

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIES EM TI-CP, TI-6AL-4V E TI-6AL-7NB  
VISANDO A OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES: PROPRIEDADES DAS  
SUPERFÍCIES E RESPOSTAS OSTEOBLÁSTICAS**

Diego Pedreira de Oliveira

São Carlos  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIES EM TI-CP, TI-6AL-4V E TI-6AL-7NB  
VISANDO A OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES: PROPRIEDADES DAS  
SUPERFÍCIES E RESPOSTAS OSTEOLÁSTICAS**

Diego Pedreira de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia  
de Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Prof. Dr. Claudemiro Bolfarini

Ag. Financiadora: CNPq

São Carlos  
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48ts

Oliveira, Diego Pedreira de.

Tratamentos de superfícies em Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb visando a osseointegração de implantes : propriedades das superfícies e respostas osteoblásticas / Diego Pedreira de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

121 p.

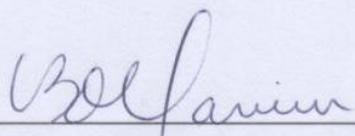
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Metais. 2. Ligas de titânio. 3. Tratamento químico. 4. Biocompatibilidade. 5. Expressão gênica. I. Título.

CDD: 620.16 (20ª)

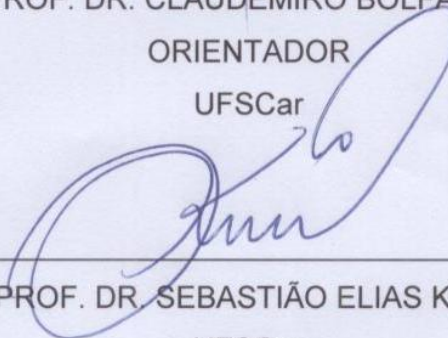
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
DIEGO PEDREIRA DE OLIVEIRA  
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS, EM 10 DE JULHO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA



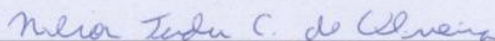
---

PROF. DR. CLAUDEMIRO BOLFINI  
ORIENTADOR  
UFSCar



---

PROF. DR. SEBASTIÃO ELIAS KURI  
UFSCar



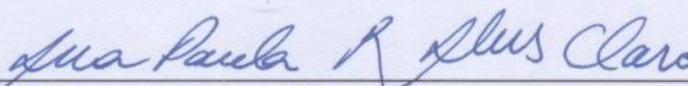
---

PROF. DR. NILSON TADEU CAMARINHO DE OLIVEIRA  
FAPESP/DEMa/UFSCar



---

PROF. DR. RUI MÁRIO CORREIA DA SILVA VILAR  
IST/UTL/PT



---

PROF. DRA. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO  
FEG/UNESP



## DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe, Eliana, e ao meu pai, Carlos (*in memoriam*), que desde quando eu agia instintivamente me importavam com Razão e Educação.

Dedico às pessoas que possam, por ventura, se beneficiar com este trabalho e sentirem suas vidas ganhar em qualidade.

## VITAE DO CANDIDATO

Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFSCar (2009), Engenheiro de Materiais pela UFSCar (2006).





## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao Professor Dr. Claudemiro Bolfarini, pela orientação, amizade e confiança proferidas ao longo deste período e cujos ensinamentos me foram de grande valia e contribuíram muito para o meu aprimoramento.

Agradeço aos funcionários e docentes do PPGCEM/UFSCar por tornarem e manterem o programa de pós-graduação em um patamar que nos orgulha. Ao DEMa e ao CCDM (UFSCar) por proverem os recursos técnicos para a realização e análise dos experimentos.

Aos amigos e colegas, desde aqueles que faziam companhia nos laboratórios e tornaram as atividades mais prazerosas àqueles que com prazerosas conversas tornam o dia-a-dia mais interessante.

Ao Nilson, à Laís e à Carolina, pessoas que se interessam pelo tema e com as quais mantive contato e cooperações.

Agradeço às pessoas que me receberam na Universidade de Ferrara, Itália, e que com paciência me ensinaram um pouco sobre respostas biológicas. Obrigado, Professor Dr Francesco Carinci, Dra. Annalisa Palmieri, Dra. Ambra Girardi, Dra Ilaria Zollino, Dra. Valentina Candoto, Me. Francesca Cura, Prof. Dra. Marcella Martinelli, Prof. Dr. Luca Scapoli.

Agradeço ao Professor Dr Rui Mário Correia da Silva Vilar e ao Dr. Alexandre Cunha do IST-UTL, Lisboa, Portugal, que me receberam durante um período de curto estágio, que me rendeu ideia para a nova etapa que se inicia.

Agradeço ao CNPq e a Capes pelo aporte financeiro para a realização do trabalho.

Ao meu irmão, Daniel, camarada e companheiro.

À Helena, sem palavras...

Aos meus familiares e amigos.



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades das superfícies de amostras de Ti-CP, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb modificadas via tratamentos químicos, bem como avaliar o comportamento das células osteoblásticas humanas frente a essas modificações. Para tanto, amostras das três ligas foram atacadas com ácido clorídrico ou fosfórico, seguido ou não por tratamento alcalino, e posteriormente analisadas quanto à morfologia, rugosidade, área efetiva e ângulo de contato (molhabilidade). Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia das superfícies e EDS para obter as composições químicas. Medidas de rugosidade e área efetiva foram executadas com microscópio confocal a laser. O goniômetro foi o equipamento utilizado para as medidas de ângulo de contato. As respostas osteoblásticas foram avaliadas por meio da técnica de reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR), para determinação das expressões gênicas de ALPL, COL1A1, COL3A1, SPP1, RUNX2 e SPARC. Os resultados demonstraram que os tratamentos provocaram alterações nas propriedades da superfície e induziram as expressões gênicas dos osteoblastos humanos. Todos os tratamentos provocaram alteração na composição química da superfície da amostra. Os tratamentos ácidos provocaram alterações de topografia e área efetiva, enquanto que os tratamentos alcalinos alteraram a morfologia da superfície e aumentaram a hidrofiliabilidade, todos em relação às amostras apenas lixadas (controles). As expressões genicas foram diferentemente reguladas de acordo com o tratamento empregado na superfície das amostras testadas. De forma geral, os tratamentos alcalinos e o ataque com ácido fosfórico são mais efetivos para controlar o comportamento celular. Os tratamentos ácidos e o tratamento alcalino induzem alterações de topografia nas escalas micro, submicro e, em alguns casos, nanométricas, fato que pode amplificar e acelerar as respostas das células sobre os materiais.



