mLPLA nos períodos: 1, 3 e 7 dias.	95
FIGURA 58 - Quantificação da liberação diária de Ag^+ das amostras 5V , 5VPLA , 3mL e 3mLPLA nos períodos entre 1 e 15 dias.....	96

FIGURA 59 – Quantificações acumulativas da liberação de Ag^+ das amostras **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** nos períodos entre 1 e 43 dias: a) concentração em ppm e b) concentração percentual.98

Resumo

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÕES DE SUPERFÍCIES ANTIMICROBIANAS E BIOATIVAS SOBRE TITÂNIO: O titânio (Ti), por ser biocompatível, apresentar estabilidade química e boas propriedades mecânicas é o material mais utilizado para fabricação de implantes dentários. Entretanto, implantes continuam apresentando um elevado número de falhas decorrentes principalmente de infecções bacterianas e afrouxamento asséptico. As infecções podem ser prevenidas com a adição de agentes antimicrobianos à superfície destes implantes e a formação de uma superfície bioativa acelera a osseointegração evitando o afrouxamento. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consistiu em modificar a superfície do Ti de modo a promover uma osseointegração precoce e lhe conferir ação antimicrobiana. Desse modo, foram produzidas superfícies porosas e bioativas de óxido de titânio sobre titânio pela inserção de íons de cálcio e fósforo através da oxidação por micro-arco. Após, prata foi depositada (via eletrodeposição ou por gotejamento de uma solução coloidal de nanopartículas de prata – NpAg) sobre esta superfície (Ti/TiO₂) com o objetivo de torná-la antimicrobiana. Para minimizar a toxicidade celular da prata, estas superfícies foram recobertas com o polímero poli (ácido lático) (PLA). As NpAg foram sintetizadas por um método reprodutível e caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis, MET, DLS e medidas de potencial-zeta. Já as superfícies de Ti (polida, anodizada, anodizada/Ag e anodizada/Ag/PLA) foram caracterizadas por MEV, EDS e DRX. Estas superfícies exibiram atividade antimicrobiana para *S. aureus*, boa biocompatibilidade com pré-osteoblastos em testes de viabilidade celular, mineralização de matriz extracelular e adesão e proliferação celular. Ademais, o recobrimento com PLA foi eficaz para liberação controlada de Ag em meio de PBS. As várias superfícies produzidas neste trabalho são promissoras para a utilização como implantes, podendo ser úteis principalmente em pacientes que apresentam doenças periodontais, ou que dispõem de um osso pobre que requer um maior estímulo para a osteogênese.

Abstract

PRODUCTION AND CHARACTERIZATIONS OF ANTIMICROBIAL AND BIOACTIVE SURFACES ON TITANIUM: Titanium (Ti), being biocompatible and presenting chemical stability and good mechanical properties, is the most used material for manufacturing dental implants. However, implants present a high number of failures mainly due to bacterial infections and aseptic loosening. Infections can be prevented by the addition of antimicrobial agents to the surface of these implants and the formation of a bioactive surface accelerates the osseointegration process preventing loosening. In this context, the aim of this work was to modify the Ti surface so as to promote an early osseointegration and to provide antimicrobial activity. Thus, porous and bioactive surfaces of titanium oxide were produced on titanium by the insertion of calcium and phosphorus ions by the micro-arc oxidation technique. Afterwards, silver was deposited (via electroplating or by dripping a colloidal silver nanoparticle solution - NpAg) on this surface (Ti/TiO₂) to provide antimicrobial activity. In addition, to minimize the cellular toxicity of silver, these surfaces were coated with the poly(lactic acid) polymer (PLA). The NpAg were synthesized by a reproducible method and characterized by UV-Vis, MET, DLS spectroscopy and zeta-potential measurements. On the other hand, the surfaces of Ti (polished, anodized, anodized/Ag and anodized/Ag/PLA) were characterized by SEM, EDS and XRD. These surfaces exhibited antimicrobial activity against *S. aureus*, good biocompatibility with pre-osteoblasts in cell-viability tests, extracellular matrix mineralization, and cell adhesion and proliferation. Furthermore, the PLA coating was effective for the controlled release of Ag in PBS medium. The various surfaces produced in this work are promising for use as implants and may be especially useful in patients who have periodontal disease, or who have poor bone stock that requires greater stimulation for osteogenesis.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Implantes dentários e mercado global	3
1.3. O titânio como biomaterial para implantes dentários	5
1.4. Características e desempenho de superfícies modificadas de Ti cp	9
1.5. Anodização, oxidação por micro-arco (MAO), recobrimentos e deposições.....	13
1.6. Nanopartículas de prata - NpAg.....	18
1.7. Eletrofiação e o uso do polímero poli (ácido lático) - PLA	25
2. Objetivos	28
3. Metodologia.....	29
3.1. Eletrodos, célula eletroquímica e soluções	29
3.1.1. Eletrodos	29
3.1.2. Célula eletroquímica.....	31
3.1.3. Soluções utilizadas.....	31
3.2. Oxidação por micro-arco – MAO.....	33
3.3. Síntese de nanopartículas de prata (NpAg)	34
3.4. Métodos de caracterização da solução de NpAg	35
3.4.1. Espectroscopia de UV-Vis	35
3.4.2. Difractometria de raios X (DRX)	35
3.4.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	36
3.4.4. Medição de potencial zeta	36
3.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	36
3.5. Métodos de deposição de prata sobre Ti anodizado	37
3.6. Processo de eletrofiação de PLA	38

3.7. Métodos de caracterização das superfícies modificadas	39
3.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)	39
3.7.2. DRX	40
3.7.3. Medidas de ângulo de contato.....	40
3.7.4. Atividade Antimicrobiana	41
3.8. Testes de biocompatibilidade.....	45
3.8.1. Viabilidade e proliferação celular (Alamar Blue)	45
3.8.2. Morfologia, adesão e proliferação celular (MEV e Microscopia de fluorescência).....	46
3.8.3. Formação de nódulos de mineralização (Vermelho de alizarina).....	47
3.9. Liberação de Ag ⁺	47
3.10. Análises estatísticas	48
4. Resultados e Discussão	49
4.1. Oxidação de titânio por micro-arco – MAO – e caracterizações das superfícies obtidas.....	49
4.2. Caracterização das nanopartículas de prata (NpAg).....	59
4.3. Deposição de Ag sobre as superfícies anodizadas	63
4.4. Caracterizações das superfícies modificadas	67
4.4.1. Atividade Antimicrobiana das superfícies Ti/TiO ₂ /Ag.....	67
4.4.2. Análises de MEV, EDS e DRX	70
4.5. Recobrimento polimérico por eletrofação	72
4.5.1. Atividade antimicrobiana das superfícies Ti/TiO ₂ /Ag/PLA.....	75
4.5.2. Medidas de ângulo de contato.....	80
4.6. Testes de biocompatibilidade.....	83
4.6.1. Viabilidade e proliferação celular	83

4.6.2. Formação de nódulos de mineralização	85
4.6.3. Morfologia, adesão e proliferação celular	87
4.7. Testes para liberação de Ag ⁺	95
5. Conclusões	100
6. Referências Bibliográficas	103
Apêndice A.....	119
Apêndice B.....	120
Apêndice C	121
Apêndice D	122
Apêndice E.....	123
Apêndice F.....	124
Apêndice G	125
Apêndice H	126
Apêndice I	127
Apêndice J	128

1. Introdução

1.1. Contextualização

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS, saúde bucal significa mais que ter dentes saudáveis. É uma parte integrada à saúde global da pessoa e primordial para seu bem-estar e qualidade de vida. Implica na ausência de dor crônica orofacial, câncer de boca e garganta, lesões nos tecidos orais, defeitos congênitos e outras doenças e distúrbios que afetam o complexo craniofacial. A integridade deste complexo age como barreira contra infecções microbianas e ameaças ambientais. Manter uma boa saúde bucal influencia na capacidade de uma pessoa sorrir, beijar, tocar, cheirar, saborear, mastigar, engolir e demonstrar sentimentos através de expressões faciais¹.

As doenças bucais são consideradas as mais comuns entre as patologias não transmissíveis e afetam as pessoas ao longo da vida. Frequentemente são a causa de faltas escolares e no trabalho, e afetam as atividades diárias individuais, gerando, portanto, um problema socioeconômico. Além disso, também interferem na questão psicossocial do indivíduo, pois em muitos casos ocorre a desfiguração facial, que pode levar a pessoa a um quadro de depressão e isolamento social².

Um relatório relacionado com a Carga Global de Doenças, publicado em 2017 por The Lancet, desenvolvido por diversos colaboradores, estimou que metade da população mundial, cerca de 3,58 bilhões de pessoas, sofrem algum tipo de doença bucal. A maior parte dessa carga é atribuída às seguintes doenças ou condições: cárie dentária, doença periodontal, câncer de boca, manifestação oral do HIV, traumatismo orodental e fissura labiopalatina. A cárie dentária e a doença periodontal são as principais responsáveis por perdas dentárias e ocupam, respectivamente, o 1º e o 11º lugar na prevalência global³ e no Brasil⁴.

Além disso, a perda severa de dentes e o edentulismo encontram-se entre as dez principais causas de Anos de Vida com Deficiência em alguns países de alta renda, devido ao envelhecimento populacional (24ª posição no ranking global)³. Em

âmbito nacional, os últimos levantamentos epidemiológicos (1986, 1996, 2003 e 2010) indicaram que o edentulismo consiste em um persistente problema de saúde pública⁴.

O aumento da urbanização e mudança no estilo de vida fazem com que a prevalência das doenças bucais aumente na maioria dos países de baixa e média renda, principalmente devido à exposição inadequada ao flúor e ao acesso limitado a serviços de saúde primária. Outro fator influente é o agressivo marketing de empresas produtoras de açúcar, tabaco e álcool que leva ao aumento do consumo desses produtos, que são agravantes destas doenças/condições⁵.

De acordo com o CDC (Centers for Disease Control and Prevention, dos EUA) as doenças e condições de saúde bucal estão associadas a outros problemas de saúde, sendo portanto, fundamental, a pesquisa científica para reduzir a carga dessas doenças⁶.

Um problema que não se classifica como doença, mas que também corrobora para as injúrias na saúde bucal é o traumatismo dentário, ligado principalmente a quedas. Estima-se que sua prevalência ultrapasse a de cáries e doenças periodontais em determinadas populações⁷. Um bilhão de pessoas possuem alguma lesão dentária traumática. Traumas orodentais têm uma prevalência global de aproximadamente 20% em ambas dentições, primária e secundária⁸. Uma pesquisa realizada no Brasil pelo Ministério da Saúde (MS) notificou que a prevalência de traumatismo dentário nos incisivos na idade de 12 anos foi de 20,5%⁹.

Com o avanço da medicina, muitos países estão passando por um envelhecimento populacional, entretanto, isso não reflete diretamente em um aumento na expectativa de vida saudável¹⁰. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro ao nascer em 2018 foi de 76,2 anos, um aumento de 6 anos em relação ao ano 2000. Em 2060, alcançará a idade de 81 anos, com 58,4 milhões de idosos (26,7% da população)¹¹. Estudos apontaram que os problemas relacionados à saúde bucal são agravados com a idade; por exemplo, 63% da população com 12 anos não apresenta problemas periodontais, e este número cai para 1,8% em idosos entre 65 a 74 anos. Nessa faixa etária, 53,7% dos idosos são edêntulos¹².

Neste cenário, o aumento na expectativa de vida e a consciência mundial na promoção da melhora da qualidade de vida das populações fizeram com que ocorresse uma expansão do mercado mundial de implantes¹³.

1.2. Implantes dentários e mercado global

Implante dentário é um substituto protético para um dente¹⁴, classificado como um dispositivo médico¹⁵. Materiais utilizados nas aplicações biomédicas são denominados biomateriais que, segundo Williams (2009), consistem em “uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usada para dirigir, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, na medicina humana ou veterinária”¹⁶. Ainda, de acordo o NIH (National Institutes of Health), biomateriais podem ser de origem sintética ou natural e são utilizados em aplicações médicas para apoiar, melhorar, ou substituir tecidos danificados ou uma função biológica¹⁷.

O mercado global de implantes dentários foi avaliado em 3,77 bilhões de dólares em 2016, com uma Taxa de Crescimento Anual Composta de 7,7%. O aumento das aplicações de implantes dentários juntamente com a crescente demanda por próteses são alguns dos principais fatores que impulsionam o mercado de implantes dentários. Este mercado é dominado por empresas localizadas na Europa, América do Norte e Ásia Pacífico (FIGURA 1)¹⁸. As marcas internacionais que mais se destacam são: Straumann (Neodent), Danaher (Nobel Biocare, Implant Direct e Alpha-Bio Tec.), Dentsply Sirona (Dentsply, AstraTech e MIS) e Henry Schein (Camlog e BioHorizons)¹⁹.

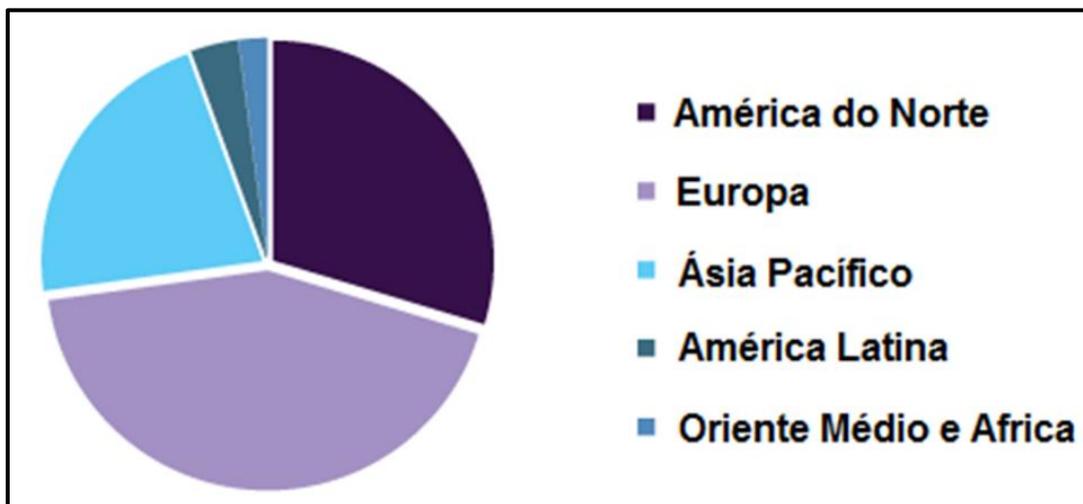


FIGURA 1 - Mercado global de implantes dentários, dividido por regiões, 2016. Adaptado¹⁸.

Apesar das marcas nacionais ainda não ocuparem um grande espaço do mercado internacional, elas têm apresentado um crescimento substancial e já são capazes de suprir boa parte da demanda do país^{20, 21}.

Um dos motivos que fazem as marcas internacionais serem tão consolidadas é que estas apresentam inúmeros estudos científicos garantindo a eficácia de seus produtos. Outro fator de destaque consiste no investimento contínuo em tecnologia. Algumas empresas de implantes realizam tratamentos na superfície dos implantes de forma a torná-los mais biocompatíveis^{22, 23}. A Straumann, por exemplo, possui tanta segurança em seus implantes que fornece garantia vitalícia de algumas linhas de seus produtos²⁴. Em 2015, a Straumann comprou a empresa brasileira Neodent²⁵ e neste mesmo ano criou o programa “Originais Neodent”, que também oferece garantia vitalícia de seus produtos, desde que sejam utilizados apenas implantes e componentes da marca²⁶.

No Brasil, pesquisas têm sido realizadas demonstrando a qualidade de seus produtos. Gehrke et al. (2018) compararam o desempenho, em coelhos, de implantes de titânio da marca brasileira Implacil De Botoli com a marca de referência Straumann. Estas marcas não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros testados para avaliar a osseointegração dos implantes²⁷. Outro estudo com implantes de titânio desta mesma marca foi realizado em 183 pacientes, totalizando 916 implantes e também apresentou

resultados promissores²⁸. O bom desempenho de implantes nacionais aumenta a segurança do dentista em realizar o procedimento, bem com a do paciente que irá recebê-lo ²⁹.

Mesmo que muitas marcas nacionais não se equiparem em propriedades com as internacionais, o aumento desse mercado é de suma importância, pois muitas vezes é a opção de melhor custo/benefício para os brasileiros²⁰.

O aumento do nível de aceitação para implantes dentários entre pacientes e cirurgiões dentistas também tem um impacto positivo no mercado, principalmente devido a limitações do uso de próteses removíveis, como desconforto, falta de aparência natural e necessidade de manutenção diária. Próteses montadas em implantes dentários não invadem os tecidos moles e melhoram a estética. Os implantes dentários além de serem esteticamente similares aos dentes naturais são tão funcionais quanto, promovendo um maior conforto ao paciente¹⁸.

Por fim, mas não menos importante, a queda acentuada no custo total ao acesso a implantes tornou-os mais acessíveis à população e impulsiona esse mercado³⁰.

No Brasil, de acordo com uma pesquisa realizada pelo Brazilian Health Devices, (Projeto Setorial executado pela ABIMO - Associação Brasileira de Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos, Odontológicos, Hospitalares e de Laboratórios, em parceria com a Apex-Brasil - Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos) as indústrias de artigos e equipamentos da área da saúde exibiram um crescimento de 72% de 2007 a 2013. Em 2013, o setor apresentou uma produção de 6,09 bilhões de reais³¹. Ainda, segundo a ABIMO, anualmente são utilizados no Brasil cerca de 800 mil implantes e 2,4 milhões de componentes de próteses dentárias²⁰. Vale lembrar que estes valores não condizem com a real demanda por esses serviços, devido ao aumento contínuo na longevidade do brasileiro³².

1.3. O titânio como biomaterial para implantes dentários

Mesmo após anos de estudos e pesquisas científicas, o sucesso de implantes dentários ainda não atinge 100% dos casos. Entretanto, houve uma melhora significativa já apresentando taxas de sucesso superiores a 90%, e esse valor se repete para taxa de sucesso a longo prazo. Apesar deste quadro ser promissor, quando uma

falha acontece o implante precisa ser removido. Para que um novo dispositivo possa ser utilizado, primeiramente é necessário que ocorra a cicatrização e provável preenchimento ósseo local, o que levará meses. Muitas vezes esse processo gera uma perda óssea local demasiada, inviabilizando a inserção de um novo implante. Por isso a busca pelo sucesso do procedimento é tão importante³³.

O afrouxamento asséptico também está entre as principais causas de falha em implantes³⁴. Este tipo de complicação geralmente acontece quando não ocorre a osseointegração completa entre o osso peri-implantar e a superfície do implante³³. Desse modo, um dos requisitos universais para implantes compreende sua habilidade em formar uma unidade mecânica estável adequada com os tecidos circunvizinhos³⁵.

Portanto, para que um implante seja empregado com êxito ele deve ter propriedades mecânicas adequadas, tais como elasticidade, ductilidade, dureza, resistência à fadiga e ao desgaste e deve apresentar uma boa biocompatibilidade³⁶. Por biocompatibilidade entende-se a habilidade de um material em coexistir com o hospedeiro por um intervalo de tempo, ou por tempo indeterminado, sem provocar reações adversas nesse organismo³⁷.

Um material biocompatível deve exibir bons resultados quanto à bioadesão, osseointegração e resistência à corrosão³⁶. Segundo Branemark³⁸, a osseointegração é caracterizada pelo crescimento e adesão do tecido ósseo à prótese. Um implante sem adequada biocompatibilidade pode ter sua funcionalidade reduzida ou anulada, ou ainda causar respostas excessivas no hospedeiro, gerando desconforto e dor ao paciente. Muitas vezes, estes implantes precisam ser cirurgicamente removidos³⁷.

De acordo com o grau de biocompatibilidade do implante e seu desempenho, eles podem ser classificados em biotoleráveis (encapsulamento fibroso); bioinertes (resposta biológica mínima, tecido fibroso reduzido); bioativos (interação do implante com o tecido biológico, sem a presença do encapsulamento); e biorreabsorvíveis ou biodegradáveis (substituição do implante por um novo tecido)³⁶.

Um dos motivos que leva a falha no implante é o uso de produtos de má qualidade, geralmente provenientes de mercados ilegais. Dados levantados pela ABIMO revelam que 30% dos implantes protéticos são irregulares³⁹. Segundo esta Associação, diversos estabelecimentos fabricantes de implantes são fechados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por não possuírem registro de seus produtos para fins

comerciais^{40, 41}. Em duas operações da ANVISA, realizadas em 2016 e 2017, mais de 500 mil implantes sem registros foram recolhidos⁴².

Existem diferentes classes de materiais utilizados na fabricação de implantes: metálicos, poliméricos, cerâmicos, compósitos e naturais. Os metais são os materiais mais utilizados para fabricação de implantes que envolvem sustentação de carga e também são muito empregados em dispositivos de fixação interna³⁶. Nesta classe, o titânio (Ti) e suas ligas são os que mais se destacam por suas propriedades como alta resistência à corrosão, baixa densidade e baixo módulo de elasticidade quando comparados com outros materiais metálicos, além de excelente biocompatibilidade. Implantes de Ti provocam um efeito mínimo no tecido onde é inserido; geralmente não levam a um processo inflamatório, nem desencadeiam reações alérgicas⁴³ e são classificados como bioinertes⁴⁴. Além disso, o Ti não é um material ferromagnético, permitindo o acompanhamento e avaliação do seu desempenho *in vivo* por ressonância magnética⁴⁵.

Uma das desvantagens do titânio comercialmente puro (Ti cp) é apresentar baixa resistência ao desgaste, inviabilizando seu uso como superfície articular⁴⁶. Por isso, o Ti cp é preferível em condições onde a resistência à corrosão é a característica de maior importância em relação às propriedades mecânicas⁴⁷. Isto explica seu vasto uso em cirurgias neurológicas, cardiovasculares, maxilofaciais, em alguns tipos de cirurgias ortopédicas, como por exemplo em componentes de fixação de próteses de quadril, e em cirurgias orais^{43, 48}. Na odontologia, titânio é o material de primeira escolha na fabricação de implantes (parafuso e pilar), coroas, pontes e sobredentaduras⁴⁹.

O titânio possui uma alta resistência à corrosão porque reage espontaneamente com o oxigênio do meio formando uma camada de óxido estável não porosa em sua superfície, com espessura entre 2 a 7 nm^{37, 50}. Esta camada pode ser espessada e modificada por diversos processamentos que melhoram sua resistência à corrosão e podem promover alterações em sua superfície, aumentando seu grau de biocompatibilidade³⁶.

Além disso, o óxido de Ti apresenta uma elevada constante dielétrica ($\epsilon = 86$), podendo resultar em interações de Van der Waals mais intensas com os tecidos adjacentes que outros óxidos. Também parece demonstrar maior atividade catalítica para algumas reações químicas orgânicas e inorgânicas em processos biológicos, melhorando

sua adesão ao meio^{38, 51}. Ademais, a rápida osseointegração desses materiais promove um selamento no implante, diminuindo a probabilidade de invasão bacteriana⁵².

De acordo com a norma ASTM F67, não existem materiais para implantes completamente livres de reações adversas, entretanto, o Ti cp induz respostas biológicas aceitáveis e por isso é vastamente utilizado em implantes cirúrgicos⁵³. Ainda de acordo com esta norma, o Ti cp é comercializado com teores de pureza entre 98 e 99,5% e classificado em 4 graus de pureza. Os elementos mais comuns encontrados são oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, carbono e ferro e seus teores estão apresentados na TABELA 1⁵³.

TABELA 1 - Composição química do Ti cp de acordo com a norma ASTM F67-13.

Composição máxima / % (m/m)				
Elemento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Nitrogênio	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbono	0,08	0,08	0,08	0,08
Hidrogênio	0,02	0,02	0,02	0,02
Ferro	0,20	0,30	0,30	0,50
Oxigênio	0,18	0,25	0,35	0,40

O Ti grau 1 é o que exibe maior pureza e ductilidade a temperatura ambiente, entretanto, apresenta menor resistência à tração. Quanto maior o teor de impureza menor a ductilidade e maior a resistência à tração desses materiais (TABELA 2). Na fabricação de implantes dentários, geralmente usa-se o titânio grau 2⁵³.

TABELA 2 - Propriedades mecânicas do Ti cp de acordo com a norma ASTM F67-13. Adaptado⁵³.

Ti cp	Propriedades mecânicas – Valores mínimos requeridos			
Grau	Resistência à tração / MPa	Resistência ao escoamento 0,2% de offset / MPa	Elongação em 4D / %	Redução de área / %
1	240	170	24	30
2	345	275	20	30
3	450	380	18	30
4	550	483	15	25

Os motivos que levam a uma melhor osseointegração ainda não são bem definidos, entretanto, sabe-se que a morfologia da superfície de implantes desempenha um importante papel nesse cenário^{38, 51}. O titânio, além de ser naturalmente um bom biomaterial, ainda permite que sua superfície seja modelada; desse modo, na próxima seção serão apresentadas diferentes superfícies de óxido de titânio e quais benefícios essas variações podem produzir.

1.4. Características e desempenho de superfícies modificadas de Ti cp

Como já referido nos tópicos anteriores, as propriedades superficiais de dispositivos implantáveis são de extrema importância para definir seu sucesso clínico. Neste contexto, a topografia e a composição dos implantes exercem um papel decisivo em seu desempenho, pois modulam a interação da superfície com células e micro-organismos. Existem diversas estratégias utilizadas com o intuito de melhorar sua osseointegração e reduzir o risco de infecções, entretanto, a grande questão é como obter um ganho em ambas as propriedades ao mesmo tempo, pois muitos tratamentos acabam desempenhando um papel antagônico. A TABELA 3 exibe as principais estratégias utilizadas para funcionalização de superfícies de biomateriais³³.

TABELA 3 – Principais estratégias usadas para funcionalização de superfícies de biomateriais, efeitos desejáveis e indesejáveis. Adaptado³³.

Estratégia	Efeito	Limitação
Aumento da rugosidade (Ra em escala μm)	Melhora a osseointegração devido a maior retenção mecânica	Também pode aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos inorgânicos (Ca/P/apatitas)	Potencial osteocondutor e osteoindutor	Também podem aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos orgânicos (proteínas/peptídeos)	Potencial osteocondutor e osteoindutor	Também podem aumentar a adesão bacteriana
Revestimentos antiadesivos	Inibe a adesão bacteriana	A adesão de células eucarióticas também é comprometida
Revestimentos bactericidas	Morte bacteriana ou inibição de sua adesão	A adesão, função e viabilidade das células eucarióticas podem ser comprometidas

Estudos sugerem que superfícies mais rugosas favorecem a adesão e maturação de células do tecido ósseo⁵⁴. Shalabi et al. (2006) demonstraram que estas superfícies apresentam melhor proliferação e adesão de osteoblastos, melhoram na resposta da fosfatase alcalina e da mineralização óssea quando comparadas com superfícies mais lisas de Ti⁵⁵. Acredita-se que a rugosidade promova um interligamento entre as células em escala micrométrica. Além disso, não só a microtopografia como a nanotopografia também é importante na adsorção de proteínas, adesão de osteoblastos e, conseqüentemente, na velocidade com que a osseointegração sucede^{45, 56, 57}. Esta superfície nanoestruturada pode, ainda, ser promissora na atividade antimicrobiana⁵⁸. De acordo com İzmir e Ercan (2018) mudar a rugosidade da superfície da escala micro para nano mantém a afinidade celular a ela e desfavorece a adesão de bactérias⁵⁹.

Topografias formadas por nanotubos de óxido de titânio crescidos em substratos de Ti via anodização, com diâmetro entre 30 a 80 nm, exibiram uma redução da adesão e colonização de *S. epidermidis* e, em contrapartida, favoreceram a adesão

de células osteogênicas⁶⁰. Gulati et al. (2016) produziram nanotubos de Ti em fios de Ti e os submergiram em colágeno contendo osteoblastos, demonstrando que esta superfície favorecia a migração, adesão e espalhamento celular⁶¹.

Nanocolunas de Ti, com diâmetro entre 40 e 60 nm, foram formadas sobre a liga Ti6Al4V e exibiram respostas opostas com relação à afinidade por células e bactérias, positivas para células eucarióticas. Este comportamento foi atribuído ao “efeito folha de lótus”, no qual gerou um efeito seletivo à diferença de tamanho entre os osteoblastos e a bactéria *S. aureus*⁶².

Ren et al. (2018) realizaram um ataque básico sobre o Ti de modo a obter uma morfologia extremamente rugosa com bordas pontiagudas. Essa superfície apresentou caráter hidrofóbico. Na sequência realizaram uma deposição de óxido de grafeno e submergiram em uma solução de aspirina; isso tornou a superfície hidrofílica e promoveu melhores resultados com respeito à proliferação de osteoblastos⁶³.

Vishnu et al. (2019) produziram uma superfície denominada “nanoflores” sobre substrato de Ti por ataque ácido (HNO_3/HF). Posteriormente, realizaram tratamentos hidrotermais, utilizando soluções básicas de NaOH, nas temperaturas de 225 e 250 °C com a intenção de aumentar a molhabilidade destas superfícies. Estas superfícies não apresentaram citotoxicidade e, apesar de apresentarem ação antibacteriana, justificada pela morfologia da superfície (“lanças pontiagudas” que formaram as “nanoflores”), também favoreceram a proliferação bacteriana. As superfícies com tratamento térmico a 250 °C foram extremamente hidrofílicas (ângulo de contato <5°) e, portanto, descartadas, visto que segundo estes autores esta superfície dificultaria a adesão celular⁶⁴.

Além da topografia, a composição química da superfície do implante também é extremamente importante no processo de osseointegração, podendo favorecer a adsorção de proteínas sobre o implante e melhorar a adesão celular⁶⁵. Quando elementos como o cálcio e o fósforo estão presentes nessa superfície ocorre um aumento na velocidade de adsorção de proteínas levando a uma fixação biológica precoce do implante⁶⁶.

Soares et al. (2018) produziram nanotubos de óxido de titânio em substratos de Ti via anodização na presença de Ca e P e concluíram que estes elementos melhoraram a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco derivadas de tecido

adiposo em relação ao titânio sem modificação. Além disso, essa superfície também apresentou maior hidrofobicidade, maior adsorção de proteínas e mineralização de cálcio⁶⁷. Em contraste, Laurindo et al. (2014) produziram superfícies altamente porosas por oxidação por micro-arco com inserção de Ca e P e obtiveram superfícies mais hidrofílicas que o Ti sem tratamento. Estes autores não realizaram testes celulares⁶⁸.

Kaczmarek et al. (2016) modificaram a superfície de Ti pela inserção de boro por plasma de arco transferido e obtiveram resultados melhores que para o Ti não tratado, com relação à viabilidade e proliferação de fibroblastos e osteoblastos⁶⁹. Huang et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes, porém, com boro (B) inserido durante a formação de filmes de óxido de Ti altamente porosos por oxidação por micro-arco (MAO). Os pré-osteoblastos apresentaram um maior espalhamento sobre a superfície contendo boro. Além disso, exibiram um aumento na atividade da fosfatase alcalina, na síntese de colágeno e na mineralização óssea. Eles atribuíram esses resultados à maior hidrofílicidade desta superfície com relação às sem B. Portanto, fica claro que mesmas morfologias podem exibir resultados diferentes por possuírem composições diferentes⁷⁰.

Zhao et al. (2013) depositaram estrôncio (Sr) sobre nanotubos de Ti, crescidos em discos de Ti, e verificaram que a incorporação deste elemento melhorou a proliferação de células-tronco mesenquimais de rato⁷¹.

Além da incorporação de elementos como Ca, P, Sr, Se e Si no titânio que visam melhorar a biocompatibilidade do material, muitos outros, tais como Zn, Cu, Ga e Ag têm sido utilizados com o intuito de promover ação bactericida à superfície^{58, 72}.

Existem diversos métodos que promovem modificações na superfície do Ti. Esses métodos visam alterar a topografia no que diz respeito à morfologia, composição química e estrutura, de modo a melhorar suas propriedades físico-químicas, favorecendo sua interação com o meio e prolongando a vida útil do material. Entretanto, ainda não é possível estudar a influência dessas alterações separadamente de modo a quantificar qual fornece maior benefício sobre a osseointegração⁷³.

Estas propriedades, dentre outros papéis, definem a capacidade do implante em adsorver proteínas e, conseqüentemente, determinam quais reações biológicas advirão, ou não, promovendo uma integração do implante aos tecidos adjacentes. Isso explica porque tantas pesquisas são realizadas para otimização de implantes ortopédicos e dentários⁷⁴.

1.5. Anodização, oxidação por micro-arco (MAO), recobrimentos e deposições

Conforme visto previamente, são as características da camada de óxido que se forma sobre o titânio, tais como cristalinidade, composição, rugosidade, espessura e morfologia que regulam a formação óssea ao redor do implante^{72, 75}. Existe um grande número de técnicas e tratamentos usados na modificação de superfícies de implantes com a finalidade de selecionar as características de interesse. Entre estas, encontram-se: a microusinagem, o polimento mecânico, o jateamento, a pulverização com plasma, a implantação iônica, o ataque químico e diversas técnicas de revestimento, sendo as mais utilizadas: deposição química ou física em fase vapor, aspersão térmica, oxidação térmica e oxidação eletroquímica (anodização)^{52, 76}.

A anodização tem se sobressaído pois possibilita, através da manipulação dos parâmetros utilizados, um maior controle sobre o espessamento, composição, morfologia e estrutura da camada de óxido formada⁷⁷. Vários estudos foram realizados para analisar a melhora na resistência à corrosão e na osseointegração do Ti cp anodizado e notou-se uma melhora em ambos parâmetros^{67, 78}.

Resumidamente, a anodização consiste no crescimento controlado de um filme de óxido em um componente metálico ligado ao polo positivo de uma célula eletroquímica⁵⁹. Essa camada de óxido apresenta altos valores de calor de formação, ponto de fusão, ponto de ebulição, energia reticular e condutividade elétrica. Estas características indicam uma forte coesão desses óxidos, além da estabilidade física, química, térmica e elétrica^{79, 80}.

Investigações sobre as condições de anodização foram estudadas por vários autores indicando que o mecanismo e a taxa de crescimento do filme de óxido de Ti, conseqüentemente suas propriedades, são fortemente dependentes da natureza e da concentração do eletrólito, da temperatura, do tempo de anodização, do tipo e velocidade da agitação, das razões entre as áreas do catodo e anodo, do pré-tratamento da amostra e dos parâmetros utilizados no processo, como, por exemplo, valor da densidade de corrente ou potencial aplicado^{81, 82}.

O óxido de Ti apresenta uma alta aderência ao metal⁸². Sua espessura é estimada pela taxa de anodização, que tipicamente assume valores entre 2,0 a 2,5 nm

V^{-1} (⁸³). Nesse processo o crescimento do óxido ocorre sob um alto campo elétrico ϵ (de 10^6 a 10^7 $V\text{ cm}^{-1}$) onde a densidade de corrente j é descrita pela Equação 1, sendo A e β constantes inerentes aos materiais⁸⁴.

$$j = A \exp(\beta \epsilon) \quad (1)$$

Quando a anodização é realizada a baixo potencial ou a baixa densidade de corrente, verifica-se a formação de um filme de óxido colorido que não apresenta muitas imperfeições⁸⁵. Por outro lado, se este processo é realizado a altos potenciais, acima do potencial de ruptura do óxido, tem-se um intenso desprendimento de O_2 e frequentemente observa-se a presença de faíscas; este procedimento é denominado oxidação por micro-arco (MAO)⁸².

O filme de óxido formado por MAO é espesso (maior que $1\ \mu\text{m}$) e devido a presença de descargas elétricas durante o processo a morfologia dessa superfície se torna muito rugosa e porosa. Esse procedimento de anodização vem sendo amplamente estudado, pois é eficiente no aumento da resistência à corrosão^{86, 87}. Além disso, esta superfície com alta rugosidade e porosidade pode ser favorável à deposição de materiais que melhoram sua biocompatibilidade⁸⁸ como a hidroxiapatita^{89, 90}, o boro⁷⁰, o estrôncio⁷¹ dentre outros⁹¹; ou ainda, a fármacos, tais como antiinflamatórios^{61, 92}, analgésicos⁶³ antibióticos⁹³; e, por fim, a elementos metálicos antimicrobianos, tais como: cobre, zinco e prata^{94, 95}.

A MAO também tem sido utilizada com sucesso na formação de filmes de TiO_2 com morfologia altamente porosa, com a incorporação de cálcio e fosfato durante o processo de oxidação nessas superfícies ^{96, 97}.

A anodização leva à formação de óxidos com estruturas amorfas, cristalinas, ou parcialmente cristalinas⁹⁸. O uso de potenciais baixos a moderados na anodização geralmente produz óxidos amorfos. Contudo, altos potenciais, usados na MAO, favorece estruturas cristalinas (rutilo, anatase e bruquita)⁹⁹. Dentre as estruturas cristalinas, a anatase é possivelmente a de maior interesse na área médica, pois em determinadas condições promove atividade antimicrobiana^{100, 101}.

Apesar da anodização fornecer resultados promissores, a maioria dos procedimentos utilizados fazem uso de eletrólitos com concentrações elevadas de ácidos ou bases fortes^{102, 103}, tornando o processo de segregação e tratamento de resíduos um problema. Portanto, para o presente trabalho pretende-se fazer uso de eletrólitos alternativos que não sejam tóxicos e não necessitem de tratamento para descarte.

Além disso, mesmo com os avanços na área médica, os implantes continuam apresentando um elevado número de falhas. As principais causas destas falhas são decorrentes de infecção bacteriana, inflamação, perda óssea e má cicatrização óssea^{104, 105}. Em se tratando de dispositivos implantáveis, um problema típico e muito grave diz respeito à formação de biofilmes de bactérias em sua superfície⁵⁸. Biofilmes consistem em agregados complexos de bactérias, geralmente fixados em uma superfície sólida. Nesta forma as bactérias são muito mais resistentes à ação de antibióticos que em sua forma planctônica¹⁰⁶.

Este cenário é tão alarmante que, de acordo com Shi et al. (2018), o CDC estimou que até 2050 mais mortes serão resultantes de infecções do que todos os cânceres combinados¹⁰⁷. Outro dado preocupante diz respeito à taxa de infecção em implantes dentários e peri-implantites que ainda é altíssima, atingindo cerca de 14% dos pacientes³³. Só nos EUA estima-se, extraoficialmente, que mais de 94 bilhões de dólares são gastos anualmente com infecções decorrentes de biofilmes, gerando cerca de meio milhão de mortes^{108, 109}. Este cenário mais que justifica a intensa pesquisa em estratégias para modificação de superfície que visam a redução de infecções bacterianas³³.

Embora exista um crescente esforço na tentativa de se inibir a colonização por patógenos em biomateriais de modo a produzir implantes otimizados que garantam uma funcionalidade ideal a longo prazo, frequentemente as alterações realizadas diminuem o desempenho destes materiais. Portanto, idealmente, um implante deve desestimular a fixação de bactérias e não afetar as funções das células eucarióticas, ou ainda, se possível, induzir uma resposta positiva nas mesmas^{33, 34}.

Em 1987, Anthony G. Gristina publicou um artigo de revisão na revista *Science* onde analisou a relação entre a colonização antimicrobiana em biomateriais e a integração celular nestas mesmas superfícies. Ele sugeriu que o destino da superfície de um implante fica sujeito a uma “corrida pela superfície” na qual, se a superfície for ocupada primeiramente por células teciduais, estas se proliferam rapidamente e

promovem uma defesa da superfície contra colônias de bactérias. Por outro lado, se as bactérias vencem esta corrida, logo sucede a formação de biofilmes e uma infecção é instalada, comprometendo a osseointegração desse implante¹¹⁰.

Mais recentemente, o grupo de pesquisa de Carlos Mas-Moruno concluiu que as bactérias e células eucarióticas não apenas competem na corrida pela superfície, mas também batalham por ela; portanto, concluíram que esta relação entre superfície, bactérias e células eucarióticas é melhor definida como “luta pela superfície”^{33, 111}.

Anthony G. Gristina (1987) ainda reportou que as bactérias são organismos muito antigos e altamente adaptáveis e apesar de biomateriais serem novos, para época, eles imitam substratos básicos nos quais as bactérias, e não células teciduais, já possuíam estratégias de colonização e sobrevivência. Por isso, modificações de superfícies são tão importantes¹¹⁰.

Rotineiramente, buscando a prevenção de infecção pela inserção de um implante, o paciente é medicado, durante a cirurgia e por dias posteriores, com altas doses de antibióticos por via intravenosa e/ou oral³⁴. Entretanto, tratamentos farmacológicos, independente da via de administração possuem limitações, dentre estas, baixa solubilidade do fármaco, má distribuição no organismo, falta de seletividade, farmacocinética não controlada e efeitos adversos graves em tecidos não-alvo⁷⁶. Além disso, este tratamento frequentemente é ineficaz devido à pouca vascularização nas proximidades do dispositivo implantado¹¹².

A ineficiência na eliminação das bactérias a curto período leva a uma infecção crônica na forma de biofilmes bacterianos quiescentes que ficam aderidos à superfície dos implantes¹¹³. Inicialmente, acontece a contaminação do implante por bactérias planctônicas que após se fixarem na superfície, desencadeiam um processo de proliferação e formação destes biofilmes³³. Na forma quiescentes, as bactérias são menos susceptíveis à ação de antibióticos; além disso, estes biofilmes agem como barreira ao antibiótico e, portanto, muitas vezes, para se obter o efeito desejado são utilizadas dosagens até mil vezes maiores de antibióticos que o indicado^{113, 114}.

Estas infecções causadas por implantes levam a sérios problemas de saúde e a uma redução significativa na qualidade de vida dos pacientes³³. Quando esta questão não é contornada a remoção ou substituição do implante é necessária, gerando altos

custos e mais desconforto ao paciente⁵⁸. Em casos severos pode acontecer o espalhamento da infecção levando a morte do paciente³³.

A liberação local controlada de fármacos vem sendo empregada para resolver este problema, por exemplo, utilizam-se cimento ósseo carregado com antibiótico. Este método reduz a concentração de bactérias ou impede sua aderência à superfície do implante⁷⁶. Todavia, impossibilita a previsão da liberação do antibiótico¹¹⁵. Diversos polímeros podem ser utilizados para liberação controlada de fármacos^{112, 116}.

Estudos realizados por Giglio et al. (2011), utilizando dois hidrogéis poliacrílicos eletrossintetizados – poli(2-hidroxietil metacrilato) e o copolímero formado por poli(etileno glicol diacrilato) e ácido acrílico – com a adição do antibiótico ciprofloxacino, sugeriram que o uso deste material no recobrimento de implantes ortopédicos poderia prevenir infecções bacterianas sem afetar sua interação com os osteoblastos¹¹². Gulati et al. (2012) estudaram um sistema de liberação controlada do anti-inflamatório indometacina através de nanotubos de TiO₂ recobertos por um filme do polímero quitosana e poli (ácido lático-co-ácido glicólico). Também foram analisadas a adesão e a proliferação de osteoblastos sobre esta superfície. Os resultados obtidos foram promissores e permitiram concluir que o sistema poderia ser aplicado com sucesso em implantes de diferentes materiais (Ti, ligas de Ti e aço inoxidável) e para diferentes fármacos, incluindo anabólicos⁷⁶. Um campo que vem ganhando força nessa área é o uso de nanofibras poliméricas¹¹⁷, que será abordado na seção 1.7.

Apesar da eficácia da liberação local controlada de fármacos, essa terapia é restringida pela sensibilidade de espécies de bactérias ao antibiótico utilizado¹¹⁸. Além disso, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, quer seja para ação terapêutica, quer para outros fins, como, por exemplo, descontaminação de ambientes, um grande número de bactérias resistentes tem surgido¹¹⁹. Isso tem se tornado um grande problema em saúde pública, o que torna a busca por alternativas aos antibióticos imprescindível¹⁰⁷.

Como já referido anteriormente, elementos inorgânicos como Zn, Cu, Ga e Ag têm sido utilizados com sucesso como agentes antimicrobianos em superfícies de Ti. Dentre estes, destaca-se a prata, por seu vasto uso na sociedade ao longo dos séculos devido a seu alto potencial antimicrobiano³⁴.

Um estudo de revisão realizado por Mi et al. (2018) apontou que o uso de nanopartículas de óxidos, metais e nanopartículas lipídicas sólidas também vem sendo

cada vez mais explorado como uma alternativa ao tratamento de rotina de infecções. Esses materiais são utilizados tanto como antimicrobianos em si, como em ação conjugada com antibióticos já existente de modo a potencializar seu efeito⁵⁸.

Dentre estes materiais, o uso de nanopartículas de prata (NpAg) é promissor graças a seu amplo espectro de ação¹¹⁹. Alguns trabalhos sugerem que as bactérias não são capazes de criar resistência a estas nanopartículas. Portanto, NpAg são agentes antimicrobianos muito mais eficientes que antibióticos e, ademais, além de atingirem uma ampla faixa de bactérias também são efetivas contra vírus e fungos, tendo assim uma ação mais ampla¹¹⁶. Outro ponto positivo é que estas nanopartículas são capazes de difundirem através de biofilmes de bactérias já formados¹²⁰.

Alguns estudos foram realizados fazendo o uso da anodização por MAO do Ti usando eletrólitos que continham precursores de P, Ca e Ag^{88, 95, 121}. Apesar destes materiais terem exibido boa resposta antimicrobiana para *S. aureus* boa parte da Ag foi incorporada dentro da camada de óxido de Ti e, portanto, não colaboraram para o resultado alcançado.

Outros autores realizaram a deposição de NpAg pós anodização por MAO e, desse modo, toda Ag depositada estava acessível. Obtiveram excelentes resultados em relação à atividade antimicrobiana destes materiais frente a alguns tipos de bactérias: *S. aureus*, *S. aureus* resistente a metilina, *S. epidermidis* e *E. coli*. Ademais, constatou-se, por testes celulares in vitro ou testes in vivo, que as NpAg ou não exprimiram resposta diferente do controle, Ti sem Ag, ou exibiram alguma alteração apenas nos períodos iniciais¹²²⁻¹²⁴.

Dessa forma, devido à grande aplicabilidade dos dispositivos implantáveis a base de titânio recobertos por TiO₂ e considerando que a infecção e o afrouxamento asséptico são as principais causas de falha destes implantes, torna-se importante aprimorar a superfície deste material para que haja uma redução destas falhas.

1.6. Nanopartículas de prata - NpAg

De acordo com a norma ISO/TS 80004-2:2015, nanopartículas correspondem a um aglomerado de átomos que formando uma partícula deve possuir ao menos uma de suas dimensões na faixa entre 1 a 100 nanômetros¹²⁵. Até 2013 existiam

mais de 1800 produtos de consumo em escala nano no mundo. Destes, a maior parte, 24 % (435 produtos), estavam relacionados a nanopartículas de prata (NpAg)¹²⁶.

NpAg vêm sendo amplamente utilizadas em diversas áreas por suas propriedades físicas e químicas peculiares que incluem pequeno tamanho, grande área superficial, cristalinidade e por exibirem propriedades ópticas únicas. Comercialmente são muito utilizadas em embalagens de alimentos, indústrias têxteis, filtros, tratamento de água, sabonetes, detergentes, pastas de dente, desinfecção de dispositivos médicos, catalisadores e várias aplicações ambientais¹²⁷.

Nas aplicações biomédicas tem ganhado destaque devido a sua notável atividade antimicrobiana. Dentre estas aplicações encontram-se o uso em curativos, recobrimento de dispositivos implantáveis, cateteres e instrumentos cirúrgicos, imagiologia médica e liberação controlada de medicamentos^{128, 129}.

Ainda que as NpAg sejam tóxicas para ambos os seres, procariontes e eucariontes, nos seres procariontes sua dose letal é geralmente muito menor. Por exemplo, a LD₅₀ (dose necessária de um composto matar pelo menos 50% da população de interesse) para a bactéria *E. coli* é de pelo menos uma ordem de magnitude menor que para hepatócitos. Ademais, a toxicidade de NpAg em humanos é sempre menor, visto que as barreiras biológicas limitam sua distribuição e penetração no organismo¹³⁰.

Além disso, a toxicidade das NpAg depende de sua concentração e do tempo de exposição das células a elas. Existem várias evidências sobre o mecanismo de ação das NpAg em diversas culturas de células. Estes estudos sugerem que as NpAg podem diminuir a viabilidade celular, aumentar o estresse oxidativo, causar danos ao DNA, induzir respostas inflamatórias, alterar a função das mitocôndrias, etc.¹³¹

Estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a toxicidade das NpAg com relação a sua composição, tamanho e forma têm sido amplamente realizados, porém ainda não se tem uma consistência nos resultados obtidos¹³¹. Geng et al. (2017) realizaram um estudo *in vivo*, em ratos, e constataram que a prata iônica provida da dissolução de NpAg reage com o enxofre disponível no meio formando nanopartículas de Ag₂S, que são muito menos tóxicas que as NpAg¹³². Estudos recentes demonstraram que quando as NpAg são imobilizadas na superfície do Ti confere a este boa osteocondutividade, excelente atividade antimicrobiana e ausência de toxicidade^{132, 133}.

Apesar de haver divergências na literatura, acredita-se que a toxicidade das NpAg é similar à da prata volumétrica (“bulk”), e que sua atividade antimicrobiana ocorre por sua dissociação em sua forma iônica^{134, 135}. Outros estudos apontam que a toxicidade da prata independe de seu tamanho¹³⁶ e depende da carga da superfície¹³⁷. Entretanto, alguns autores relatam que o tamanho das NpAg é sim uma variável importante no quesito toxicidade¹³¹. De acordo com Morones et al. (2005), a atividade antimicrobiana das NpAg são dependentes do tamanho, onde, partículas com diâmetro entre 1 e 10 nanômetros demonstraram maior eficiência que partículas maiores¹³⁸.

Wang et al. (2014) realizaram um estudo demonstrando o efeito da solubilidade e do tipo de recobrimento de NpAg em relação à toxicidade celular através do uso de partículas de 20 e 110 nm, recobertas com polivinilpirrolidona (P) ou com citrato (C). As partículas de 20 nm foram mais tóxicas em ambos os recobrimentos. Estes autores relataram que partículas menores exibem uma taxa de dissolução maior e, conseqüentemente, uma maior biodisponibilidade de prata iônica ao meio (FIGURA 2). Ainda neste estudo, as partículas de 110 nm recobertas com citrato (C110) apresentaram maior citotoxicidade que as partículas do mesmo tamanho recobertas com polivinilpirrolidona (P110), o que foi atribuído à habilidade de P complexar-se com a prata iônica dissolvida no meio¹³⁹. Em um estudo desenvolvido por Haase et al. (2017) utilizando partículas de 50 e 100 nm, recobertas com P ou C, foram encontrados resultados semelhantes. Portanto, tanto o tamanho da partícula quanto o tipo de recobrimento podem afetar a citotoxicidade celular¹⁴⁰.

O organismo é um sistema extremamente complexo que não pode ser mimetizado por experiências *in vitro*. Desse modo, apesar de muitos testes *in vitro* terem demonstrado uma alta toxicidade das NpAg, vários experimentos *in vivo* demonstraram que as NpAg não apresentam uma toxicidade significativa^{141, 142}.

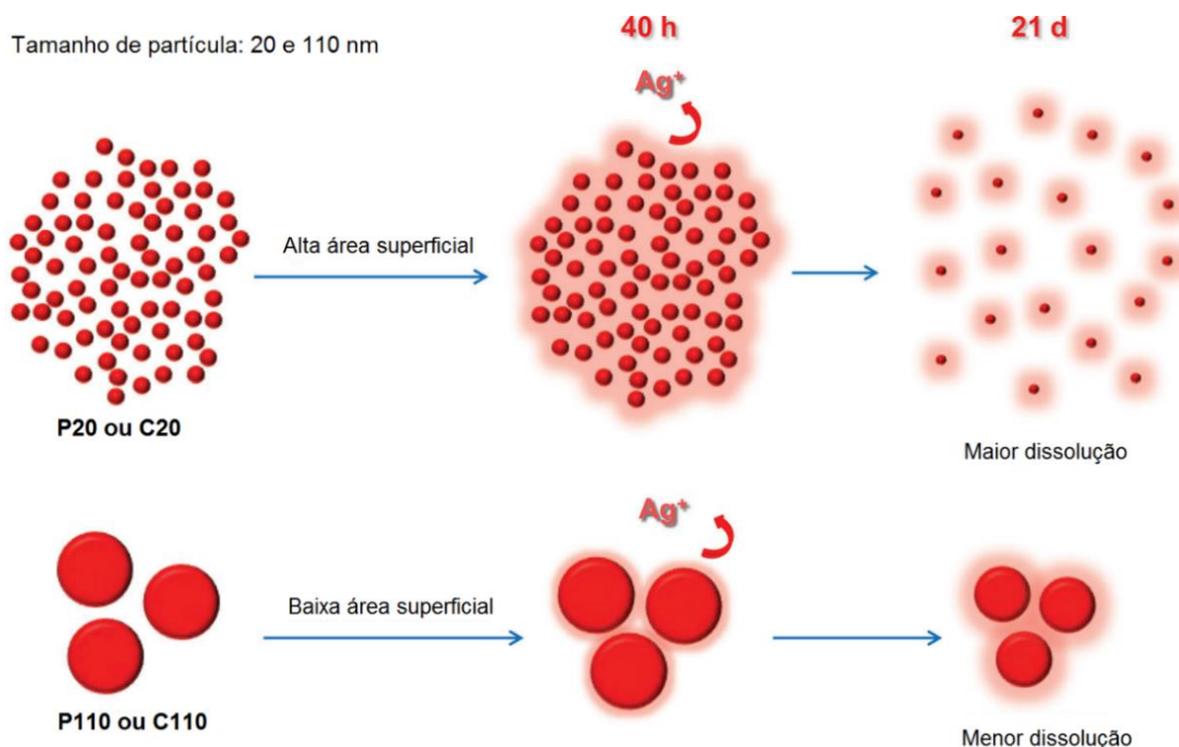


FIGURA 2 - Efeito do tamanho de partículas na dissolução das NpAg¹³⁹.

Alguns estudos sugerem que a toxicidade da prata é reduzida quando são utilizadas na forma de nanopartículas e não na iônica, pois o mecanismo de liberação de íons torna-se muito mais lento já que a prata é oxidada apenas parcialmente^{131, 143}.

Kim et al. (2007) realizaram um estudo de toxicidade de NpAg em *S. aureus* e *E. coli* e observaram que *S. aureus* foi mais susceptível às NpAg. Segundo estes autores NpAg não são partículas neutras, e dependendo sua carga superficial, positiva ou negativa, estas desencadearão uma resposta específica nos micro-organismos analisados. As NpAg deste estudo eram positivamente carregadas e, portanto, tiveram maior interação pelos lipossacarídeos negativamente carregados das *E. coli*¹⁴⁴.

Em um estudo realizado por Qin et al. (2017), tanto as NpAg quanto a prata iônica (Ag⁺) não exibiram efeitos tóxicos em ratos quando administradas em uma dosagem de 1 mg kg⁻¹. Ademais, a quantidade de prata acumulada em órgãos foi significativamente menor para ratos tratados com NpAg em relação aos tratados com solução de AgNO₃¹⁴¹. Braeuning et al. (2018) demonstraram resultados semelhantes, onde a quantidade de prata acumulada em órgãos dos ratos tratados com NpAg foi bem menor que os tratados com solução de AgNO₃¹⁴². Veronesi et al. (2016) também

relataram menor toxicidade das NpAg em relação à solução de AgNO_3 . Estes autores justificaram que a liberação mais lenta de íons de prata pelas NpAg permite que os hepatócitos consigam quelar o excesso de íons Ag^+ tornando-os mais tolerantes às NpAg¹⁴⁵.

A toxicidade das NpAg está relacionada à absorção destas pelas células ou por danos gerados na célula devido ao aumento da concentração de íons de prata pela dissolução dessas partículas¹⁴⁶. Entretanto, o mecanismo de ação da NpAg ainda é controverso, e ainda não se tem um consenso sobre a que se deve sua atividade antimicrobiana, se às NpAg em si ou devido à liberação de íons a partir destas^{147, 148}.

Acredita-se que sua toxicidade esteja ligada à sua interação com a membrana celular (gerando rompimento da membrana); com o DNA (tanto as NpAg quanto os íons liberados por estas podem interromper a produção de ATP e a replicação do DNA); com as proteínas presentes nas membranas (NpAg e Ag^+ podem afetar a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, geram vazamento de citoplasma e morte celular); e pela formação de espécies reativas ao oxigênio, como ilustrado na FIGURA 3¹⁴⁹.

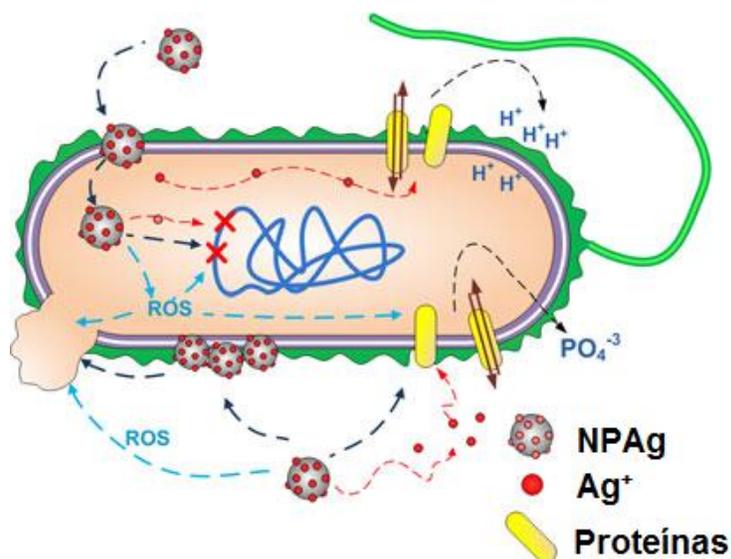


FIGURA 3 – Representação ilustrativa do mecanismo de ação da Ag em procariontes. Adaptado¹⁴⁹.

Xiu et al. (2012) realizaram experimentos em condições anaeróbicas na tentativa de sanar a questão do mecanismo de ação da atividade antimicrobiana da prata. Em seu trabalho utilizaram NpAg recobertas com poli(etileno glicol) (PEG) e com polivinilpirrolidona (PVP)¹⁴⁸. A dissolução da prata em meio aquoso aerado é uma oxidação que envolve prótons e oxigênio dissolvido, vide Equações 2 e 3:



Desse modo, na ausência de O_2 a dissolução das nanopartículas foi evitada e a toxicidade destas puderam ser estudadas sem a influência da prata iônica. Nestas condições as NpAg não apresentaram atividade antimicrobiana. Sendo assim, as propriedades como tamanho, forma, área superficial, recobrimentos e carga superficial das NpAg afetam indiretamente sua toxicidade, através da manipulação da taxa de dissolução^{143, 148}. Resultados de outros artigos corroboram com estes, demonstrando que a citotoxicidade das NpAg ocorre através de sua dissolução após endocitose celular^{130, 145, 150}.

A funcionalização das NpAg com o polímero PEG (poli(etileno glicol)) ou com a proteína BSA (Albumina do Soro Bovino) são uma alternativa efetiva na redução da toxicidade dessas nanopartículas, entretanto, isto faz com que elas percam suas características originais¹³¹. Outros artigos utilizando o polímero poli(ácido láctico) (PLA) mostram resultados semelhantes¹⁵¹⁻¹⁵³.

Segundo Godoy et al. (2015), a placa dentária é um biofilme que causa a cárie, gengivite e periodontites. Na maioria dos estudos analisa-se a atividade antimicrobiana, de superfícies tratadas, em testes *in vitro* com biofilmes formados por apenas um micro-organismo, entretanto, biofilmes formados na cavidade oral envolvem a participação de mais de 700 espécies de bactéria. Desse modo, tentando se aproximar de um modelo mais realista estes autores utilizaram um biofilme obtido pela placa dentária de um voluntário para avaliar a atividade antimicrobiana de 5 tipos de recobrimentos de Ti, em relação ao Ti não tratado. O tratamento com eletrodeposição de prata foi o que mostrou maior atividade antimicrobiana¹⁵⁴.

Apesar da atividade antimicrobiana da prata ser bem consolidada na literatura, já existem trabalhos que relatam a resistência de bactérias a ela, entretanto, o mecanismo para este processo ainda é incerto^{134, 155}. Xiu et al. (2012) também relataram que concentrações subletais da prata podem levar ao efeito hormese para *E. coli*¹⁴⁸. Na hormese baixa concentração do composto de interesse promove efeito contrário ao esperado¹⁵⁶.

De acordo com Natsuki et al. (2015) o custo e a facilidade da síntese de nanopartículas são tão importantes quanto às nanopartículas em si¹²⁹. A produção de nanopartículas pode ser realizada a partir de diversas rotas físicas, químicas e biológicas de síntese, que podem ser divididas em duas categorias fundamentais: *top-down* e *bottom-up* (FIGURA 4). No método *top-down* o material (em escala macrométrica) é quebrado, moído ou fatiado até atingir a escala nano. Uma das vantagens desse método é a produção de grande quantidade de material em pouco tempo. Já no *bottom-up*, átomos se ligam formando moléculas e, por conseguinte, nanopartículas. Sua principal vantagem é a produção de nanopartículas mais homogêneas e superfícies perfeitas¹²⁷.

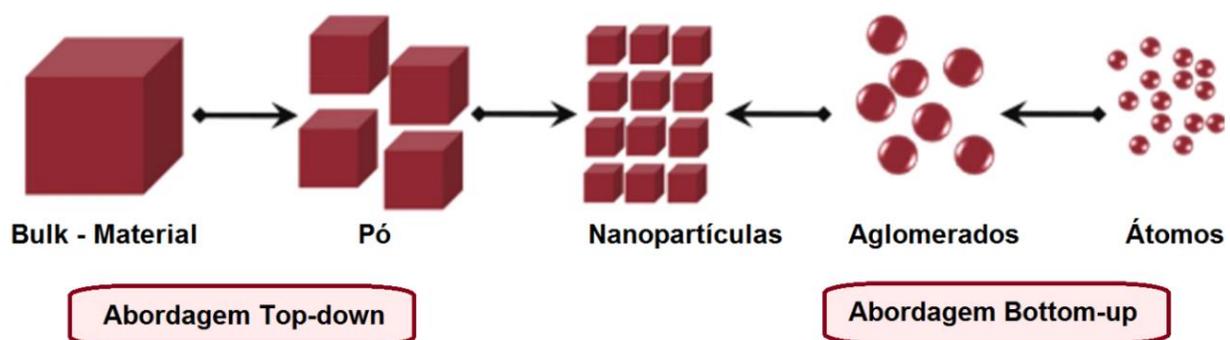


FIGURA 4 – Tipos de abordagem de sínteses de nanopartículas: top-down e bottom-up. Adaptado¹²⁷.

O uso da prata como agente antimicrobiano na área biomédica é bem estabelecido, e muitos são os materiais comerciais que fazem uso dessa propriedade. Entretanto, apesar do vasto estudo na área, até o presente momento ainda não são produzidos implantes dentários comerciais com esta propriedade.

1.7. Eletrofiação e o uso do polímero poli (ácido lático) - PLA

Nanofibras produzidas por eletrofiação, por suas propriedades como alta área superficial em relação ao volume e alta porosidade, têm sido cotadas para aplicação em sistemas de filtração, sensores químicos e ópticos, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas, armazenamento de energia, carreadores de enzimas e liberação de fármacos^{117, 157}.

A eletrofiação é um método simples e versátil. Ocorre pela aplicação de um campo elétrico entre a agulha de uma seringa, que contém a solução polimérica desejada e um coletor para deposição das nanofibras. Após a aplicação do campo, uma gota cônica da solução é formada na ponta da agulha. Quando as forças elétricas superam a força oriunda da gota um jato polimérico é formado e atraído pelo coletor (FIGURA 5), neste processo ocorre simultaneamente a evaporação do solvente¹¹⁷.

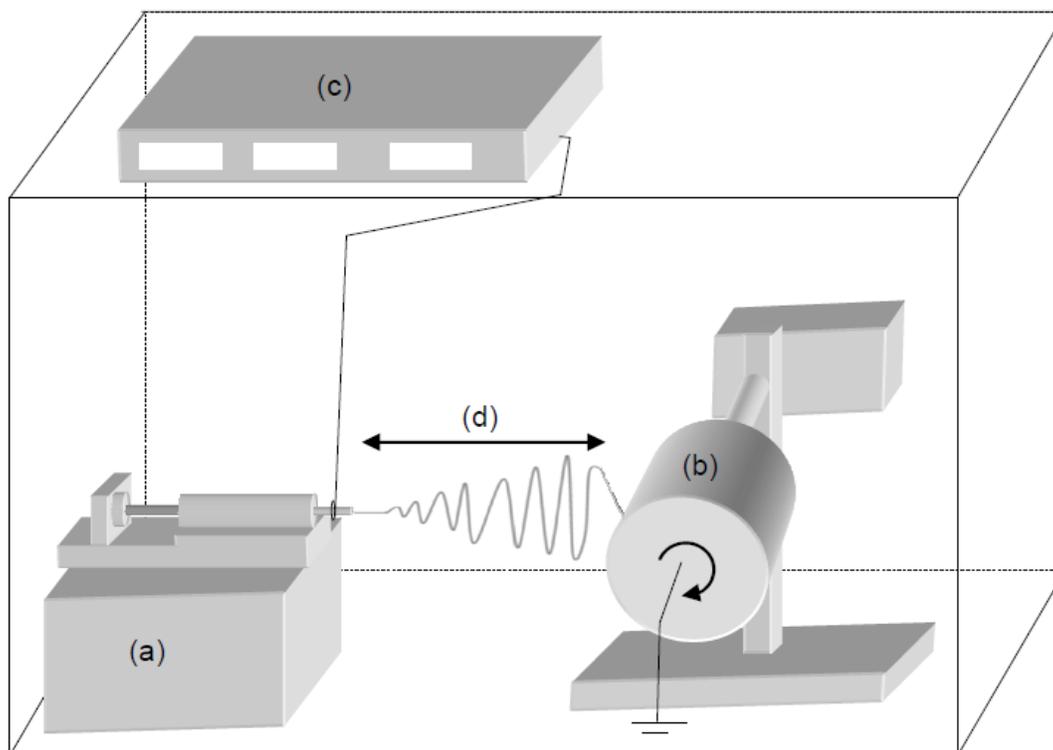


FIGURA 5 - Sistema de eletrofiação e seus componentes. a) bomba seringa, b) coletor aterrado, c) fonte de alta tensão e d) distância de trabalho. Adaptado¹⁵⁸.

A morfologia e o diâmetro das nanofibras obtidas dependem principalmente de 3 parâmetros operacionais: 1) propriedades da solução: viscosidade, tensão superficial, condutividade, concentração do polímero, e solvente utilizado; 2) parâmetros do processo: potencial, campo elétrico, distância entre a agulha e o coletor, fluxo da solução e diâmetro da agulha; 3) condições ambientais: umidade, pressão e temperatura^{117, 157}.

Muitos polímeros têm sido aplicados em recobrimentos de superfície de Ti com diferentes propósitos. Alguns destes possuem atividade antimicrobiana, como o polipirrol¹⁵⁹ e o poli(etileno glicol)¹⁶⁰, outros são utilizados como carreadores de fármacos como a quitosana (também possui atividade antimicrobiana)⁹³, poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA)¹⁶¹ e poli(ácido lático) (PLA)¹⁶².

Em revestimentos por eletrofiação existem mais de 100 diferentes tipos de polímeros (naturais ou sintéticos). Vários têm sido amplamente utilizados na engenharia¹¹⁷. Dentre estes o PLA tem se destacado por suas propriedades e baixo custo de produção (FIGURA 6). Monômeros de PLA geralmente são produzidos pelo processamento do ácido lático que, por sua vez, pode ser obtido a partir de recursos renováveis como o amido de milho, cana-de-açúcar, beterraba e resíduo de biomassa¹⁶³. O ácido lático também pode ser produzido sinteticamente¹⁶⁴.

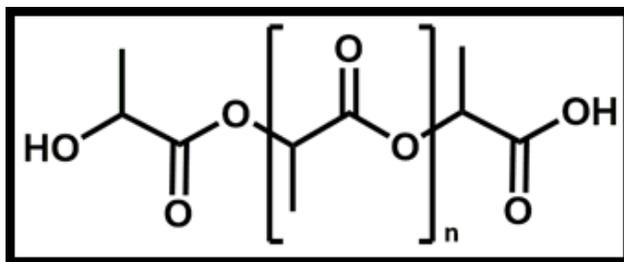


FIGURA 6 – Unidade estrutural do polímero poli (ácido lático) - PLA.

Polímeros naturais geralmente apresentam inconvenientes como altos custos, baixa reprodutibilidade e pureza questionável. No entanto, o PLA é um polímero sintético, que pode ser facilmente produzido a baixo custo^{164, 165}. Além disso, por ser um polímero comercial de base biológica, biodegradável, biocompatível, biorreabsorvível, compostável, não-tóxico e com algumas propriedades mecânicas desejáveis, é considerado o substituto mais promissor para polímeros derivados do petróleo. Um ponto

negativo desse material é que possui baixa tenacidade, baixa resistência mecânica e alta fragilidade¹⁶³.

Em relação à produção de nanofibras de PLA, Gu et al. (2005) investigaram o efeito da concentração do polímero e dos parâmetros do processo, como campo elétrico, fluxo e distância entre agulha e coletor, na morfologia da nanofibra. Esses autores concluíram que para a obtenção de nanofibras com diâmetros mais uniformes é necessário o uso de concentrações mais elevadas do polímero e aplicação de altos potenciais¹⁶⁶.

A utilização da eletrofiação para produção de nanofibras de PLA com ou sem aditivos tem sido promissora em aplicações biomédicas, e existem diversos trabalhos publicados nesta área consolidando sua eficiência¹⁵¹⁻¹⁵³. Por exemplo, Chen et al. (2016) desenvolveram *scaffolds* de nanofibras produzidas pela eletrofiação de uma solução de PLA e gelatina para regeneração de cartilagem. O material foi testado *in vitro* em condrócitos e *in vivo* por meio de um modelo de lesão de cartilagem articular em coelhos. Estes dispositivos apresentaram excelente citocompatibilidade e altas taxas de reabsorção¹⁶⁷.

No presente trabalho buscou-se a obtenção de superfícies altamente porosas de óxido de titânio sobre Ti através da técnica de oxidação por micro-arco, seguida de uma deposição de prata nessa estrutura. Como a prata pode exercer uma certa toxicidade celular optou-se por realizar a deposição de uma camada de PLA sobre Ti/TiO₂/Ag, com a finalidade de minimizar o contato direto dessa superfície com as células e de obter-se uma liberação controlada dos íons de prata.

2. Objetivos

Considerando o atual cenário brasileiro, com o aumento da longevidade e os constantes acidentes, os problemas de saúde bucal, principalmente aqueles relacionados à perda dentária só tendem a aumentar. Com isso, surge a necessidade de se criar novos dispositivos implantáveis que atendam melhor as exigências dessa demanda.

O titânio, por suas propriedades, é geralmente o material de primeira escolha para uso em implantes. Um grande esforço vem sendo realizado com o intuito de se aprimorar as propriedades superficiais do material, entretanto, ainda há muitas falhas de implantes decorrentes de infecção bacteriana. Já foram propostas algumas soluções para este problema, porém ainda é questionável qual o melhor caminho para sanar tal questão. Dentro deste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi modificar a superfície de Ti através da oxidação por micro-arco (MAO) para obtenção de óxidos altamente porosos com inserção de cálcio e fósforo, e sobre esta superfície depositar Ag e recobrir com nanofibras de poli (ácido lático) - PLA, de modo a formar um biomaterial resistente à ação de agentes nocivos, com o mínimo de efeitos adversos no organismo e com boa biocompatibilidade.

Além disso, os objetivos específicos foram:

- Otimizar a anodização do Ti por MAO utilizando eletrólitos não tóxicos e precursores de cálcio e fósforo, visando um menor risco ao manipulador, minimizando a geração de resíduos e promovendo a produção de uma superfície com morfologia e composição química adequadas para uso em implantes;
- Sintetizar nanopartículas de prata (NpAg) por um método simples que fosse reprodutível e estável, e caracterizá-las;
- Realizar caracterizações morfológicas, estruturais, de biocompatibilidade e de atividade antimicrobiana dos sistemas: titânio comercialmente puro polido (Ti cp), titânio anodizado via MAO (Ti/TiO₂), titânio anodizado com deposição de Ag (Ti/TiO₂/Ag) e titânio anodizado com deposição de prata e recobrimento polimérico (Ti/TiO₂/Ag/PLA).

3. Metodologia

Na presente seção serão exibidos o método de preparação dos eletrodos de Ti e as soluções utilizadas. Ademais, serão apresentadas as metodologias utilizadas para as modificações de superfície do Ti cp e de síntese de NpAg. Também serão descritas as principais técnicas utilizadas para as caracterizações das NpAg, e das superfícies: Ti cp, Ti/TiO₂, Ti/TiO₂/Ag e Ti/TiO₂/Ag/PLA.

3.1. Eletrodos, célula eletroquímica e soluções

Os eletrodos e a célula eletroquímica utilizados neste trabalho foram confeccionados nas oficinas de vidraria e mecânica do Departamento de Química da UFSCar.

3.1.1. Eletrodos

Os eletrodos de trabalho foram construídos a partir de uma chapa de Ti cp com espessura de 2 mm, procedente da Titanews (pureza >90%). Discos de Ti com 12,6 mm de diâmetro foram cortados por eletroerosão. Na sequência, estes discos foram mecanicamente polidos (lixa 320), embutidos em resina (poliéster) de cura lenta deixando uma área geométrica de 1,25 cm² (vide FIGURA 7), novamente polidos (lixas 320, 400 e 600, nessa ordem) e lavados com água deionizada.

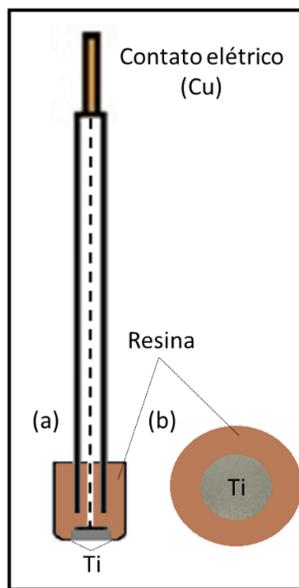


FIGURA 7 - Imagem ilustrativa do eletrodo de trabalho de Ti cp utilizado na oxidação por MAO: (a) disco com 2 mm de espessura e 12,6 mm de diâmetro com contato elétrico embutido em resina e (b) visão da face inferior do eletrodo.

O contra-eletrodo utilizado foi fabricado com platina. Um fio de platina (Alfa Aesar, pureza 99,999%) foi modelado na forma de anéis, com área igual a 1,6 cm², soldado em um tudo de vidro e em uma haste de cobre, usada para o contato externo (FIGURA 8).

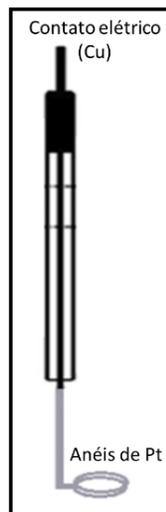


FIGURA 8 - Imagem ilustrativa do contra-eletrodo composto por anéis de platina (Pt) com contato elétrico de cobre (Cu), utilizado na anodização por MAO.

3.1.2. Célula eletroquímica

As anodizações via MAO foram realizadas utilizando-se uma célula de vidro convencional com uma tampa em Teflon[®] disposta de dois orifícios para a entrada dos eletrodos de trabalho e do contra-eletródo (FIGURA 9).

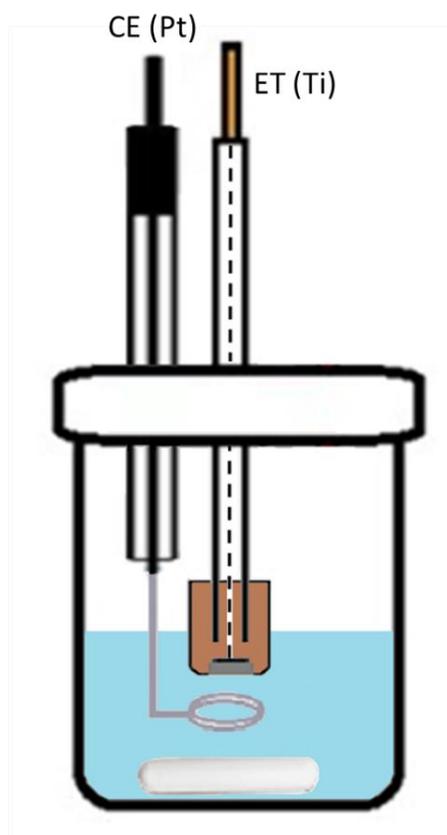


FIGURA 9 - Imagem ilustrativa da célula de vidro convencional utilizada nas anodizações por MAO e barra magnética utilizada para agitação. CE = contra-eletródo; ET = eletrodo de trabalho.

3.1.3. Soluções utilizadas

Para o preparo de todas as soluções aquosas, utilizou-se água destilada e deionizada providas através do equipamento MILLI-Q plus da MILLIPORE.

Os eletrólitos utilizados nas anodizações por MAO encontram-se listados na .

TABELA 4.

TABELA 4 - Soluções utilizadas para os processos de anodização do Ti cp por MAO.

Solução	Eletrólito	Concentração / mol L⁻¹
1	CH ₃ COOH	0,010 e 0,100
2	NaHCO ₃	0,010 e 0,500
3	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,100
	Na ₂ HPO ₄	0,001
4	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,060
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,200
5	CaHPO ₄	0,050
6	K ₃ PO ₄	0,100
7	K ₃ PO ₄	0,100
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,167
8	K ₃ PO ₄	0,100
	Ca(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,167
9	K ₃ PO ₄	0,100
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,167
	Ag(NO ₃)	0,003

As soluções poliméricas utilizadas no processo de obtenção das fibras de PLA foram preparadas pela dissolução do PLA (66.000 g mol⁻¹, procedente da Nature Works) em clorofórmio e dimetilformamida (DMF) (razão desses solventes 3:1 V/V), definindo-se uma concentração final de PLA de 10 e 14% m/m. Primeiramente adicionou-se o PLA em clorofórmio sob agitação magnética constante, a temperatura ambiente, até completa dissolução do polímero (tempo médio de 4 h). Em seguida adicionou-se DMF com a finalidade de promover cargas na solução polimérica que são imprescindíveis ao processo de eletrofiação (descrito adiante).

Além dessas soluções, para o estudo da liberação controlada de Ag utilizou-se uma solução tampão fosfato-salina (PBS), cuja composição está disposta na TABELA 5.

TABELA 5 - Composição e pH da solução tampão fosfato-salina (PBS).

Sal	Concentração / mmol L ⁻¹	pH
KH ₂ PO ₄	1,54	
NaCl	155,17	7,4
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2,71	

3.2. Oxidação por micro-arco – MAO

Os procedimentos de MAO foram realizados utilizando-se uma fonte de alta tensão da marca Tectrol (0-300 V e 0-1 A) conectada a um multímetro digital da marca Keithley modelo 2100 interfaceado a um microcomputador controlado pelo programa KI-TOOL, para aquisição e gerenciamento dos dados (para acompanhamento do perfil cronopotenciométrico do crescimento dos óxidos de Ti). Os eletrólitos e parâmetros estudados encontram-se dispostos na TABELA 6.

TABELA 6 - Condições investigadas para o processo de anodização do Ti cp por MAO.

Solução	Eletrólito	Concentração / mol L ⁻¹	Potencial / V	Tempo / min	Observação
1	CH ₃ COOH	0,010 e 0,100	300	1, 3 e 5	
2	NaHCO ₃	0,100 e 0,500	200		
3	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,100	250	1, 5 e 10	pH 5,0
	Na ₂ HPO ₄	0,001			
4	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,060	250	1	90 °C
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,200			
5	CaHPO ₄	0,050	250	1, 5 e 10	
6	K ₃ PO ₄	0,100		1	
7	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,167	250	1, 5 e 10	
8	Ca(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	0,167			
9	AgNO ₃	0,003			

3.3. Síntese de nanopartículas de prata (NpAg)

As NpAg foram sintetizadas pelo método de redução por borohidreto de sódio (NaBH₄). O nitrato de prata (AgNO₃) foi utilizado como precursor de Ag e o citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) como agente estabilizante. As concentrações e os volumes utilizados estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - Condições utilizadas na síntese de nanopartículas de prata (NpAg).

Reagente	Concentração / 10 ⁻² mol L ⁻¹	Volume / mL
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0,05	100
AgNO ₃	2,5	1
NaBH ₄	11	1

Em um kitasato de 250 mL foram adicionados 100 mL da solução de citrato de sódio e 1 mL da solução de AgNO₃. Esta solução foi mantida sob agitação constante, com o auxílio de um agitador magnético, em banho de gelo para que a temperatura

atingisse 0 °C, aproximadamente. Em seguida, foram gotejados 1,0 mL da solução de NaBH₄ a uma vazão de 0,5 mL por minuto, através do uso de uma bomba seringa (KD Scientific, modelo KDS 100). Após a adição do NaBH₄ a coloração da solução passou de transparente para amarela, evidenciando qualitativamente a formação de NpAg. Posteriormente essa solução foi armazenada a temperatura ambiente na ausência de luz. A FIGURA 10 apresenta o esquema para a obtenção das NpAg.

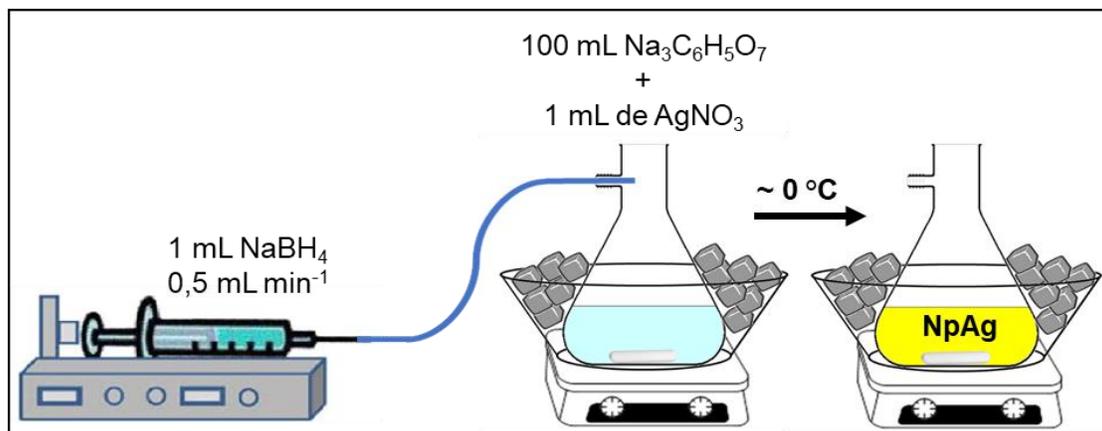


FIGURA 10 - Esquema representativo do processo de síntese de nanopartículas de prata (NpAg).

3.4. Métodos de caracterização da solução de NpAg

3.4.1. Espectroscopia de UV-Vis

Os espectros de ultravioleta-visível das soluções coloidais de prata foram obtidos a partir da solução aquosa em um espectrofotômetro (Jasco V-660) na região de 300 nm a 800 nm utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico e água destilada como líquido padrão.

3.4.2. Difratometria de raios X (DRX)

As análises de DRX, para caracterização da estrutura cristalina das NpAg, foram realizadas em um equipamento da marca Shimadzu, modelo XRD 6000, com fonte de radiação CuK α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. As medidas

foram feitas em varredura contínua no intervalo de $35^\circ \leq 2\theta \leq 85^\circ$ a uma velocidade de varredura de $0,2^\circ \text{ min}^{-1}$. A solução de NpAg foi gotejada sobre um substrato de silício e após repetidos processos de gotejamento/secagem os difratogramas dessas amostras eram obtidos. A identificação das fases cristalinas das NpAg foi realizada por meio de difratogramas obtidos com padrões tabelados disponíveis em bancos de dados “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File* (JCPDS - PDF).

3.4.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês “dynamic light scattering”) foi realizado para determinação do tamanho das partículas em solução. As medidas de DLS foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) usando o equipamento Zetasizer Nanoseries da Malvern Instruments.

3.4.4. Medição de potencial zeta

Medidas de potencial zeta foram realizadas para determinar o potencial de superfície das NpAg e sua estabilidade em diferentes valores de pH. O equipamento utilizado foi o Zetasizer, modelo Nano Series, da Malvern Instruments. O pH foi ajustado com o auxílio de um titulador MPT-2, utilizando-se soluções de ácido nítrico (HNO_3) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio (NaOH) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, para os valores de 2,2 até 11,2. As medidas foram realizadas em triplicatas.

3.4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens de microscopia de transmissão das NpAg foram realizadas em um microscópio TECNAI F20, operando a 200 kV. Nesta análise também foi realizada medida em modo de alta resolução. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono amorfo.

3.5. Métodos de deposição de prata sobre Ti anodizado

Foram utilizados três tipos de deposições de Ag sobre as superfícies anodizadas, podendo ser classificadas, conforme exibidos na TABELA 8, como:

1. *Eletrodeposição*: foi utilizada uma fonte da marca Impac, modelo 3645A DC (0-36 V e 0-3 A). O potencial foi ajustado para -3 ou -5 V e os tempos de deposição variaram entre 0,5 e 5 min.

2. *Gotejamento*: com o auxílio de um pipetador gotejou-se sobre a superfície de Ti anodizado volumes da solução de NpAg variando entre 0,3 e 15 mL. A secagem desta solução foi realizada de diversos modos (vide TABELA 8) a 25 ou 250 °C. Na temperatura de 250 °C a amostra de Ti anodizado foi disposta sobre uma chapa de aquecimento mantida temperatura, e sobre ela gotejados os diferentes volumes da solução de NpAg.

3. *Ressuspensão das NpAg seguida por gotejamento*: a solução de NpAg foi concentrada com o auxílio de uma centrífuga seguida por ressuspensão em etanol e, na sequência, gotejada sobre a superfícies de Ti anodizado.