## **SURFACE MODIFICATION OF TI-CP, TI-6AL-4V E TI-6AL-7NB AIMING OSSEOINTEGRATION OF IMPLANTS: SURFACE PROPERTIES AND OSTEOBLASTIC RESPONSES**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the properties of the surfaces of CP-Ti, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb alloys modified via chemical treatments, as well as evaluating the behavior of human osteoblastic cells as function of these changes. For this purpose, samples of the three alloys were etched with hydrochloric acid or phosphoric acid, followed or not by alkaline treatment, and subsequently analyzed their morphology, roughness, effective area and contact angle (wettability). Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the morphology of surfaces and EDS for chemical compositions. Roughness and effective area measurements were performed with confocal laser microscope. A goniometer was used for the measurement of contact angle. Osteoblastic responses were evaluated by means of the technique of polymerase chain reaction with reverse transcription real-time (real-time PCR) to determine the gene expression of ALPL, COL1A1, COL3A1, SPP1, RUNX2 and SPARC. The results showed that the treatments significantly change the surface properties and induced the gene expression of human osteoblasts. All treatments caused change in the chemical composition of the sample surface. Acid treatments caused changes in actual topography and area, while alkaline treatments altered the surface morphology and increased hydrophilicity compared to the only abraded samples (controls). The gene expression was regulated differently in accordance with the surface treatment employed in the samples tested. Overall, treatment with alkaline treatment and phosphoric acid are more effective to control cell behavior. The alkali treatment and acid treatments together induce changes in the topography at micro, submicron and in some cases nanometric scales, which may amplify and accelerate the response of the cells on the materials.



## PUBLICAÇÕES ORIGINADAS

### Artigos

Oliveira, D.P.; PALMIERI, A; CARINCI, F; BOLFARINI, C.. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013.

S. FANALI; M. A. LOPEZ; M. Andreasi BASSI; L. CONFALONE; G. ELIA; PEDREIRA DE OLIVEIRA, D.; F. CARINCI. Implants inserted in different sites: analysis of 390 fixtures. *European Journal of Inflammation*, v. 10, p. 1-5, 2012.

S. FANALI; M. A. LOPEZ; M. Andreasi BASSI; L. CONFALONE; PEDREIRA DE OLIVEIRA, D; F. CARINCI. Retrospective study on 205 fixtures inserted in upper jaw. *European Journal of Inflammation*, v. 10, p. 13-16, 2012.

M. A. LOPEZ; M. Andreasi BASSI; L. CONFALONE; S. FANALI; V. CANDOTTO; PEDREIRA DE OLIVEIRA, D; F. CARINCI. Post-extractive implants: Outcome of 40 cases. *European Journal of Inflammation*, v. 10, p. 21, 2012.

### Congressos

Oliveira, N. T. C.; Oliveira, D.P.; BOLFARINI, C.. Obtaining of nanostructured surfaces on Ti and its biomedical alloys. In: XI Encontro da SBPMAT, 2012, Florianópolis. XI Brazilian MRS Meeting, 2012.

Oliveira, N. T. C.; VERDERIO, J. F.; Oliveira, D.P.; BOLFARINI, C.. Obtaining of nanostructured surfaces on Ti and biomedical Ti-Mo alloy. In: The 5th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials, 2012, São Carlos. NANOMAT 2012, 2012.

Oliveira, N. T. C.; Oliveira, D. P.; BOLFARINI, C.. XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. In: XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2012, Fortaleza. XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2012. (resumo expandido).



## SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA .....	i
DEDICATÓRIA .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
PUBLICAÇÕES .....	xi
SUMÁRIO.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxi
<b>1. INTRODUÇÃO: contextualização da pesquisa .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Biomateriais .....	7
2.2 Superfície do metal .....	9
2.3 Modificação da superfície visando a osseointegração .....	13
2.4 Modificações das superfícies .....	20
2.4.1 Tratamento Ácido .....	20
2.4.2 Tratamento alcalino .....	27
2.5 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas .....	30
2.5.1 Efeito da energia da superfície .....	31
2.5.2 Efeito da Rugosidade .....	35
2.5.3 Efeito da Topografia .....	38
2.5.4 Efeito da composição .....	40
2.6 Respostas Biológicas.....	42
2.6.1 Reação de polimerase em cadeia – Transcrição Reversa: <i>Reverse Transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)</i> .....	42
2.6.2 Expressão gênica de osteoblastos humanos em ensaios <i>in vitro</i> .....	46
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>

3.1. Obtenção dos discos .....	50
3.2. Modificação das superfícies .....	51
3.2.1. Procedimento para o ataque ácido .....	51
3.2.2. Procedimento para tratamento alcalino.....	52
3.3. Caracterização das superfícies das amostras .....	52
3.3.1 Morfologia e composição química .....	52
3.3.2 Medidas de Rugosidade .....	53
3.3.3 Medida de Ângula de contato .....	54
3.3.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> .....	55
3.3.5.1 Cultura primária de osteoblastos humanos (Human Osteoblasts - HOb) .....	55
3.3.5.2 Cultura celular .....	56
3.3.5.3 Procesamento de RNA .....	56
3.3.5.7 PCR em tempo real .....	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>59</b>
4.1. Características das superfícies.....	59
4.1.1. Morfologia da superfície (Topografia) .....	59
4.1.1.1. Titânio comercialmente puro (Ti-CP).....	59
4.1.1.2. Titânio-6Alumínio-4Vanádio (Ti-6Al-4V-ELI) .....	65
4.1.1.3. Titânio-6Alumínio-7Nióbio (Ti-6Al-7Nb).....	71
4.1.2. Rugosidade .....	76
4.1.3. Área efetiva da superfície.....	78
4.1.4. Composição química.....	80
4.1.5. Ângulo de contato ou molhabilidade .....	83
4.1.6. Respostas Biológicas.....	86
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>101</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 : Distribuição em porcentagem das publicações por áreas de pesquisa de acordo com as palavras pesquisadas.....	3
Figura 1.2: Quantidade de publicações por ano disponíveis no sítio de consulta <i>Web of Science</i> com as seguintes palavras: <i>surface and biomaterial* and osseointegration</i> .....	3
Figura 1.3: Distribuição de publicações por países. Constam 10 dos principais países em quantidade de publicações com os termos pesquisados.....	4
Figura 2.1: Decomposição em oito picos (elétrons $2p_{3/2}$ e $2p_{1/2}$ em quatro valências) do espectro de Ti 2p, obtido a partir de uma amostra de titânio lixada e imersa por 300s em água. Os números com as setas representam as valências encontradas na análise (extraída de [20]).....	10
Figura 2.2: Espectro de XPS do nível Ti2p (à esquerda) e O1s (à direita) em superfície de Ti: (A) sem tratamento (controle) e (B) superfície tratada com $H_2SO_4 + H_2O_2$ (extraída de [21]).....	11
Figura 2.3: Perfil de análise via AES das concentrações relativas de elementos presentes na superfície do titânio lixado e imerso 300s em solução de Hank (pH 7,4) (extraída de [20]).....	12
Figura 2.4: Uma visão artística da interface titânio/osso dividida em cinco regiões. O óxido de titânio é coberto com uma camada extremamente fina de peróxido de titânio, que está em contato com o osso em recuperação (extraída e modificada de [19]).....	13
Figura 2.5: micrografias via MEV de uma superfície de um implante dental de titânio (Cortesia de Straumann AG, Suíça) [32] atacada por duplo ácido. ....	21
Figura 2.6: MEV das superfícies: controle (a,c) e atacadas com ácido (b,d). Barras de escala em a,b = 50 $\mu m$ e em c,d = 10 $\mu m$ (extraída de [36]. ....	22
Figura 2.7: Micrografia eletrônica de varredura de células cultivadas em superfícies controle da liga Ti-6Al-4V (A) e do Ti-CP (E) que exibem superfície lisa, enquanto as atacadas: Ti-6Al-4V (C) e Ti-CP (G), são caracterizados por uma única nanotopografia. Em 6 horas, não foi detectado diferença significativa	

na forma das células aderidas à superfície controle (B and F) e nanotexturizada (D e H) (extraída de [8])..... 23