4.

TABELA 8 - Diferentes métodos de deposição de prata sobre Ti anodizado por MAO.

	Eletrólito	Concentração / mol L ⁻¹	Potencial / V	Tempo / min
Eletrodeposição	Ag ₂ SO ₄	0,001	-3 e -5	0,5; 1 e 5
	AgNO ₃	0,001	-5	1
	Solução de NpAg	-	-3 e -5	0,5; 1 e 5
	Tipo de secagem	Volume / mL	Concentração de Ag ⁺ / mol L ⁻¹	Temperatura / °C
Gotejamento de solução de NpAg	Temperatura ambiente	~ 0,3		~ 25
	Fluxo de gás N ₂ Chapa de Aquecimento	~ 0,3 0,4; 0,8; 1,2; 3; 5; 10 e 15	2,65	~ 250
NpAg Ressuspendida em EtOH	Temperatura ambiente	~ 0,3	-	~ 25

3.6. Processo de eletrofiação de PLA

Uma fonte de alimentação de alta tensão foi usada para gerar um campo elétrico em torno de 22,2 kV entre um coletor aterrado e uma agulha. A solução de polímero foi colocada em uma seringa plástica de 20 ml (marca BD Plastipak®) e uma bomba seringa (marca KD Scientific, modelo KDS 100) foi utilizada para manter uma vazão constante de 1,2 mL h⁻¹ da solução através da agulha. O coletor consistiu em um cilindro de aço inoxidável recoberto com papel alumínio onde as amostras foram fixadas com o auxílio de uma fita dupla face, uma seguida da outra (FIGURA 11b). A distância de trabalho (DT) entre a ponta da agulha e o coletor para a deposição de nanofibras foi de 9 cm. O tempo de fiação da solução variou entre 30 s e 15 min.

As eletrofiações foram realizadas a temperatura ambiente (~ 25 °C) com coletor rotacional (400 rpm) e estacionário e com umidade do ar a cerca de 40 %. Um esquema do sistema de eletrofiação está representado na FIGURA 5 da Introdução, e uma imagem real do sistema utilizado pode ser observada na FIGURA 11.

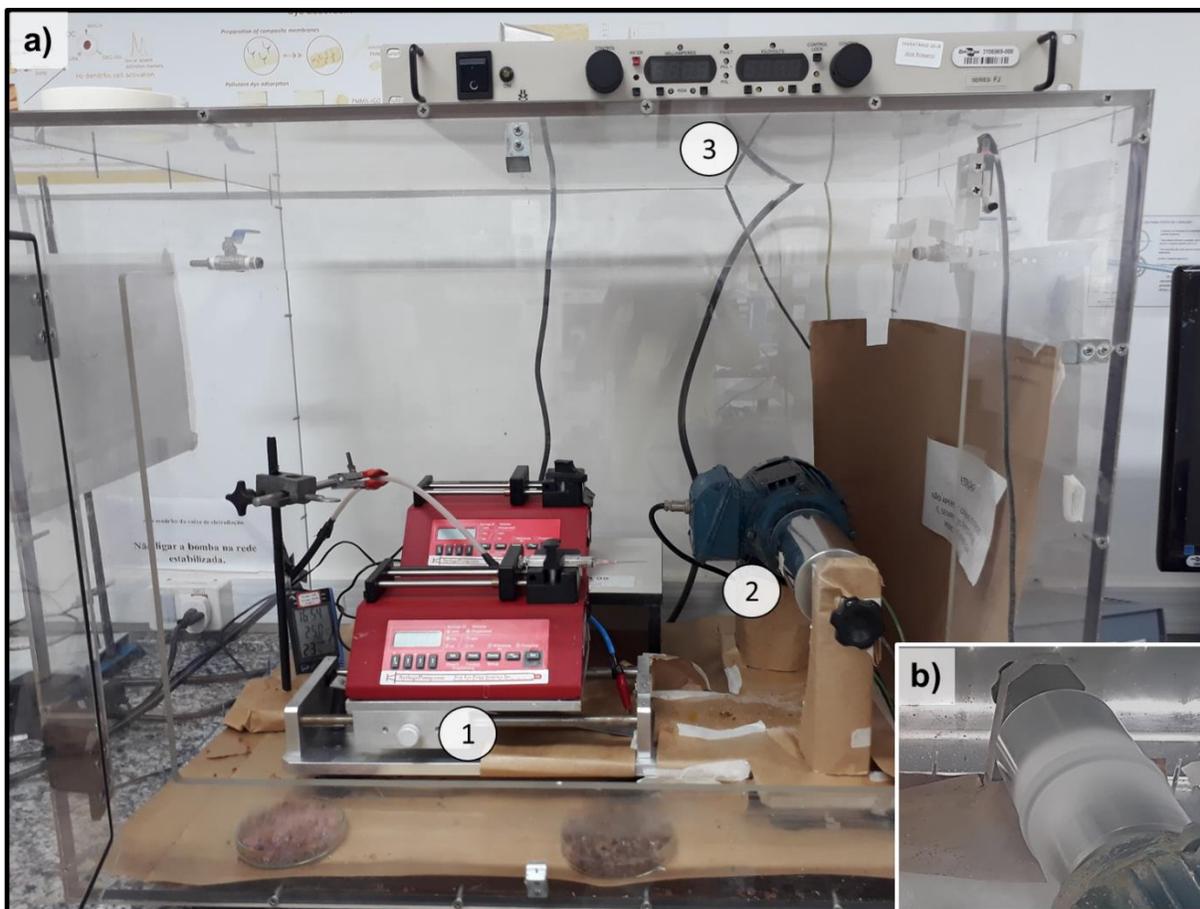


FIGURA 11. (a) Foto do sistema utilizado para produção de fibras por eletrofiação: 1) bomba seringa, 2) coletor aterrado, 3) fonte de alta tensão; (b) Amostras dispostas no centro do coletor durante a eletrofiação.

3.7. Métodos de caracterização das superfícies modificadas

3.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)

Imagens da topografia das amostras de Ti, com e sem tratamento, foram realizadas através do microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30 FEG (Field Emission Gun). Ademais, este equipamento possui um sistema de EDS, da marca Bruker, que permitiu a determinação da composição química semiquantitativa da razão Ca/P do sistema Ti/TiO₂. Essas medidas foram realizadas em 3 amostras. Também foram

realizados mapeamentos dos elementos químicos de interesse (Ti, O, P, Ca e Ag) das superfícies Ti/TiO₂/Ag.

3.7.2. DRX

O equipamento utilizado para as análises das estruturas cristalinas das superfícies do Ti, com e sem tratamento, foi o mesmo descrito no item 3.4.2. Utilizou-se a voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA, varredura contínua a uma velocidade de 2° min⁻¹ no intervalo de 20° ≤ 2θ ≤ 80°. A identificação das fases cristalinas foi realizada por meio de difratogramas disponíveis em bancos de dados “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File* (JCPDS - PDF).

3.7.3. Medidas de ângulo de contato

O ângulo de contato é definido como o ângulo entre o plano tangente a uma gota do líquido e o plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, representado pela FIGURA 12¹⁶⁸.

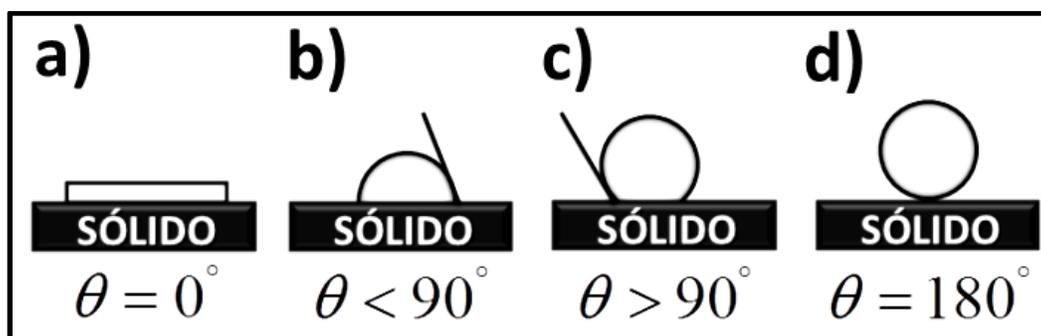


FIGURA 12 - Ângulos de contato de líquidos em superfícies sólidas: (a) superfície molhante; (b) predominantemente molhante; (c) e (d) não molhantes¹⁶⁸.

Quando $\theta = 0^\circ$, o líquido se espalha de modo indefinido e o molhamento da superfície é total. Por definição diz-se que esta superfície é molhante quando $\theta < 90^\circ$, quando ocorre o molhamento parcial do sólido e o líquido se espalha de modo espontâneo, caracterizando uma superfície predominantemente molhante. Se $\theta > 90^\circ$ ou

$\theta = 180^\circ$ não há o molhamento do sólido pelo líquido, portanto, tem-se uma superfície não molhante.

Para avaliar a molhabilidade das superfícies obtidas foi utilizado um goniômetro Optical contact angle meter CAM 101. Nestas medidas uma gota de água deionizada com volume de 5,0 μL foi depositada sobre as superfícies das amostras por meio de uma microseringa. Imagens de baixo aumento desta gota foram obtidas por uma câmera de vídeo e o ângulo de contato foi medido através do goniômetro. Esta medida corresponde à média entre os ângulos formados entre a amostra e a gota nos lados esquerdo e direito. Foram realizadas 6 medidas por amostra, e em 5 amostras por tratamento.

3.7.4. Atividade Antimicrobiana

Estes ensaios foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com o intuito de avaliar a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* nas diferentes superfícies. Para estes testes todas as amostras foram esterilizadas por meio de exposição à radiação ultravioleta durante 15 minutos de cada lado. As amostras analisadas foram: Ti/TiO₂, Ti/TiO₂/Ag e Ti/TiO₂/Ag/PLA. O titânio anodizado (Ti/TiO₂) foi utilizado como controle negativo. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

Para o preparo do inóculo empregado nos dois testes utilizou-se a cepa bacteriana *S. aureus* da American Type Culture Collection (ATCC 25923) oriunda da Fundação Oswaldo Cruz e pertencente ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP-UFSCar). As cepas foram previamente ativadas, realizando a transferência da cultura estoque dessa bactéria (mantida a -20°C) para o meio de cultura Müller Hinton (MH) pH $7,3 \pm 0,1$ (Oxoid®) e incubada em estufa por 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após incubação a cultura foi centrifugada por 10 min a 3600 rpm (centrifuga da marca Eppendorf, modelo 5418), o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em PBS. Foram transferidas algumas gotas da suspensão

deste inóculo para um tubo de vidro contendo 5 mL de PBS estéril de modo a obter uma turbidez óptica comparável à escala 0,5 de McFarland, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹) de *S. aureus* (FIGURA 13B). Para confirmação da concentração do inóculo foram realizadas leituras de absorvância em 600 nm, buscando um valor de absorvância entre 0,08 e 0,09, por meio de um espectrofotômetro (Femto, modelo 600).

a) Teste de Disco-Difusão

Os testes de disco-difusão utilizados neste trabalho foram adaptados do teste protocolo da Norma M2-A8 adotado pela ANVISA com a permissão da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) que se refere aos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão.

Para estes testes foram utilizadas placas de ágar MH (FIGURA 13A). Os inóculos foram espalhados no meio MH com um *swab* estéril em movimentos de vai e vem. Este procedimento foi repetido mais duas vezes girando a placa aproximadamente 60° cada vez a fim de assegurar uma distribuição uniforme de inóculo (FIGURA 13C). Após, os discos foram dispostos no ágar MH com a superfície tratada voltada para baixo (FIGURA 13D) e as placas foram incubadas em estufa a 36 ± 1 °C por 24 horas. Por fim, foram tiradas fotos das placas e medidos os halos de inibição, com o auxílio de uma régua (FIGURA 13E). A formação dos halos de inibição é dependente da difusão e solubilidade do agente antimicrobiano no ágar MH.

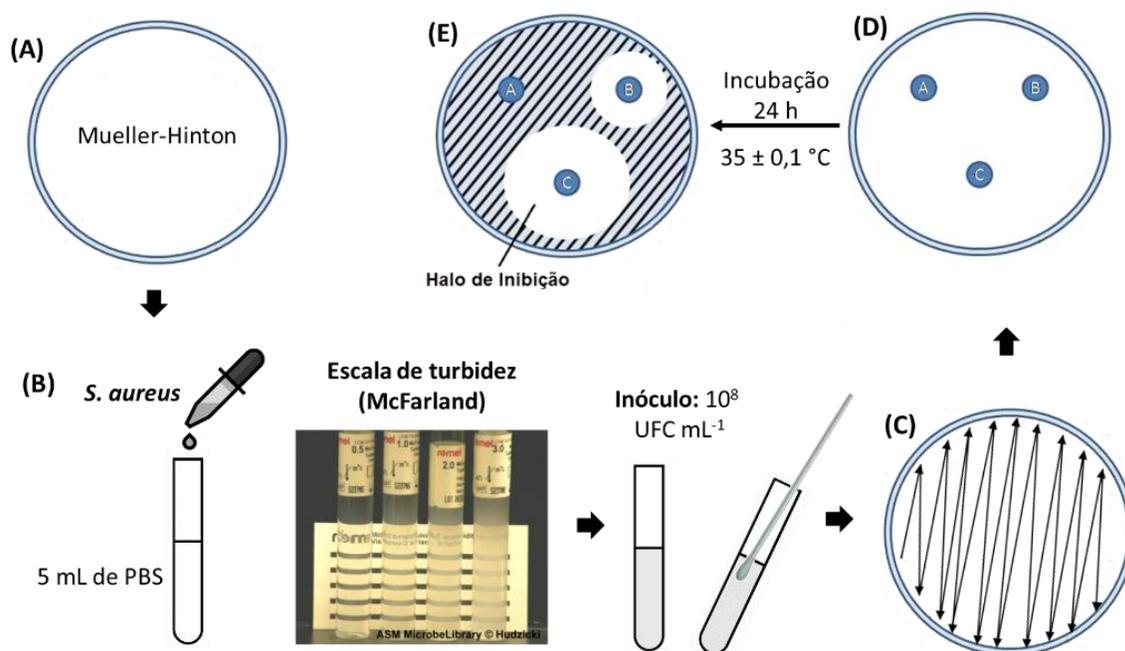


FIGURA 13. Esquema utilizado para realização do teste de disco-difusão. A) placas de ágar MH. B) ajuste do inóculo de *S. aureus* para 10^8 UFC mL⁻¹. C) inoculação da placa contendo ágar MH. D) colocação dos discos de Ti na placa com as superfícies tratadas voltadas para baixo. E) halos de inibição formados após incubação.

b) Teste de atividade antimicrobiana adaptada segundo a Norma japonesa, JIS 2801 (2012)

As amostras, previamente esterilizadas, foram dispostas em poços de uma placa de 24 poços e sobre elas foram adicionados 30 μ L do inóculo bacteriano (*S. aureus*). Sobre o inóculo foi disposto um filme de polietileno de aproximadamente 11 mm de diâmetro, previamente esterilizado por calor úmido em autoclave, com a finalidade de maximizar o contato entre a suspensão bacteriana e a superfície das amostras, formando uma fina camada da suspensão em contato direto com os corpos de prova (FIGURA 14) (para as amostras recobertas com PLA, considerando que o mesmo tem caráter hidrofóbico, esse contato não foi tão eficiente quanto para as demais superfícies sem o polímero).

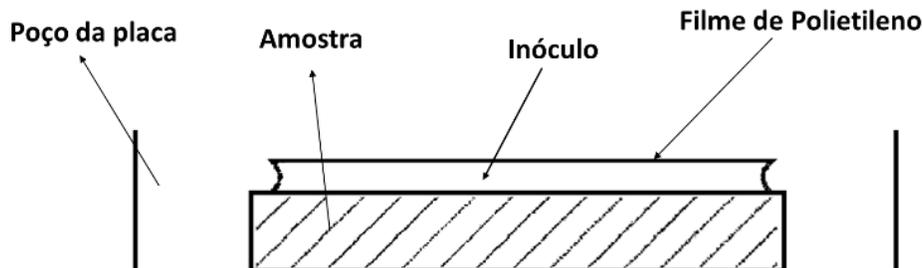


FIGURA 14. Ilustração do inóculo composto por uma suspensão de *S. aureus* sobre a amostra tratada recoberta com um filme de polietileno utilizado para aumentar a área de contato entre a amostra e a suspensão.

As placas foram então incubadas a 36 ± 1 °C por 24 horas em câmara úmida, onde foi utilizado um recipiente de plástico revestido com papel toalha úmido e vedado.

Após o período de incubação as amostras foram cuidadosamente transferidas para tubos de plástico de 15 mL do tipo Falcon contendo 1 mL de solução fosfato-salina (PBS), previamente esterilizados. Para desagregação dos biofilmes os tubos ficaram sob agitação por ultrassom durante 16 minutos a 150 W e 50 Hz. A partir desta suspensão desagregada foram realizadas diluições seriadas de 10 a 100.000 vezes em PBS. Para avaliação quantitativa das células foi utilizado o método *Spread-Plate*, no qual 25 μ L de todas as diluições e da suspensão original foram espalhados em duplicata sobre placas contendo o meio de cultivo Agar Contagem de Placas ((PCA) pH $7,3 \pm 0,1$ (Oxoid®)) com auxílio de alças de Drigalsky esterilizadas. Estas placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 horas e após este período foram realizadas as contagens de UFC.

O restante da suspensão, 850 μ L, foi inoculado utilizando-se o método de semeadura *Pour-Plate* em PCA. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 48 horas e a contagem de UFC foi realizada após este período.

3.8. Testes de biocompatibilidade

Estes testes foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Os testes *in vitro* para análise da biocompatibilidade dos sistemas propostos (Ti cp, Ti/TiO₂, Ti/TiO₂/Ag e Ti/TiO₂/Ag/PLA), descritos nesta seção, foram utilizados para avaliar morfologia, adesão, diferenciação e proliferação celular de pré-osteoblastos da linhagem MC3T3 retirados da calvária de camundongo.

Para todos os ensaios 50 µL de meio de cultura contendo 2×10⁴ células foram espalhadas sobre cada disco de Ti, com e sem tratamento. Após o período inicial de adesão de 4 horas o volume do meio foi completado para 1000 µL. As células foram cultivadas em poços individuais em placas de 24 poços, incubadas em meio de cultura α-MEM contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina, 50 µg mL⁻¹ de ácido ascórbico e 10 mmol L⁻¹ de β-glicerofosfato, a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Foram realizados ensaios independentes e em duplicata por três vezes.

3.8.1. Viabilidade e proliferação celular (Alamar Blue)

A viabilidade celular nas diferentes superfícies estudadas foi analisada pelo uso do kit Alamar Blue® (Life Technologies) nos períodos 1 e 3 dias.

Para este ensaio os discos de Ti foram alocados em placas de 24 poços seguidas pelo plaqueamento das células de pré-osteoblastos sobre suas superfícies e adição de 500 µL da solução de trabalho do Alamar Blue (α-MEM com 10% de FBS, 1% de P/S e 10% de Alamar Blue). Um poço contendo somente a solução de trabalho foi utilizado como controle negativo. As amostras foram então incubadas em uma estufa por 4 h a 37 °C. Após este período foram coletadas alíquotas de 150 µL de cada poço, transferidas para uma placa de 96 poços e realizadas leituras de absorbância em um espectrofotômetro de microplacas nos comprimentos de onda 570 e 600 nm. O número de células viáveis está relacionado com a quantidade de redução do corante e foi

expresso em percentual de redução do Alamar Blue, de acordo com o protocolo do fabricante.

A proliferação celular segue o mesmo protocolo do ensaio de viabilidade, entretanto, as análises são estendidas para períodos mais prolongados (1, 3, 7, 10, 14 e 21 dias). No presente trabalho a proliferação foi avaliada apenas para as superfícies Ti cp e Ti/TiO₂. Este ensaio fornece um resultado mais preciso de viabilidade/proliferação pois a medida da redução do corante é realizada na mesma amostra nos diferentes tempos.

3.8.2. Morfologia, adesão e proliferação celular (MEV e Microscopia de fluorescência)

Nas amostras avaliadas por MEV os pré-osteoblastos foram cultivados sobre os discos de Ti, com e sem tratamento, e avaliados nos períodos 1, 3 e 7 dias. Para cada um destes períodos as células passaram por um processo de fixação, com uma solução de glutaraldeído 2 % (Sigma-Aldrich) em α -MEM (Gibco), foram então lavadas três vezes com PBS e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (25, 50, 70, 95 e 100%, 10 min em cada solução). Posteriormente as amostras passaram por um processo de secagem a vácuo em dessecador por 30 min. Por fim, estas amostras foram recobertas com ouro (~ 12 nm) pelo processo de metalização no qual foi utilizado o Metalizador SCD 050 (Bal-Tec), e a deposição foi realizada por 50 segundos, utilizando uma corrente de 40 mA.

A adesão e espriamento celular foram avaliados por fluorescência direta com faloidina conjugada com o corante Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes), que sinaliza o citoesqueleto de actina e com o corante dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes) para marcação nuclear. As células foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos FL, AMG Micro). Assim como para amostras preparadas para o MEV os pré-osteoblastos foram cultivados sobre os discos de Ti, com e sem tratamento, e avaliados nos períodos 1, 3 e 7 dias.

3.8.3. Formação de nódulos de mineralização (Vermelho de alizarina)

Este teste visa quantificar a formação de nódulos minerais que estão relacionados a maior diferenciação celular. Para isso, o cálcio depositado nas membranas celulares dos pré-osteoblastos foi corado com o vermelho de alizarina após 21 dias de cultivo sobre as diferentes superfícies. Neste ensaio as células cultivadas nas superfícies foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C e fixadas com 1 mL de etanol 70% sob refrigeração (4 °C) por 1 hora. Após esse período as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e duas vezes com água deionizada e coradas com 1 mL de solução de Vermelho de Alizarina (40 mmol L⁻¹, pH 4,2, Sigma-Aldrich) em temperatura ambiente por 5 min na ausência de luz e sob agitação suave (VDRL Shaker, Biomixer). O corante que não aderiu às células foi aspirado e cada amostra foi então lavada várias vezes com água deionizada para retirar o excesso de corante. Essas amostras foram então fotografadas e, em seguida, os nódulos foram dissolvidos pela adição de 500 µL de solução de cloreto de cetilpiridínio 10% (Sigma-Aldrich) por 15 min, sob agitação a temperatura ambiente. Por fim, foram coletadas três alíquotas de 100 µL dessas soluções, transferidas para poços de placas de 96 poços e realizada a leitura da absorbância a 550 nm em leitor de microplacas (Power Wave XS, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

3.9. Liberação de Ag⁺

Para investigar o comportamento de liberação de íons de Ag dos revestimentos TiO₂/Ag, e TiO₂/Ag/PLA estas amostras foram dispostas em tubos do tipo Falcon de 15 mL e imersas em 5 mL de PBS a 37 °C (usando um banho ultratermostático da marca Ethik Technology, modelo 521-2D), no escuro, por 43 dias. Em períodos pré-determinados (diariamente nos 15 primeiros dias e nos dias 22, 29, 36 e 43) todo o volume do tubo foi coletado e PBS fresco foi reabastecido em conformidade. Estas alíquotas foram analisadas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma - ICP OES (iCAP 7000, Thermo Fisher Scientific) para investigar a liberação de Ag⁺. Esta medida foi realizada em triplicata. Além disso, após o último período de coleta, essas

amostras foram transferidas para uma estufa a 60 °C, por 24 horas e, posteriormente, passaram por um processo de extração com 10 mL de ácido nítrico 30 %, para determinação da Ag remanescente.

3.10. Análises estatísticas

Para o tratamento estatístico utilizou-se a análise de variância ANOVA de fator único dentro de um intervalo de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$) para determinar a variabilidade dos resultados obtidos na viabilidade celular, proliferação celular, mineralização óssea e ângulo de contato, comparando-se os valores de $F_{\text{crítico}}$ em relação aos de $F_{\text{calculado}}$ para cada tratamento e/ou entre períodos. Os tratamentos e/ou períodos que apresentaram $F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$, ou seja, $p > 0,05$ não apresentaram diferença significativa, sendo considerados homogêneos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Oxidação de titânio por micro-arco – MAO – e caracterizações das superfícies obtidas

Amostras de Ti foram anodizadas conforme procedimento e condições descritos no item 3.2 e resumidos na TABELA 6.

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível a análise da morfologia dos óxidos de titânio formados nas condições estudadas. Para comparação com as superfícies de Ti anodizadas também foi realizada a observação MEV da superfície de Ti polida mecanicamente até lixa 600 (denominada **Polida – Pol**) (FIGURA 15). Visualmente foi possível observar ranhuras provenientes do polimento. Através da micrografia de MEV pode-se observar melhor a presença das ranhuras deixadas pelas partículas abrasivas de óxido de alumínio das lixas d'água.

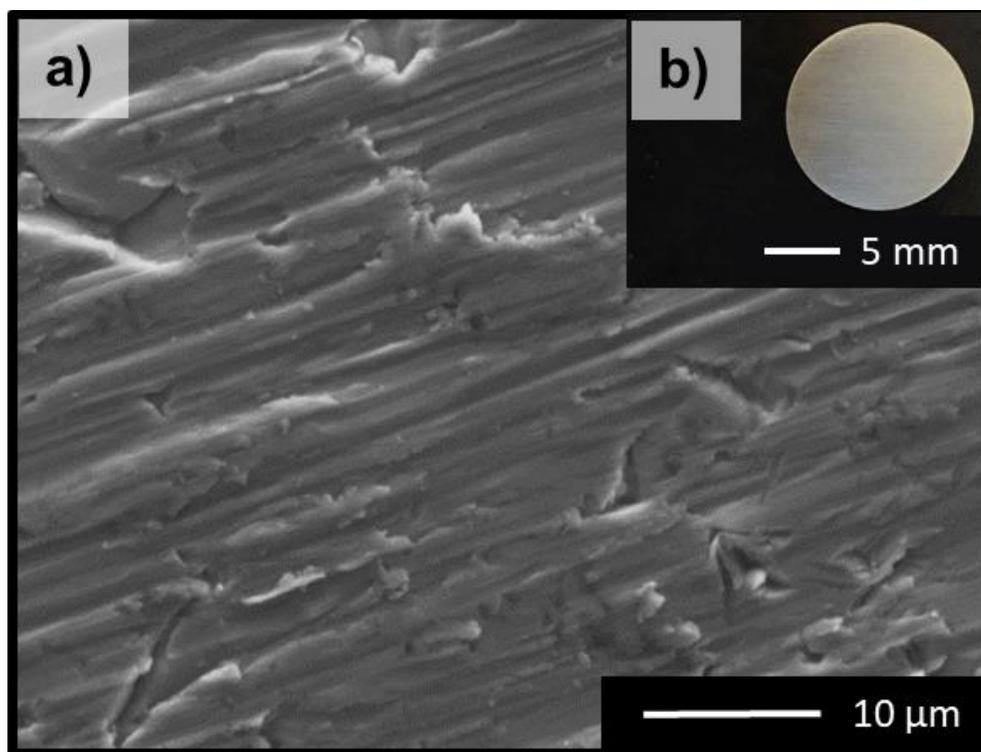


FIGURA 15 – Amostras de Ti cp polida até lixa 600: a) Micrografia de MEV e b) Fotografia da superfície da amostra.

As anodizações do Ti cp realizadas com as **soluções 1 e 2** (TABELA 6), ácido acético e bicarbonato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 200 e 300 V, respectivamente, não levaram à formação de uma camada de óxido com porosidade considerável. Através da FIGURA 16 pode-se observar poros em escala nanométrica com distribuição não homogênea formados nos óxidos dessas amostras, não sendo, portanto, interessante para os objetivos do presente trabalho.

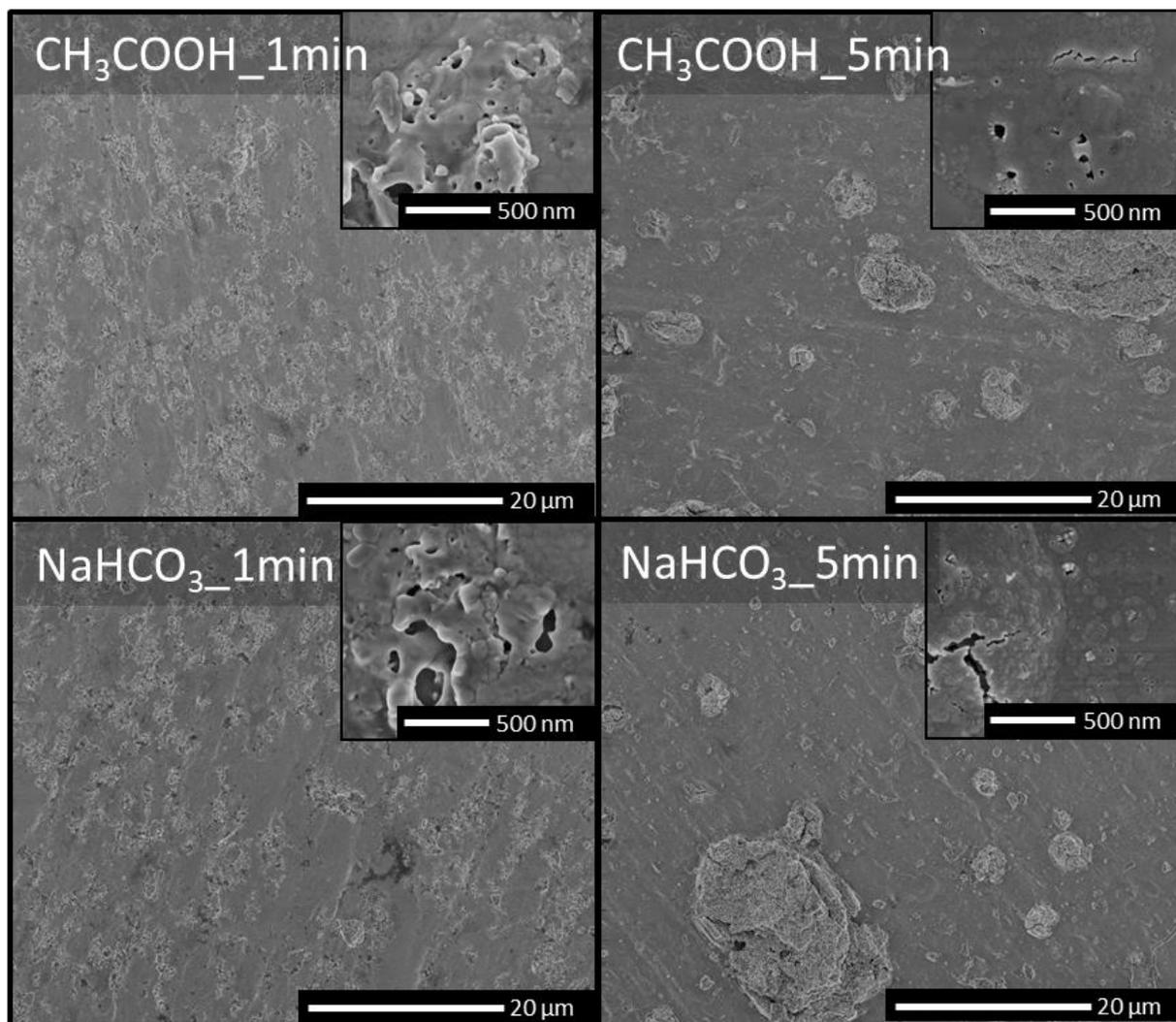


FIGURA 16 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por anodização a 200 V durante 1 e 5 min em soluções de CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 1**) a 300 V e de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 2**) a 200 V.

As condições de anodização apresentadas na TABELA 6 utilizadas como **solução 3**, tampão fosfato, promoveram um aumento na rugosidade da superfície, porém sem formação de poros, logo, inadequada para os fins deste trabalho (FIGURA 17).

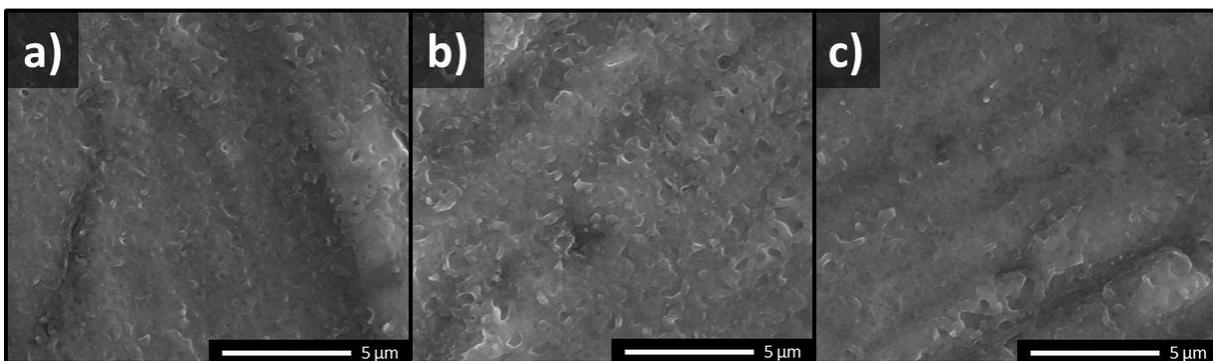


FIGURA 17 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por anodização em solução tampão fosfato (**solução 3**) a 250 V, nos tempos: a) 1 min, b) 5 min e c) 10 min.

A anodização realizada em $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 4**) a 250 V, por 1 minuto a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ resultou em uma degradação severa da resina e formação de uma superfície não homogênea de óxido. Portanto, não foram realizadas imagens por MEV desta amostra. Já os filmes de óxido formados pelo uso da **solução 5**, referente ao eletrólito CaHPO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, apresentaram coloração roxo-esverdeada. Como relatado na literatura, superfícies coloridas são formados por camadas de óxido pouco espessas (geralmente menores que $1 \text{ } \mu\text{m}$) e escassamente porosas⁸⁵. Desse modo, essas superfícies também não se mostraram adequadas quanto à morfologia desejada e, por conseguinte, não foram realizadas imagens por MEV.

A superfície da amostra anodizada por MAO em K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 6**), a 250 V por 1 min não se apresentou homogênea, e pôde-se observar que ocorreu degradação da resina suporte do eletrodo durante o processo, fato evidenciado por um odor característico e posteriormente pela formação de uma mancha sobre a amostra. Pela imagem de MEV realizada em uma região dessas manchas (apresentada na FIGURA 18), nota-se que, muito provavelmente, houve incorporação da resina degradada no filme de óxido formado. Assim sendo, ainda que essa condição tenha proporcionado a formação de uma superfície porosa, ela não foi considerada adequada.

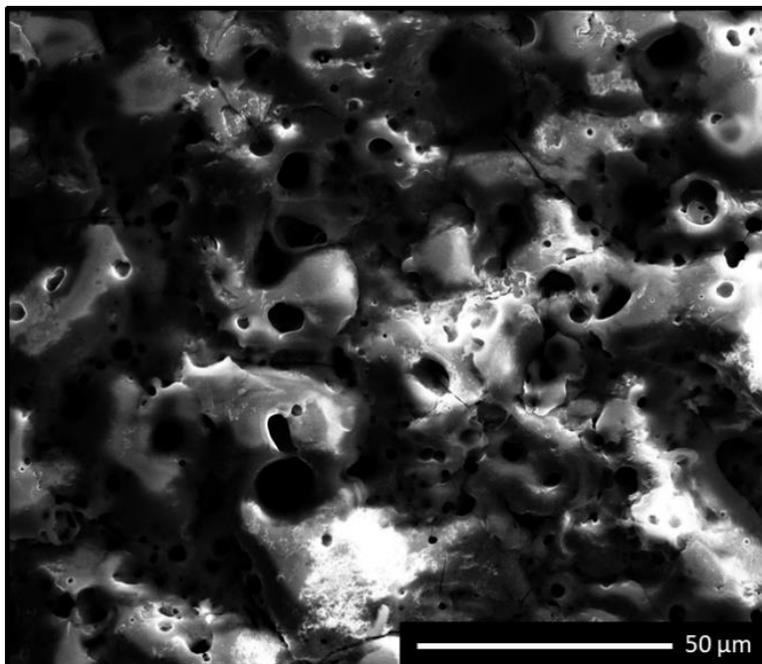


FIGURA 18 - Micrografia de MEV da região manchada do óxido de Ti devido à incrustação de resina ao óxido durante o processo de MAO. Anodização realizada durante 1 min a 250 V em solução de K_3PO_4 0,1 mol L^{-1} (**solução 6**).

A anodização na solução de K_3PO_4 0,1 mol L^{-1} e $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0,167 mol L^{-1} , **solução 7**, levou à formação de uma camada branca espessa não homogênea e não aderente sobre o Ti. Nas regiões não recobertas por esta camada branca era possível observar visualmente uma coloração azulada no óxido formado. Novamente, como óxidos coloridos são formados por camadas pouco porosas⁸⁵, esta superfície não foi considerada adequada para as finalidades deste trabalho e não foram realizadas análises por MEV.

As imagens obtidas das amostras de Ti anodizadas em K_3PO_4 0,1 mol L^{-1} e $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 0,167 mol L^{-1} (**solução 8**), a 250 V, nos tempos 1, 5 e 10 min apresentaram superfícies altamente porosas e com poros distribuídos homogeneamente sobre a superfície, como almejado para o intuito desta pesquisa (FIGURA 19). As variações nos tempos de anodização não levou a modificações na morfologia destas superfícies.

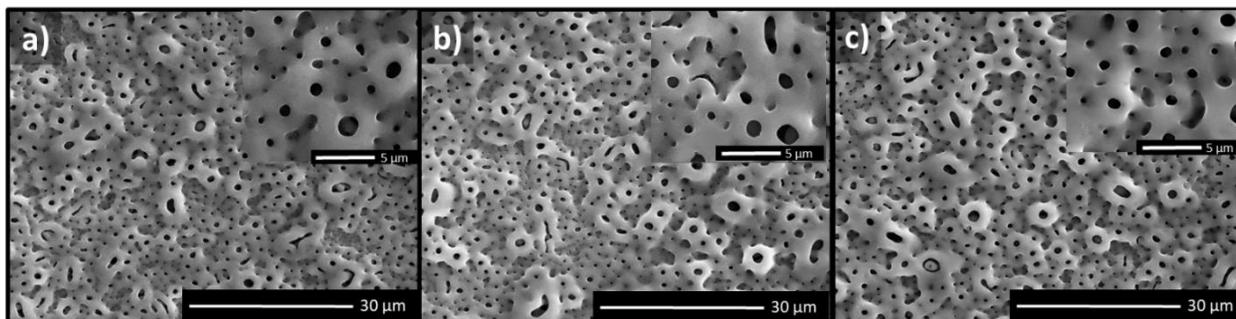


FIGURA 19 - Micrografias de MEV dos óxidos de Ti crescidos por MAO a 250 V em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 8**) a 250 V, nos tempos: a) 1 min, b) 5 min e c) 10 min.

Por fim, as anodizações realizadas em K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 9**), a 250 V, nos tempos 1, 5 e 10 min também permitiram a formação da topografia desejada (dada a similaridade com as imagens obtidas pela **solução 8** está apresentada aqui apenas a imagem referente ao maior tempo de anodização, de 10 min (FIGURA 20a). Entretanto, como pode-se observar pelo espectro obtido por EDS (FIGURA 20b), não há evidências de incorporação de íons de Ag na camada do óxido. Assim sendo, optou-se por realizar a deposição de Ag por outros métodos que serão analisados na seção 4.3.

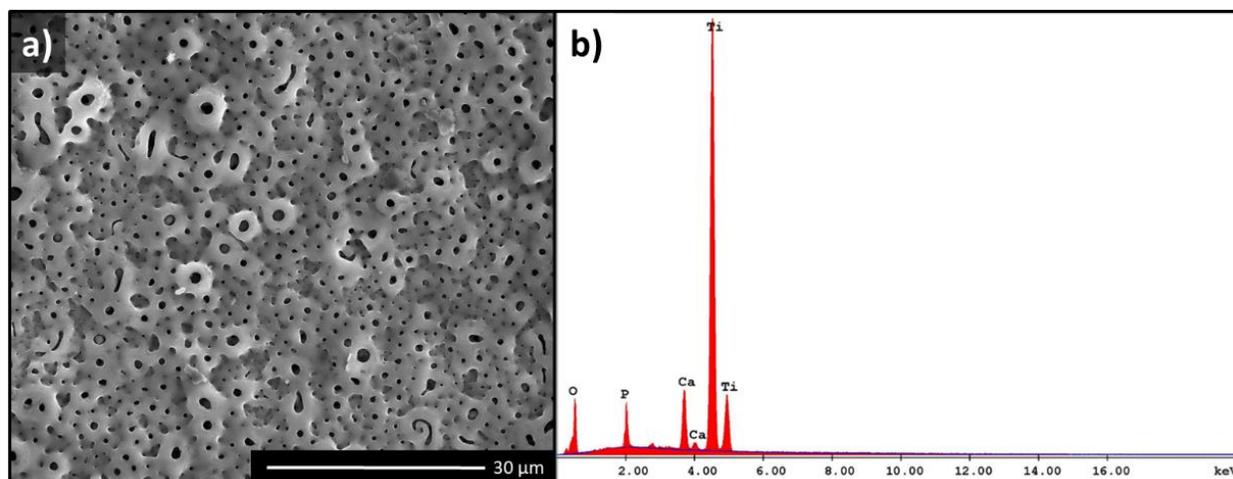


FIGURA 20 - a) Micrografia de MEV do óxido de Ti crescido por MAO), a 250 V por 10 min em solução de K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 9**). b) Espectro de EDS da amostra exibida em a).

De acordo com as análises das superfícies produzidas, para dar continuidade a este estudo foi selecionada a superfície obtida pela **solução 8** com tempo de anodização de 1 minuto, visto que o aumento no tempo de anodização não proporcionou variações na morfologia do óxido (FIGURA 19). O espectro de EDS desta amostra comprova a presença dos elementos Ca e P (FIGURA 21). Como observado na micrografia apresentada na FIGURA 19a, não ocorreu deposição de precipitados sobre a superfície anodizada, desse modo, pode-se inferir que os elementos Ca e P foram inseridos dentro da camada de óxido de Ti formado durante a anodização.