Figura 2.8: Micrografias por MEV de células em superfícies usinadas (A) e nanotexturizadas (B-F). Porções do citoplasma de algumas células exibem uma aparência reticulada (asteriscos em A-C). (C) maior aumento da região pontilhada destacada em (B). As células prolongam-se com filopodias sobre os metais, entretanto, esse comportamento foi mais evidente no Ti-liga nanotexturizado (pontas das setas em D) e no Ti-CP nanotexturizado (B-pontas das setas). Em (F), destacado a partir de (E) as extremidades das células (setas em F) tendem a seguir o caminho das paredes das nanocavitações (extraída e modificada de [8]). ..... 25

Figura 2.9: Micrografia por MEV de superfícies Ti-CP: controle (A) e tratada com ácido (B). Distribuição do tamanho de nanopits (C). Dimensão fractal dos nanopits da imagem B (extraída de [21])..... 26

Figura 2.10: Mecanismo de formação de apatitas em superfícies tratadas com modificação alcalina NaOH (extraída e modificada de [41]). ..... 28

Figura 2.11: formação de apatitas nas superfícies com géis após tratamento com NaOH: (A) SiO<sub>2</sub>, (B) TiO<sub>2</sub>, (C) ZrO<sub>2</sub>, (D) Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, (E) Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (extraída de [41]). ..... 29

Figura 2.12: Ilustração de diferentes ângulos de molhamento de uma gota de água em três diferentes superfícies. Em (a) superfície hidrofóbica; (b) molhamento parcial e em (c) superfície hidrofílica. Esquemáticos em fonte vermelha temos as tensões superficiais ( $\sigma$ : J/m<sup>2</sup>) e o ângulo de contato  $\theta$  [51]. ..... 32

Figura 2.13: Imagens obtidas com auxílio de MEV das superfícies dos materiais mostrando a morfologia de osteoblastos primários de ratos após 8 horas de incubação. Há três características morfológicas: circular e hemisferoidal com filipodium (a) (6500X); plana com lamelopodium (b) (5500X); achatada com extensões citoplasmáticas (c) (4500X). A maior parte das células do T36P (TiO<sub>2</sub> – anatásio) estava achatada e espraiada (f), enquanto nos grupos T03P (TiO<sub>2</sub>- rutilo) em (d) e a fase TiO<sub>2</sub> amorfa denominado grupo T12P (e) estavam hemisferoidais e achatadas com um lamelopodium. O número e a área aferida

de células estão esquematizados nas figuras (g) e (h), respectivamente (extraída e traduzida de [51]).	34
Figura 2.14: Comportamentos celulares de (a) adesão e (b) proliferação frente às diferentes superfícies submetidas aos processos de lixamento com diferentes granulometrias de abrasivos (meshs #: 180, 600 e 1200). O controle refere-se ao cultivo diretamente sobre a superfície do recipiente plástico utilizado para armazenar o meio (extraída de [61]).	36
Figura 2.15: Adesão da proteína albumina sérica bovina (concentração na no eixo da ordenada) nas superfícies de Ti-6Al-4V lixadas em papéis impregnados com SiC # 1200 e 180 (extraída de [61]).	37
Figura 2.16: Imagens comparativas por MEV retroespalhados de células osteoblásticas crescendo em (a) Ti polido; (b) nanotubos de TiO <sub>2</sub> amorfo e (c) nanotubos de TiO <sub>2</sub> anatásio. Todas as imagens foram realizadas após 48 horas de incubação.	41
Figura 2.17: Esquema do mecanismo dividido em três etapas de amplificação que ocorrido durante o ensaio com RT-PCR [extraída e traduzida de [81]].	44
Figura 2.18: Figura esquemática do RNA na expressão gênica e produção de proteínas, o dogma central da biologia celular, modificada de [85].	46
Figura 3.1: Fluxograma da etapa experimental.	49
Figura 3.2: Gota de água deionizada sobre a superfície da amostra 5A. O ângulo medido refere-se à média dos ângulos $\Theta_1$ (à esquerda) e $\Theta_2$ (à direita) da gota, respectivamente.	54
Figura 4.1: Imagens da surface da amostra 1A de Ti-CP lixada, com dois aumentos no MEV: (a)1000x and (b)10000x (sentido horário).	60
Figura 4.2: Imagens da surface da amostra 2A (Ti-CP #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).	61
Figura 4.3: Imagens da surface da amostra 3A (TiCP#1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000, (d) 30000 vezes e (e) 30000 vezes com aumento da intensidade de contraste (sentido horário).	63

Figura 4.4: Imagens da surface da amostra 4A (TiCP#1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	63
Figura 4.5: Imagens da surface da amostra 5A (TiCP#1500+ H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes. (sentido horário). .....	64
Figura 4.6: Imagens da surface da amostra 1B (Ti6Al-4V #1500) em dois aumentos no MEV: (a) 1000 e (b) 10000 vezes (sentido horário). .....	66
Figura 4.7: Imagens da surface da amostra 2B (Ti6Al-4V #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	67
Figura 4.8: Imagens da surface da amostra 3B (Ti6Al-4V #1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	68
Figura 4.9: Imagens da superfície da amostra 4B (Ti6Al-4V #1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	69
Figura 4.10: Imagens da superfície da amostra 5B (Ti6Al-4V #1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH) com quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	69
Figura 4.10: Imagens da superfície da amostra 5B (Ti6Al-4V#1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH) com quatro aumentos no MEV: (a) 1000; (b) 5000; (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário) .....	70
Figura 4.11: Imagens da superfície da amostra 1C (Ti6Al-7Nb #1500) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	71
Figura 4.12: Imagens da surface da amostra 2C (Ti-6Al-7Nb #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário). .....	72
Figura 4.13: Imagens da surface da amostra 3C (Ti-6Al-7Nb #1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes e (e) ampliada do original (sentido horário). .....	73