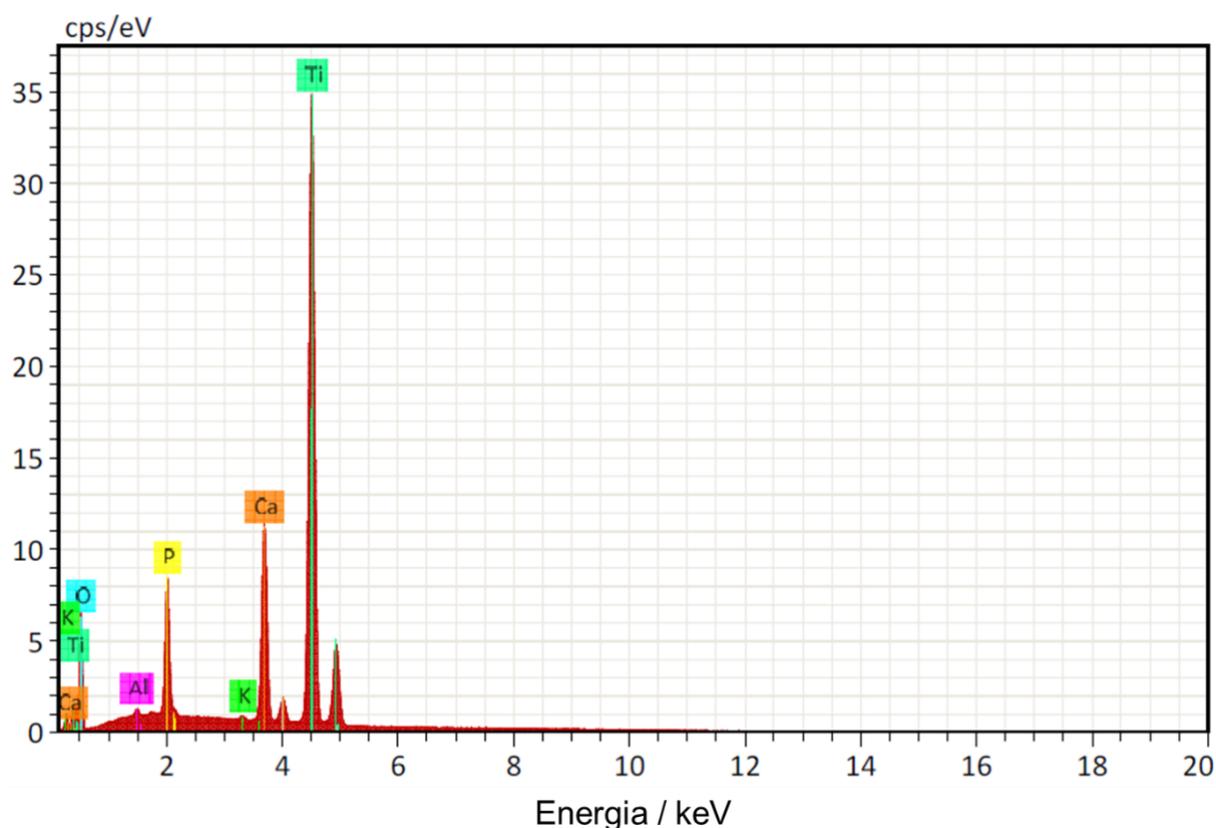


FIGURA 21 - Espectro de EDS da amostra de Ti cp anodizada a 250 V por 1 min, em solução de K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ (**solução 8**).

Portanto, foi possível a produção de uma superfície com alta densidade de poros, com incorporação dos íons Ca e P, onde os parâmetros selecionados para a

respectiva anodização por MAO estão dispostos na TABELA 9. A partir daqui a amostra obtida por esta condição será denominada **Anodizada - An**.

TABELA 9 - Parâmetros selecionados para produção de uma superfície de óxido de titânio altamente porosa sobre titânio, via anodização por MAO.

Solução 8	Concentração / mol L ⁻¹	Potencial / V	Tempo / min
K ₃ PO ₄	0,100	250	1
Ca(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O	0,167		

Com o auxílio do software Image J foram medidos os diâmetros dos poros de imagens de MEV da amostra **An** por 1 min, que permitiu a construção do histograma exibido na FIGURA 22. O diâmetro médio dos poros foi de $0,65 \pm 0,4 \mu\text{m}$, com maior distribuição entre 0,1 e 1,4 μm . Estimou-se, ainda, uma densidade de poros de $\sim 330 \text{ cm}^{-2}$.

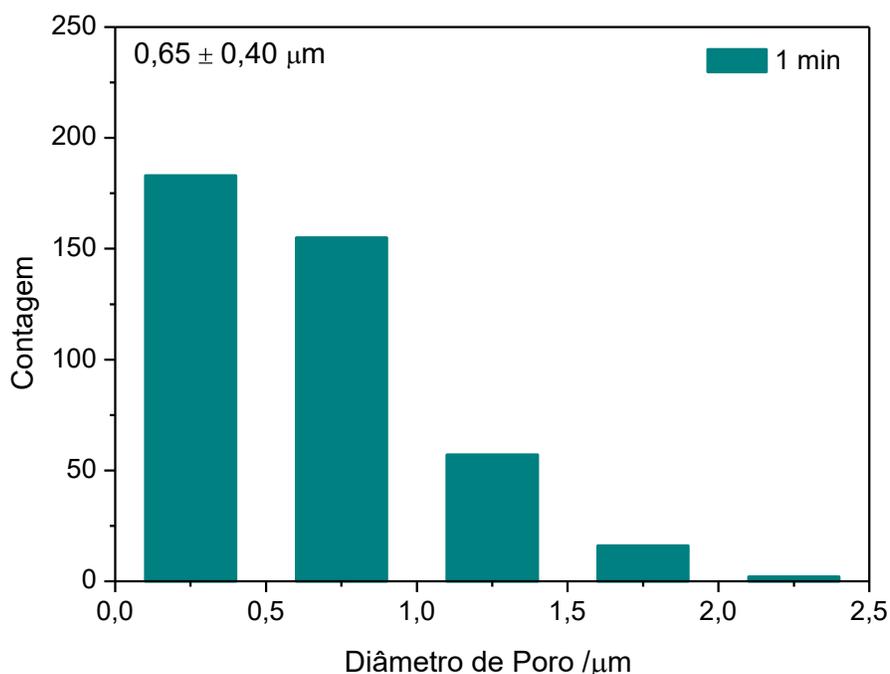


FIGURA 22 - Histograma dos diâmetros dos poros construídos a partir de micrografias de MEV referentes às amostras de Ti anodizadas nas condições da TABELA 9.

A FIGURA 23 apresenta os difratogramas de raios X das amostras de Ti cp **Pol** e **An**. Na amostra **Pol** foram identificados apenas picos de titânio, referentes à ficha cristalográfica PDF#44-1294. Já para amostra **An** foi possível a identificação da fase cristalina anatase do TiO_2 , pela presença dos picos em $25,28^\circ$, $48,0^\circ$, $53,89^\circ$ e $55,06^\circ$, referentes à ficha cristalográfica PDF#21-1272.

Este resultado é muito promissor, visto que, como mencionado na Introdução, a anatase em determinadas condições promove atividade antimicrobiana^{100, 101}. Além disso, ela também é mais eficiente que outras na nucleação e crescimento da hidroxiapatita¹⁶⁹.

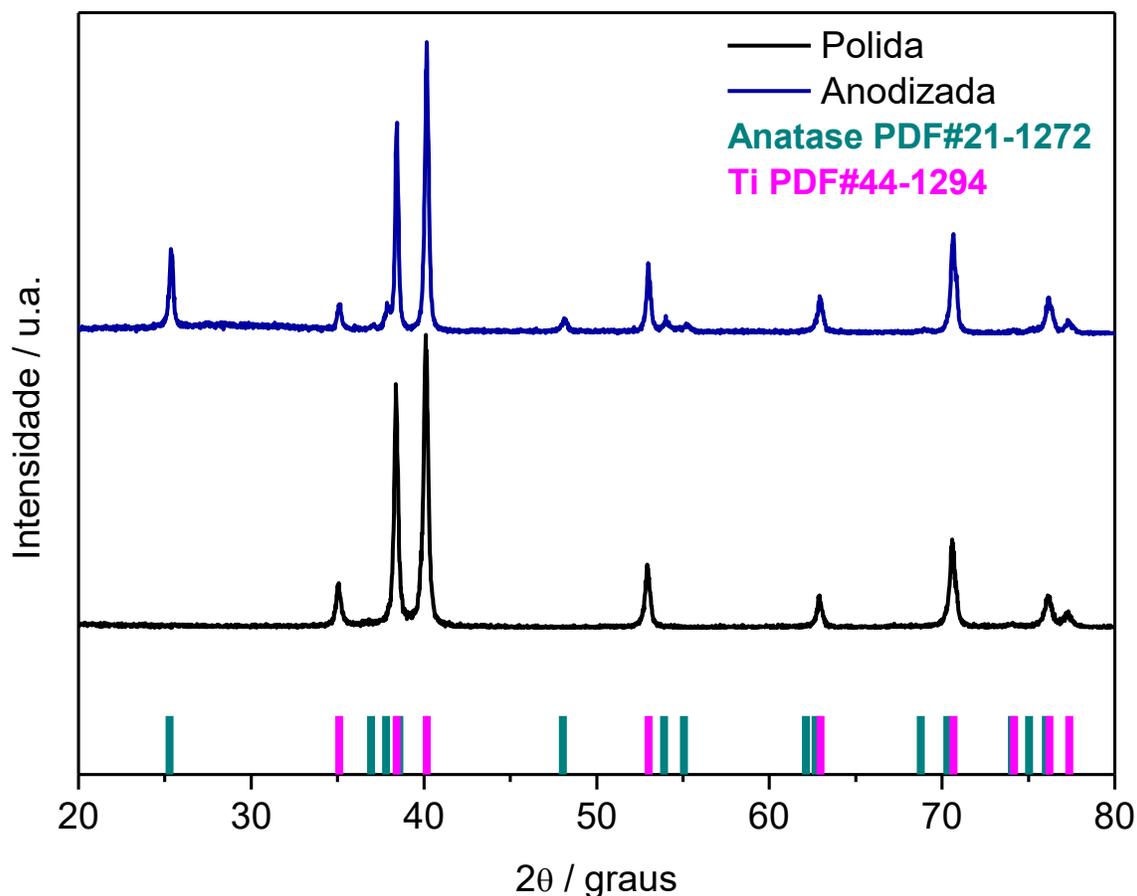


FIGURA 23 - Difratogramas de raios X das amostras de Ti polida e anodizada a 250 V por 1 min em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$.

A distribuição dos elementos oxigênio, cálcio e fósforo inseridos na camada de óxido da amostra anodizada foi avaliada pelo mapeamento de elementos realizado por EDS. A FIGURA 24 indica a presença e uma distribuição homogênea dos três elementos investigados. Este foi um resultado muito promissor visto que a presença destes elementos melhora na adesão, proliferação e diferenciação celular^{66, 67, 170}.

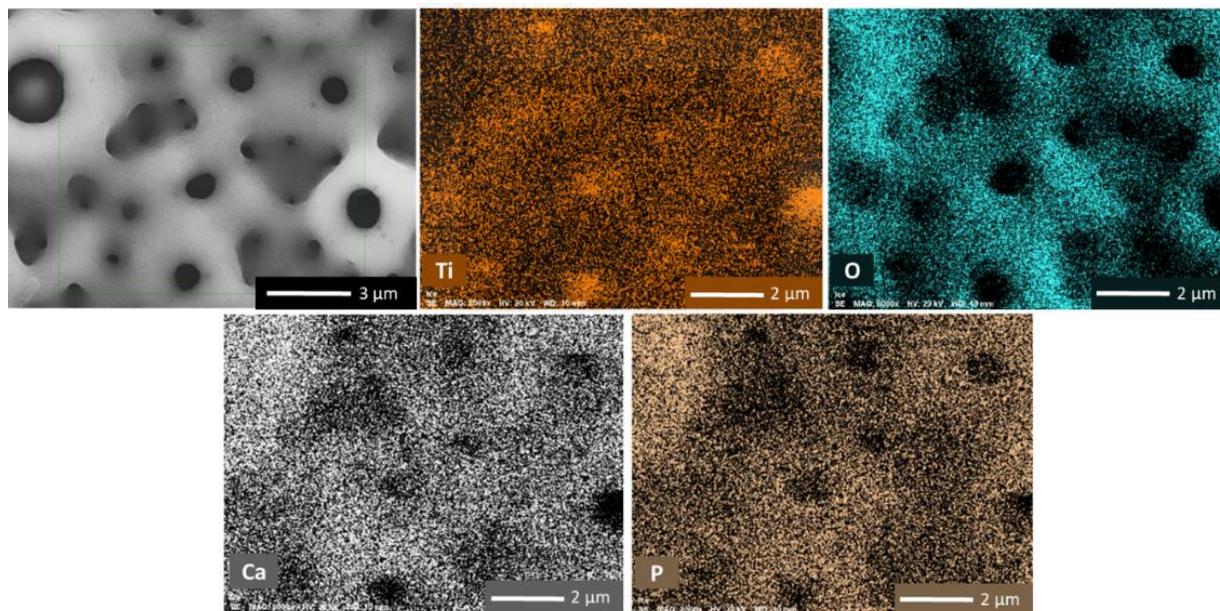


FIGURA 24 - Mapeamento dos elementos Ti, O, Ca e P realizado por EDS da amostra anodizada a 250 V por 1 min em solução contendo K_3PO_4 0,1 mol L⁻¹ e $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 0,167 mol L⁻¹.

Outro fator importante no quesito biocompatibilidade compreende a razão Ca/P. O tecido ósseo é composto por fosfatos de cálcio, principalmente pela hidroxiapatita (HAp) em sua forma cristalina, que possui uma razão atômica de Ca/P igual a 1,67⁶⁸. Foi na tentativa de alcançar valores próximos a este que as concentrações dos eletrólitos precursores desses elementos foram escolhidas (vide TABELA 4). A análise semiquantitativa de EDS revelou uma razão de Ca/P para a amostra **An** de $2,22 \pm 0,28$. Apesar do valor obtido ter sido 33 % maior que o da HAp isso pode ser promissor. Wu et al. (2015) estudou a influência do aumento dessa razão na atividade da fosfatase alcalina, que é um indicador do metabolismo celular. Eles produziram razões de Ca/P entre 0,40 e 2,21 e observaram que a fosfatase alcalina aumentou para maiores razões¹⁷¹.

Ademais, Marques et al. (2016) produziram superfícies de Ti modificadas por MAO com precursores de Ca e P e obtiveram razões de Ca/P de 1,7 a 2,08. Eles concluíram que maiores valores desta razão fornecem ao material maior resistência tanto ao desgaste quanto à corrosão¹⁷².

Com o intuito de estimar-se a espessura do filme de óxido da amostra **An** foi realizada uma micrografia de MEV em um corte transversal desta, exibida na FIGURA 25. A espessura média do filme de óxido, calculada a partir de 4 medidas indicadas na microscopia, foi de $3,2 \pm 0,44 \mu\text{m}$. Geralmente os óxidos formados por MAO em eletrólitos precursores de Ca e P apresentam valores entre 1 e $6 \mu\text{m}$ ^{88, 122}.

Ainda, a partir da FIGURA 25, observou-se que a camada de óxido de titânio formada pode ser dividida em duas partes: a primeira, adjacente ao Ti, compacta e com poucas falhas, e a segunda, mais espessa e com a presença de poros. Essa estrutura é típica da formação de óxido sobre o Ti por MAO, como relatado em outros trabalhos^{86, 173, 174}.

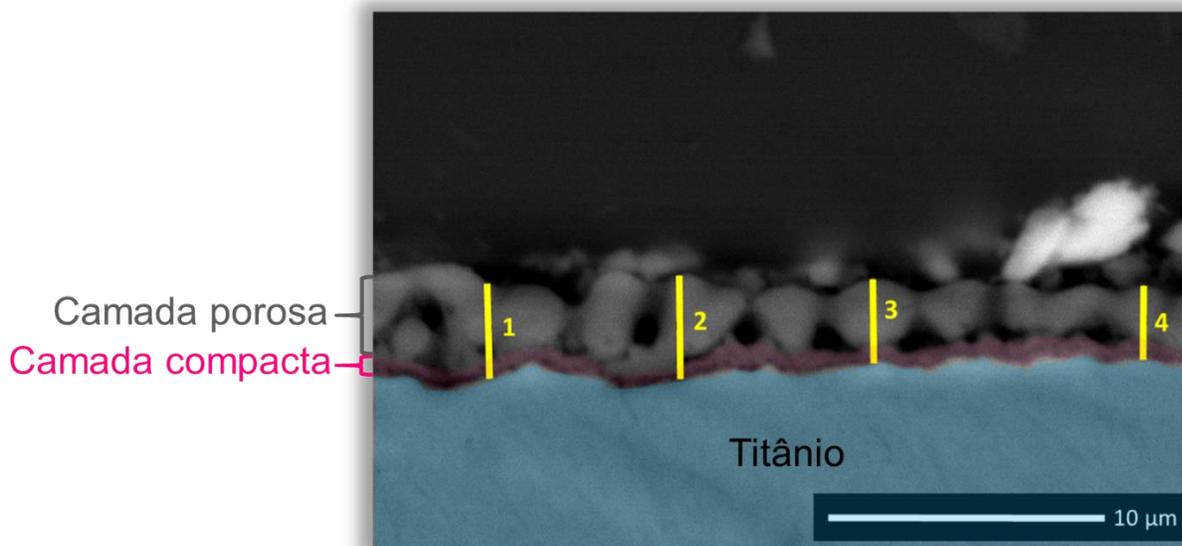


FIGURA 25 - Micrografia de MEV em um corte transversal da amostra anodizada a 250 V por 1 min, em solução contendo K_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$. Regiões das camadas compacta e do titânio coloridas artificialmente.

4.2. Caracterização das nanopartículas de prata (NpAg)

Após o fim da síntese (vide item 3.3) a solução apresentou a cor amarela, característica de NpAg em solução coloidal, resultante da absorção da radiação eletromagnética em ressonância com os plasmons de superfície das nanopartículas. Para nanopartículas esféricas o comprimento de onda de absorção máximo se dá em torno de 400 nm. Neste trabalho essa absorção máxima ocorreu em torno de 390 nm (FIGURA 26).

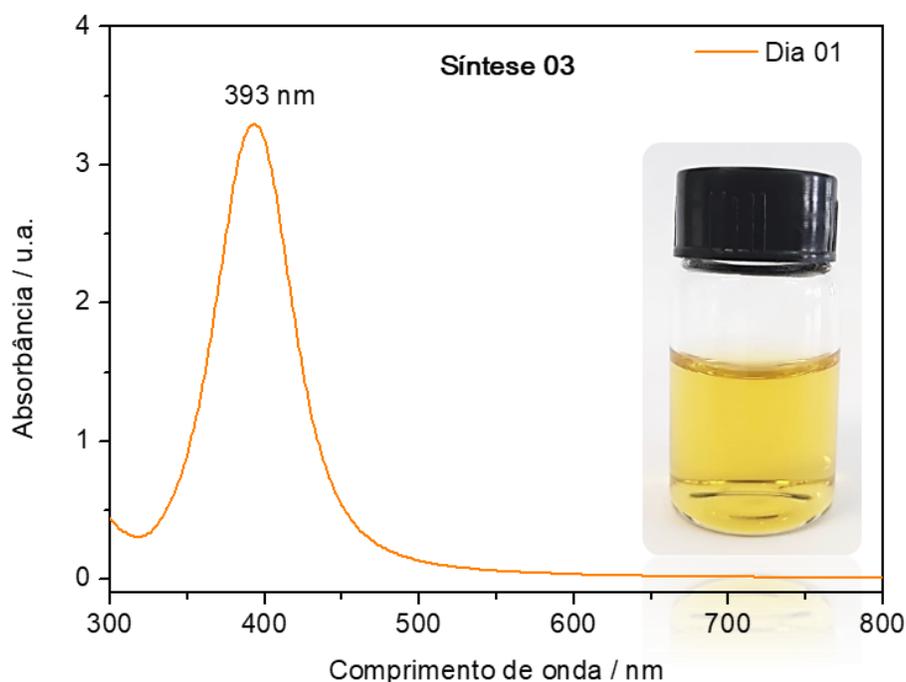


FIGURA 26 - Espectros de UV-Vis da solução coloidal de prata obtida com as condições de síntese de nanopartículas de prata dispostas na TABELA 7.

A FIGURA 27a ilustra o difratograma das NpAg previamente depositadas sobre substrato de silício (Si), onde os picos observados correspondem à Ag com estrutura cúbica referente à ficha cristalográfica JCPDS – PDF#4-783. A partir da área selecionada em amarelo da FIGURA 27b, que representa os planos cristalinos, foi construído um perfil de contraste (branco-preto) que permitiu medir a distância entre

estes planos, sendo possível indexar ao plano (111) da prata metálica com estrutura cfc (FIGURA 27c).

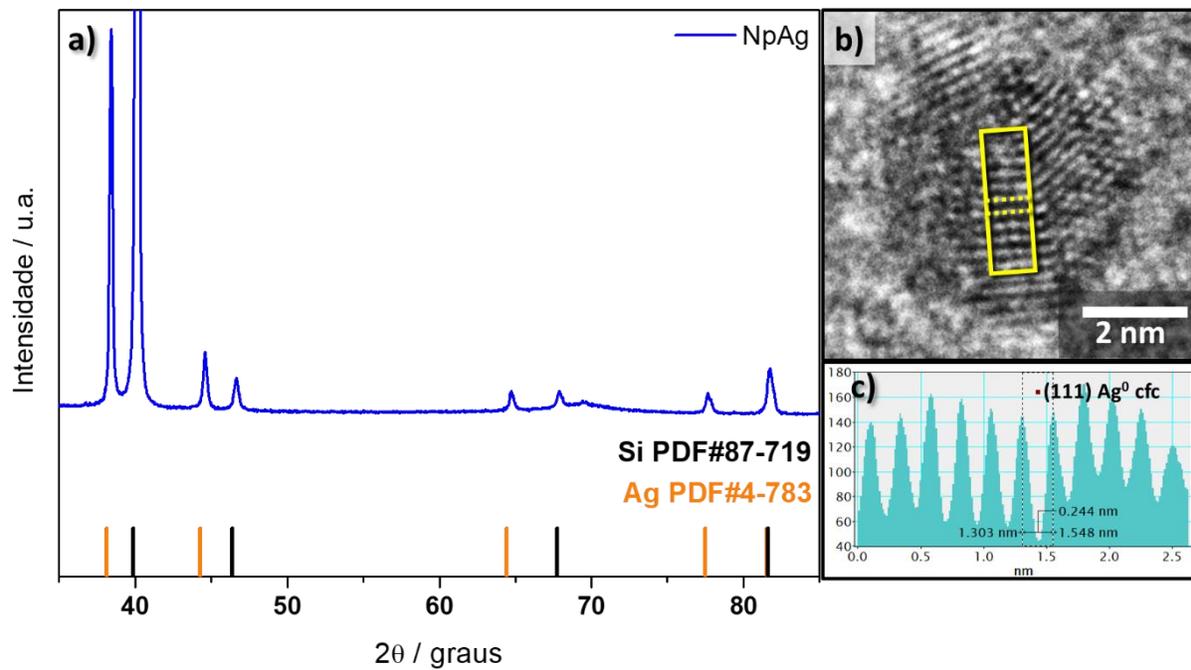


FIGURA 27 - a) Difratoograma de raios X das NpAg obtidas com as condições de síntese de nanopartículas de prata apresentadas na TABELA 7. b) Imagem de alta resolução por TEM de uma destas NpAg. c) Perfil de contraste (branco-preto) referente às áreas destacadas em amarelo em b) que correspondem aos planos cristalinos do material.

Foram preparadas seis soluções coloidais de NpAg visando avaliar sua reprodutibilidade, e também foram realizados testes para avaliar sua estabilidade ao longo do tempo e em diferentes pHs. A FIGURA 28a apresenta o máximo de absorção da média destas em função do tempo, com um pequeno desvio padrão. Nota-se que não houve redução da absorbância máxima destas soluções mesmo após 30 dias da síntese. O valor do comprimento de onda no máximo de absorção da banda plasmônica ao longo do tempo também foi avaliado, observando-se que não houve deslocamento do mesmo para nenhuma solução sintetizada. Dada a similaridade dos gráficos, a FIGURA 28b apresenta os espectros de apenas uma solução.

Medidas de potencial zeta podem ser usadas para determinar a carga superficial de uma partícula dispersa em uma dispersão coloidal, de modo que os valores

predizem a estabilidade coloidal. Partículas com potencial zeta $> \pm 30$ mV são consideradas estáveis¹⁷⁵. O ponto isoelétrico, no qual a carga das NpAg é nula, foi obtido em pH próximo de 3,8 (FIGURA 28). Portanto, as nanopartículas em pH $> 3,8$ exibiram carga negativa e, para pH $< 3,8$, carga positiva. A medida de potencial zeta no pH de síntese, equivalente a 9,4, apresentou um valor de -51 mV. Este valor negativo, provavelmente, está relacionado a cargas negativas de citrato que circundam as nanopartículas. Tanto um aumento quanto uma redução no pH de síntese da solução levou à redução da estabilidade da solução coloidal, entretanto as NpAg só se tornaram de fato instáveis em valores de pH menores que 5.

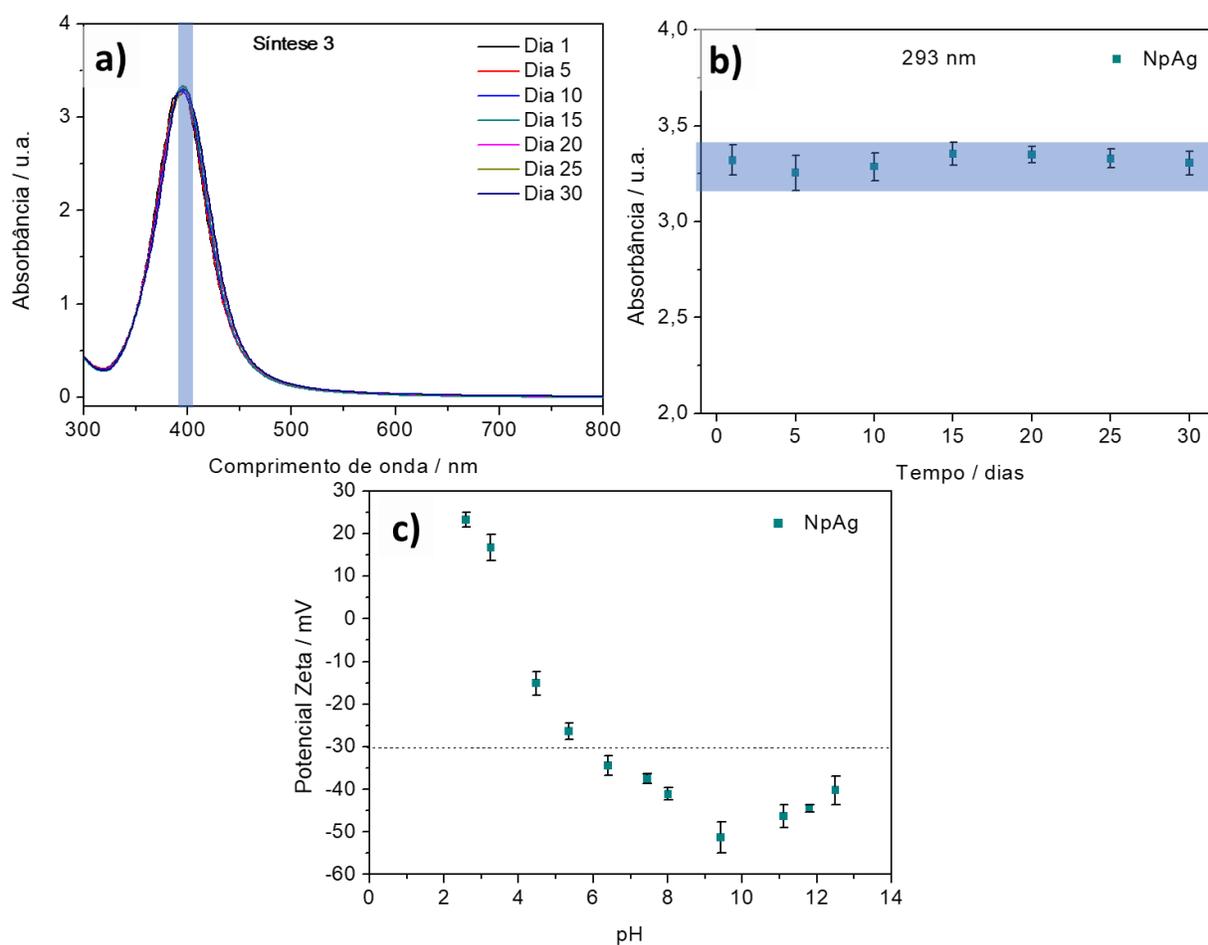


FIGURA 28 - Caracterizações das NpAg obtidas com as condições de síntese apresentadas na TABELA 7: a) Espectro de UV-Vis da síntese 3 de NpAg; b) Gráfico da absorbância máxima da solução de NpAg em função do tempo; c) Gráfico do potencial zeta em função do pH da solução de NpAg.

Nas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), um feixe de elétrons ao atravessar a amostra sofre diversos tipos de espalhamento que dependem das propriedades do material. Imagens de campo claro são formadas por elétrons que sofrem pouco desvio e de campo escuro por elétrons difratados pelos planos cristalinos do material. Pelas imagens obtidas por MET observa-se que as nanopartículas exibiram forma esférica (Figura 29a). Com o auxílio do software Image J foi realizada a contagem das NpAg a partir de várias imagens, sendo possível a construção de um histograma (Figura 29b) onde observou-se que as partículas estão mais distribuídas entre 1,5 e 6 nm, com tamanho médio de $3,91 \pm 1,25$ nm.

O tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas também foi caracterizado por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Esta técnica mede o movimento browniano das partículas e o relaciona com seu tamanho. As partículas são iluminadas por um feixe de laser e são medidas as flutuações de intensidade de luz espalhada pela solução coloidal. O tamanho de partícula medido por DLS corresponde ao diâmetro de uma esfera que se difunde na mesma velocidade que a partícula de interesse¹⁷⁶.

As partículas apresentaram maior distribuição entre 6 e 12 nm, com tamanho médio de $9,00 \pm 2,17$ nm (Figura 29c). Estes valores não foram muito diferentes dos obtidos por MET, o que indica pouca aglomeração das NpAg em solução.

Ainda, os diâmetros das NpAg observados pelas medidas de DLS foram superiores aos diâmetros observados pela técnica de MET, provavelmente porque com a técnica DLS mede-se o diâmetro hidrodinâmico da partícula, enquanto que com medidas de MET apenas o tamanho da partícula em si é considerado¹³¹. Outro ponto importante neste quesito é que em solução pode haver interações eletrostáticas entre as NpAg, podendo levar a um aumento no valor medido dos diâmetros.

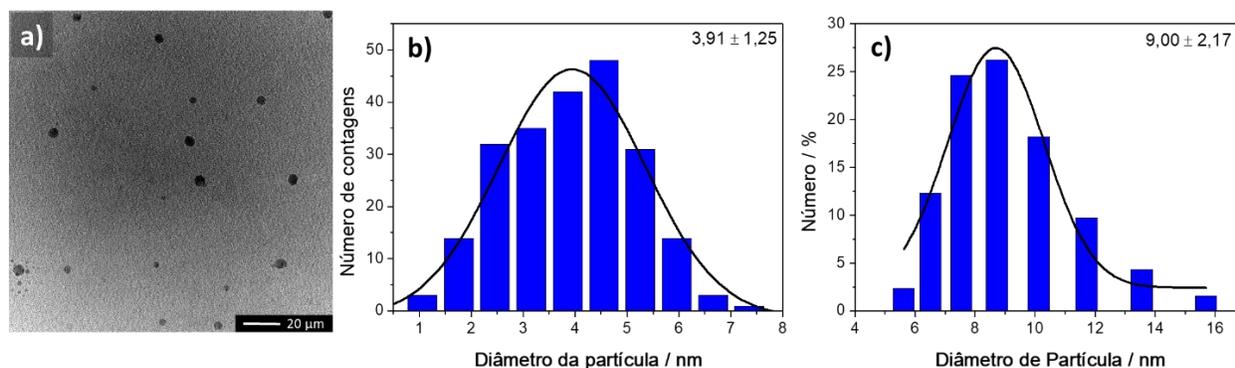


FIGURA 29 - a) Micrografia de MET das NpAg obtidas com as condições de síntese apresentadas na TABELA 7. Histogramas dos diâmetros de partículas obtido por: b) imagens de MET e, c) DLS.

4.3. Deposição de Ag sobre as superfícies anodizadas

Para promover atividade antimicrobiana sobre as amostras anodizadas (**An**) foram realizadas diversas tentativas de deposição de prata sobre sua superfície. A TABELA 8 resume as principais metodologias utilizadas. Destas algumas proporcionaram deposições significativas e homogêneas de prata sobre a superfície do Ti anodizado, demarcadas pelo símbolo “+” na TABELA 10. As deposições sinalizadas com o símbolo “-” ou não foram uniformes (gotejamento com secagem a temperatura ambiente, secagem com N₂ e gotejamento com solução de NpAg ressuspensa em EtOH, ou não apresentaram uma deposição significativa (gotejamento em chapa aquecida com volumes: 0,4; 0,8 e 1,2 mL).

TABELA 10 – Métodos de deposição de prata em Ti anodizado. (+) representa um recobrimento homogêneo e/ou significativo e (-) não homogêneo e/ou significativo.

Eletrodeposição	Ag_2SO_4	+	
	AgNO_3	+	
	NpAg	-	
Gotejamento de solução de NpAg	Temperatura ambiente	-	
	Secagem com N_2	-	
	Ressuspensão em EtOH	-	
	Aquecimento	Volumes menores (0,4; 0,8 e 1,2 mL)	-
		Volumes maiores (3, 5, 10 e 15 mL)	+

A FIGURA 30 apresenta imagens de MEV de algumas amostras cujas deposições não foram adequadas. Não foram obtidas imagens da amostra anodizada e com deposição de Ag por gotejamento seguido de secagem com gás N_2 , pois a deposição foi visualmente heterogênea.

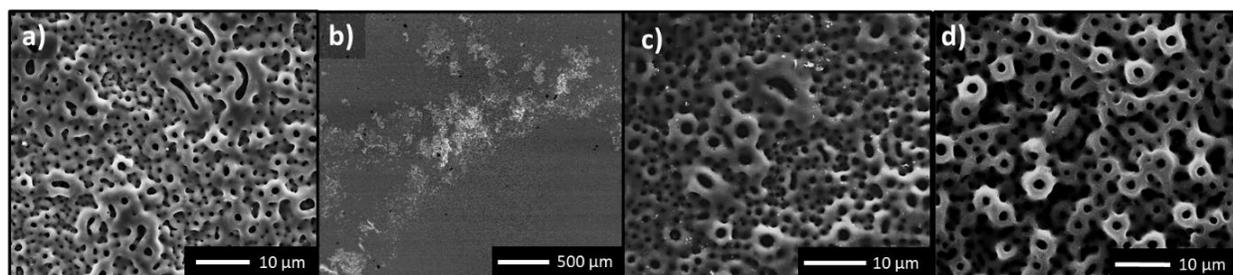


FIGURA 30 – Micrografias de MEV das superfícies com deposições de prata em Ti anodizado, inadequadas para o propósito deste trabalho: a) eletrodeposição de NpAg, b) secagem a temperatura ambiente, c) ressuspensão em EtOH e d) gotejamento de 1,2 mL sobre amostra aquecida.

A TABELA 11 resume as condições estudadas para as deposições de prata, tanto por eletrodeposição quanto por gotejamento, que foram adequadas para os objetivos deste trabalho.

TABELA 11 – Condições de deposição de Ag sobre Ti anodizado que foram significativas e/ou homogêneas.

Eletrodeposição de Ag			
Eletrólito	Concentração / mol L ⁻¹	Potencial / V	Tempo / min
Ag ₂ SO ₄	0,001	-3 e -5	0,5; 1 e 5
AgNO ₃	0,001	-5	1

Gotejamento de NpAg			
Solução	Volume / mL	Concentração de Ag ⁺ / mol L ⁻¹	Temperatura da Chapa / °C
NpAg (~ 4 nm)	3; 5; 10 e 15	2,65	~ 250

As micrografias de MEV das amostras que tiveram a prata eletrodepositada sobre o Ti anodizado estão dispostas na FIGURA 31, de onde se nota que a prata apresenta uma morfologia globular e dendrítica (melhor evidenciada pela FIGURA 37). Pode-se observar que não houve uma diferença significativa na eletrodeposição em Ag₂SO₄ 0,001 mol L⁻¹ a -5 V por 30 s e 1 min. Aparentemente houve um pequeno aumento na Ag depositada para o tempo de 5 min. Com relação à eletrodeposição no potencial de -3 V, por 30 s, para este eletrólito, nota-se que houve perda no quesito distribuição de Ag, com a formação de aglomerados. Para o eletrólito AgNO₃ mantendo a concentração, 0,001 mol L⁻¹, e parâmetros de eletrodeposição (-5 V, por 1 min) ocorreu uma redução visual na quantidade de Ag depositada.

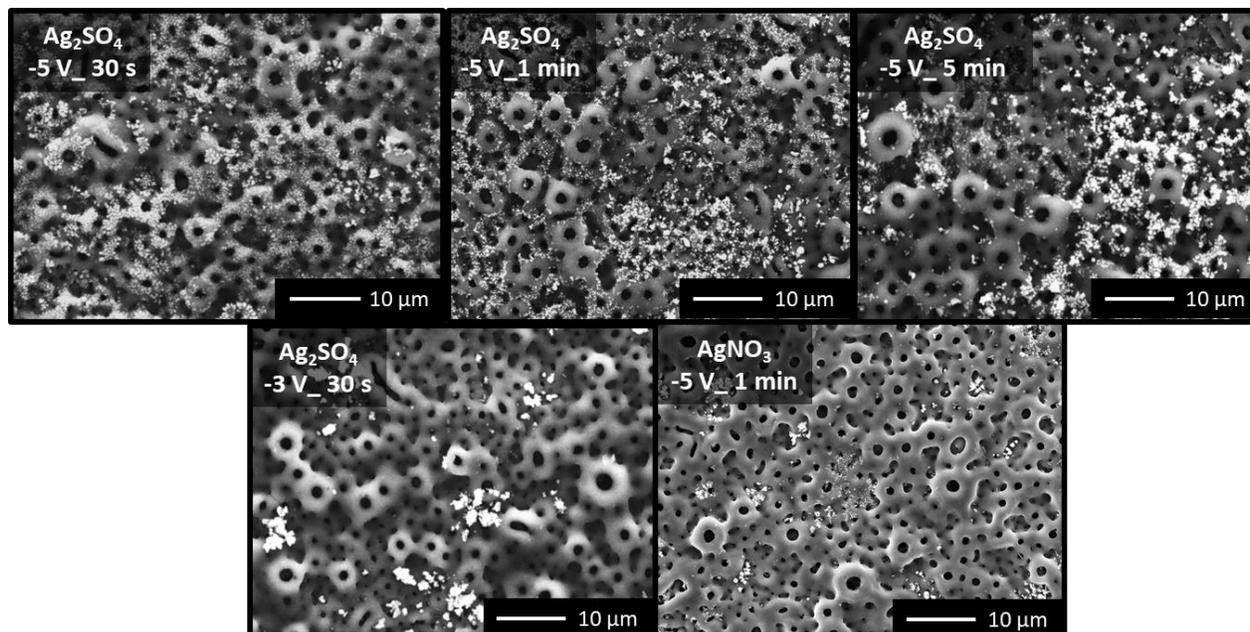


FIGURA 31 – Micrografias de MEV das amostras de Ti anodizadas com prata eletrodepositada nos eletrólitos Ag_2SO_4 e AgNO_3 $0,001\text{ mol L}^{-1}$ a -3 e -5 V nos diferentes tempos: 30 s , 1 min e 5 min .

A FIGURA 32 apresenta as amostras de Ti anodizado e com deposição de Ag por gotejamento dos volumes da solução de NpAg: 3 , 5 , 10 , e 15 mL . É evidente que quanto maior o volume gotejado maior a deposição de Ag. Para os volumes 3 , 5 e 10 mL a Ag depositada apresenta morfologia globular e encontra-se bem distribuída sobre a superfície. Já para o volume de 15 mL , além desta morfologia, pôde-se observar uma deposição preferencial de NpAg ao redor dos poros, evidenciada pela formação de aglomerados.

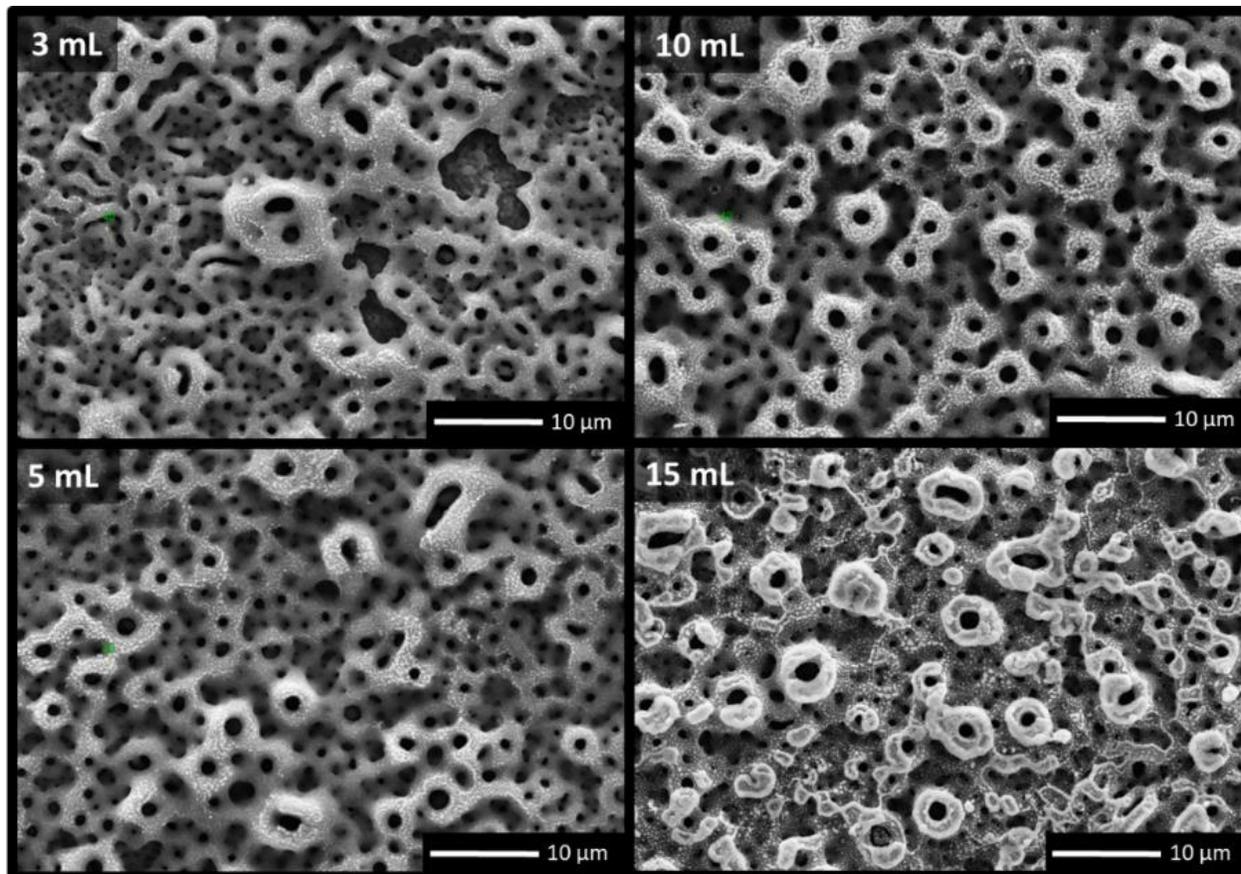


FIGURA 32 – Micrografias de MEV das amostras de Ti anodizadas e com Ag depositada por gotejamento dos volumes da solução de NpAg: 3, 5, 10 e 15 mL.