Figura 4.14: Imagens da superfície da amostra 4C (Ti-6Al-7Nb #1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).....	74
Figura 4.15: Imagens da superfície da amostra 5C (Ti-6Al-7Nb #1500+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +NaOH) em cinco aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000, (d) 30000 e (e) 50000 vezes (modificada do original) (sentido horário).....	75
Figura 4.16: gráfico representando as medidas de rugosidade, R <sub>a</sub> e R <sub>z</sub> para as amostras de Ti-CP. ....	77
Figura 4.17: gráfico representando as medidas de rugosidade, R <sub>a</sub> e R <sub>z</sub> para as amostras de Ti-6Al-4V. ....	77
Figura 4.18: gráfico representando as medidas de rugosidade, R <sub>a</sub> e R <sub>z</sub> para as amostras de Ti-6Al-7Nb. ....	787
Figura 4.19: Porcentagem de aumento das áreas de todos os materiais e todos os tratamentos de 1 a 5 descritos na Tabela 3.1. ....	80
Figura 4.20: Composição química via EDS nas amostras (a – d) 2A, 3A, 4A, 5A, respectivamente.....	82
Figura 4.21: Composição química via EDS nas amostras (a – d) 2B, 3B, 4B, 5B, respectivamente.....	82
Figura 4.22: Composições químicas via EDS nas amostras (a-d) 2C, 3C, 4C, 5C, respectivamente. ....	83
Figura 4.23: Gota de água deionizada sobre a superfície da amostra 2A e 5C nos ensaios de molhabilidade para determinar o ângulo de contato médio.....	84
Figura 4.24: O ângulo médio observa-se o formato da gota de água (miliQ) com aproximadamente 4,0 µL sobre as superfícies com diferentes tratamentos químicos. As medidas foram realizadas com auxílio do software (KSV Contact Angle Measurement System). ....	84
Figura 4.25: Esquema de gotas sobre superfície com texturas. Comportamento no caso do (a) modelo de Wenzel (b) e (c) modelo de Cassie-Baxter [105]. ....	85
Figura 4.26: Ângulos de contato de todas as amostras testadas.....	86

Figura 4.27: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-CP grau II com diferentes modificações superficiais (2A, 3A, 4A, 5A) após sete dias.....	88
Figura 4.28: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-CP grau II com diferentes modificações superficiais (2A, 3A, 4A, 5A) após quinze dias.....	89
Figura 4.29: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-CP grau II com diferentes modificações superficiais (2B, 3B, 4B, 5B) após sete dias.....	91
Figura 4.30: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-6Al-4V-ELI com diferentes modificações superficiais (2B, 3B, 4B, 5B) após sete dias.....	92
Figura 4.31: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-6Al-7Nb com diferentes modificações superficiais (2C, 3C, 4C, 5C) após sete dias.....	94
Figura 4.32: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura <i>in vitro</i> sobre discos de Ti-6Al-7Nb com diferentes modificações superficiais (2C, 3C, 4C, 5C) após quinze dias.....	95
Figura 4.33: Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) dos processos que antecedem o fenômeno de osseointegração.....	97
Figura B.1: esquema de representação da linha média (extraído de [116]). ..	115
Figura B.2: Percurso de apalpamento para a medição de rugosidade (extraído de [116]). ..	116
Figura B.3: Perfil de rugosidade média, Ra (extraído de [116]).....	116
Figura B.4: Esquema dos parâmetros de cálculo de $R_z$ e $R_{máx}$ (extraído de [116]) .....	116



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Modificações superficiais e propriedades superficiais do titânio (extraída e modificada [21]).....	14
Tabela 2.2: Métodos para obter nano características em implantes de titânio (extraído e traduzido de [17,21,22]). .....	16
Tabela 2.3: Resultados da deconvolução dos spectra Ti2p, C1s e O1s em análise por XPS: relativo às áreas dos picos dos componentes. ....	40
Tabela 3.1: Descrição dos parâmetros utilizadas nas modificações das superfícies.....	50
Tabela 4.1: Resumo das características para as amostras de Ti-CP. ....	65
Tabela 4.2: Resumo das características para as amostras de Ti-6Al-4V.....	70
Tabela 4.3: Resumo das características para as amostras de Ti-6Al-7Nb. ....	76
Tabela 4.4: Áreas da superfície e a porcentagem de aumento com relação a área geométrica do plano, medidas com microscópio confocal a laser para todas amostras do estudo.....	79



## 1. INTRODUÇÃO: CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

Os biomateriais podem ser definidos como materiais, sintéticos ou naturais, utilizados como componentes em aplicações médicas e que interagem com os sistemas biológicos (Willians, 1987 apud [1]). Dentre os biomateriais existentes, os implantes são aqueles que devem atender determinados requisitos para serem aplicados no interior do corpo humano após intervenção cirúrgica. Especificamente, os implantes intraósseos devem possuir características que promovam a fixação assintomática dos materiais no interior de tecidos ósseos.

De forma geral, os materiais sintéticos utilizados para produzir biomateriais são: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Alguns componentes podem ser montados empregando-se dois ou mais tipos de materiais, é o caso, por exemplo, de alguns projetos de prótese de quadril na qual todos os tipos de materiais mencionados podem ser utilizados.

Quanto aos materiais metálicos, aqueles classificados como refratários são os que induzem respostas não inflamatórias e reduzidas espessuras de tecidos fibrosos, permitindo assim maior fixação biológica e biocompatibilidade. Fazem parte desses metais: titânio (Ti), nióbio (Nb), háfnio (Hf), tântalo (Ta) e rênio (Re). Em comum todos eles apresentam excelente resistência à corrosão, fato que pode ser explicado pelo mecanismo e a velocidade com que auto-reparam suas camadas passivas após algum dano [2].

O titânio e algumas de suas ligas permanecem amplamente utilizados em aplicações médicas devido as suas propriedades de resistência à corrosão, alta resistência mecânica, baixa densidade e reduzido módulo de elasticidade (ou de Young). Essas propriedades influenciam no desempenho do implante e na constituição da interface implante/osso, importante para a garantia da biocompatibilidade de implantes intraósseos.

O conceito de biocompatibilidade pode ser entendido como sendo a habilidade de um material em uma função específica induzir uma resposta apropriada ao tecido hospedeiro (Willians, 1987 apud [1]). Quando o material

apresenta reações inadequadas ou adversas, a citotoxicidade pode ser apontada como a causa desta incompatibilidade e é frequentemente dependente da tendência de ionização dos metais utilizados na liga. Desta forma o alumínio (Al) e o vanádio (V), presentes em algumas ligas de titânio, podem ser dissolvidos no interior do corpo humano e serem causadores de doenças e inflamações. Por esse motivo, é interessante evitar a exposição destes elementos imediatamente nas superfícies dos biomateriais ou buscar alternativas de materiais livres de elementos citotóxicos.

A utilização de materiais adequados e tratamentos de superfícies apropriados podem tornar os materiais metálicos bioativos e com isso acelerar o processo de osseointegração, culminando em um período pós-operatório reduzido ao paciente, que pode ser traduzido em incontáveis benefícios.