4.4. Caracterizações das superfícies modificadas

4.4.1. Atividade Antimicrobiana das superfícies Ti/TiO₂/Ag

Para todas as amostras selecionadas de Ti anodizado e com deposição de Ag observou-se a formação de halos de inibição, o que indica que essas superfícies tiveram resposta positiva com relação à atividade antimicrobiana para a bactéria Gram+ *Staphylococcus aureus*.

A FIGURA 33 apresenta o resultado referente ao teste de disco-difusão para as superfícies de Ti anodizado com prata eletrodepositada. Não houve diferença significativa entre os diferentes tempos (30 s, 1 min e 5 min) de eletrodeposição a -5 V, em Ag₂SO₄ 0,001 mol L⁻¹. Entretanto, com relação à eletrodeposição no mesmo potencial

em AgNO_3 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ notou-se uma redução significativa no halo de inibição, provavelmente devido a que, nesta condição, houve uma menor quantidade de Ag depositada (vide FIGURA 31). Deste modo, o eletrólito escolhido para dar continuidade aos testes foi Ag_2SO_4 .

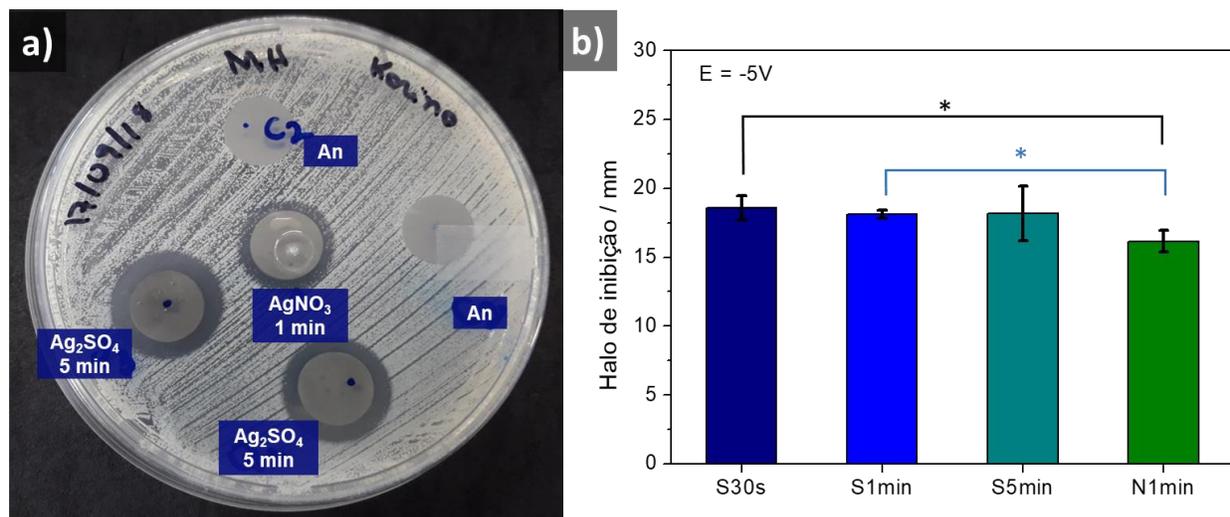


FIGURA 33 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado com eletrodeposição de Ag em Ag_2SO_4 (S) e AgNO_3 (N) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ a -3 e -5 V nos tempos: 30 s, 1 min e 5 min. a) Foto dos halos de inibição, onde A1 = AgNO_3 _1min; Q1 = Ag_2SO_4 _30s; Q3 = Ag_2SO_4 _1min e C2 = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição de cada tratamento (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

Comparando os halos de inibição das amostras contendo Ag eletrodepositada em Ag_2SO_4 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 s, nos potenciais -3 e -5 V, não se observou variação significativa (FIGURA 34). Porém, vale lembrar que a eletrodeposição em -5 V apresentou uma melhor uniformidade (FIGURA 31). Portanto, dentre as condições estudadas a que melhor se adequou aos propósitos deste trabalho foi a eletrodeposição em Ag_2SO_4 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 s a -5 V. Doravante esta amostra será denominada de **5V**.

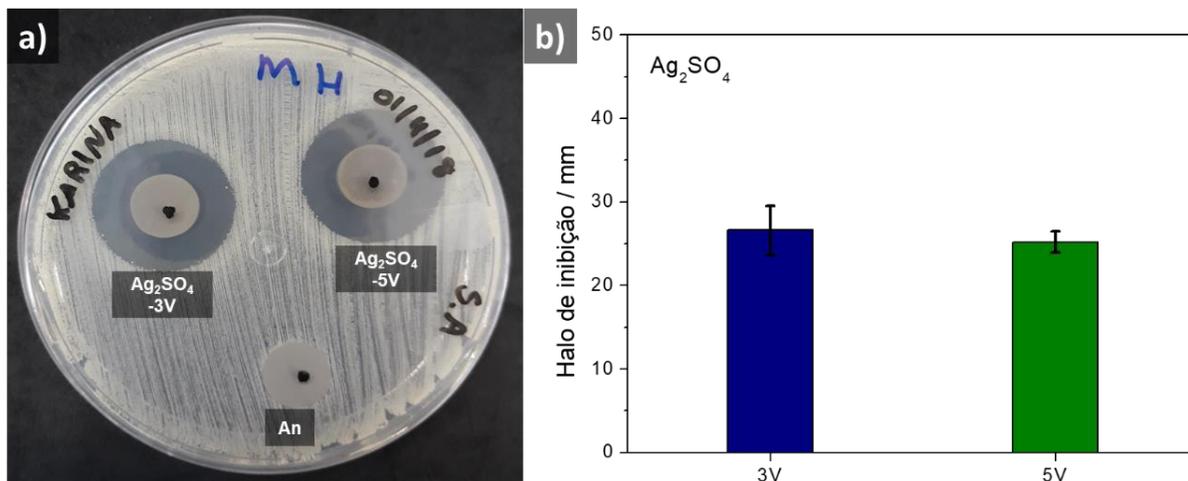


FIGURA 34 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado e com eletrodeposição de Ag em Ag_2SO_4 $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 s, nos potenciais: -3 e -5 V. a) Foto dos halos de inibição, onde An = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição dos diferentes tratamentos (não houve diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

Em relação aos resultados com Ag depositada por gotejamento de solução contendo NpAg, observou-se que quanto maior o volume de deposição da solução maior o halo de inibição (vide FIGURA 35b), porém, para o volume de 15 mL notou-se uma redução no diâmetro do halo. Muito provavelmente isso ocorreu devido à aglomeração da Ag durante a produção destas amostras (FIGURA 32) o que pode ter levado a uma menor área superficial deste material antimicrobiano. Desse modo, dentre as deposições de Ag por gotejamento de solução de NpAg, considerando que a Ag pode ser tóxica para células optou-se por utilizar o menor volume de deposição que apresentou atividade antimicrobiana, ou seja, 3 mL. De agora em diante essa amostra será denominada **3mL**.

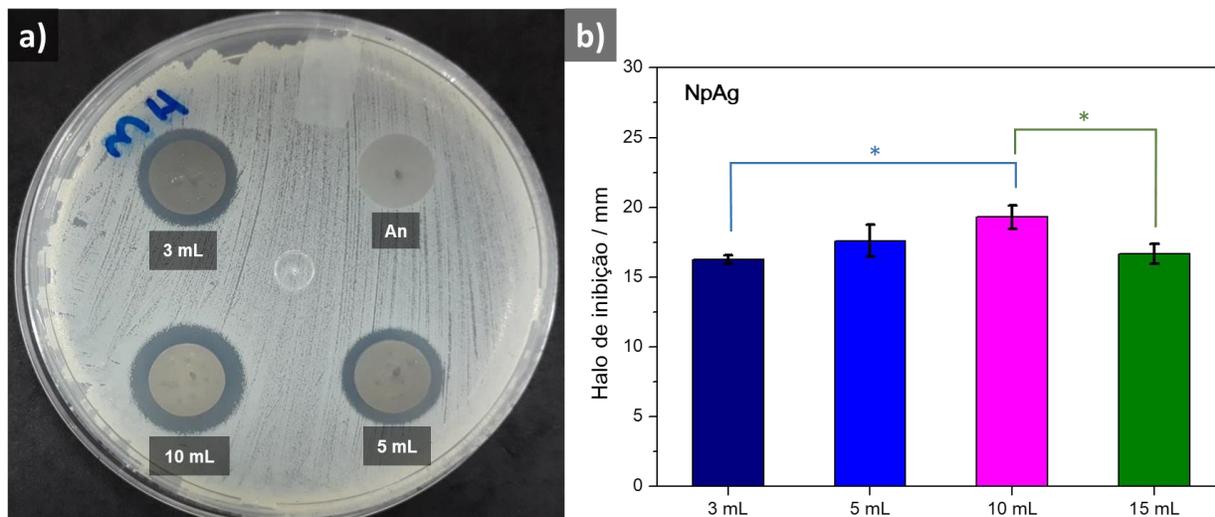


FIGURA 35 - Teste de disco-difusão em ágar das amostras de Ti anodizado e com deposição de Ag por gotejamento dos volumes: 3, 5, 10 e 15 mL. a) Foto dos halos de inibição, onde, An = Anodizada (controle negativo). b) Gráfico comparando a média da triplicata dos diâmetros dos halos de inibição dos diferentes tratamentos (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

A TABELA 12 resume as condições de deposição de Ag selecionadas de acordo com os resultados antimicrobianos mais promissores, para realizar o recobrimento polimérico e demais análises.

TABELA 12 - Parâmetros das deposições de Ag sobre o Ti anodizado das amostras selecionadas para recobrimento polimérico.

Eletrodeposição de Ag	Solução	Potencial / V	Tempo / min	Amostra
	Ag_2SO_4 0,001 mol L ⁻¹	-5	0,5	5V
Gotejamento de NpAg	Solução	Volume / mL	Temperatura / °C	Amostra
	NpAg (~ 4 nm)	3	~ 250	3mL

4.4.2. Análises de MEV, EDS e DRX

A FIGURA 36 exibe os difratogramas de raios X das amostras **5V** e **3 mL**. Ambos apresentaram um pico em torno de 44,3 graus e outro, de menor intensidade, em

64,4 graus, similares aos encontrados na ficha cristalográfica JCPDS-PDF#04-0783, referentes aos planos cristalinos (200) e (220), respectivamente, da prata metálica de estrutura cúbica.

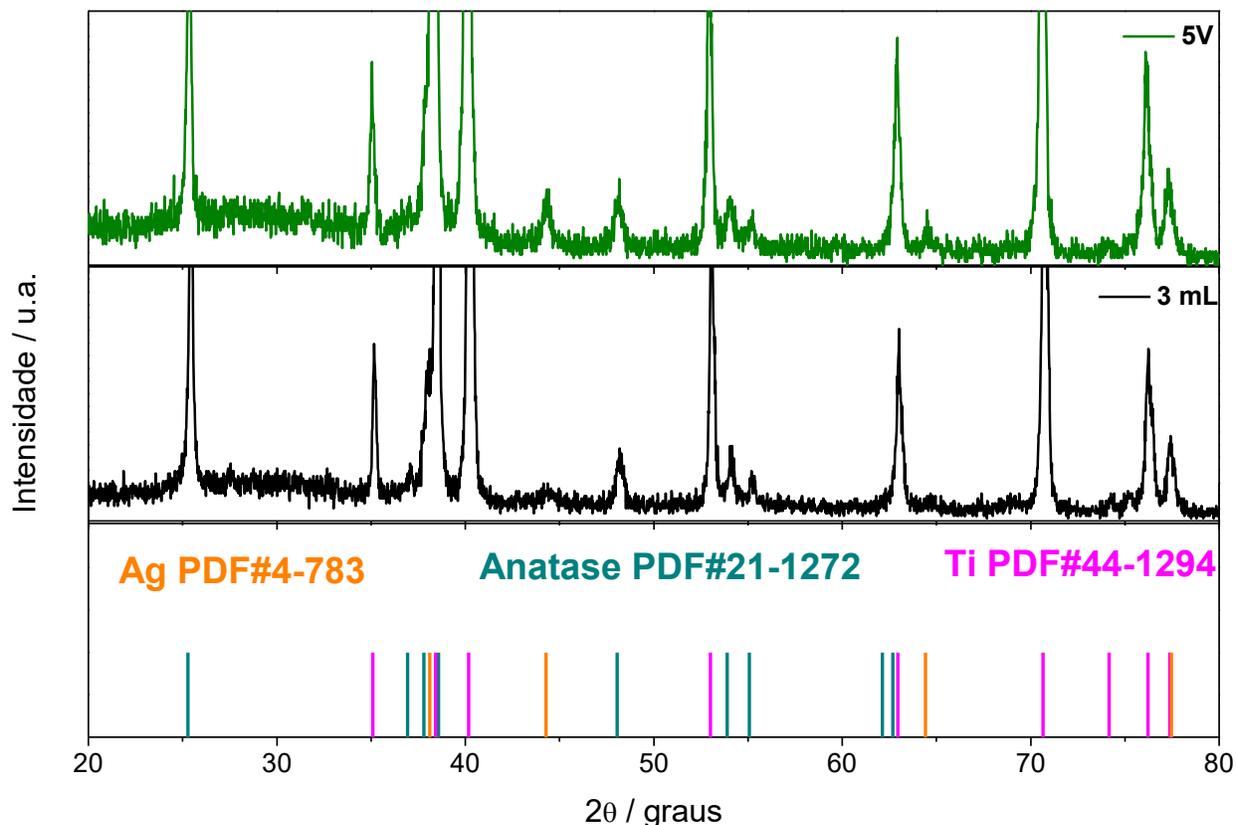


FIGURA 36 - Difratomogramas de raios X das amostras **5V** e **3mL**. Condições de anodização por MAO destas amostras dispostas na TABELA 12.

Adicionalmente, medidas de EDS foram realizadas confirmando a presença da Ag nas amostras **3mL** e **5V** (Apêndice A) e, para avaliação da distribuição da Ag sobre a superfície destas, realizou-se o mapeamento de elementos por EDS. Através das imagens contidas da FIGURA 37 observou-se que a deposição por gotejamento de NpAg forneceu uma melhor distribuição da prata comparada à da amostra **5V**.

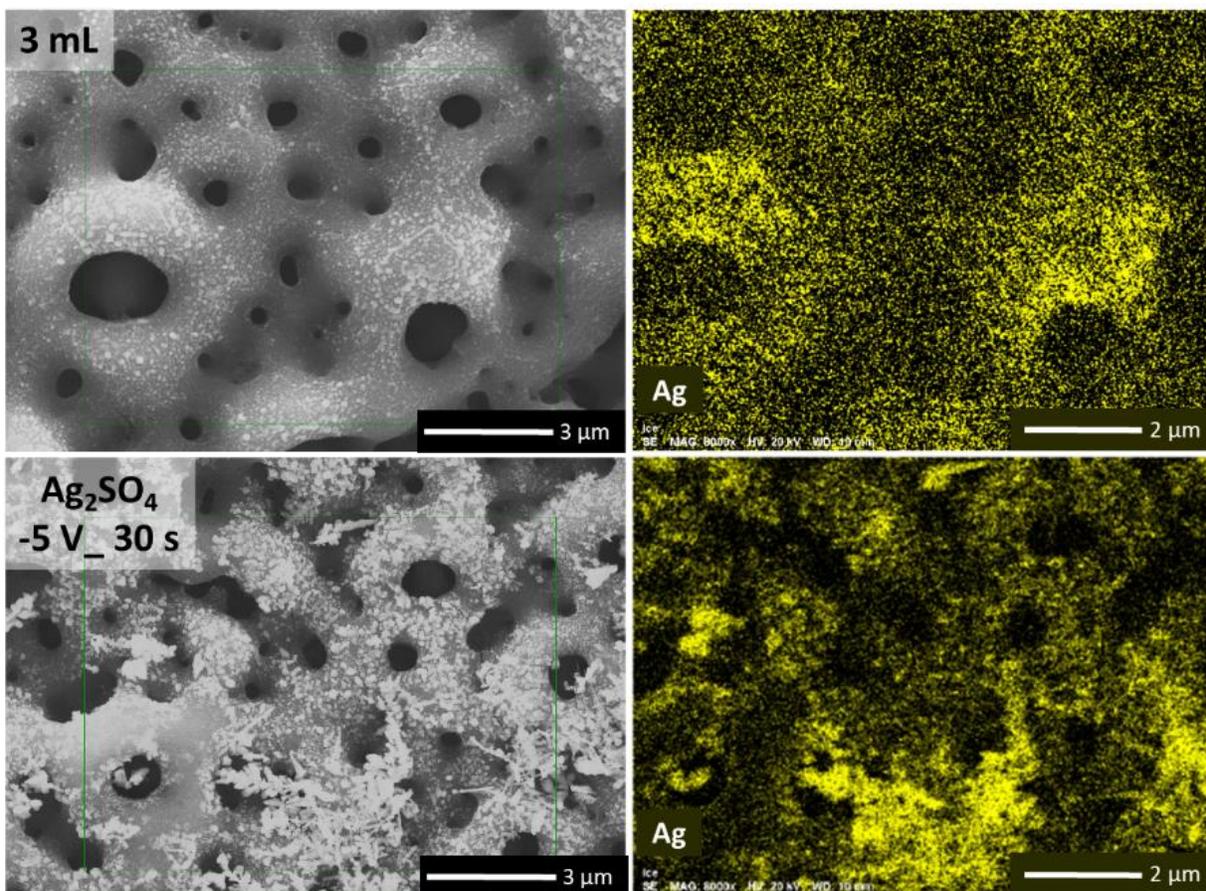


FIGURA 37 – Imagens de MEV e mapeamento do elemento Ag por EDS das amostras 3mL e 5V. Condições de anodização por MAO destas amostras dispostas na TABELA 12.

4.5. Recobrimento polimérico por eletrofição

Para otimização da deposição de fibras de PLA sobre as amostras de Ti anodizado foram variados os parâmetros: tipo de coletor (rotacional e estático), tempo de deposição (0,5 – 15 min) e concentração do PLA (10 e 14 %), resumidos na TABELA 13.

TABELA 13 - Parâmetros utilizados na eletrofiação do PLA para recobrimento das amostras: **An, 3mL e 5V**. E = coletor estático e R = coletor rotacional à 400 rpm.

Tempo / min	PLA 10 % <i>m/m</i>		PLA 14 % <i>m/m</i>
0,5	E		
1	E		
2	E	R	R
3		R	R
4		R	R
5	E	R	R
10		R	R
15		R	R

As deposições realizadas com o coletor estático não apresentaram um bom recobrimento das superfícies estudadas (Apêndice B). Comparando o mesmo tempo de recobrimento na mesma concentração do PLA e variando apenas o uso do coletor entre estático e rotacional, observou-se que ocorre um maior recobrimento com o coletor rotacional (FIGURA 38).

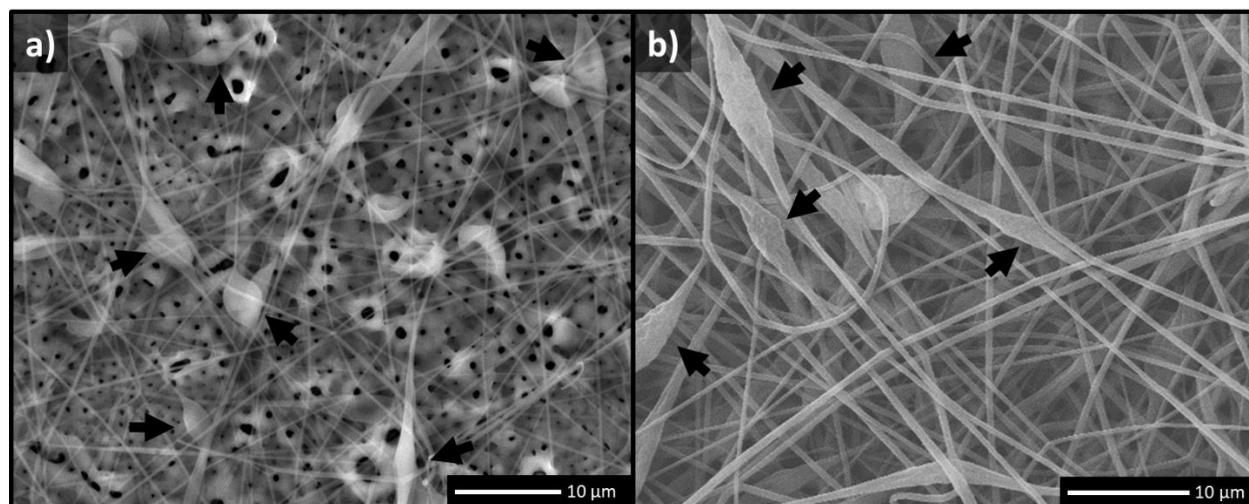


FIGURA 38 - Fibras de PLA 10 % depositadas por 5 minutos sobre Ti anodizado. Tipo de coletor: a) estático e b) rotacional. Setas indicativas em alguns “beads”.

De modo geral, o aumento do tempo de fiação gerou um maior recobrimento da amostra (Apêndice B). Todas as nanofibras obtidas com o PLA 10 % (*m/m*) exibiram a presença de grãos ou *beads*, em evidência na FIGURA 38b. Segundo Gu et al. (2005)

um aumento na concentração do polímero leva à formação de fibras mais uniformes¹⁶⁶. Portanto, aumentou-se a concentração do PLA para 14 % (*m/m*). A FIGURA 39 permite comparar o recobrimento nestas diferentes concentrações de PLA, onde comprovou-se que o aumento da concentração do polímero foi eficiente para a formação de fibras mais uniformes e sem a presença de *beads*.

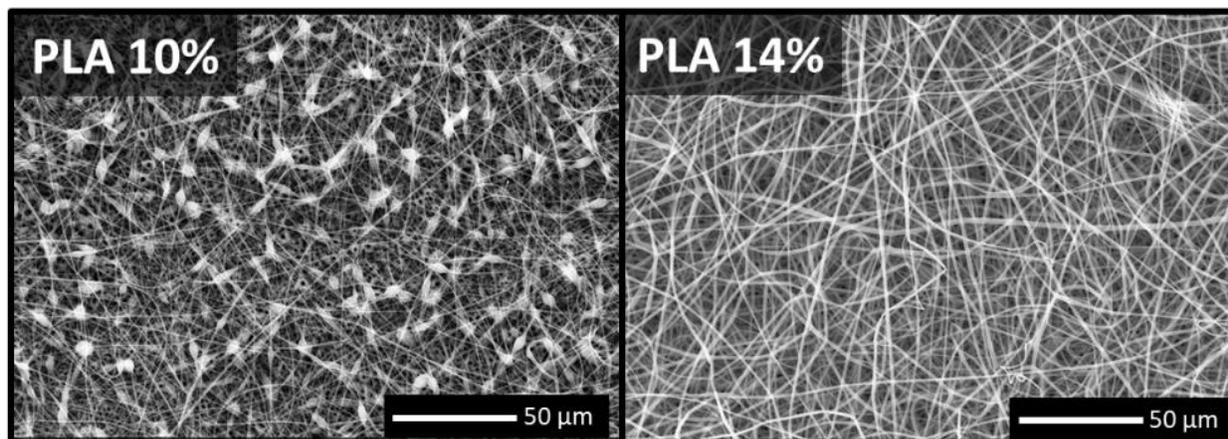


FIGURA 39 - Fibras de PLA 10 e 14 % (*m/m*) sobre Ti anodizado (**An**) após 10 min de eletrofição.

A fiação do PLA 14 % foi realizada por 2, 3, 4, 5, 10 e 15 min (Apêndice C) sobre as superfícies de Ti anodizado com e sem deposição de Ag, e, assim como para o PLA 10 %, quanto maior foi o tempo de fiação maior o recobrimento da amostra. Visando um maior recobrimento das superfícies decidiu-se utilizar o tempo de 15 min. As amostras com deposição de Ag **5V** e **3mL** que foram recobertas com polímero foram denominadas **5VPLA** e **3mLPLA**, e a amostra **An** que também foi recoberta com o polímero foi designada como **AnPLA**.

Através de micrografias de MEV destes recobrimentos, exemplificadas na FIGURA 40a, e, com o auxílio do software Image J, foi possível construir um histograma de distribuição dos diâmetros dessas fibras (FIGURA 40b), demonstrando que nessa condição de fiação foi possível obter fibras ultrafinas com diâmetro médio de $0,93 \pm 0,26$ μm e distribuição majoritária entre 0,6 e 1,2 μm .

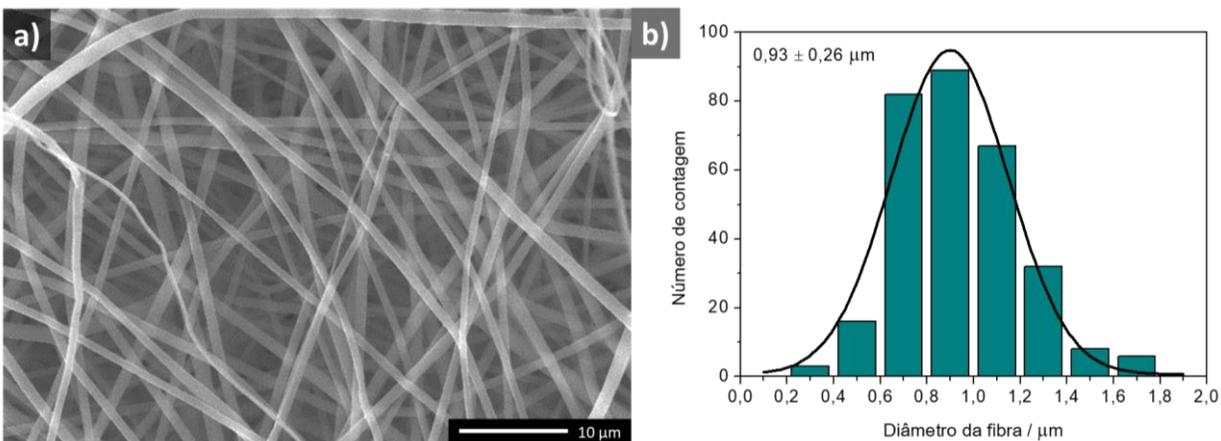


FIGURA 40 - a) Fibras ultrafinas de PLA 14 % (*m/m*) eletrofiadas por 15 min sobre Ti anodizado. b) Histograma dos diâmetros das fibras.

4.5.1. Atividade antimicrobiana das superfícies Ti/TiO₂/Ag/PLA

Após recobrimento polimérico nas amostras (descrito na TABELA 12) foi realizado, novamente, o teste de disco-difusão de modo a verificar se a atividade antimicrobiana continuaria presente. Observou-se que não houve formação do halo de inibição (vide FIGURA 41), muito provavelmente porque o PLA retardou a difusão da Ag para o meio, impedindo a formação do halo. Vale ressaltar que uma vez que as bactérias já tenham formado colônias sobre o ágar, mesmo que o agente antimicrobiano se difunda e desencadeie a morte bacteriana não mais resultará na formação de halo, pois os debris celulares continuaram presentes tornando impossível a verificação visual da morte dos micro-organismos.



FIGURA 41 - Teste antimicrobiano de disco-difusão com *S. aureus* das amostras **An**, **5VPLA** e **3mLPLA**.

Como o teste de disco-difusão pode não ter sido adequado para avaliação da atividade antimicrobiana deste tipo de amostras, utilizou-se uma adaptação da norma japonesa, JIS 2801 (2012), para melhor avaliação destas. Nesta norma, o inóculo, que consiste em uma suspensão de *S. aureus*, fica em contato direto com a superfície da amostra e sobre este é colocado um filme de polietileno com o intuito de promover um melhor espalhamento do inóculo. Estas amostras são então incubadas por 24 h, a 36 ± 1 °C. Deste modo, a difusão da Ag para a suspensão poderia ser mais eficiente que no teste de disco-difusão.

Conforme descrito em Metodologia, após a incubação realizou-se uma diluição seriada da suspensão e inoculada em ágar PCA pelo método *Spread-Plate* e também por *Pour-Plate*. A FIGURA 42 ilustra o resultado da atividade antimicrobiana pelo método *Spread-Plate* da amostra **An**, que foi utilizada como controle negativo. Nota-se a formação de colônias até diluição 10^{-2} . Não foi realizado o método *Pour-Plate* para o controle.

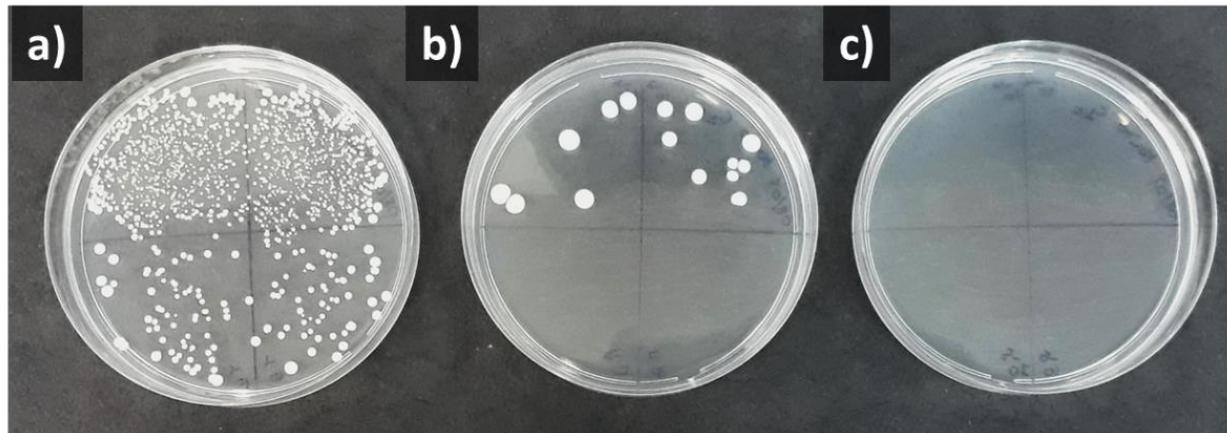


FIGURA 42 – Teste de atividade antimicrobiana com *S. aureus* pelo método *Spread-Plate* para amostra **An** (controle). Diluições: a) quadrantes superiores 10^0 e quadrantes inferiores 10^{-1} , b) quadrantes superiores 10^{-2} e quadrantes inferiores 10^{-3} e c) quadrantes superiores 10^{-4} e quadrantes inferiores 10^{-5} .

Não foi observado crescimento de UFC nas amostras **5V** e **3mL** para ambos os métodos de semeadura: *Pour-Plate* e *Spread-Plate*. Entretanto, não se observou o mesmo resultado para as amostras recobertas com PLA (FIGURA 43); para estas, ocorreu a formação de UFC, porém houve uma redução com relação ao controle. Este resultado corrobora com a hipótese levantada após leitura dos resultados dos testes de disco-difusão. Muito provavelmente o PLA cause um retardamento da difusão da prata, além disso, como se trata de um polímero hidrofóbico, durante as análises foi notável que, mesmo com o uso do filme de polietileno sobre o inóculo, não houve um espalhamento completo da suspensão sobre a superfície da amostra. Isso leva a uma menor área de contato entre inóculo e amostra, podendo também estar gerando esta diminuição da atividade antimicrobiana destas amostras.

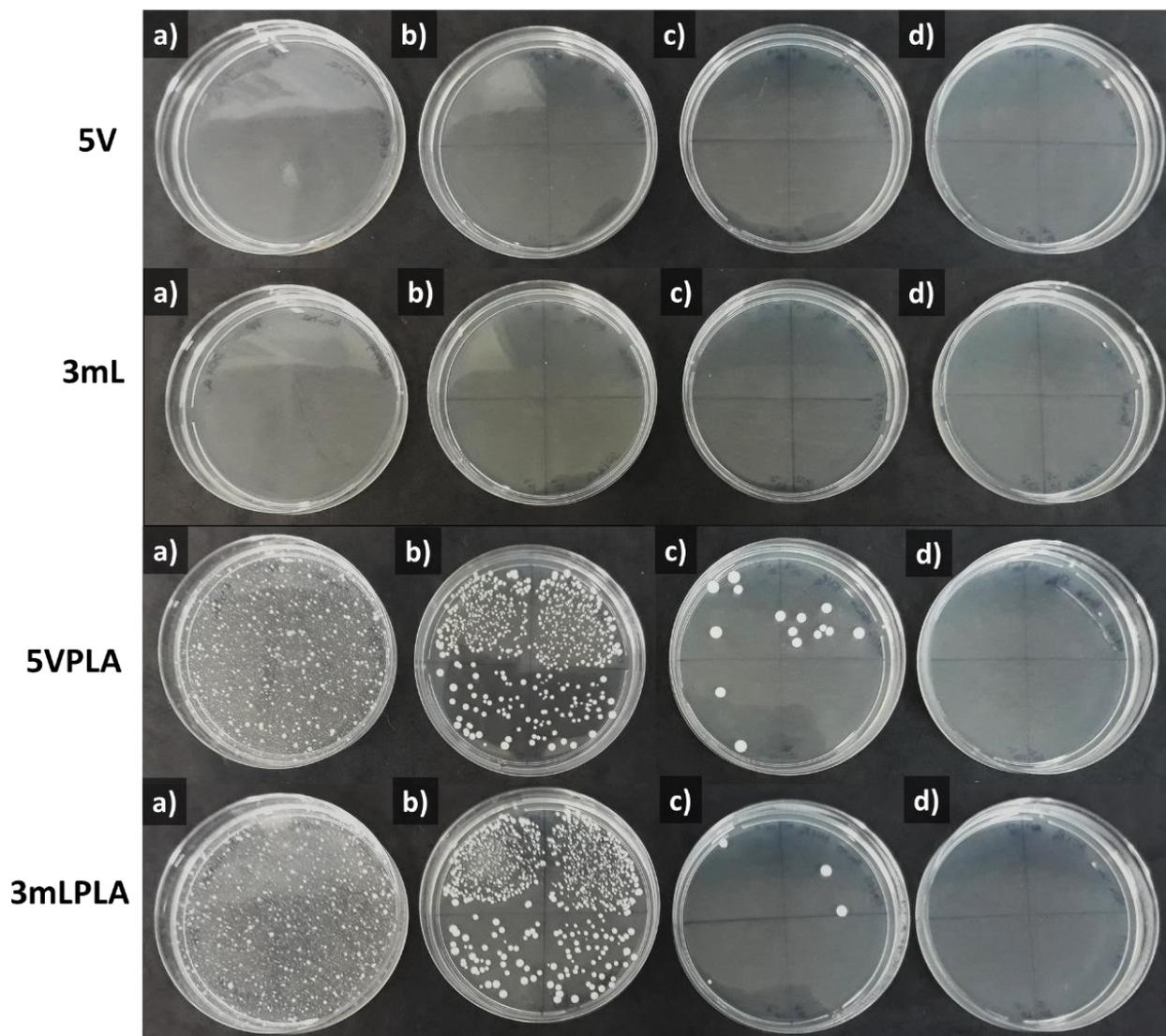


FIGURA 43 - Testes antimicrobianos com *S. aureus* das amostras **5V**, **3 mL**, **5VPLA** e **3mLPLA** segundo a norma JIS 2801 (2012). a) método *Pour-Plate*, e, demais placas método *Spread Plate* nas diluições: b) quadrantes superiores 10^0 e quadrantes inferiores 10^{-1} , c) quadrantes superiores 10^{-2} e quadrantes inferiores 10^{-3} e d) quadrantes superiores 10^{-4} e quadrantes inferiores 10^{-5} .

Quantitativamente, as amostras **5V** e **3mL** foram capazes de fornecer uma redução maior que 4 ordens de grandeza com relação ao controle, o que corresponde a uma morte de praticamente todas as bactérias (FIGURA 44). Jia et al. (2016) produziram superfícies similares à estas amostras. De acordo com eles a atividade antimicrobiana destas amostras está relacionada principalmente a 3 fatores: 1 - à repulsão das bactérias

pelos íons de prata liberados ao meio; 2 - à morte por contato entre bactéria e a Ag da superfície e; 3 - à ação sinérgica desses fatores. Ainda segundo estes autores, a existência de Ag dentro dos poros torna essas cavidades uma “armadilha mortal” às bactérias, pois uma vez lá dentro torna-se impossível se libertarem com vida. Um agravante para as bactérias é que seu metabolismo acidifica o meio fazendo com que a prata metálica se dissolva mais rapidamente e potencialize sua atividade antimicrobiana¹²².

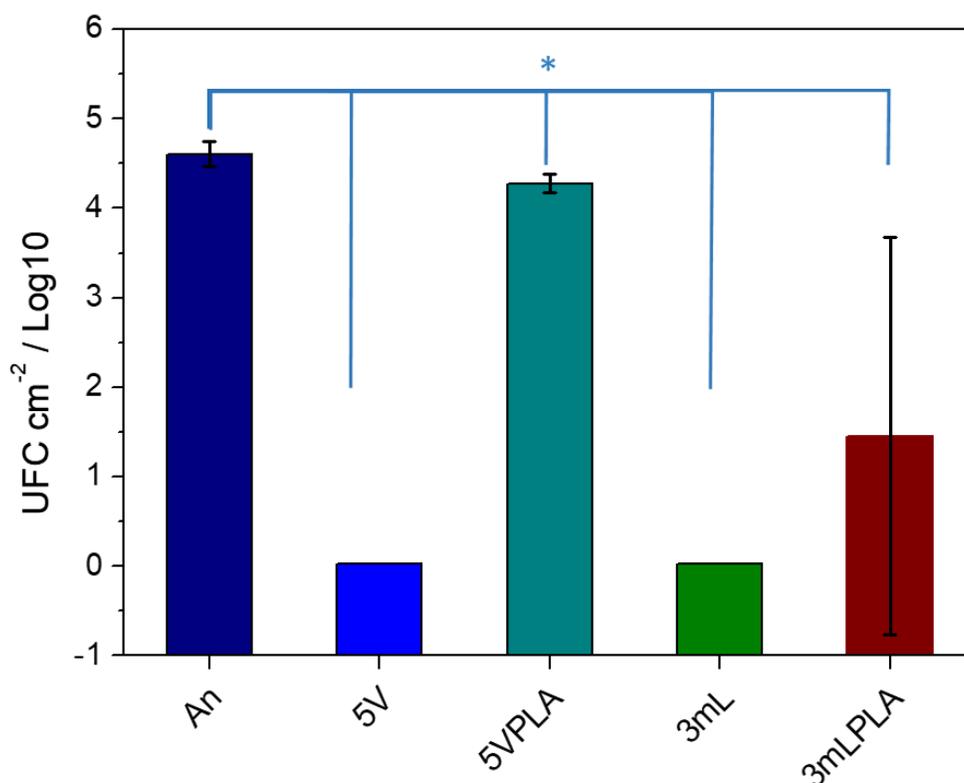


FIGURA 44 - Contagem das UFC da bactéria *S. aureus* do teste antimicrobiano segundo a norma JIS 2801 (2012) das amostras **An**, **5V**, **5VPLA**, **3 mL** e **3mLPLA** (*diferença estatística entre o grupo controle (**An**) e os demais, $p > 0,05$).

Ainda que as amostras **3mLPLA** e **5VPLA** não tenham suscitado uma redução tão expressiva das UFC quanto as não recobertas, muito provavelmente porque a morte bacteriana esteja relacionada apenas com a liberação de íons de prata ao meio, ainda apresentaram uma redução significativa comparadas à **An**, com um valor de aproximadamente 83 e 54 % para **3mLPLA** e **5VPLA**, respectivamente (TABELA 14).

TABELA 14 - Redução percentual de UFC de *S. aureus* segundo a norma JIS 2801 (2012) das amostras **An**, **5V**, **5VPLA**, **5V** e **3mLPLA**.

	Controle	5V	5VPLA	3mL	3mLPLA
Redução de UFC / %	0,0 ^a	99,998 ^b	54,165 ^c	99,998 ^b	83,165 ^d
Desvio padrão	0,0	0,000	10,534	0,000	27,073

^{a,b,c,d} diferença estatística entre os grupos assinalados, $p > 0,05$.

De acordo com Qing et al. (2018) as NpAg exibem dois mecanismos antibacterianos que são amplamente aceitos: morte por contato e morte mediada por íons de Ag¹⁷⁷. Ademais, acredita-se que exista um sinergismo entre esses mecanismos¹⁷⁸. Desse modo, é provável que o recobrimento polimérico tenha minimizado a atividade antibacteriana da Ag ao inibir o mecanismo de morte por contato. Além disso, a resposta extremamente superior das amostras **5V** e **3mL** muito provavelmente esteja relacionada a este sinergismo.

4.5.2. Medidas de ângulo de contato

A molhabilidade de uma superfície é de suma importância em aplicações biomédicas, pois influencia na interação do material com proteínas do meio em que é inserido, consequentemente em seu desempenho com relação ao seu comportamento celular. A rugosidade e a composição química são propriedades que afetarão essa molhabilidade⁷⁵. Alguns estudos sugerem que superfícies de Ti mais hidrofílicas induzem respostas celulares osteogênicas durante a cicatrização de implantes dentários acelerando o processo de osseointegração^{63, 67, 122}.

Medidas de ângulo de contato são utilizadas para definir a molhabilidade de um material sólido, que por sua vez, está relacionada à hidroflicidade de sua superfície. Superfícies hidrofóbicas, devido à pouca afinidade por água, não se molham (superfície apolar), ou seja, a gota não sofre espalhamento. O contrário é observado em superfícies hidrofílicas (superfície polar), quando ocorre o espalhamento da gota e a superfície é então molhada.

As medidas de ângulo de contato foram realizadas nas amostras **Pol**, **An**, **AnPLA**, **3mL**, **3mLPLA**, **5V** e **5VPLA**. A FIGURA 45 apresenta fotos destas amostras, onde nota-se que a amostra **Pol** possui a coloração cinza do Ti com uma aparência mais brilhante que as demais. Já a amostra **An** mantém a cor cinza, porém com uma tonalidade mais opaca. A amostra com deposição de Ag **5V** também possui a coloração cinza opaco, porém apresenta algumas manchas de cor cinza com tonalidade mais escura, ao contrário da amostra **3mL** que exibe algumas manchas de cinza claro. Todas as amostras com recobrimento polimérico, **AnPLA**, **5VPLA** e **3mLPLA**, apresentaram a mesma aparência, demonstrando que o recobrimento com PLA realizado nas mesmas condições foi reprodutível.