Frente a este desafio, o desenvolvimento de superfícies que acelerem o processo de osseointegração dos biomateriais intraósseos é um desafio atual em vários campos de pesquisa, tais como, ciência dos materiais, engenharia, odontologia, medicina, física, química e biologia, como podem ser observadas as porcentagens distribuídas de publicações para diversas áreas de pesquisa, Figura 1.1, após consulta realizada com auxílio de um sítio da internet, *Web of Science*, na qual englobou os seguintes termos no campo tópico: Topic=(surface and biomaterial\* and osseointegration). Foram retornadas 251 publicações quando a consulta foi efetuada, janeiro de 2013 [3]. A Figura 1.2 apresenta a quantidade de artigos científicos publicados nos últimos quinze anos sobre o mesmo tema da Figura 1.1. Nota-se que a partir do ano 2000 o número de publicações cresceu vertiginosamente.

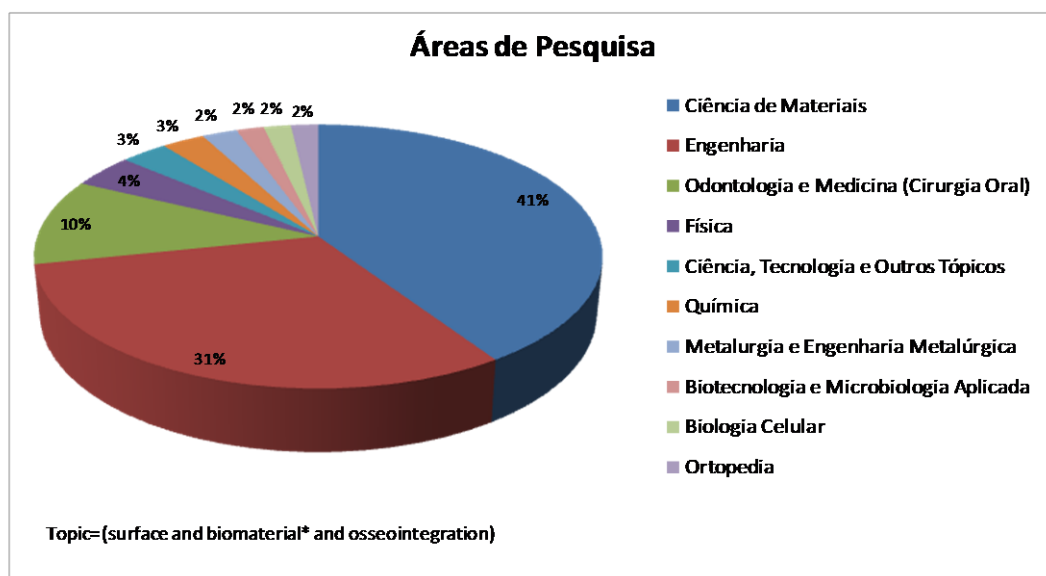


Figura 1.1 : Distribuição em porcentagem das publicações por áreas de pesquisa de acordo com as palavras pesquisadas.

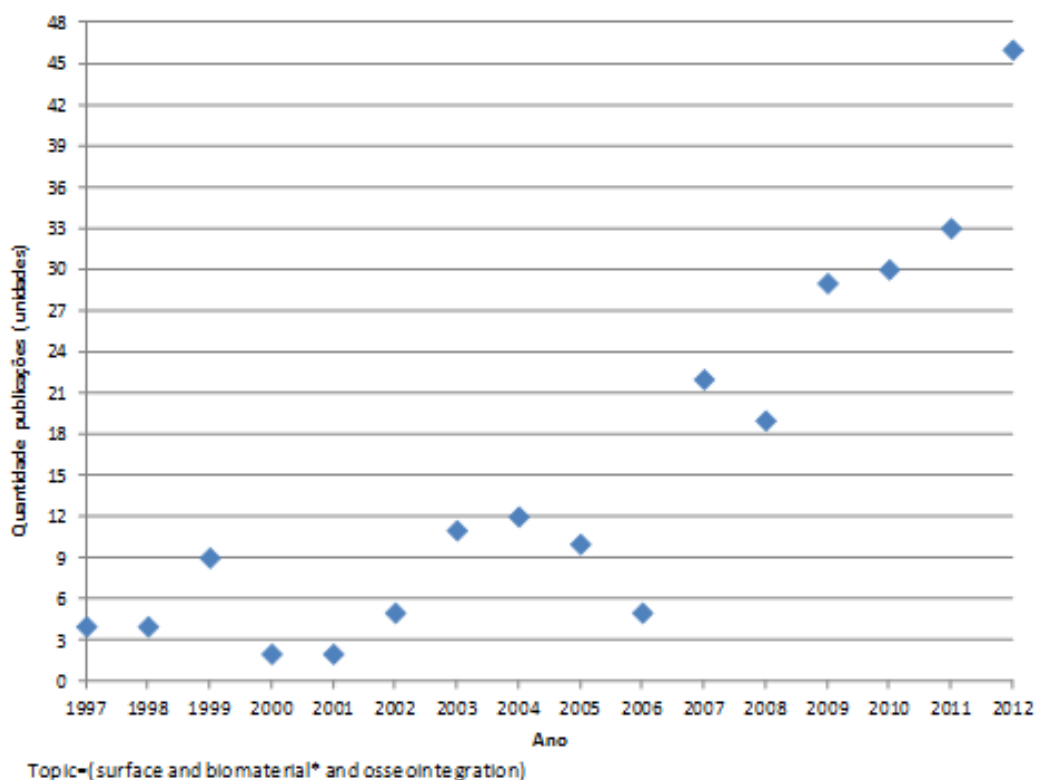


Figura 1.2: Quantidade de publicações por ano disponíveis no sítio de consulta *Web of Science* com as seguintes palavras: *surface and biomaterial\* and osseointegration*.

O crescimento observado na última década, de acordo com a Figura 1.2, pode ser explicado pela prioridade que alguns países vêm demonstrando para o campo de pesquisa voltado aos biomateriais, que compreendem, em geral, produtos com alto valor agregado e de alta tecnologia com grande arcabouço científico.

Desta maneira, a busca por tecnologias que possa combinar propriedades na busca de aperfeiçoar os projetos de implantes faz parte do foco de grupos de pesquisa pelo mundo, inclusive no Brasil, país que ocupa a quinta posição em número de publicações, utilizando os termos de pesquisa, já citados acima, Figura 1.3.

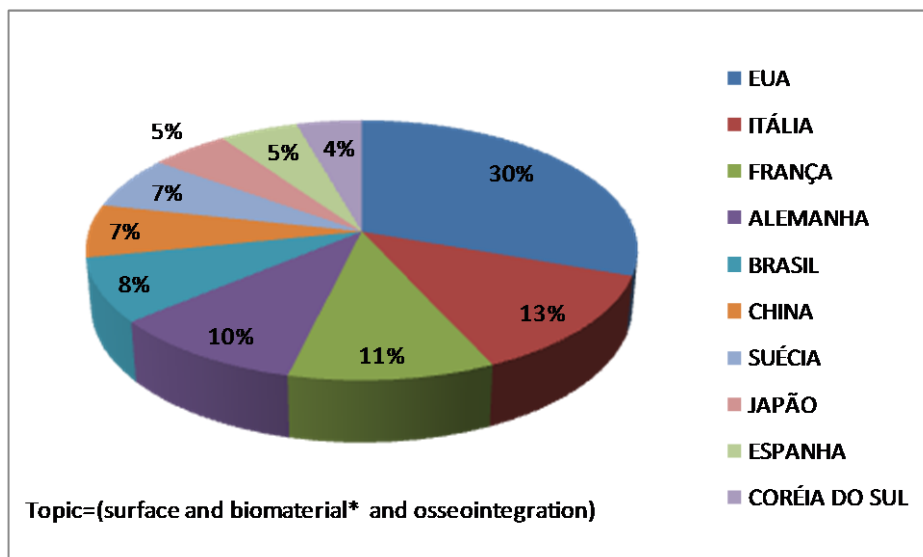


Figura 1.3: Distribuição de publicações por países. Constam 10 dos principais países em quantidade de publicações com os termos pesquisados.

A notoriedade da posição ocupada pelo Brasil com relação ao número de publicações provém da prioridade a que se atribui este campo de pesquisa pelo governo brasileiro para, provavelmente, possibilitar inovação ou nacionalização dos produtos neste setor.

Partindo para uma visão microscópica e nanométrica, verifica-se que os desenvolvimentos de superfícies de implantes intraósseos estão centrados na obtenção de superfícies que controlem as respostas biológicas [4–6]. Assim, quando a busca realizada no sítio *Web of Science* passa a conter os seguintes termos: Topic=(surface and biomaterial\* and osseointegration and micro\*) são

retornadas 122 publicações, sendo a mais antiga do ano de 1998 e em 2012 foram publicados um total de 26 com esses termos. Trocando o termo *micro* por *nano* da pesquisa, ou seja, Topic=(surface and biomaterial\* and osseointegration and nano\*), a publicação retornada mais antiga é do ano de 2008 e o total do número de publicações até janeiro de 2013 é de 66, o que comprova ser um tema que desperta interesse atualmente.

Essa análise permite concluir que os materiais que possuem características contendo nanoestruturas, nanotopografias, nanoporos, nanotubos, nanoesferas, vêm sendo focados no campo de pesquisa relacionado a **superfícies de materiais** que visam à osseointegração de implantes [3]. Esse fato decorre das respostas biológicas frente a superfície por meio tanto de ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Com relação aos ensaios *in vitro*, há estudos que se utilizam de células osteoblásticas (de ratos ou de humanos) e de células estaminais mesenquimais (células pluripotentes que podem se diferenciar em várias linhagens celulares, inclusive em osteoblastos) para avaliarem as respostas biológicas frente aos materiais. O que se tem observado é que as superfícies de materiais que contem características na escala de nanômetros, nanotopografias ou nanotexturas, favorecem respostas celulares e melhoram a osseointegração de implantes, fato que pode ser observado em estudos que se utilizam de testes *in vivo* com ratos, cachorros ou coelhos [7–12].

A maioria dos estudos focados em tratamentos de superfície de implantes concentra-se na utilização de titânio comercialmente puro (Ti-CP) como material para aplicação em implantes dentários. O interesse do presente estudo, no entanto, é o de focar nas ligas de titânio utilizadas para aplicação em implantes com carregamento elevado durante solicitações mecânicas (implante femoral, por exemplo). Neste caso, os tratamentos podem induzir a formação de óxidos outros que não o de titânio, acrescentando problemas tais como:

1. Aumento da citotoxicidade provocado pela presença de elementos indesejados na superfície, por exemplo, alumínio e vanádio;

2. Menor osseointegração decorrente do decréscimo da fixação biológica e da biocompatibilidade.

Ademais, o escopo das modificações ou tratamentos das superfícies dos implantes é justamente aprimorar as propriedades de superfície dos materiais para favorecer e catalisar o processo de fixação biológica do implante ao osso.

Neste trabalho, a estratégia consiste em desenvolver métodos de modificação de superfície de baixo custo tendo em vista o cenário brasileiro de recursos escassos para aplicação em Saúde. Com este propósito foram realizadas modificações de superfície com tratamentos químicos que pudessem provocar alterações das propriedades da superfície, mais especificamente de topografia, rugosidade, ângulo de contato (molhabilidade) e área efetiva para em seguida avaliar os efeitos destas propriedades sobre as respostas biológicas (expressões gênicas de proteínas relacionadas ao osso) em especial do comportamento dos osteoblastos humanos sobre amostras de Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb modificadas por meio de ataques ácidos, combinados ou não com tratamento alcalino.

O objetivo, portanto, é de avaliar as influências e correlações entre as variações de topografia, ângulo de contato, área efetiva da superfície, rugosidade e composição com relação às expressões gênicas dos osteoblastos humanos de genes específicos aos fenômenos de osteocondução, importante propriedade para a fixação biológica e integração do implante aos tecidos ósseos [13,14].



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como se trata de um assunto multidisciplinar, o Apêndice A poderá ser consultado para encontrar as definições de léxicos frequentemente utilizados neste texto, mas que não são comumente encontrados em trabalhos que envolvem ciência e engenharia de materiais.

### 2.1 Biomateriais

Geralmente os requisitos para que um biomaterial torne-se um produto podem ser agrupados em quatro categorias [15]:

**Biocompatibilidade:** habilidade de o material induzir uma resposta adequada ao tecido no qual está inserido, ou seja, tecido hospedeiro.

**Esterilizabilidade:** o material deve estar apto a receber os diversos processos de esterilização, tais como: radiação, gás ou aquecimento em autoclave.

**Funcionabilidade:** este requisito depende da habilidade com que o material possa ser conformado para atender uma função particular, incluindo nesta categoria a viabilidade econômica utilizando processos de fabricação de engenharia.

**Manufaturabilidade:** é frequente apontar materiais candidatos a biocompatíveis, porém a dificuldade em processá-los pode ser um entrave na produção do componente para a área médica.

É comum classificar os materiais implantáveis de acordo com as interações entre o implante e o tecido ósseo [16]:

**Materiais Biotolerantes:** apresentam a formação de tecido conectivo com espessura entre  $0,1\mu\text{m}$  e  $10\mu\text{m}$  que não adere à sua superfície podendo conduzir a falha prematura do implante.

**Materiais Bioativos:** formação de tecido ósseo ao redor do implante fortemente integrado ao osso. Nessa classe há uma maior tendência de sucesso de implantação.