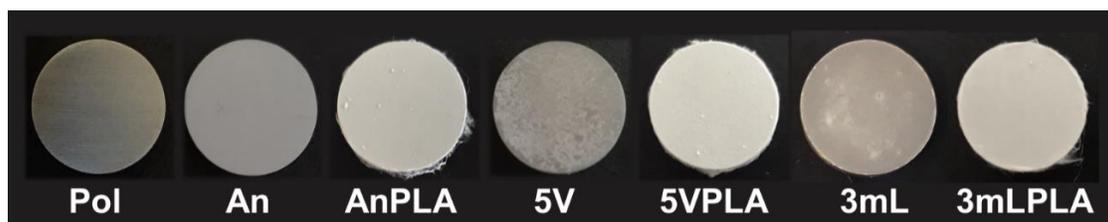


FIGURA 45 - Fotos das amostras de Ti com diferentes tratamentos de superfícies: **Pol**, **An**, **AnPLA**, **3mL**, **3mLPLA**, **5V** e **5VPLA**.

A FIGURA 46 mostra as fotografias de uma gota de água, com volume de 5 μL , sobre as superfícies modificadas de Ti. Visualmente a amostra **3mL** foi a que apresentou menor ângulo de contato, seguida pela amostra **Pol**. As demais amostras demonstraram um comportamento muito semelhante.

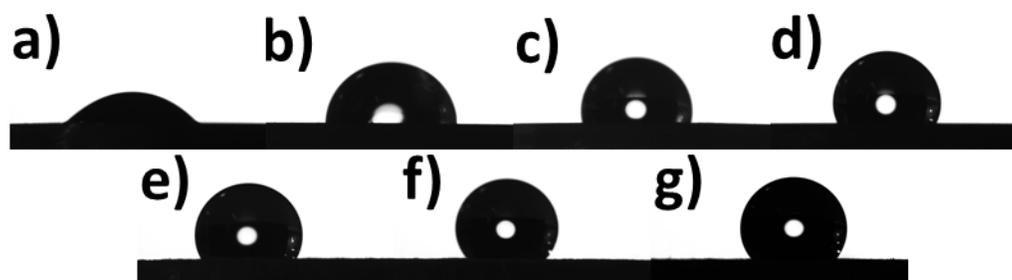


FIGURA 46 – Imagens dos ângulos de contato de uma gota d'água, no tempo de 10s, sobre as amostras: a) **3mL**, b) **Pol**, c) **5V**, d) **An**, e) **5VPLA**, f) **3mLPLA** e g) **AnPLA**.

Notavelmente após a anodização a molhabilidade da superfície diminuiu, muito provavelmente devido à formação de poros. Após deposição de NpAg ocorreu um aumento expressivo na molhabilidade, e com o recobrimento polimérico novamente houve uma redução na molhabilidade. Visto que o PLA é um polímero hidrofóbico e que foi realizado o mesmo tipo de recobrimento nas amostras **AnPLA**, **5VPLA** e **3mLPLA**, é coerente que estas superfícies sejam não molhantes, ou, predominantemente não molhantes, e que o ângulo de contato sobre estas seja semelhante.

A FIGURA 47 apresenta a variação do ângulo de contato formado entre a gota d'água e a superfície do Ti modificado no transcorrer de 90 s. Com exceção das amostras **3mL** e **5V**, as demais amostras praticamente não exibiram variação no ângulo de contato com o tempo. Para estas amostras é possível que esta redução seja devido à penetração parcial da gota nos poros.

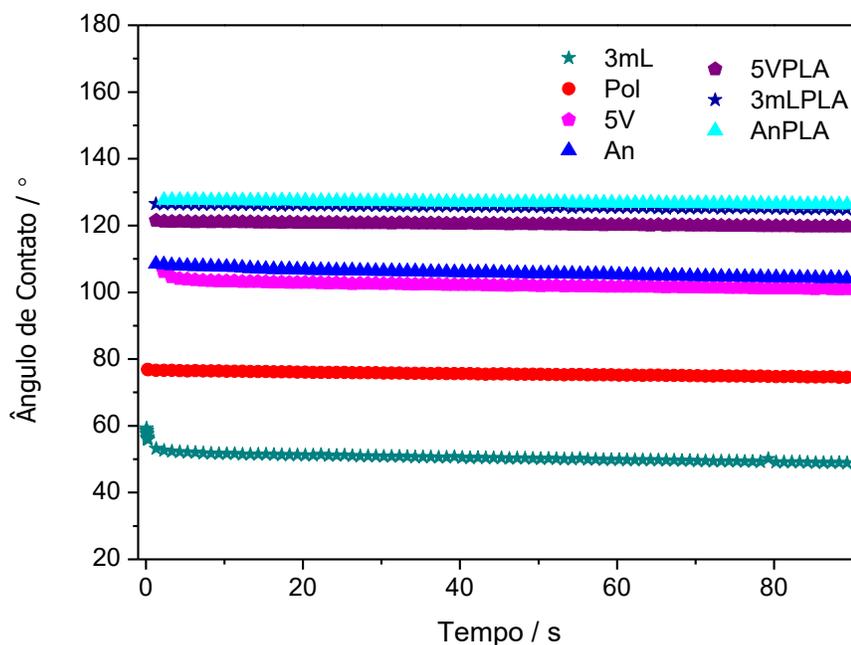


FIGURA 47 – Gráfico da variação com o tempo do ângulo de contato entre uma gota d'água e as superfícies das amostras: **3mL**, **Pol**, **5V**, **An**, **5VPLA**, **3mLPLA** e **AnPLA**.

A TABELA 15 apresenta os valores dos ângulos de contato em ordem crescente, nos períodos de 10 e 90 s, das superfícies estudadas. Nota-se que não houve variação significativa para quase todos os tratamentos entre os períodos de 10 e 90 s, com exceção da amostra **Pol**. Muito provavelmente essa diferença ocorreu somente nesta superfície pois é a única não porosa.

Apenas as amostras **3mL** e **Pol** foram predominantemente molhantes, as demais foram não molhantes. Como referido anteriormente, observa-se que os recobrimentos poliméricos apresentaram valores similares de ângulo de contato e não apresentaram diferença estatística entre si. Também não houve diferença significativa entre os grupos **5V** e **An**, o que evidencia a diferença nas características das amostras que passaram por processos de deposição de Ag diferentes. As superfícies apresentaram molhabilidade decrescente na seguinte ordem: **3mL > Pol > 5V > An > 5VPLA > 3mLPLA e AnPLA**.

TABELA 15 - Ângulos de contato de uma gota d'água, nos períodos de 10 e 90 s, sobre a superfície das amostras: **3mL, Pol, 5V, An, 5VPLA, 3mLPLA e AnPLA**.

Amostra	Tempo / s	Ângulo de Contato / °	Desvio Padrão	Tempo / s	Ângulo de Contato / °	Desvio Padrão
3mL ^a		51,56	13,83		48,66	13,72
Pol ^a		77,55*	1,68		73,86*	2,18
5V ^b		104,11	2,27		101,30	2,72
An ^b	10	107,61	8,06	90	103,23	7,95
5VPLA ^c		122,01	6,40		120,67	6,64
3mLPLA ^c		126,28	3,52		124,90	3,51
AnPLA ^c		126,65	4,15		125,36	4,22

*diferença estatística entre os tempos de 10 e 90 s, $p > 0,05$.

^{a,b,c} diferença estatística entre os grupos assinalados, $p > 0,05$.

4.6. Testes de biocompatibilidade

4.6.1. Viabilidade e proliferação celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada para as amostras **Pol** e **An** pelo teste Alamar Blue até 21 dias. As células viáveis podem reduzir o composto resazurina, de coloração azul e não fluorescente, para resorufina que possui cor avermelhada e é fluorescente. Portanto, há uma correlação direta entre a redução do sal presente no meio osteogênico e a densidade de células vivas, ou seja, este teste é indicativo do crescimento celular e da atividade metabólica^{67, 179}.

Ambas amostras permitiram a proliferação celular ao longo do tempo e não exibiram diferença significativa dentro de um intervalo de confiança de 95 % entre elas dentro do mesmo período (FIGURA 48).

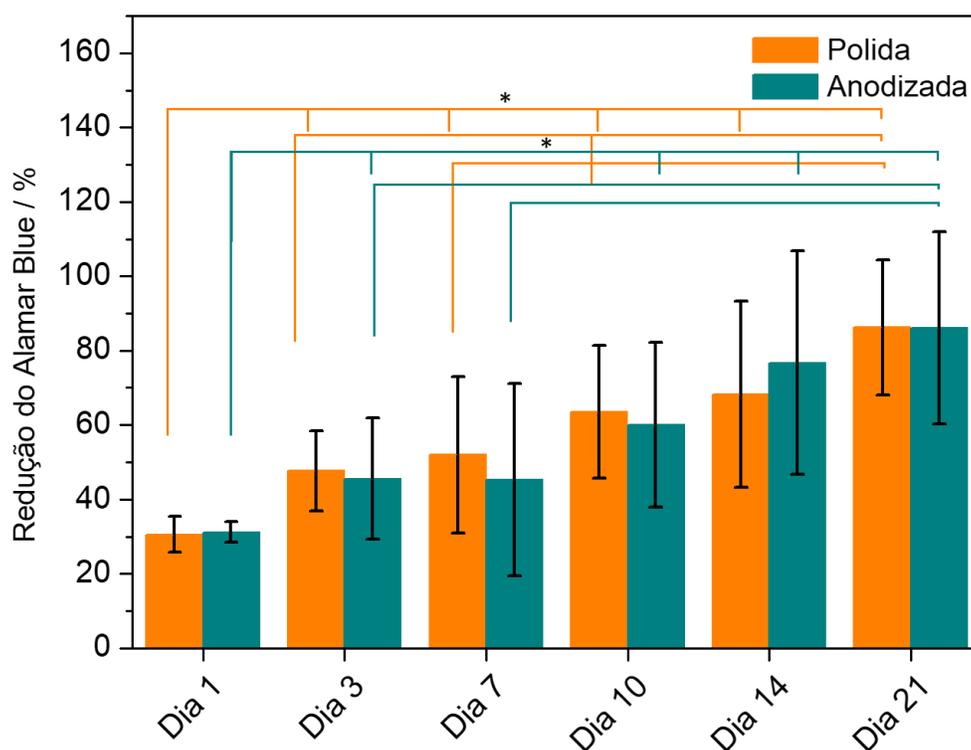


FIGURA 48 – Gráfico do teste Alamar Blue para proliferação celular sobre as amostras **Pol** e **An** ao longo de 21 dias (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

A viabilidade celular foi avaliada para as amostras **Pol**, **An**, **AnPLA**, **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** e nenhuma destas amostras apresentou citotoxicidade para os pré-osteoblastos (Figura 49). Não exibiram diferença significativa dentro de um intervalo

de confiança de 95 % entre as amostras. E entre os períodos apenas a amostra **Pol** e **An** apresentaram diferença.

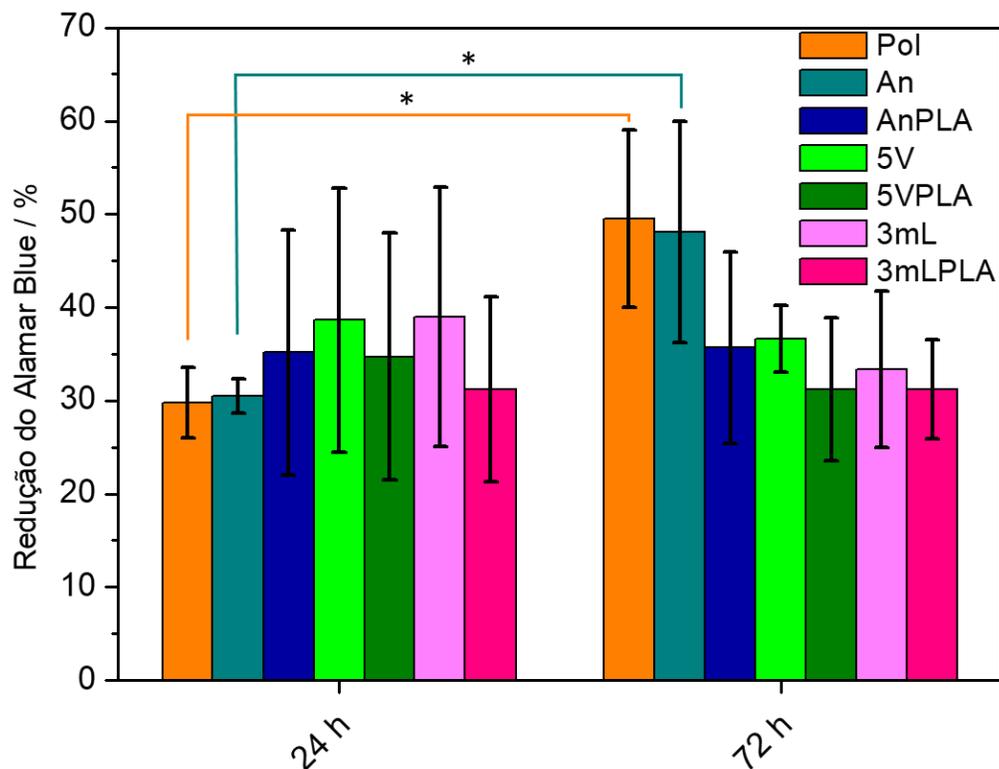


Figura 49 – Gráfico da viabilidade celular realizada pelo teste Alamar Blue no período de 24 e 72 horas para as amostras: **Pol**, **An**, **AnPLA**, **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

4.6.2. Formação de nódulos de mineralização

Como pode ser observado pela FIGURA 50, após 21 dias de cultura celular as superfícies apresentaram nódulos de mineralização de matriz extracelular, representados pelas manchas mais escuras coradas com vermelho de alizarina, que caracteriza a presença de osteoblastos maduros e ativos. Visualmente a amostra **An** foi a que demonstrou um melhor resultado, indicando que os pré-osteoblastos apresentaram maior diferenciação, já que apenas osteoblastos maturados secretam matriz extracelular.

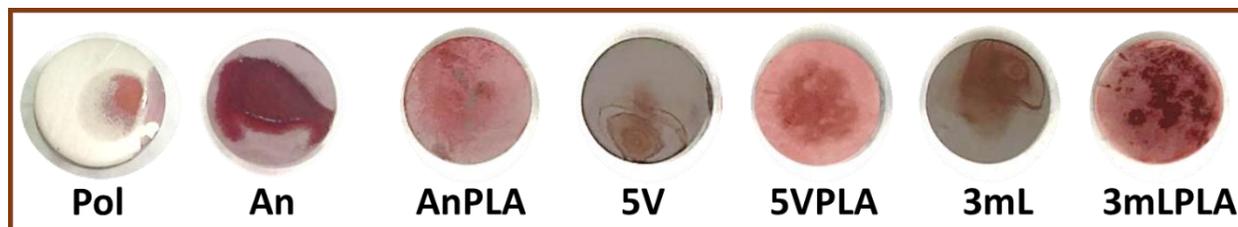


FIGURA 50 – Fotos das amostras **Pol**, **An**, **AnPLA**, **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA**, após 21 dias de cultivo celular, demonstrando as diferentes quantidades de formação de nódulos de mineralização extracelular (corados com vermelho de alizarina nas amostras).

Após solubilização do corante foi realizada a leitura da absorvância dessas amostras, onde confirmou-se maior mineralização de matriz extracelular para amostra **An**, seguida pelas amostras: **3mLPLA**, **AnPLA**, **5VPLA**, **Pol**, **5V** e **3mL** (FIGURA 51).

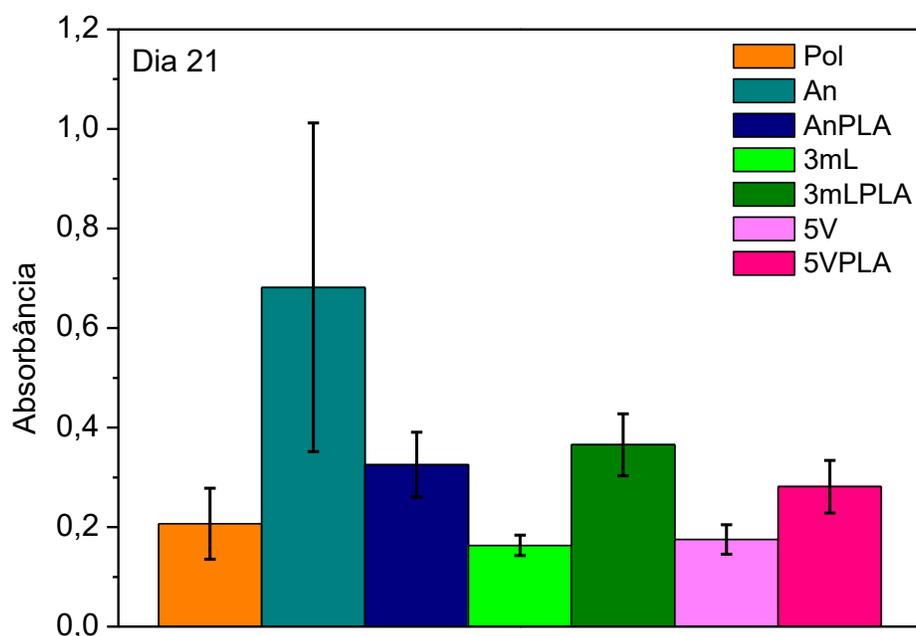


FIGURA 51 – Formação de nódulos de mineralização extracelular das amostras **Pol**, **An**, **AnPLA**, **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** após 21 dias de cultivo celular (*diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$).

4.6.3. Morfologia, adesão e proliferação celular

A morfologia, adesão e proliferação celular foram avaliadas pelo cultivo de pré-osteoblastos sobre as diferentes superfícies nos períodos de 1, 3 e 7 dias, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência direta.

Como pode-se observar através das micrografias de MEV de menor aumento, dispostas na FIGURA 52, no dia 1 ambas as amostras, **Pol** e **An**, exibiram um bom número de células, porém ainda foi possível identificá-las isoladamente. Nas micrografias realizadas no dia 3 observou-se um aumento no número de células, e no dia 7 exibiram confluência total, ou seja, houve a formação de uma manta de células sobre toda a superfície do disco (vide também outras micrografias de MEV da amostra **Pol** no Apêndice D e da **An** no Apêndice E). Com relação à morfologia celular, na amostra **Pol** as células apresentaram forma mais arredondada, ou poligonais, e com menor volume celular (células mais achatadas) que para a amostra **An**.

De acordo com Soares et al. (2018) a incorporação de Ca e P melhorou a adesão celular e estimulou a produção de proteínas marcadores-chave que indicam diferenciação celular⁶⁷.

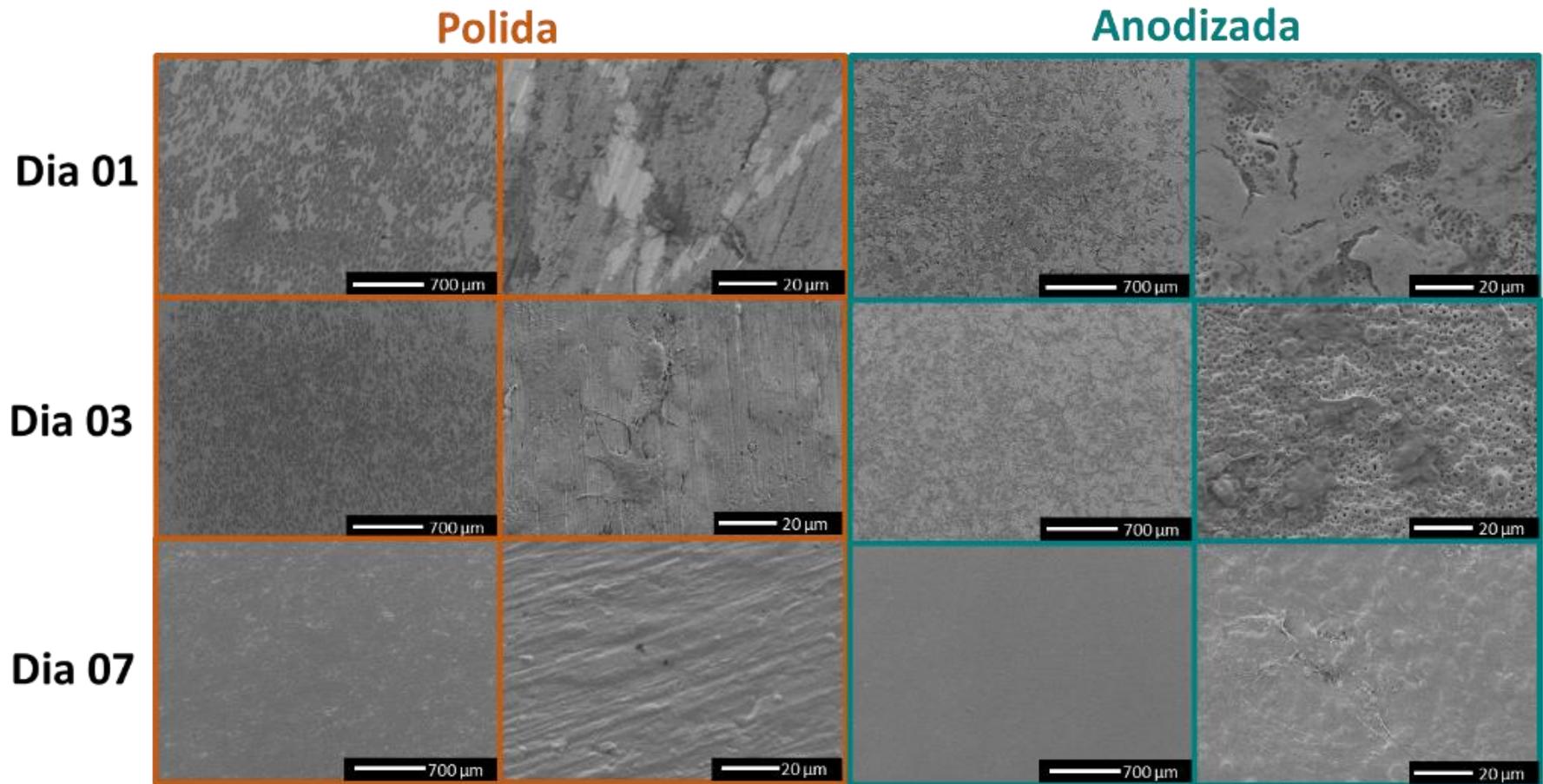


FIGURA 52 - Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **Pol** e **An** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

As células cultivadas sobre as amostras **5V** e **3mL** (outras micrografias de MEV da amostra **5V** encontram-se no Apêndice G e da **3mL** no Apêndice I) exibiram uma disseminação ao longo dos dias semelhante às amostras **Pol** e **An**. Com confluência total no período 7, porém, aparentemente com menor proliferação nos dias iniciais e com respeito à morfologia, nota-se que as células são menos arredondadas (FIGURA 53).

De acordo com Ren et al. (2018) morfologias mais alongadas, com células em formato de fusos, como as obtidas com as amostras **5V** e **3mL**, são sugestivas de maior atividade metabólica⁶³.

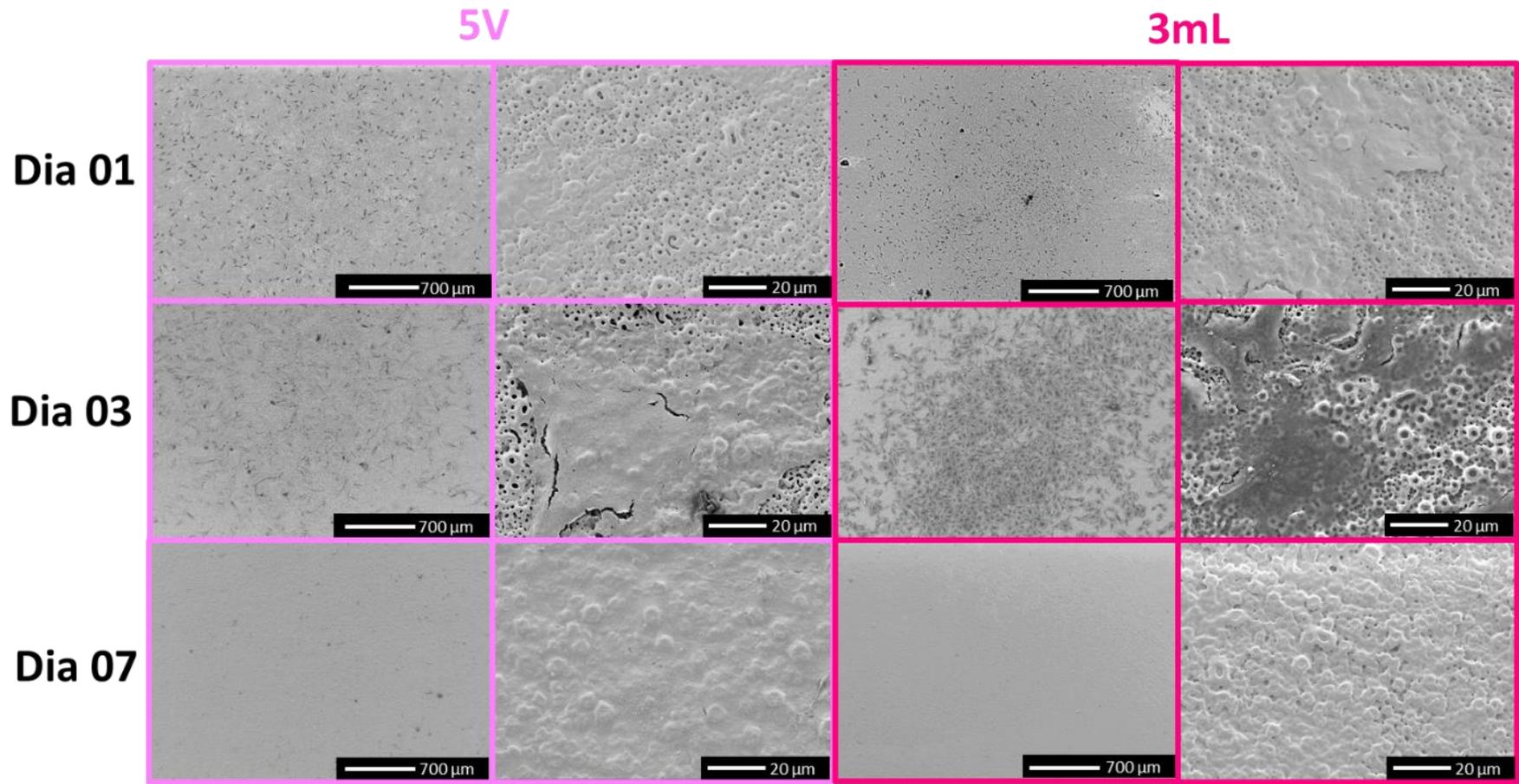


FIGURA 53 - Micrografias de MEV das células cultivadas sobre as amostras **5V** e **3mL** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

Os discos de titânio anodizados e com deposição de Ag foram recobertos com PLA (**5VPLA** e **3mLPLA**) para avaliar a liberação de Ag⁺ e, também, para promover uma barreira entre a Ag e as células de modo a minimizar sua toxicidade. Para verificar a influência apenas do PLA nos pré-osteoblastos, o titânio anodizado também foi recoberto com o polímero (**AnPLA**).

Através da FIGURA 54 observa-se que as células apresentaram uma boa proliferação ao longo do tempo na amostra **AnPLA**, com confluência quase total no dia 7, o que demonstra que o PLA é biocompatível. Entretanto, para as amostras **5VPLA** e **3mLPLA** houve uma nítida redução da proliferação celular. Talvez a prata dissolvida para o meio tenha afetado às células e gerado essa redução.

Além disso, o dia 7 de cultivo da amostra **3mLPLA** apresentou menor número de células que o período anterior. Nesta superfície observa-se o crescimento das células sobre as fibras de PLA e também entre estas fibras, sendo que nos demais recobrimentos esse crescimento só foi observado somente nas superfícies das fibras. Talvez nesta amostra o recobrimento polimérico não tenha sido similar aos demais, possivelmente com fibras mais frouxas levando a um crescimento diferente (outras micrografias de MEV da amostra **AnPLA**, **5VPLA** e **3mLPLA** podem ser vistas nos Apêndice F, H e J). Devido à estrutura do recobrimento polimérico não foi possível analisar a morfologia celular nestas amostras.

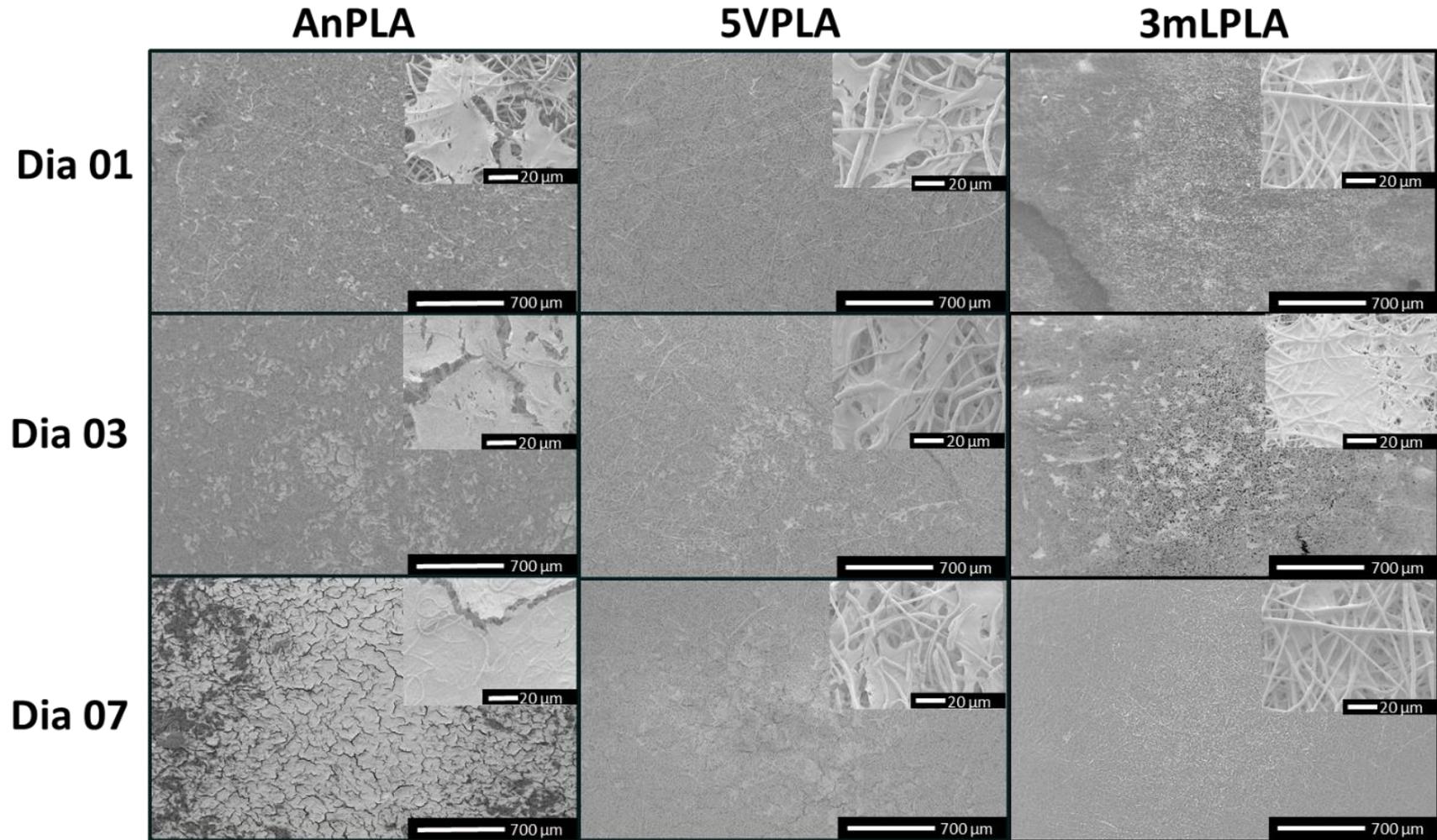


FIGURA 54 - Micrografias de MEV das células cultivadas sobre as amostras **AnPLA**, **5VPLA** e **3mLPLA** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência direta também foram analisadas buscando-se investigar a adesão e a disseminação celular dessas amostras nos períodos 1, 3 e 7 dias de cultivo. Nesta técnica o núcleo é corado em azul e o citoplasma em verde.

Através da FIGURA 55 fica nítido que as células apresentam morfologias diferentes nas superfícies **Pol** e **An**. Na amostra **Pol** as células exibiram uma forma poligonal, já na **An** elas manifestaram prolongamentos citoplasmáticos ou filopodia, demonstrando um estágio mais avançado de desenvolvimento, o que as tornam mais “disformes”. Isso explica por que as micrografias de MEV para as células crescidas na amostra **Pol** pareciam estar mais “achatadas”. No dia 7 de análise também houve confluência total das células para ambas as amostras.

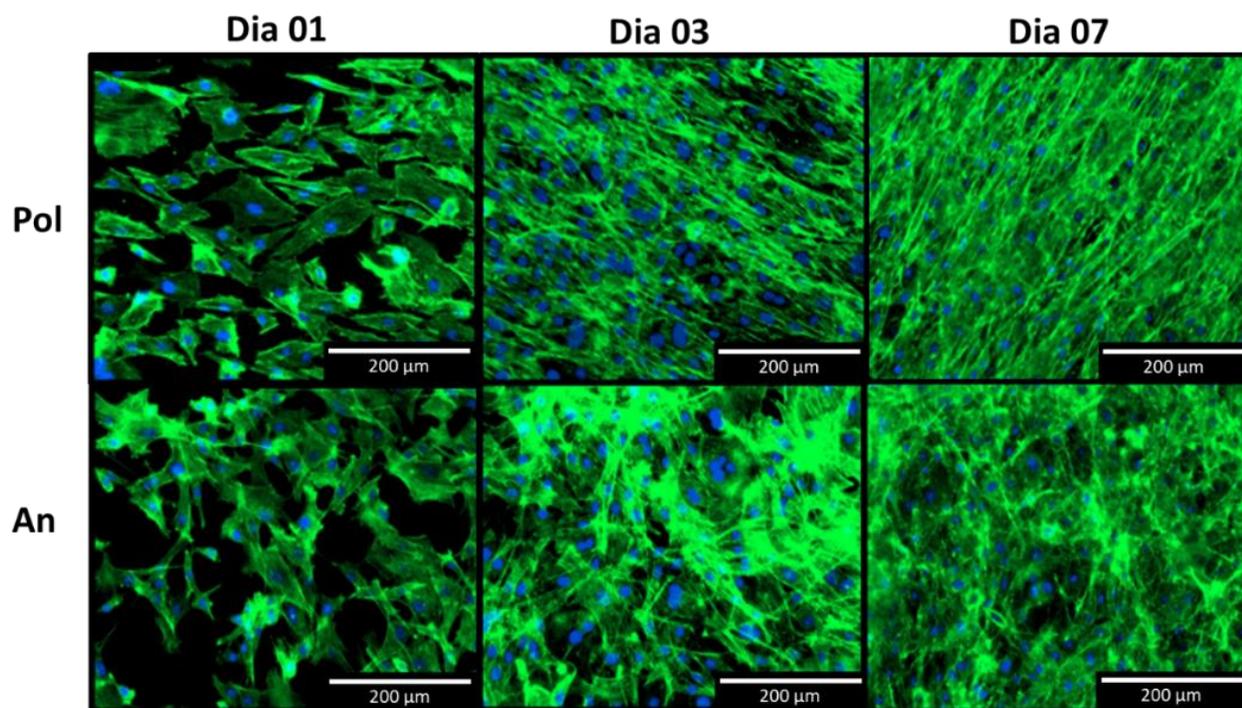


FIGURA 55 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras **Pol** e **An** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

Nas amostras **5V** e **3mL** houve proliferação celular ao longo dos dias, porém, não houve uma confluência no dia 7. Portanto, esses substratos foram,

aparentemente, menos favoráveis ao crescimento celular (FIGURA 56). Com relação à morfologia destas células, no dia 1 observa-se que há um menor espalhamento da célula comparado com o dia 7.

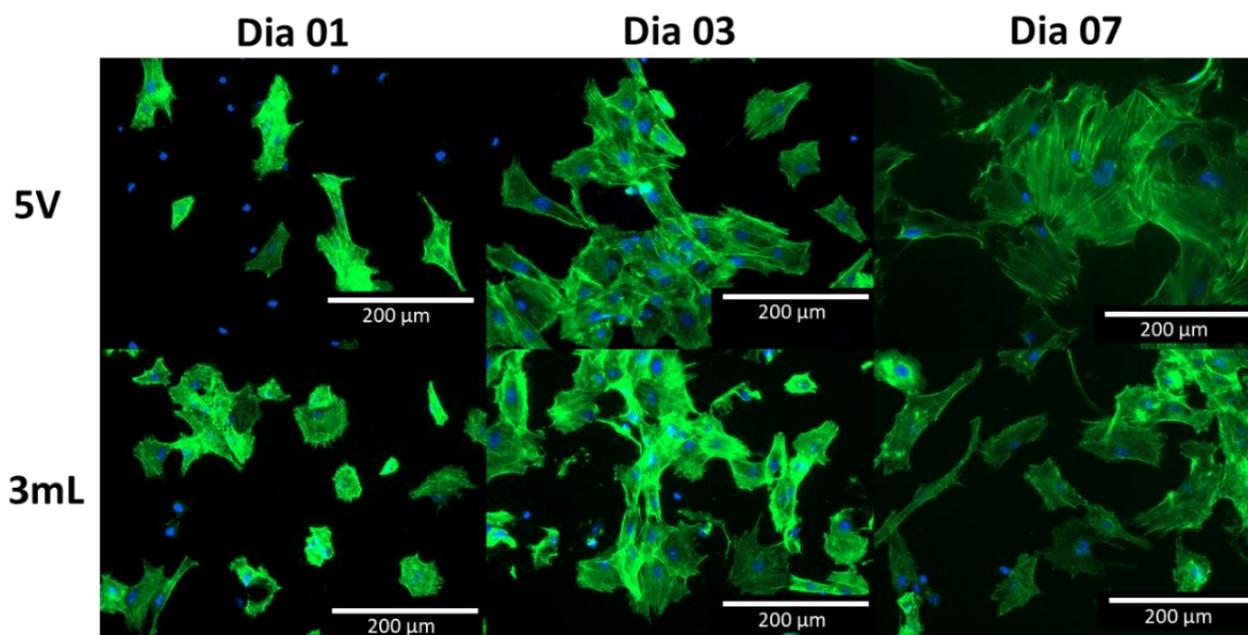


FIGURA 56 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras **5V** e **3mL** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

Conforme pode ser observado pela FIGURA 57 as imagens de fluorescência das amostras **AnPLA** e **5VPLA** evidenciaram um comportamento semelhante de disseminação e morfologia aos dos resultados obtidos por MEV, porém a amostra **3mPLA** não. Nesta última, contrariamente ao observado anteriormente, a proliferação celular foi significativa.

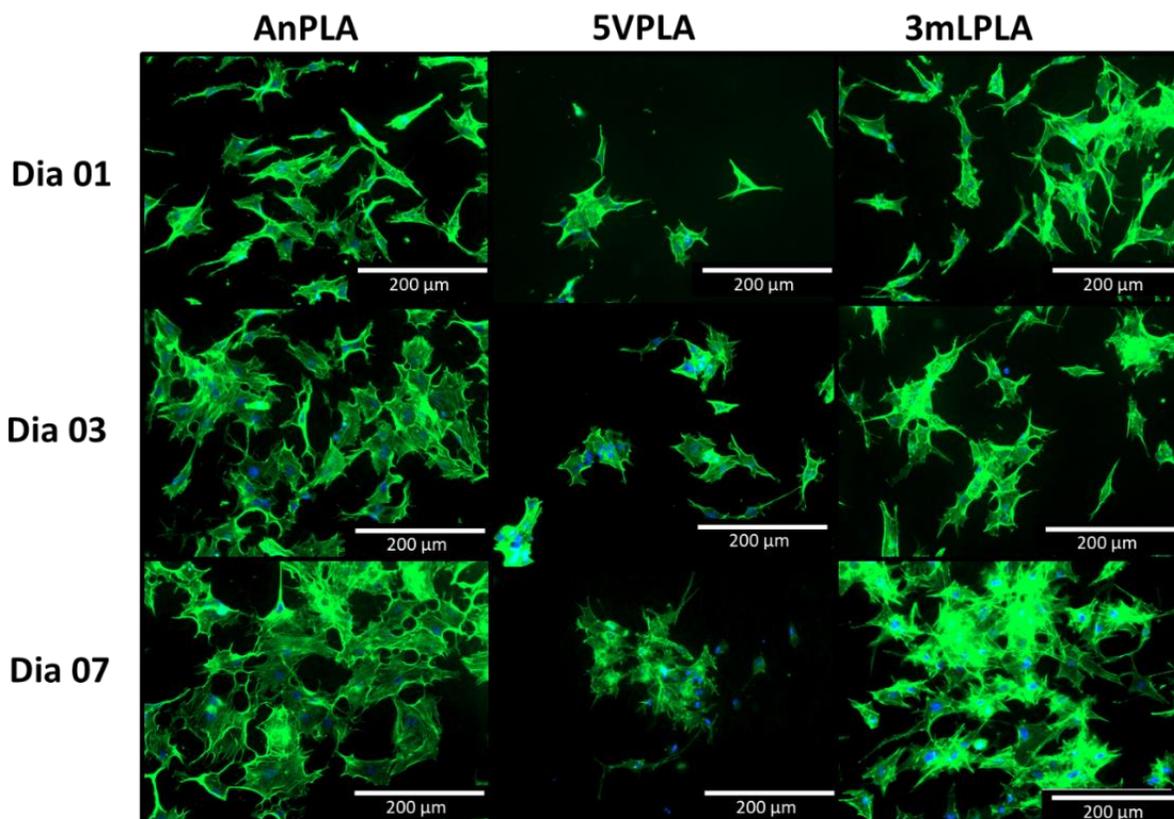


FIGURA 57 - Micrografias de fluorescência direta das células cultivadas sobre as amostras **AnPLA**, **5VPLA** e **3mLPLA** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

4.7. Testes para liberação de Ag^+

O risco de infecção decorrente de implantes dentários é maior no primeiro dia pós implante. Desse modo, é desejável que a liberação da prata seja maior nesse período¹⁸⁰. O gráfico representado na FIGURA 58 indica a liberação diária de Ag^+ das amostras **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** em PBS, a 37 °C, na ausência de luz. Os perfis de liberação das amostras **3mL** e **3mLPLA** são similares, isto é, inicialmente ocorre uma liberação maior de Ag^+ , que vai diminuindo com o tempo. Em contrapartida, as amostras **5V** e **5VPLA** exibem uma liberação mais lenta no início. Em ambos os casos pode-se concluir que o PLA foi efetivo no controle da liberação de Ag^+ . Entretanto, de acordo com os perfis exibidos pelas amostras **3mL** e **3mLPLA**, estas são mais promissoras ao combate de infecção relacionada aos implantes.

Além disso, a faixa de valores limiares de apoptose celular é de 0,78 – 1,56 ppm^{149, 180}. A amostra **3mL** foi a que apresentou maior concentração de liberação no primeiro dia, com valor igual a 0,36 ppm, bem abaixo deste limiar. Portanto, as amostras estudadas neste trabalho não são consideradas tóxicas. Por outro lado, são promissoras como antibactericidas, uma vez que a concentração de prata mínima para inibição de *S. aureus* é menor que 4 ppb⁽¹⁴⁴⁾.