**Materiais Biorreabsorvíveis:** ocorre a substituição do material implantado por osso autólogo.

De uma maneira geral, os implantes a base de Ti podem ser classificados como biotolerantes ou bioinertes; no entanto, os processos de modificação da superfície primam em promover a formação de uma superfície bioativa e promover a formação do tecido ósseo na superfície do implante. Do ponto de vista biológico, os materiais podem receber as seguintes classificações atreladas às respostas das células relacionadas à osteogênese (formação de osso) [13]:

**Osteoindução:** processo pela qual a osteogênese é induzida a partir de células pluripotentes e indiferenciadas que de alguma maneira são estimuladas a desenvolver-se em uma linhagem de células formadoras de osso, preosteoblastos, por exemplo.

**Osteocondução:** refere-se ao processo pelo qual o osso é conduzido e cresce mediante a superfície e no interior de suas irregularidades.

De forma geral, o que se busca em implantes intraósseos, a partir de materiais biocompatíveis, é a modificação da sua superfície de tal maneira a torná-la bioativa, controlando a osteocondução e por fim a osseointegração do componente. Sendo o termo osseointegração definido a seguir:

**Osseointegração** foi preconizado por Branemark em 1977 como sendo um conceito histológico ocasionado pelo contato direto entre osso/implante ao nível de resolução da luz do microscópio óptico [17]. Posteriormente, o conceito foi aprimorado por Zarb e Albrektsson (1991) chegando a uma definição clinicamente aplicável, como um processo no qual é obtida e mantida a fixação assintomática e rígida dos materiais aloplásticos durante as cargas funcionais [18]. Na prática trata-se da existência de um

ancoramento que evita a movimentação progressiva entre o osso e o componente implantado [19].

## 2.2 Superfície do metal

Quando um material é implantado no interior do corpo humano, instantaneamente ocorrem reações entre a superfície do biomaterial e os fluidos intracorpóreos. Essas interações imediatas são fundamentais para a biocompatibilidade da superfície do implante.

Neste ponto, é importante entender o conceito de **superfície** de forma geral, uma vez que o enfoque conceitual pode variar conforme a área de interesse.

Os átomos na superfície dos materiais metálicos são considerados parcialmente reativos, devido às configurações eletrônicas nas superfícies serem diferentes das do volume do material. Portanto, a superfície possui propriedades diferenciadas. Esta característica culmina no aumento da energia livre superficial de *Gibbs* e por esse motivo o metal pode, por exemplo, se ligar espontaneamente ao oxigênio atmosférico formando a denominada **camada passiva**.

A formação da camada passiva ao redor da superfície dos materiais metálicos ocorre inicialmente a uma taxa extremamente rápida até atingir espessura por volta de 2 a 3 nm com estrutura do óxido amorfa. Em seguida o aumento da espessura do filme formado ocorre de forma mais lenta chegando a 5 nm após uma semana do polimento da superfície de titânio comercialmente puro (Ti-CP), por exemplo. Deste modo, por ser constituída rapidamente, a superfície tende a não possuir contornos de grãos e defeitos estruturais, o que pode culminar na elevada resistência à corrosão do metal [20].

Titânio comercialmente puro e ligas de titânio são recobertos espontaneamente pelos seus filmes passivos, que se auto-reparam quando são rompidos por algum motivo.

Quando amostra de titânio comercialmente puro é polido em água deionizada e a sua superfície é analisada por *espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X* (XPS) o que se observa é a decomposição do espectro de Ti 2p em quatro picos referentes às valências:  $Ti^0$ ,  $Ti^{2+}$ ,  $Ti^{3+}$  e  $Ti^{4+}$ . Desta maneira, o filme da superfície formado nestas condições consiste de óxido de titânio amorfo ou com baixa cristalinidade, possuindo o metal quatro estados de oxidação, como pode ser observado na Figura 2.1[20].

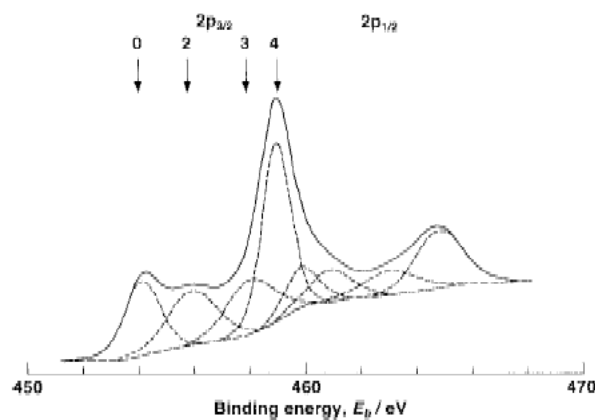


Figura 2.1: Decomposição em oito picos (elétrons  $2p_{3/2}$  e  $2p_{1/2}$  em quatro valências) do espectro de Ti 2p, obtido a partir de uma amostra de titânio lixada e imersa por 300s em água. Os números com as setas representam as valências encontradas na análise (extraída de [20]).

Na Figura 2.2, temos a comparação de resultados de análises obtidas por XPS de uma amostra de titânio polida, lavada sucessivamente com tolueno e água destilada, secada ao ar (Figura 2.2 A) e de outra submetida a um processo de reoxidação a partir de um ataque químico com  $H_2SO_4 + H_2O_2$  (1:1) por 2 horas (Figura 2.2 B). Nesta análise, pode-se observar que o óxido formado após o ataque químico tem maior tendência a ser estequiométrico, com fórmula  $TiO_2$ , comparado ao da amostra sem tratamento superficial [21].

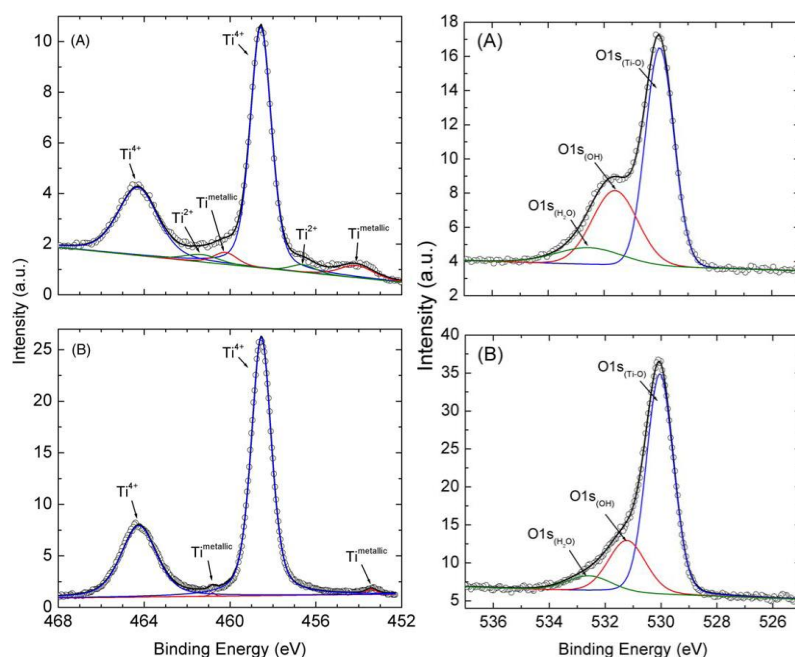


Figura 2.2: Espectro de XPS do nível Ti2p (à esquerda) e O1s (à direita) em superfície de Ti: (A) sem tratamento (controle) e (B) superfície tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (extraída de [21])

As superfícies de titânio modificadas com ácido sulfúrico apresentam maiores tendências a sofrerem incorporações de enxofre quanto maior a concentração do ácido utilizado. No entanto, a contaminação com cloretos tende a manter-se sempre baixa quando se utiliza ácido clorídrico para esse fim, mesmo com aumento da concentração de cloretos na solução, sendo apontado como excelente descontaminante [22].