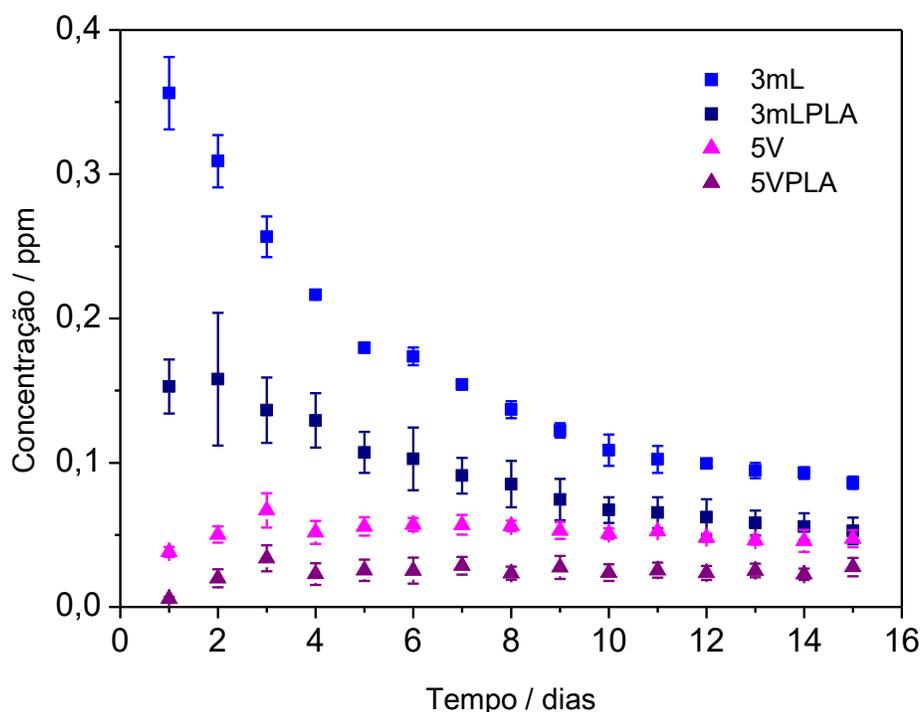


FIGURA 58 - Quantificação da liberação diária de Ag⁺ das amostras **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** nos períodos entre 1 e 15 dias.

Após os 15 primeiros dias de liberação, onde o meio de PBS era coletado e repostado, foi realizada a troca desse meio semanalmente por 4 vezes na intenção de se obter um perfil de liberação que permitisse a maior quantidade possível de liberação da prata depositada (FIGURA 59). Além disso, no último dia de coleta de PBS essas amostras foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas e passaram por um processo de extração com ácido nítrico concentrado, com o intuito de dissolver toda a prata

remanescente e quantificá-la. Sendo assim, foi possível obter a quantidade de prata total de cada amostra individualmente.

A TABELA 16 apresenta os valores referentes à concentração total de Ag depositada sobre as diferentes amostras. As amostras sem recobrimento polimérico (**3mL** e **5V**) exibiram uma concentração maior de Ag que as com recobrimento (**3mLPLA** e **5VPLA**), muito provavelmente alguma quantidade de Ag tenha ficado impregnada (retida) na camada de PLA. Nota-se ainda que a amostra com deposição por gotejamento de Ag apresentou uma reprodutibilidade maior que por eletrodeposição, evidenciado pelo menor valor do desvio padrão.

TABELA 16 - Concentração total (em ppm) de Ag das amostras: **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA**.

Amostra	Concentração / ppm	Desvio Padrão
5V	1,99	0,40
5VPLA	0,76	0,22
3mL	3,78	0,17
3mLPLA	2,18	0,13

O gráfico representado na FIGURA 59a apresenta a liberação de prata acumulada até 43 dias. Observa-se uma continuidade nos perfis de liberação até 15 dias (FIGURA 58) para todos os tratamentos.

Para a análise da liberação percentual de Ag das amostras sem recobrimento com PLA, para cada amostra foi calculado a concentração total de prata pela soma das concentrações acumuladas ao longo dos períodos acrescido da concentração de prata retirada por extração após os 43 dias. Entretanto, conforme explicado anteriormente o PLA não permitiu a extração total de Ag das superfícies com recobrimento, portanto, para análise da quantidade percentual da prata liberada destas amostras utilizou-se a concentração total média da prata obtida pelas amostras sem recobrimento.

A partir da FIGURA 59b pode-se observar que boa parte da prata depositada foi liberada pela amostra **3mL** no dia 43 (89,1 %). Esse valor foi ~ 33 % menor para a amostra **3mLPLA**, o que comprova que o PLA está retardando a liberação da

prata para o meio. Já para a amostra **5V** ocorre a liberação de aproximadamente 61,6 % com uma redução de ~ 32 % para amostra **5VPLA**. A redução da liberação de Ag foi muito próxima para ambas as amostras, o que indica que os recobrimentos foram de fato similares.

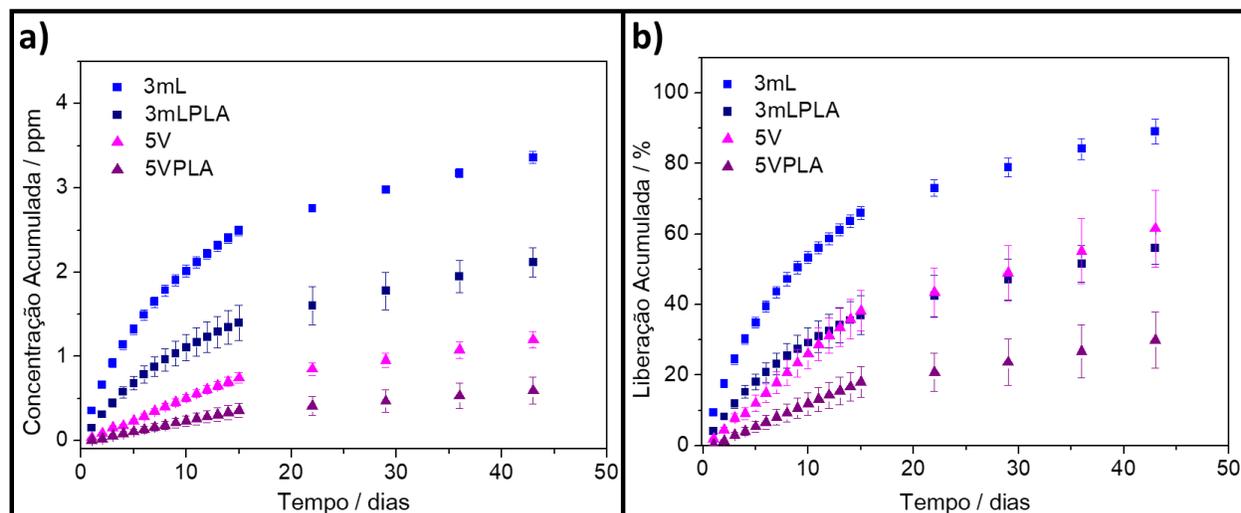


FIGURA 59 – Quantificações acumulativas da liberação de Ag^+ das amostras **5V**, **5VPLA**, **3mL** e **3mLPLA** nos períodos entre 1 e 43 dias: a) concentração em ppm e b) concentração percentual.

Em síntese, ambas as amostras, com tipos de deposição de Ag diferentes, foram eficientes para liberação controlada de Ag, demonstrando um perfil de liberação “lento” ao longo dos dias. Ademais, o uso do recobrimento com PLA mostrou-se promissor ao controle dessa liberação, evidenciado por uma redução significativa na quantidade de Ag, principalmente nos dias iniciais.

Segundo Du et al. (2016) NpAg, com diâmetros de 12 a 38 nm, apresentaram propriedades antioxidantes, exibiram atividade antibiofilmes e foram biocompatíveis em concentrações de até 10 ppm¹⁸¹, muito maior que a máxima concentração acumulada observada por este trabalho (~ 3,5 ppm).

Ademais, de acordo com Qin et al. (2014) quando NpAg são imobilizadas na superfície de Ti (neste trabalho foram utilizadas NpAg com aproximadamente 20 nm de diâmetro) elas apresentam menor citotoxicidade que quando estão em suspensão; e oferecem uma boa defesa contra agentes nocivos, independentemente da liberação da

Ag, podendo, portanto, reduzir a infecção periprotética associada ao implante¹⁸². Desse modo é muito interessante que a prata disposta na superfície do titânio permaneça ali ao longo do tempo. Os resultados obtidos pelas deposições estudadas neste trabalho são, portanto, muito promissores, pois a liberação da prata para o meio perdurou por mais de 40 dias, tempo suficiente para que um implante seja osseointegrado.

5. Conclusões

O titânio é o material biocompatível mais utilizado na fabricação de implantes dentários e cada vez mais estudos têm sido realizados com o intuito de modificar sua superfície de modo a torná-la mais osteocondutora e, portanto, acelerando o processo de osseointegração. Entretanto, alto é o número de falhas decorrentes de afrouxamento asséptico e infecções. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo principal produzir um material que sanasse esses problemas.

Vários foram os estudos e análises para alcançar este objetivo. Para isso foram fabricadas superfícies altamente porosas de óxido de titânio sobre o titânio com a presença de Ca e P através da técnica de anodização por micro-arco (MAO). Ademais, foram realizadas deposições de prata sobre estas superfícies de modo a atribuí-las atividade antimicrobiana. E, como este elemento pode ser tóxico às células realizou-se um recobrimento destas superfícies com o polímero poli (ácido lático) (PLA), que é biocompatível e biorreabsorvível, visando uma barreira física entre a superfície do Ti e as células e, também, para promoção de uma liberação controlada da prata.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se destacar que:

- Otimizou-se uma metodologia, através da técnica de oxidação por micro-arco (MAO) em eletrólitos não tóxicos e não contaminantes, que permitiu produzir de maneira reprodutível, sobre o titânio, superfícies de TiO_2 com alta porosidade e inserção de P e Ca;
- Através das análises de difratometria de raios X (DRX) foi possível constatar que o óxido TiO_2 formado sobre a amostra **An** está em sua fase cristalina anatase, o que é promissor, visto que a anatase pode promover atividade antimicrobiana e, além disso, também é mais eficiente que outras fases na nucleação e crescimento da hidroxiapatita que constitui o osso;
- Os mapeamentos realizados por espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) revelaram uma distribuição uniforme de P e Ca incorporados no TiO_2 da amostra **An**;

- Foi proposta uma rota de síntese de nanopartículas de prata (NpAg) simples e reprodutível, obtendo-se nanopartículas de ~ 4 nm estáveis ao longo do tempo em uma ampla faixa de pH (5-13);
- As deposições de Ag sobre as superfícies anodizadas, obtidas tanto por eletrodeposição em Ag_2SO_4 0,001 mol L⁻¹ quanto por gotejamento de NpAg foram eficientes, ressaltando-se que as micrografias de MEV e o mapeamento da Ag realizado por EDS indicaram que a deposição de Ag por gotejamento forneceu uma distribuição mais homogênea;
- Através da eletrofiação foi possível realizar um recobrimento uniforme das amostras **5V** e **3mL** com fibras ultrafinas do polímero PLA, permitindo que houvesse uma liberação controlada de íons de Ag em meio de PBS;
- Os testes antimicrobianos revelaram que todas as superfícies apresentaram atividade antimicrobiana para *S. aureus*, com melhores resultados para as superfícies sem recobrimento com PLA;
- De acordo com as medidas de ângulo de contato apenas as amostras **3mL** e **Pol** foram predominantemente molhantes ou hidrofílicas, o que poderia facilitar a adesão dos osteoblastos “*in vivo*”, visto que o processo de osseointegração é dependente da molhabilidade do material; as demais superfícies foram não molhantes;
- Todas as superfícies, com e sem Ag e PLA, apresentaram boa biocompatibilidade em testes com pré-osteoblastos, com maior diferenciação celular para **An**, **3mL** e **5V**; isso ocorreu provavelmente devido à morfologia porosa destas superfícies;
- A amostra **An** apresentou maior quantidade de nódulos de mineralização, o que indica maior maturação celular e, portanto, indicativo de processo de osseointegração precoce;

Em síntese, considerando o atual cenário mundial onde a demanda por implantes dentários só tende a aumentar, sendo um dos principais fatores o aumento na longevidade e como é natural ocorrer uma diminuição da massa óssea corporal com a idade e um aumento na ocorrência de periodontites, faz-se necessário o uso de implantes dentários que sejam não apenas biocompatíveis, mas também

osteocondutores para atender essa demanda. Neste cenário, as várias superfícies produzidas neste trabalho podem ser promissoras para a utilização como implante, tanto pela morfologia e composição da camada de óxido formada, quanto pelas superfícies que dispuseram de deposição de prata e recobrimento polimérico. Estas superfícies podem ser úteis principalmente em pacientes que apresentem problemas periodontais, ou que dispõem de um osso pobre que requer um maior estímulo para a osteogênese.

6. Referências Bibliográficas

1. PETERSEN, P. E. & KWAN, S. "Equity, social determinants and public health programmes--the case of oral health". *Community dentistry and oral epidemiology*, **39**: 481, 2011.
2. JIN, L. J.; LAMSTER, I. B.; GREENSPAN, J. S.; PITTS, N. B.; SCULLY, C. & WARNAKULASURIYA, S. "Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health". *Oral diseases*, **22**: 609, 2016.
3. COLLABORATORS "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016". *Lancet*, **390**: 1211, 2017.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_bucal_sistema_unico_saude.pdf. Acesso em: 29/03/2019.
5. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>. Acesso em: 27/03/2019.
6. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: https://www.cdc.gov/oralhealth/publications/sgr2000_05.htm. Acesso em: 01/03/2019.
7. LAM, R. "Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature". *Australian Dental Journal*, **61**: 4, 2016.
8. PETTI, S.; GLENDOR, U. & ANDERSSON, L. "World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries". *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*, **34**: 71, 2018.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em: 20/03/2019.
10. World Congress 2015. Disponível em: https://www.who.int/oral_health/tokyodeclaration_final.pdf. Acesso em: 10/03/2019.
11. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?=&t=resultados>. Acesso em: 03/03/2019.

12. CHAVES, S. C. L.; ALMEIDA, A.; ROSSI, T. R. A.; SANTANA, S. F.; BARROS, S. G. & SANTOS, C. M. L. "Oral health policy in Brazil between 2003 and 2014: scenarios, proposals, actions, and outcomes". *Cien Saude Colet*, **22**: 1791, 2017.
13. Straumann Group – 2016 Annual Report. Disponível em: https://www.marketscreener.com/STRAUMANN-HOLDING-408695/pdf/708757/Straumann%20Holding_Annual-Report.pdf. Acesso em: 31/03/2019.
14. AO - Academy of Osseointegration. Disponível em: <http://whydentalimplants.org/what-are-implants/>. Acesso em: 21/03/2019.
15. FDI World Dental Federation Disponível em: <https://www.fdiworlddental.org/resources/policy-statements-and-resolutions/dental-implants>. Acesso em: 27/03/2019.
16. WILLIAMS, D. F. "On the nature of biomaterials". *Biomaterials*, **30**: 5897, 2009.
17. Disponível em: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials>. Acesso em: 05/08/2019.
18. GVR - Grand View Research. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dental-implants-market>. Acesso em: 27/03/2019.
19. Straumann Group – 2016 Annual Report. Disponível em: <https://www.straumann.com/content/dam/media-center/group/en/documents/annual-report/2016/Markets.pdf>. Acesso em: 31/03/2019.
20. CFO - Conselho Federal de Odontologia. Disponível em: <http://cfo.org.br/website/cresce-o-numero-de-implantes-dentarios-no-brasil/>. Acesso em: 27/03/2019.
21. JUNIOR, N. L. D. P. "Valor, mercado e preço em implantodontia. Implantes são todos iguais?". *Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo*, **29**: 268, 2017.
22. Disponível em: <https://implantesorais.com.br/implante-dentario-nacional-x-implante-importado-vale-a-pena-usar-um-implante-importado/>. Acesso em: 29/03/2019.
23. Disponível em: <https://www.sigaodontologia.com.br/category/implantodontia/>. Acesso em: 31/03/2019.
24. Straumann. Disponível em: <https://www.straumann.com/br/pt/profissionais-de-odontologia/servicos/servicos-para-o-cliente/garantia-vitalicia.html>. Acesso em: 31/03/2019.
25. Neodent. Disponível em: <https://www.neodent.com.br/noticias/straumann-aumenta-aquisi%C3%A7%C3%A3o-da-neodent-para-100/>. Acesso em: 31/03/2019.

26. Neodent. Disponível em: <https://www.neodent.com.br/noticias/produtos-t%C3%AAm-garantia-vital%C3%ADcia-com-programa-%E2%80%9Coriginais-neodent%E2%80%9D/>. Acesso em: 31/03/2019.
27. GEHRKE, S. A.; RAMIREZ-FERNANDEZ, M. P.; GRANERO MARIN, J. M.; BARBOSA SALLES, M.; DEL FABBRO, M. & CALVO GUIRADO, J. L. "A comparative evaluation between aluminium and titanium dioxide microparticles for blasting the surface titanium dental implants: an experimental study in rabbits". *Clinical oral implants research*, **29**: 802, 2018.
28. DALAGO, H. R.; SCHULDT FILHO, G.; RODRIGUES, M. A.; RENVERT, S. & BIANCHINI, M. A. "Risk indicators for Peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants". *Clinical oral implants research*, **28**: 144, 2017.
29. INPN - ImplantNewsPerio - International Journal. Disponível em: <http://www.inpn.com.br/Materia/SextaBianchini/132659>. Acesso em: 27/03/2019.
30. Audubon Dental Center. Disponível em: <https://www.audubondentalcenterofclinton.com/dental-implants-increase-demand-next-years/>. Acesso em: 27/03/2019.
31. Brazilian Health Devices. Disponível em: <http://brazilianhealthdevices.com/market>. Acesso em: 01/04/2019.
32. SOARES, G. A. Biomateriais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Rio de Janeiro, 2005. p.
33. MAS-MORUNO, C.; SU, B. & DALBY, M. J. "Multifunctional Coatings and Nanotopographies: Toward Cell Instructive and Antibacterial Implants". *Advanced Healthcare Materials*, **8**: 1801103, 2019.
34. RAPHEL, J.; HOLODNIY, M.; GOODMAN, S. B. & HEILSHORN, S. C. "Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants". *Biomaterials*, **84**: 301, 2016.
35. WILLIAMS, D. F. "Definitions in biomaterials". IN: *Progress in Biomedical Engineering*. WILLIAMS, D. F. (Eds.). Amsterdam, Elsevier Publishers, 1987. p. 67
36. BASU, B. & NATH, S. "Fundamentals of biomaterials and biocompatibility". IN: *Advanced Biomaterials: fundamentals, processing, and applications*. BASU, B.; KATTI, D. & KUMAR, A. (Eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, 2009. p. 3
37. OSHIDA, Y. & TUNA, E. B. "Science and technology integrated titanium dental implant systems". IN: *Advanced Biomaterials: fundamentals, processing and applications*. BASU, B.; KATTI, D. & KUMAR, A. (Eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, 2009. p. 143

38. BRANEMARK, P. I. "Introduction to osseointegration". IN: Tissue Integrated Prostheses Osseointegration in Clinical Dentistry. BRANEMARK, P. J.; ZARB, G. A. & ALBREKTSSON, T. (Eds.). Chicago, Quintessence Publishing, 1985. p. 11
39. ABIMO - Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos. Disponível em: <https://abimo.org.br/noticias/pirataria-em-implantes-e-tema-de-discussao-no-35o-ciosp/>. Acesso em: 29/03/2019.
40. ABIMO - Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos. Disponível em: <https://abimo.org.br/noticias/anvisa-fecha-o-cerco-contra-pirataria-de-implantes-odontologicos-na-regiao-de-campinas/>. Acesso em: 28/03/2019.
41. ABIMO - Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos. Disponível em: <https://abimo.org.br/noticias/anvisa-fecha-mais-estabelecimentos-de-implantes-odontologicos-falsos/>. Acesso em: 28/03/2019.
42. ABIMO - Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos. Disponível em: <https://abimo.org.br/noticias/operacao-da-anvisa-com-apoio-da-abimo-ja-apreendeu-mais-de-500-mil-implantes-sem-registro/>. Acesso em: 28/03/2019.
43. CHEN, Q. & THOUAS, G. A. "Metallic implant biomaterials". Materials Science and Engineering: R: Reports, **87**: 1, 2015.
44. SAINI, M.; SINGH, Y.; ARORA, P.; ARORA, V. & JAIN, K. "Implant biomaterials: A comprehensive review". World journal of clinical cases, **3**: 52, 2015.
45. VANZILLOTTA, P. S.; SOARES, G. A.; BASTOS, I. N.; SIMÃO, R. A. & KUROMOTO, N. K. "Potentialities of some surface characterization techniques for the development of titanium biomedical alloys". Materials Research, **4**: 437, 2004.
46. GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R. & GOGIA, A. K. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review". Prog. Mater. Sci., **54**: 397, 2009.
47. APARICIO, C.; GIL, J.; FONSECA, C.; BARBOSA, M. & PANEL, J. A. "Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications". Biomaterials, **24**: 263, 2003.
48. CHATURVEDI, T. P. "An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys)". Indian J. Den. Res., **1**: 91, 2009.
49. ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; VALIEV, R. & MEYERS, M. A. "Biomedical applications of titanium and its alloys". JOM, **60**: 46, 2008.
50. LAUSMAA, J. & KASEMO, B. "Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials". Appl. Surf. Sci., **44**: 133, 1990.

51. KASEMO, B. "Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects". *J. Prosthet. Dent.*, **49**: 832, 1983.
52. PAITAL, S. R. & DAHOTRE, N. B. "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies". *Mater. Sci. Eng. R*, **66**: 1, 2009.
53. ASTM F67-13(2017), Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700), ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017, www.astm.org.
54. KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; DEAN, D. D. & BOYAN, B. D. "The role of implant surface characteristics in the healing of bone". *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **4**: 329, 1996.
55. SHALABI, M. M.; GORTEMAKER, A.; VAN'T HOF, M. A.; JANSEN, J. A. & CREUGERS, N. H. "Implant surface roughness and bone healing: a systematic review". *Journal of dental research*, **85**: 496, 2006.
56. GUEHENNEC, L. L.; MARTIN, F.; LOPEZ-HEREDIA, M.-A.; LOUARN, G.; AMOURIQ, Y.; COUSTY, J. & LAYROLLE, P. "Osteoblastic cell behavior on nanostructured metal implants". *Nanomedicine-UK*, **3**: 61, 2008.
57. MEIRELLES, L.; CURRIE, F.; JACOBSSON, M.; ALBREKTSSON, T. & WENNERBERG, A. "The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration". *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **23**: 641, 2008.
58. MI, G.; SHI, D.; WANG, M. & WEBSTER, T. J. "Reducing Bacterial Infections and Biofilm Formation Using Nanoparticles and Nanostructured Antibacterial Surfaces". *Adv Healthc Mater*, **7**: e1800103, 2018.
59. İZMİR, M. & ERCAN, B. "Anodization of titanium alloys for orthopedic applications". *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, **13**: 28, 2018.
60. PENG, Z.; NI, J.; ZHENG, K.; SHEN, Y.; WANG, X.; HE, G.; JIN, S. & TANG, T. "Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion". *International journal of nanomedicine*, **8**: 3093, 2013.
61. GULATI, K.; KOGAWA, M.; PRIDEAUX, M.; FINDLAY, D. M.; ATKINS, G. J. & LOSIC, D. "Drug-releasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **69**: 831, 2016.
62. IZQUIERDO-BARBA, I.; GARCIA-MARTIN, J. M.; ALVAREZ, R.; PALMERO, A.; ESTEBAN, J.; PEREZ-JORGE, C.; ARCOS, D. & VALLET-REGI, M. "Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and *Staphylococcus aureus* proliferation". *Acta biomaterialia*, **15**: 20, 2015.

63. REN, L.; PAN, S.; LI, H.; LI, Y.; HE, L.; ZHANG, S.; CHE, J. & NIU, Y. "Effects of aspirin-loaded graphene oxide coating of a titanium surface on proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells". *Scientific reports*, **8**: 15143, 2018.
64. VISHNU, J.; MANIVASAGAM, V. K.; GOPAL, V.; GARCIA, C. B.; HAMEED, P.; MANIVASAGAM, G. & WEBSTER, T. J. "Hydrothermal treatment of etched titanium: A potential surface nano-modification technique for enhanced biocompatibility". *Nanomedicine*, 102016, 2019.
65. LE GUEHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. & AMOURIQ, Y. "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration". *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, **23**: 844, 2007.
66. MARQUES, I. S. V.; DA CRUZ, N. C.; LANDERS, R.; YUAN, J. C.; MESQUITA, M. F.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T. & BARÃO, V. A. D. "Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: The role of electrolyte concentration and treatment duration". *Biointerphases*, **10**: 041002, 2015.
67. SOARES, P.; DIAS-NETIPANYJ, M. F.; ELIFIO-ESPOSITO, S.; LESZCZAK, V. & POPAT, K. "Effects of calcium and phosphorus incorporation on the properties and bioactivity of TiO₂ nanotubes". *Journal of biomaterials applications*, **33**: 410, 2018.
68. LAURINDO, C. A.; TORRES, R. D.; MALI, S. A.; GILBERT, J. L. & SOARES, P. "Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **37**: 223, 2014.
69. KACZMAREK, M.; JURCZYK, M. U.; MIKLASZEWSKI, A.; PASZEL-JAWORSKA, A.; ROMANIUK, A.; LIPINSKA, N.; ZURAWSKI, J.; URBANIAK, P. & JURCZYK, K. "In vitro biocompatibility of titanium after plasma surface alloying with boron". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **69**: 1240, 2016.
70. HUANG, Q.; ELKHOOLY, T. A.; LIU, X.; ZHANG, R.; YANG, X.; SHEN, Z. & FENG, Q. "SaOS-2 cell response to macro-porous boron-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation on titanium". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **67**: 195, 2016.
71. ZHAO, L.; WANG, H.; HUO, K.; ZHANG, X.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WU, Z. & CHU, P. K. "The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates". *Biomaterials*, **34**: 19, 2013.
72. JAGER, M.; JENNISSEN, H. P.; DITTRICH, F.; FISCHER, A. & KOHLING, H. L. "Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants". *Materials*, **10**: 1302, 2017.

73. MORRA, M.; CASSINELLI, C.; BRUZZONE, G.; CARPI, A.; SANTI, G. D.; GIARDINO, R. & FINI, M. "Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis". *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **1**: 46, 2003.
74. DING, X.; ZHOU, L.; WANG, J.; ZHAO, Q.; LIN, X.; GAO, Y.; LI, S.; WU, J.; RONG, M.; GUO, Z.; LAI, C.; LU, H. & JIA, F. "The effects of hierarchical micro/nanosurfaces decorated with TiO₂ nanotubes on the bioactivity of titanium implants in vitro and in vivo". *International journal of nanomedicine*, **10**: 6955, 2015.
75. VELASCO-ORTEGA, E.; ALFONSO-RODRIGUEZ, C. A.; MONSALVE-GUIL, L.; ESPANA-LOPEZ, A.; JIMENEZ-GUERRA, A.; GARZON, I.; ALAMINOS, M. & GIL, F. J. "Relevant aspects in the surface properties in titanium dental implants for the cellular viability". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **64**: 1, 2016.
76. GULATI, K.; RAMAKRISHNAN, S.; AW, M. S.; ATKINS, G. J.; FINDLAY, D. M. & LOSIC, D. "Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion". *Acta biomaterialia*, **8**: 449, 2012.
77. LU, X.; MOHEDANO, M.; BLAWERT, C.; MATYKINA, E.; ARRABAL, R.; KAINER, K. U. & ZHELUDKEVICH, M. L. "Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – A review". *Surface and Coatings Technology*, **307**: 1165, 2016.
78. SINGH, A.; SINGH, B. P.; WANI, M. R.; KUMAR, D.; SINGH, J. K. & SINGH, V. "Effect of anodization on corrosion behaviour and biocompatibility of Cp-titanium in simulated body fluid". *Bull. Mater. Sci.*, **36**: 931, 2013.
79. YOUNG, L. *Anodic Oxide Films*. London, Academic Press, 1962. p. 377
80. VIJH, A. K. "Solid-state properties of some valve metal oxide". *J. Electrochem. Soc.*, **14**: 921, 1969.
81. DIAMANTI, M. V. & PEDEFERRI, M. P. "Effect of anodic oxidation parameters on the titanium oxides formation". *Corros. Sci.*, **49**: 939, 2007.
82. LIU, X.; CHU, P. K. & DING, C. "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical application". *Mat. Sci. Eng. R*, **47**: 49, 2004.
83. SUL, Y. T.; JOHANSSON, C. B.; JEONG, Y. & ALBREKTSSON, T. "The electrochemical oxide growth behavior on titanium in acid and alkaline electrolytes". *Med. Eng. Phys.*, **23**: 329, 2001.
84. IKONOPISOV, S. "Electronic conduction of anodized aluminium electrodes". *Electrochem. Acta*, **14**: 761, 1969.

85. ZANIOLO, K. M.; BIAGGIO, S. R.; BOCCHI, N. & ROCHA-FILHO, R. C. "Properties of colored oxide films formed electrochemically on titanium in green electrolytes under ultrasonic stirring". *Journal of Materials Science*, **53**: 7294, 2018.
86. YEROKHIN, A.; PARFENOV, E. V. & MATTHEWS, A. "In situ impedance spectroscopy of the plasma electrolytic oxidation process for deposition of Ca- and P-containing coatings on Ti". *Surface and Coatings Technology*, **301**: 54, 2016.
87. DZHURINSKIY, D.; GAO, Y.; YEUNG, W. K.; STRUMBAN, E.; LESHCHINSKY, V.; CHU, P. J.; MATTHEWS, A.; YEROKHIN, A. & MAEV, R. G. "Characterization and corrosion evaluation of TiO₂:n-HA coatings on titanium alloy formed by plasma electrolytic oxidation". *Surface and Coatings Technology*, **269**: 258, 2015.
88. TEKER, D.; MUHAFFEL, F.; MENEKSE, M.; KARAGULER, N. G.; BAYDOGAN, M. & CIMENOGLU, H. "Characteristics of multi-layer coating formed on commercially pure titanium for biomedical applications". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **48**: 579, 2015.
89. DUARTE, L. T. Estudos do Crescimento Anódico de Óxidos e da Deposição de Apatitas Sobre a Liga Biocompatível Ti-13Nb-13Zr. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009. Tese de Doutorado, 200 p.
90. LIU, S.; LI, B.; LIANG, C.; WANG, H. & QIAO, Z. "Formation mechanism and adhesive strength of a hydroxyapatite/TiO₂ composite coating on a titanium surface prepared by micro-arc oxidation". *Applied Surface Science*, **362**: 109, 2016.
91. PAN, H.; HAN, J. J.; PARK, Y. D.; CHO, T. H. & HWANG, S. J. "Effect of sustained release of rhBMP-2 from dried and wet hyaluronic acid hydrogel carriers compared with direct dip coating of rhBMP-2 on peri-implant osteogenesis of dental implants in canine mandibles". *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, **44**: 116, 2016.
92. WANG, T.; WENG, Z.; LIU, X.; YEUNG, K. W. K.; PAN, H. & WU, S. "Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants". *Bioactive materials*, **2**: 44, 2017.
93. ORDIKHANI, F.; ZUSTIAK, S. P. & SIMCHI, A. "Surface Modifications of Titanium Implants by Multilayer Bioactive Coatings with Drug Delivery Potential: Antimicrobial, Biological, and Drug Release Studies". *Jom*, **68**: 1100, 2016.
94. PALZA, H. "Antimicrobial polymers with metal nanoparticles". *International journal of molecular sciences*, **16**: 2099, 2015.
95. ZHANG, L.; GAO, Q. & HAN, Y. "Zn and Ag Co-doped Anti-microbial TiO₂ Coatings on Ti by Micro-arc Oxidation". *Journal of Materials Science & Technology*, **32**: 919, 2016.

96. OLIVEIRA, N. C.; MOURA, C. C.; ZANETTA-BARBOSA, D.; MENDONCA, D. B.; COOPER, L.; MENDONCA, G. & DECHICHI, P. "Effects of titanium surface anodization with CaP incorporation on human osteoblastic response". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **33**: 1958, 2013.
97. CHOI, J. W.; HEO, S. J.; KOAK, J. Y.; KIM, S. K.; LIM, Y. J.; KIM, S. H. & LEE, J. B. "Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages". *J. Oral Rehabil.*, **33**: 889, 2006.
98. DIEBOLD, U. "The surface science of titanium dioxide". *Surf. Sci. Rep.*, **48**: 53, 2003.
99. OHTSUKA, T.; GUO, J. & SATO, N. "Raman spectra of the anodic oxide film on titanium sulfate and neutral phosphate solutions". *J. Electrochem. Soc.*, **133**: 2473, 1986.
100. GIORDANO, C.; SAINO, E.; RIMONDINI, L.; PEDEFERRI, M. P.; VISAI, L.; CIGADA, A. & CHIESA, R. "Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on titanium grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices". *Colloid. Surfaces B*, **88**: 648, 2011.
101. VISAI, L.; RIMONDINI, L.; GIORDANO, C.; CURTO, B. D.; SBARRA, M. S.; FRANCHINI, R.; VALLE, C. D. & CHIESA, R. "Electrochemical surface modification of titanium for implant abutments can affect oral bacteria contamination". *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, **6**: 170, 2008.
102. FAZEL, M.; SALIMIJAZI, H. R.; GOLOZAR, M. A. & GARSIVAZ JAZI, M. R. "A comparison of corrosion, tribocorrosion and electrochemical impedance properties of pure Ti and Ti6Al4V alloy treated by micro-arc oxidation process". *Applied Surface Science*, **324**: 751, 2015.
103. XIA, Z.; NANJO, H.; AIZAWA, T.; KANAKUBO, M.; FUJIMURA, M. & ONAGAWA, J. "Growth process of atomically flat anodic films on titanium under potentiostatical electrochemical treatment in H₂SO₄ solution". *Surf. Sci.*, **601**: 5133, 2007.
104. ESTEBAN, J. & CORDERO-AMPUERO, J. "Treatment of prosthetic osteoarticular infections". *Expert. Opin. Pharmacother.*, **12**: 899, 2011.
105. COOK, G. E.; MARKEL, D. C.; REN, W.; WEBB, L. X.; MCKEE, M. D. & SCHEMITSCH, E. H. "Infection in orthopaedics". *J. Orthop. Trauma*, **29**: S19, 2015.
106. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. *Microbiologia*. 10ed. Porto Alegre, Artmed, 2012.
107. SHI, D.; MI, G.; WANG, M. & WEBSTER, T. J. "In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery". *Biomaterials*, **198**: 228, 2019.
108. WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; BENNETT, M. E.; WOLCOTT, B. M.; GOGOKHIA, L.; COSTERTON, L. W. & DOWD, S. E. "Chronic wounds and the medical biofilm paradigm". *JOURNAL OF WOUND CARE*, **19**: 45, 2010.

109. ROMLING, U.; KJELLEBERG, S.; NORMARK, S.; NYMAN, L.; UHLIN, B. E. & AKERLUND, B. "Microbial biofilm formation: a need to act". *Journal of internal medicine*, **276**: 98, 2014.
110. GRISTINA, A. G. "Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration". *Science*, **25**: 1588, 1987.
111. HOYOS-NOGUÉS, M.; VELASCO, F.; GINEBRA, M.-P.; MANERO, J. M.; GIL, F. J. & MAS-MORUNO, C. "Regenerating bone via multifunctional coatings: The blending of cell integration and bacterial inhibition properties on the surface of biomaterials ". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**: 21618, 2017.
112. DE GIGLIO, E.; COMETA, S.; RICCI, M. A.; CAFAGNA, D.; SAVINO, A. M.; SABBATINI, L.; ORCIANI, M.; CECI, E.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G. M. & MATTIOLI-BELMONTE, M. "Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections". *Acta biomaterialia*, **7**: 882, 2011.
113. *Manual de Higiene Bucal*. Buenos Aires, Medica Panamericana, 2009.
114. DAROUICHE, R. O. "Treatment of infections associated with surgical implants". *N. Engl. J. Med.*, **350**: 1422, 2004.
115. SIMCHI, A.; TAMJID, E.; PISHBIN, F. & BOCCACCINI, A. R. "Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications". *Nanomedicine*, **7**: 22, 2011.
116. GONZALEZ-SANCHEZ, M. I.; PERNI, S.; TOMMASI, G.; MORRIS, N. G.; HAWKINS, K.; LOPEZ-CABARCOS, E. & PROKOPOVICH, P. "Silver nanoparticle based antibacterial methacrylate hydrogels potential for bone graft applications". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **50**: 332, 2015.
117. HAIDER, A.; HAIDER, S. & KANG, I.-K. "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology". *Arabian Journal of Chemistry*, **11**: 1165, 2018.
118. LIU, Y.; ZHENG, Z.; ZARA, J. N.; HSU, C.; SOOFER, D. E.; LEE, K. S.; SIU, R. K.; MILLER, L. S.; ZHANG, X.; CARPENTER, D.; WANG, C.; TING, K. & SOO, C. "The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (DL-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel". *Biomaterials*, **33**: 8745, 2012.
119. KIM, D.; KWON, S. J.; WU, X.; SAUVE, J.; LEE, I.; NAM, J.; KIM, J. & DORDICK, J. S. "Selective Killing of Pathogenic Bacteria by Antimicrobial Silver Nanoparticle-Cell Wall Binding Domain Conjugates". *ACS applied materials & interfaces*, **10**: 13317, 2018.
120. PAUKSCH, L.; FRANKE, J.; SCHNETTLER, R. & LIPS, K. S. "Synergistic toxicity of gentamicin- and nanosilver-doped polymethylmethacrylate bone cement on primary human osteoclasts". *Cells, tissues, organs*, **199**: 384, 2014.

121. AYDOGAN, D. T.; MUHAFFEL, F.; KILIC, M. M.; ACAR, O. K.; CEMPURA, G.; BAYDOGAN, M.; KARAGULER, N. G.; KOSE, G. T.; CZYRSKA-FILEMONOWICZ, A. & CIMENOGLU, H. "Optimisation of micro-arc oxidation electrolyte for fabrication of antibacterial coating on titanium". *Materials Technology*, **33**: 119, 2017.
122. JIA, Z.; XIU, P.; LI, M.; XU, X.; SHI, Y.; CHENG, Y.; WEI, S.; ZHENG, Y.; XI, T.; CAI, H. & LIU, Z. "Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses". *Biomaterials*, **75**: 203, 2016.
123. LI, Y.; YANG, C.; YIN, X.; SUN, Y.; WENG, J.; ZHOU, J. & FENG, B. "Inflammatory responses to micro/nano-structured titanium surfaces with silver nanoparticles in vitro". *Journal of Materials Chemistry B*, **7**: 3546, 2019.
124. WANG, J.; LI, J.; GUO, G.; WANG, Q.; TANG, J.; ZHAO, Y.; QIN, H.; WAHAFU, T.; SHEN, H.; LIU, X. & ZHANG, X. "Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver". *Scientific reports*, **6**: 2016.
125. ISO. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:54440:en>. Acesso em: 06/03/2019.
126. VANCE, M. E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E. P.; MCGINNIS, S. P.; HOHELLA, M. F., JR.; REJESKI, D. & HULL, M. S. "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory". *Beilstein journal of nanotechnology*, **6**: 1769, 2015.
127. PAREEK, V.; BHARGAVA, A.; GUPTA, R.; JAIN, N. & PANWAR, J. "Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review". *Advanced Science, Engineering and Medicine*, **9**: 527, 2017.
128. WANG, Z.; XIA, T. & LIU, S. "Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects". *Nanoscale*, **7**: 7470, 2015.
129. NATSUKI, J. "A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications". *International Journal of Materials Science and Applications*, **4**: 325, 2015.
130. CHEVALLET, M.; VERONESI, G.; FUCHS, A.; MINTZ, E.; MICHAUD-SORET, I. & DENIAUD, A. "Impact of labile metal nanoparticles on cellular homeostasis. Current developments in imaging, synthesis and applications". *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, **1861**: 1566, 2017.
131. DAS, B.; TRIPATHY, S.; ADHIKARY, J.; CHATTOPADHYAY, S.; MANDAL, D.; DASH, S. K.; DAS, S.; DEY, A.; DEY, S. K.; DAS, D. & ROY, S. "Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study". *Journal of*

biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, **22**: 893, 2017.

132. GENG, H.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; TODD, N.; DEVLIN-MULLIN, A.; MOORE, K. L.; GOLROKHI, Z.; GILCHRIST, J. B.; JONES, E.; POTTER, R. J.; SUTCLIFFE, C.; O'BRIEN, M.; HUKINS, D. W. L.; CARTMELL, S.; MITCHELL, C. A. & LEE, P. D. "Biotransformation of Silver Released from Nanoparticle Coated Titanium Implants Revealed in Regenerating Bone". ACS applied materials & interfaces, **9**: 21169, 2017.

133. ZHU, Y.; CAO, H.; QIAO, S.; WANG, M.; GU, Y.; LUO, H.; MENG, F.; LIU, X. & LAI, H. "Hierarchical micro/nanostructured titanium with balanced actions to bacterial and mammalian cells for dental implants". International journal of nanomedicine, **10**: 6659, 2015.

134. FAUNCE, T. & WATAL, A. "Nanosilver and global public health: international regulatory issues". Nanomedicine, **5**: 617, 2010.

135. WIJNHOFEN, S. W. P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; DEKKERS, S.; DE JONG, W. H.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS, A. J. A. M. & GEERTSMA, R. E. "Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment". Nanotoxicology, **3**: 2009.

136. KIM, J. S.; SUNG, J. H.; JI, J. H.; SONG, K. S.; LEE, J. H.; KANG, C. S. & YU, I. J. "In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure". Safety and health at work, **2**: 34, 2011.

137. WU, T. & TANG, M. "Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs". Journal of applied toxicology : JAT, **38**: 25, 2018.

138. MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T. & YACAMAN, M. J. "The bactericidal effect of silver nanoparticles". Nanotechnology, **16**: 2346, 2005.

139. WANG, X.; JI, Z.; CHANG, C. H.; ZHANG, H.; WANG, M.; LIAO, Y. P.; LIN, S.; MENG, H.; LI, R.; SUN, B.; WINKLE, L. V.; PINKERTON, K. E.; ZINK, J. I.; XIA, T. & NEL, A. E. "Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential". Small, **10**: 385, 2014.

140. HAASE, A.; DOMMERSHAUSEN, N.; SCHULZ, M.; LANDSIEDEL, R.; REICHARDT, P.; KRAUSE, B. C.; TENTSCHERT, J. & LUCH, A. "Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models". Archives of toxicology, **91**: 3991, 2017.

141. QIN, G.; TANG, S.; LI, S.; LU, H.; WANG, Y.; ZHAO, P.; LI, B.; ZHANG, J. & PENG, L. "Toxicological evaluation of silver nanoparticles and silver nitrate in rats following 28 days of repeated oral exposure". *Environmental toxicology*, **32**: 609, 2017.
142. BRAEUNING, A.; OBEREMM, A.; GORTE, J.; BOHMERT, L.; JULING, S. & LAMPEN, A. "Comparative proteomic analysis of silver nanoparticle effects in human liver and intestinal cells". *Journal of applied toxicology : JAT*, **38**: 638, 2018.
143. LIU, J. & HURT, A. "Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids". *Environ. Sci. Technol.*, **44**: 2169, 2010.
144. KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H. & CHO, M. H. "Antimicrobial effects of silver nanoparticles". *Nanomedicine*, **3**: 95, 2007.
145. VERONESI, G.; DENIAUD, A.; GALLON, T.; JOUNEAU, P. H.; VILLANOVA, J.; DELANGLE, P.; CARRIERE, M.; KIEFFER, I.; CHARBONNIER, P.; MINTZ, E. & MICHAUD-SORET, I. "Visualization, quantification and coordination of Ag(+) ions released from silver nanoparticles in hepatocytes". *Nanoscale*, **8**: 17012, 2016.
146. GLIGA, A. R.; SKOGLUND, S.; ODNEVALL WALLINDER, I.; FADEEL, B. & KARLSSON, H. L. "Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release". *Particle and Fibre Toxicology*, **11**: 1, 2014.
147. FALCONER, J. L. & GRAINGER, D. W. "In vivo comparisons of silver nanoparticle and silver ion transport after intranasal delivery in mice". *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **269**: 1, 2018.
148. XIU, Z. M.; ZHANG, Q. B.; PUPPALA, H. L.; COLVIN, V. L. & ALVAREZ, P. J. "Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles". *Nano letters*, **12**: 4271, 2012.
149. MARAMBIO-JONES, C. & HOEK, E. M. V. "A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment". *Journal of Nanoparticle Research*, **12**: 1531, 2010.
150. DE MATTEIS, V.; MALVINDI, M. A.; GALEONE, A.; BRUNETTI, V.; DE LUCA, E.; KOTE, S.; KSHIRSAGAR, P.; SABELLA, S.; BARDI, G. & POMPA, P. P. "Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag+ ion release in the cytosol". *Nanomedicine*, **11**: 731, 2015.
151. MOHITI-ASLI, M.; POURDEYHIMI, B. & LOBOA, E. G. "Novel, silver-ion-releasing nanofibrous scaffolds exhibit excellent antibacterial efficacy without the use of silver nanoparticles". *Acta biomaterialia*, **10**: 2096, 2014.

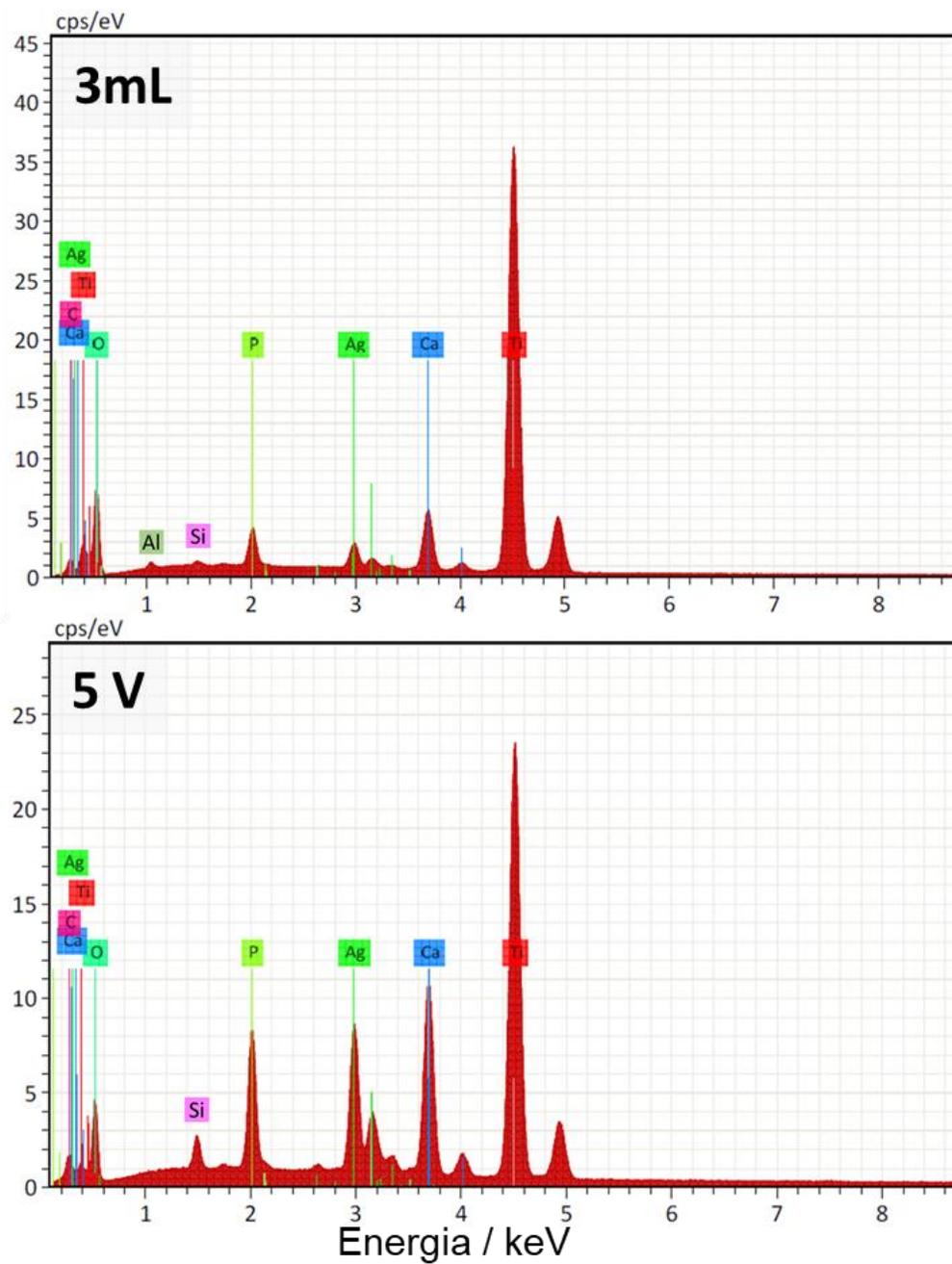
152. MUNTEANU, B. S.; AYTAC, Z.; PRICOPE, G. M.; UYAR, T. & VASILE, C. "Polylactic acid (PLA)/Silver-NP/VitaminE bionanocomposite electrospun nanofibers with antibacterial and antioxidant activity". *Journal of Nanoparticle Research*, **16**: 2643, 2014.
153. JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; SHALUMON, K. T.; CHENNAZHI, K. P. & NAIR, S. V. "Biomedical Applications of Polymer/Silver Composite Nanofibers". **246**: 263, 2011.
154. GODOY-GALLARDO, M.; WANG, Z.; SHEN, Y.; MANERO, J. M.; GIL, F. J.; RODRIGUEZ, D. & HAAPASALO, M. "Antibacterial coatings on titanium surfaces: a comparison study between in vitro single-species and multispecies biofilm". *ACS applied materials & interfaces*, **7**: 5992, 2015.
155. SILVER, S.; PHUNG LE, T. & SILVER, G. "Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds". *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **33**: 627, 2006.
156. CALABRESE, E. J. & BALDWIN, L. A. "Defining hormesis". *Human & experimental toxicology*, **21**: 91, 2002.
157. JUNOH, H.; JAAFAR, J.; MOHD NORDDIN, M. N. A.; ISMAIL, A. F.; OTHMAN, M. H. D.; RAHMAN, M. A.; YUSOF, N.; WAN SALLEH, W. N. & ILBEYGI, H. "A Review on the Fabrication of Electrospun Polymer Electrolyte Membrane for Direct Methanol Fuel Cell". *Journal of Nanomaterials*, **2015**: 1, 2015.
158. PICCIANI, P.; MEDEIROS, E.; J. ORTS, W. & H. C. MATTOSO, L. *Advances in Electroactive Electrospun Nanofibers IN: Nanofibers: Production, Properties and Functional Applications*. Lin, T. (Eds.). Rijeka, Croatia, InTech, 2011. 458 p
159. ZHOU, Z.; LI, W.; HE, T.; YU, P.; TAN, G. & NING, C. "Controllable Protein Adsorption and Bacterial Adhesion on Polypyrrole Nanocone Arrays". *Journal of Materials Science & Technology*, **32**: 950, 2016.
160. CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; FERRARA, C. & MUSTARELLI, P. "Silica-polyethylene glycol hybrids synthesized by sol-gel: Biocompatibility improvement of titanium implants by coating". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **55**: 118, 2015.
161. KUMERIA, T.; MON, H.; AW, M. S.; GULATI, K.; SANTOS, A.; GRIESSER, H. J. & LOSIC, D. "Advanced biopolymer-coated drug-releasing titania nanotubes (TNTs) implants with simultaneously enhanced osteoblast adhesion and antibacterial properties". *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **130**: 255, 2015.
162. CAO, X.-Y.; TIAN, N.; DONG, X. & CHENG, C.-K. "Implant Coating Manufactured by Micro-Arc Oxidation and Dip Coating in Resorbable Polylactide for Antimicrobial Applications in Orthopedics". *Coatings*, **9**: 2019.

163. NOFAR, M.; SACLIGIL, D.; CARREAU, P. J.; KAMAL, M. R. & HEUZEY, M. C. "Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications". *International journal of biological macromolecules*, **125**: 307, 2019.
164. LASPRILLA, A. J.; MARTINEZ, G. A.; LUNELLI, B. H.; JARDINI, A. L. & FILHO, R. M. "Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review". *Biotechnology advances*, **30**: 321, 2012.
165. PERES, C.; MATOS, A. I.; CONNIOT, J.; SAINZ, V.; ZUPANCIC, E.; SILVA, J. M.; GRACA, L.; SA GASPAR, R.; PREAT, V. & FLORINDO, H. F. "Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation". *Acta biomaterialia*, **48**: 41, 2017.
166. GU, S.-Y. & REN, J. "Process Optimization and Empirical Modeling for Electrospun Poly(D,L-lactide) Fibers using Response Surface Methodology". *Macromolecular Materials and Engineering*, **290**: 1097, 2005.
167. CHEN, W.; CHEN, S.; MORSE, Y.; EL-HAMSHARY, H.; EL-NEWHY, M.; FAN, C. & MO, X. "Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering". *ACS applied materials & interfaces*, **8**: 24415, 2016.
168. NETO, F. N. D. S. Efeito da inserção de nanopartículas sintéticas preparadas por rota coloidal em matriz acrílica comercial de uso odontológico. São Carlos, Departamento de Química - UFSCar, 2016. 118 p.
169. UCHIDA, M.; KIM, H.-M.; KOKUBO, T.; FUJIBAYASHI, S. & NAKAMURA, T. "Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid". *J. Biomed. Mater. Res. A*, **64**: 165, 2003.
170. RIBEIRO, A. R.; OLIVEIRA, F.; BOLDRINI, L. C.; LEITE, P. E.; FALAGAN-LOTSCH, P.; LINHARES, A. B.; ZAMBUZZI, W. F.; FRAGNEAUD, B.; CAMPOS, A. P.; GOUVEA, C. P.; ARCHANJO, B. S.; ACHETE, C. A.; MARCANTONIO, E., JR.; ROCHA, L. A. & GRANJEIRO, J. M. "Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **54**: 196, 2015.
171. WU, S.-D.; ZHANG, H.; DONG, X.-D.; NING, C.-Y.; FOK, A. S. L. & WANG, Y. "Physicochemical properties and in vitro cytocompatibility of modified titanium surfaces prepared via micro-arc oxidation with different calcium concentrations". *Applied Surface Science*, **329**: 347, 2015.
172. MARQUES, I.; ALFARO, M. F.; CRUZ, N. C. D.; MESQUITA, M. F.; TAKOUDIS, C.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T. & BARAO, V. A. R. "Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms". *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, **60**: 8, 2016.

173. CHANG, C.; HUANG, X.; LIU, Y.; BAI, L.; YANG, X.; HANG, R.; TANG, B. & CHU, P. K. "High-current anodization: A novel strategy to functionalize titanium-based biomaterials". *Electrochimica Acta*, **173**: 345, 2015.
174. DUARTE, L. T.; BOLFARINI, C.; BIAGGIO, S. R.; ROCHA-FILHO, R. C. & NASCENTE, P. A. "Growth of aluminum-free porous oxide layers on titanium and its alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb by micro-arc oxidation". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **41**: 343, 2014.
175. LEITE, E. R. & RIBEIRO, C. *Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals*. 1ed. Springer-Verlag New York, 2012. 95
176. Zetasizer nano series user manual. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd., 2013. 250 p.
177. QING, Y.; CHENG, L.; LI, R.; LIU, G.; ZHANG, Y.; TANG, X.; WANG, J.; LIU, H. & QIN, Y. "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies". *International journal of nanomedicine*, **13**: 3311, 2018.
178. SIRITONGSUK, P.; HONGSING, N.; THAMMAWITHAN, S.; DADUANG, S.; KLAYNONGSRUANG, S.; TUANYOK, A. & PATRAMANON, R. "Two-Phase Bactericidal Mechanism of Silver Nanoparticles against *Burkholderia pseudomallei*". *PloS one*, **11**: e0168098, 2016.
179. AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C. & PIJNENBORG, R. "The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells". *Human reproduction*, **22**: 1304, 2007.
180. WAN, Y.; WANG, G.; REN, B.; LIU, Z. & GE, P. "Construction of Antibacterial and Bioactive Surface for Titanium Implant". *Nanomanufacturing and Metrology*, **1**: 252, 2018.
181. DU, J.; SINGH, H. & YI, T. H. "Antibacterial, anti-biofilm and anticancer potentials of green synthesized silver nanoparticles using benzoin gum (*Styrax benzoin*) extract". *Bioprocess and biosystems engineering*, **39**: 1923, 2016.
182. QIN, H.; CAO, H.; ZHAO, Y.; ZHU, C.; CHENG, T.; WANG, Q.; PENG, X.; CHENG, M.; WANG, J.; JIN, G.; JIANG, Y.; ZHANG, X.; LIU, X. & CHU, P. K. "In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium". *Biomaterials*, **35**: 9114, 2014.

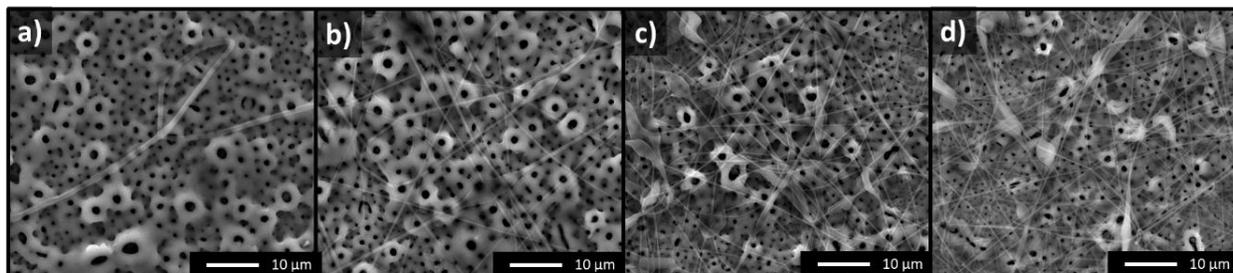
Apêndice A

Espectros de EDS das amostras **3mL** e **5V**.

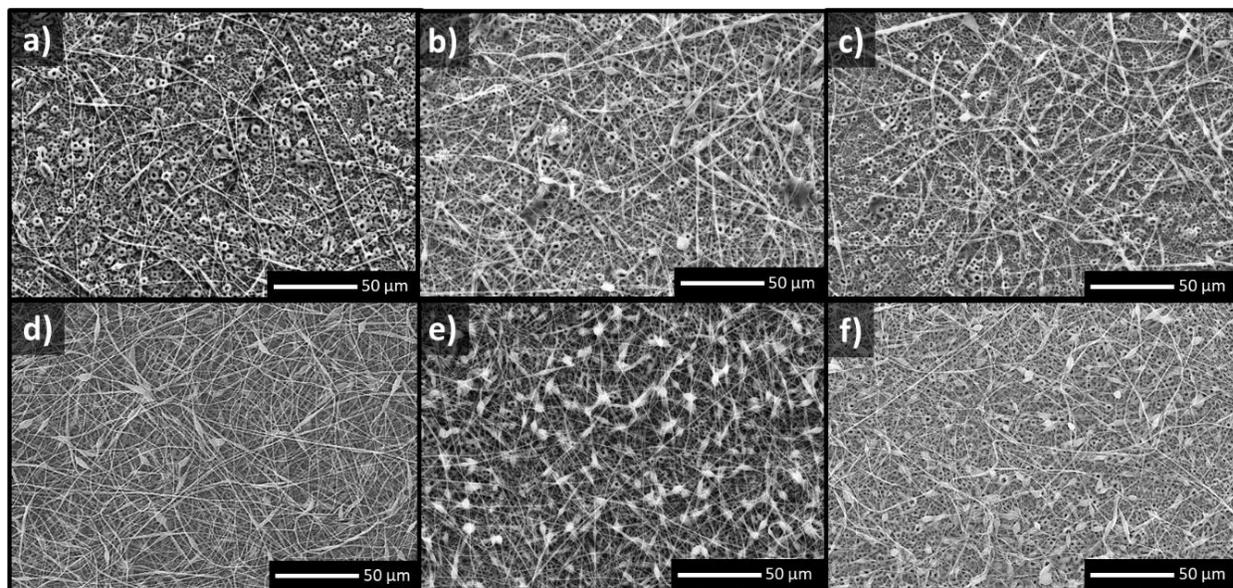


Apêndice B

Deposição de fibras de PLA 10 % com coletor estático sobre Ti anodizado a diferentes tempos: a) 30 s, b) 1 min, c) 2 min e d) 5 min.

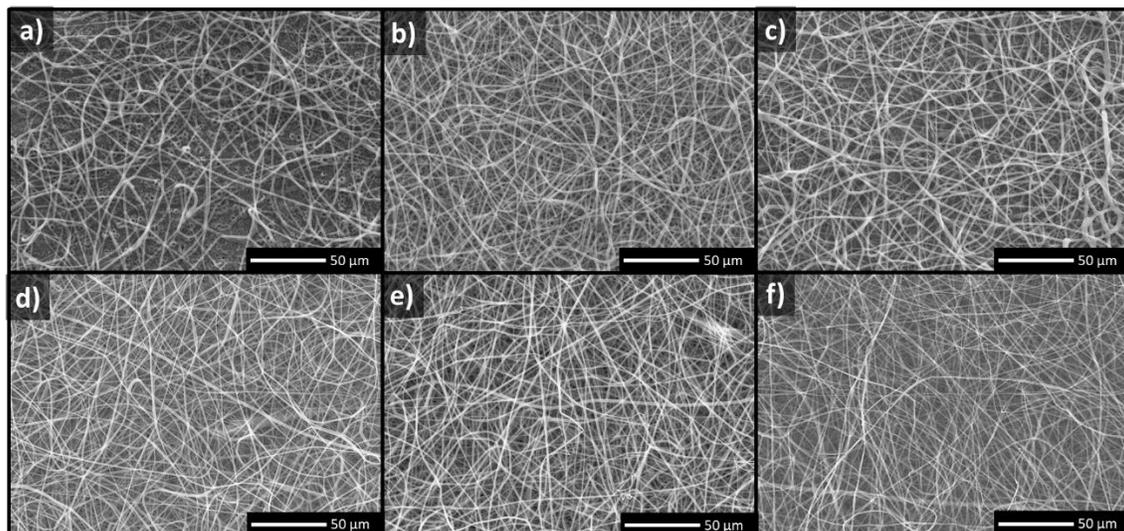


Deposição de fibras de PLA 10 % com coletor rotacional o sobre Ti anodizado a diferentes tempos: a) 2 min, b) 3 min, c) 4 min, d) 5 min, e) 10 min e f) 15 min.



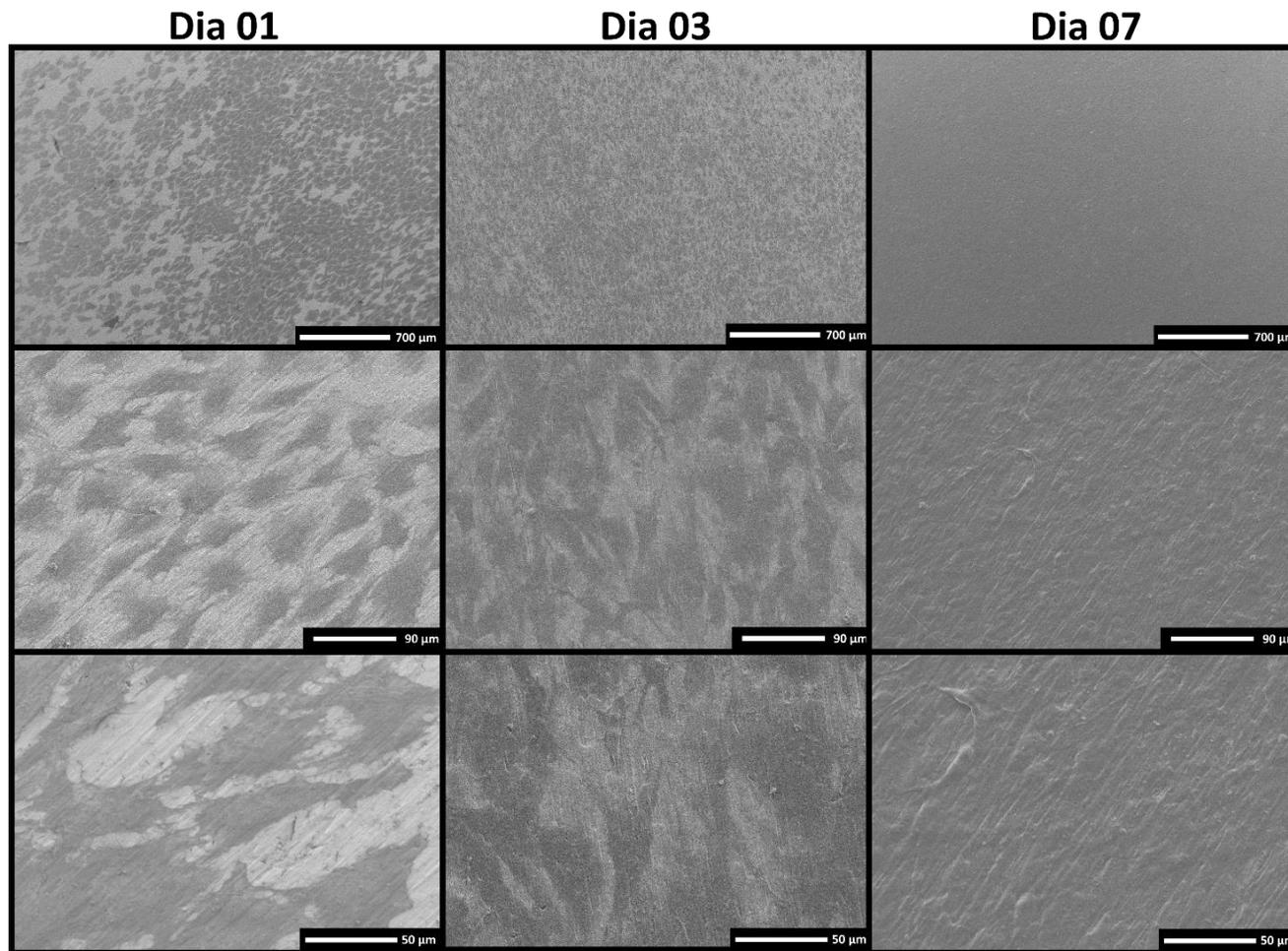
Apêndice C

Deposição de fibras de PLA 14 % com coletor rotacional sobre Ti anodizado a diferentes tempos: a) 2 min, b) 3 min, c) 4 min, d) 5 min, e) 10 min e f) 15 min.



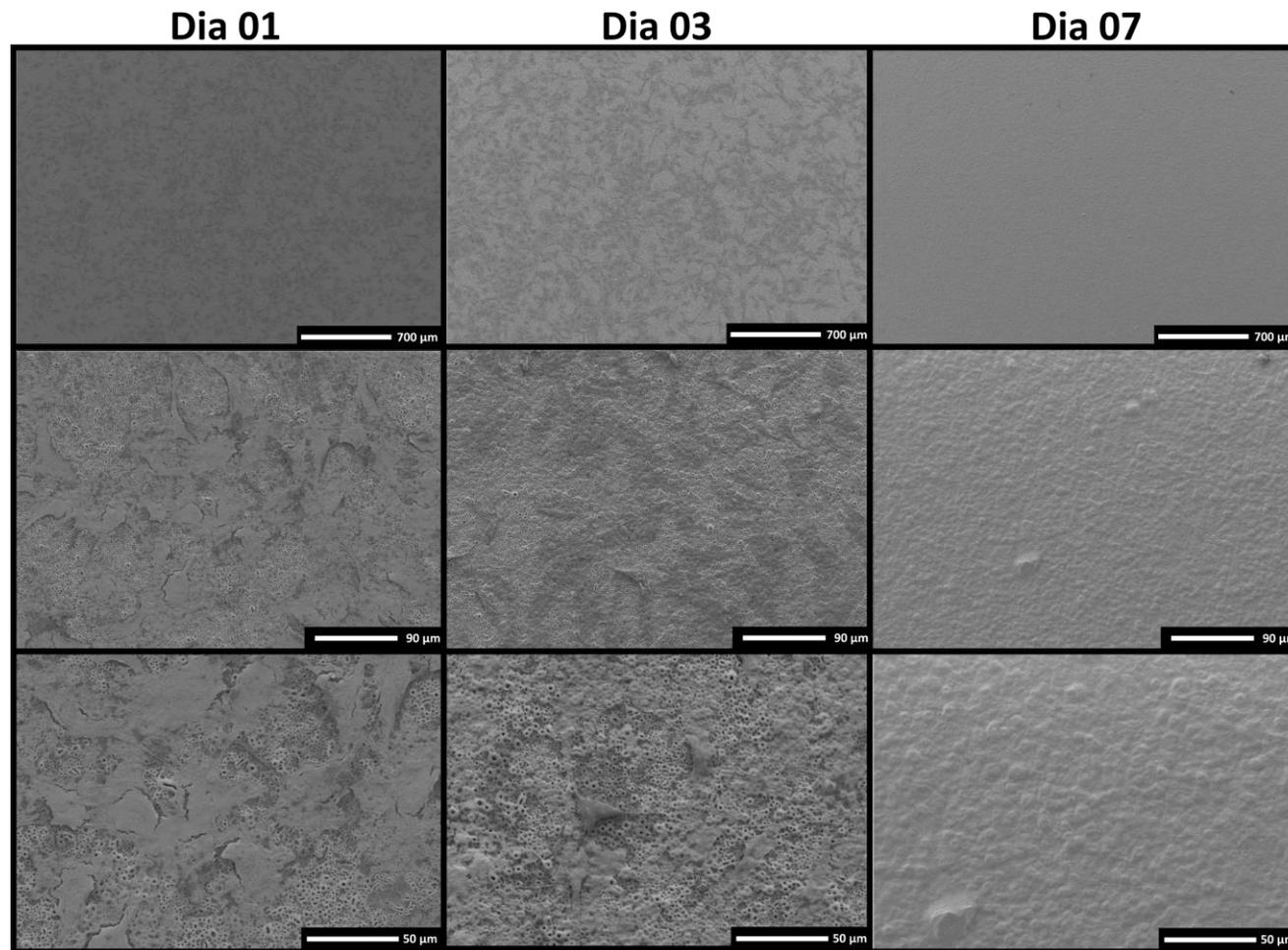
Apêndice D

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **Pol** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



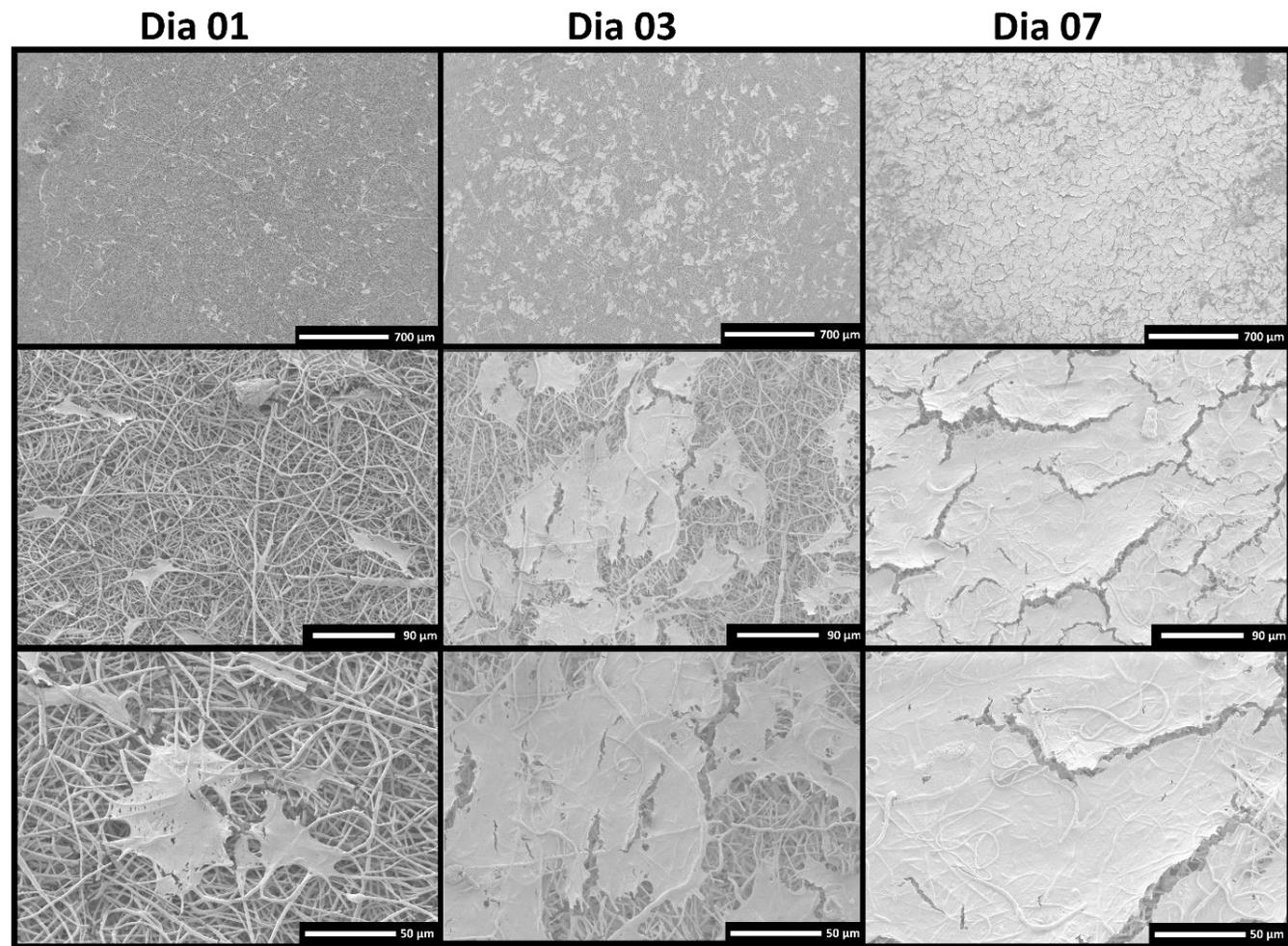
Apêndice E

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **An** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



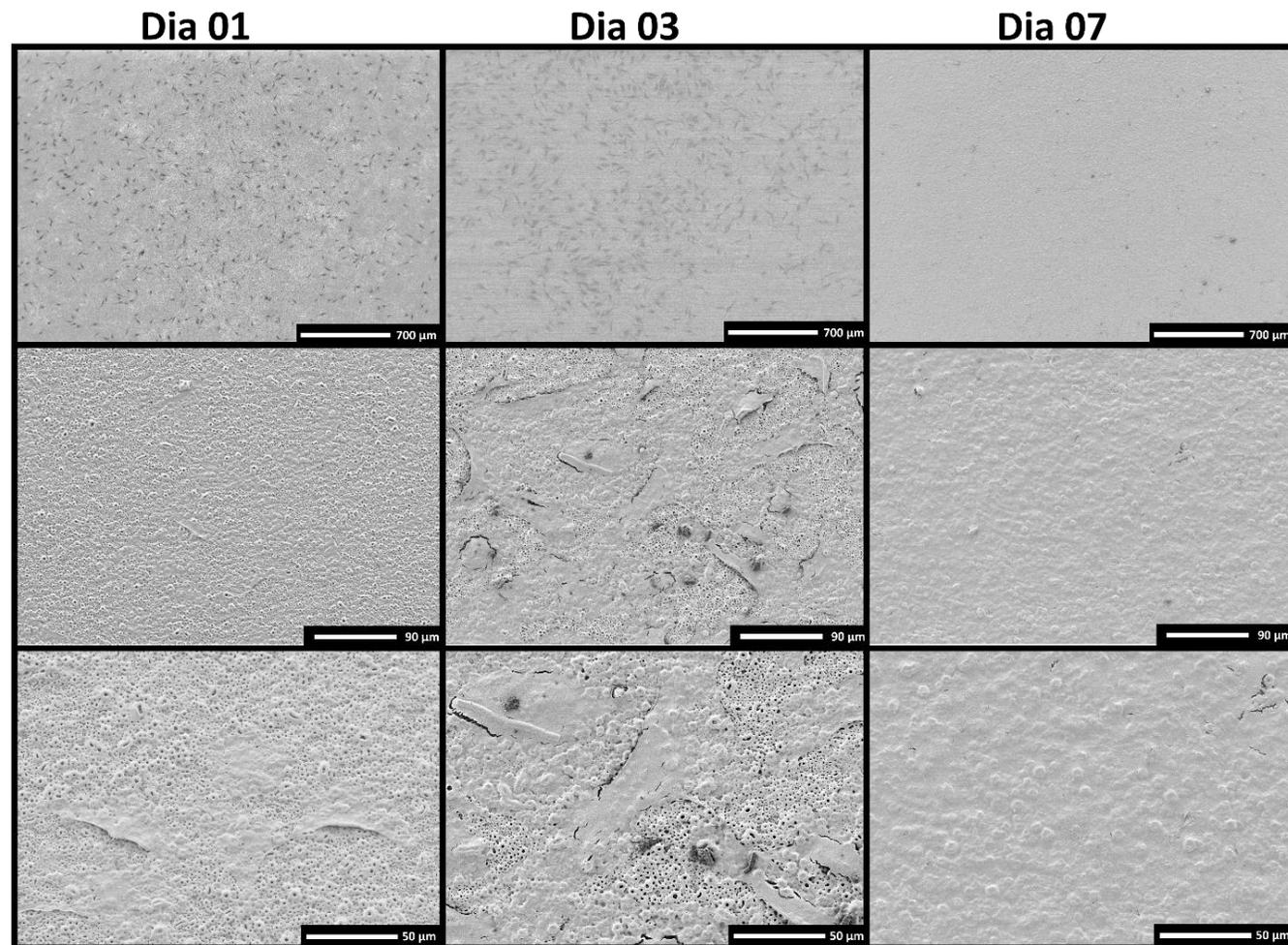
Apêndice F

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **AnPLA** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



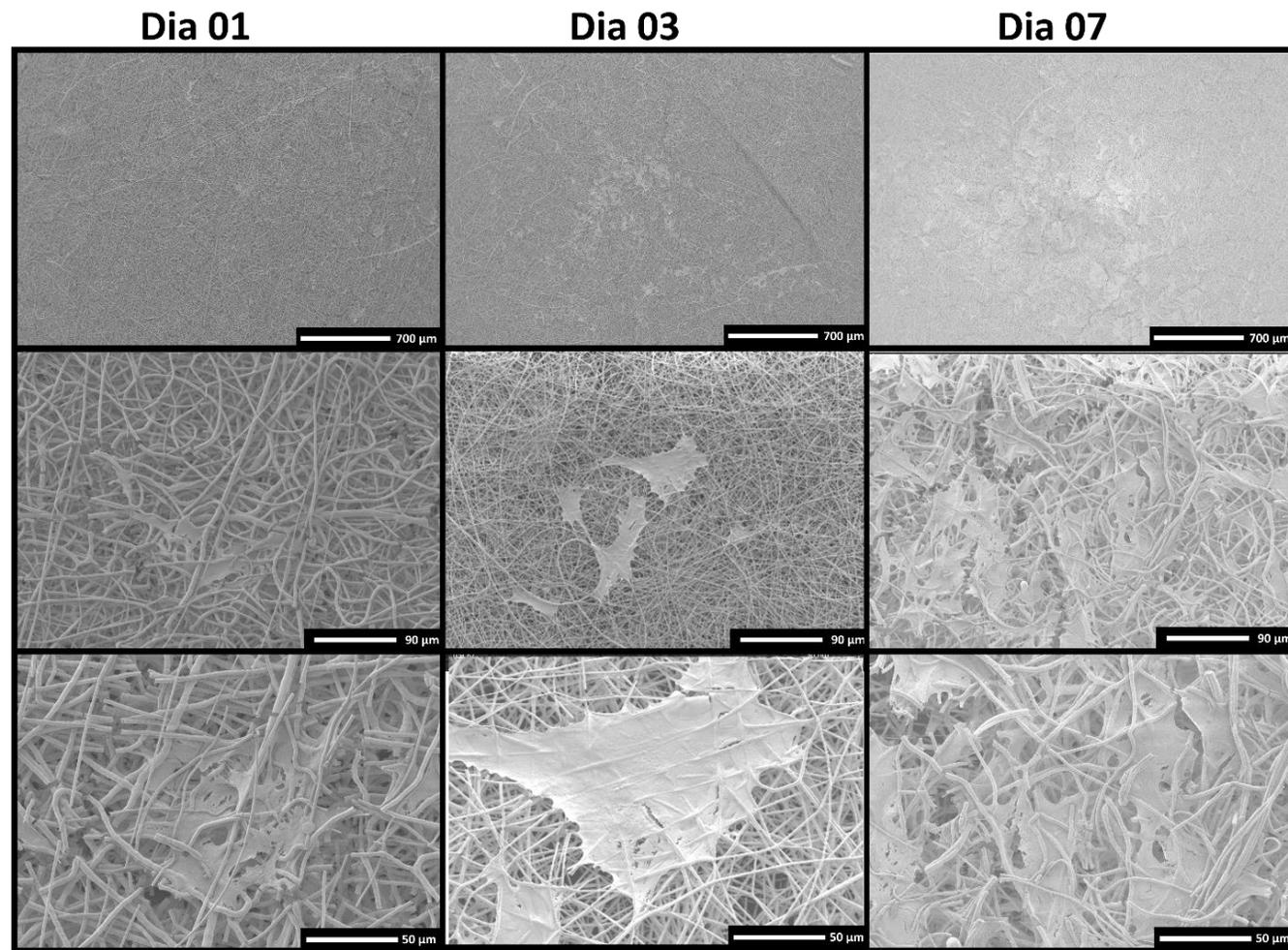
Apêndice G

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **5V** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



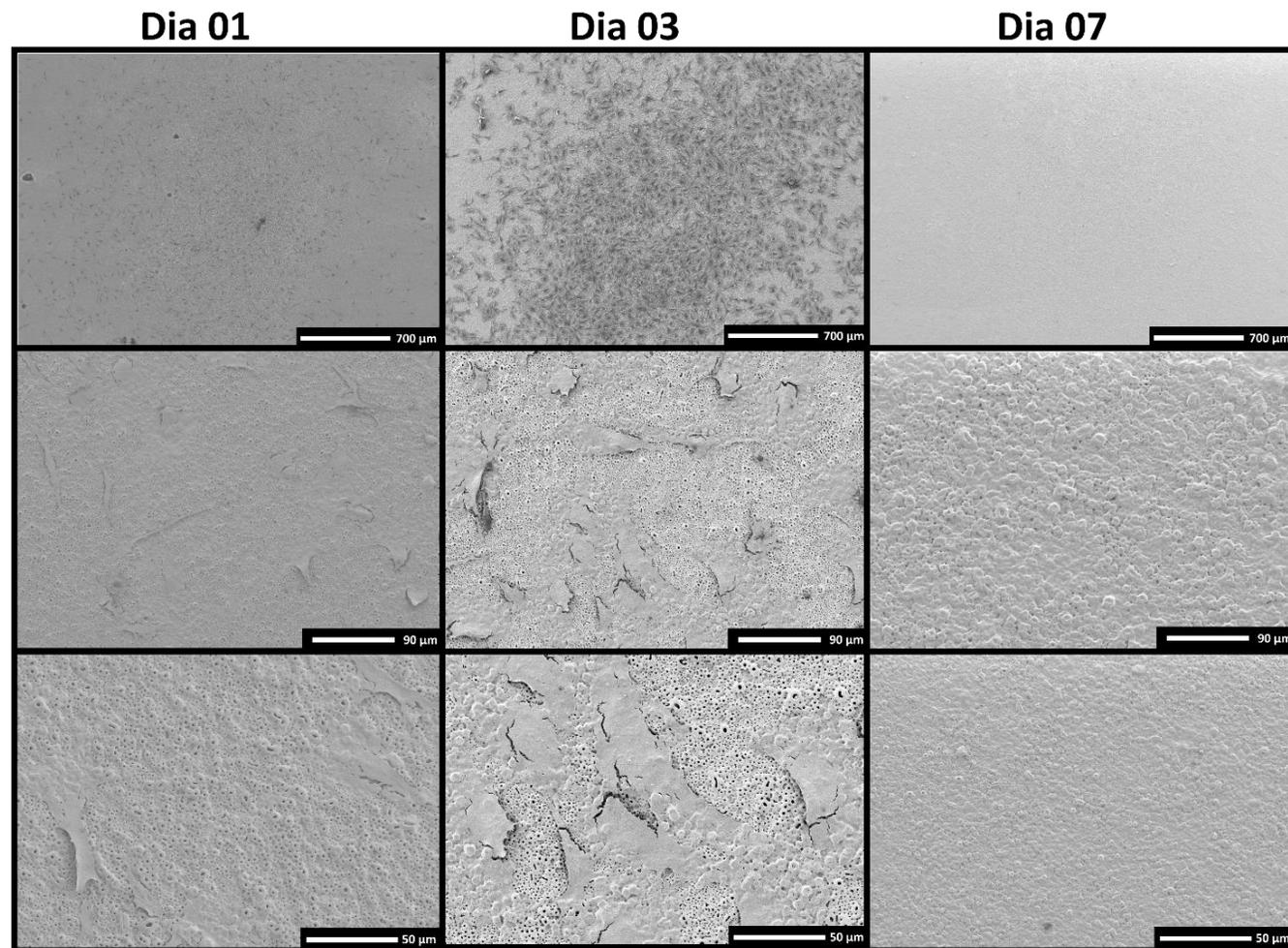
Apêndice H

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **5VPLA** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



Apêndice I

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **3mL** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.



Apêndice J

Micrografias de MEV das células de pré-osteoblastos cultivadas sobre as amostras **3mLPLA** nos períodos: 1, 3 e 7 dias.