Com relação à liga Ti-6Al-4V a formação da camada passiva na superfície contem traços de óxido de alumínio, e em menor quantidade o elemento vanádio. Esses elementos devem ser evitados já que apresentam citotoxicidade [15].

Quando a superfície de uma amostra de titânio que passou por um processo de lixamento para remover a camada passiva de óxido é imediatamente imersa durante 300 segundos em solução de Hank (pH 7,4) para checar concentrações dos íons [20], o que ocorre é a adsorção de íons fosfato e de íons cálcio proveniente da solução em decorrência da repassivação, conforme Figura 2.3, na qual apesar da predominância de titânio

e oxigênio constata-se a existência dos íons na região em destaque da Figura 2.3 [20].

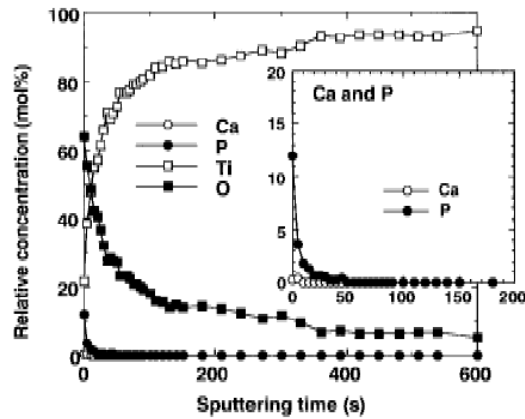


Figura 2.3: Perfil de análise via AES das concentrações relativas de elementos presentes na superfície do titânio lixado e imerso 300s em solução de Hank (pH 7,4) (extraída de [20]).

Quando algum componente composto por titânio que foi implantado em corpo humano é submetido a uma análise via *espectroscopia por elétrons Auger* (AES) a superfície pode revelar constituintes de cálcio, fósforo e enxofre [15].

A Figura 2.4 ilustra esquematicamente em forma ampliada as regiões formadas na interface titânio/osso. No esquema a partir do lado esquerdo da figura em direção ao lado direito encontram-se destacadas cinco regiões distintas. A primeira refere-se ao titânio metálico (região 1) recoberto por uma camada de óxido ( $\text{TiO}_2$ ) formando a região 2. Esta, por sua vez, após interação com grupos hidroxila da água, por exemplo, forma um material com consistência de um gel na superfície (região 3). Neste estágio, as proteínas presente nos fluidos corpóreos aderem-se à camada de Ti-Gel (região 4) e o processo prossegue pela adesão das células osteoblásticas (região 5) rumo à formação óssea e à osseointegração.

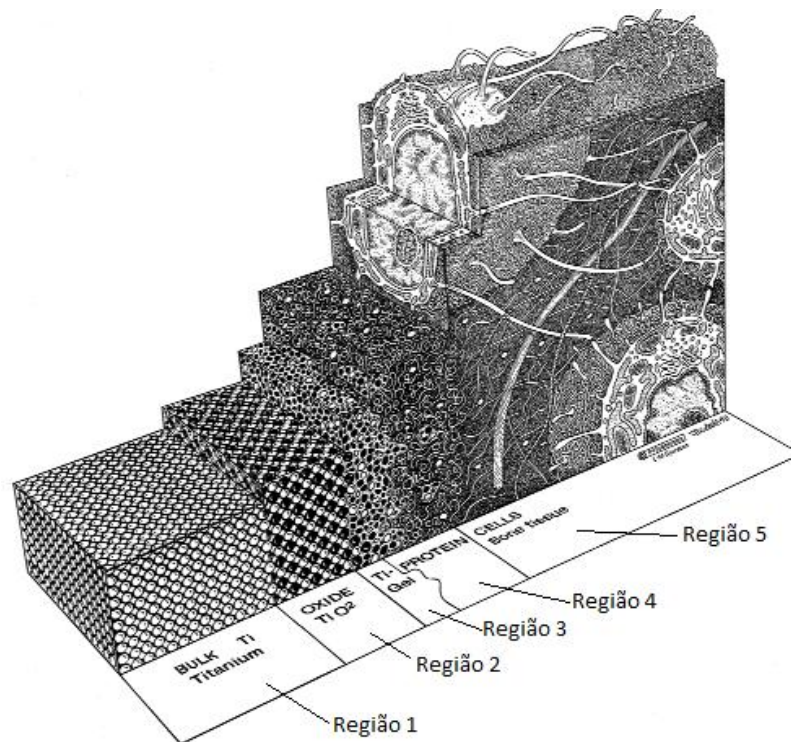


Figura 2.4: Uma visão artística da interface titânio/osso dividida em cinco regiões. O óxido de titânio é coberto com uma camada extremamente fina de peróxido de titânio, que está em contato com o osso em recuperação (extraída e modificada de [19]).

### 2.3 Modificação da superfície visando a osseointegração

A modificação da superfície de implantes intraósseos tem o propósito de estimular o processo de osseointegração, ou seja, provocar uma melhor e mais espontânea adesão do osso traumatizado ao metal. Desta forma, criar uma superfície que favoreça a constituição da interface implante/osso é muito útil para a área dos biomateriais.

Podemos listar quatro fatores relacionados aos materiais que regulam as características da interface implante/osso, são eles [16]:

- Energia da superfície;
- Composição da superfície;

- Rugosidade da superfície;
- Topografia da superfície.

A energia da superfície do material é influenciada por alterações entre composição, rugosidade e topografia que podem ser combinadas de forma a promover diferentes respostas celulares frente às diferentes superfícies, sendo um método eficiente para estudar os mecanismos que antecedem a osseointegração [23]. Os efeitos desses fatores sobre as respostas biológicas estão explicados na Seção 2.5.

Muitos métodos de processamento vêm sendo testados com intuito de manipular esses fatores para que se obtenha biomateriais com superfícies que favoreçam a osseointegração [8,9,11,12,21,24–26]. Na tabela 2.1 encontram-se listados métodos de modificações separados em duas categorias: manipulação física ou manipulação química [23].

Tabela 2.1: Modificações e propriedades de superfícies para titânio liga (extraída e modificada [23]).

<b><i>Modificação</i></b>	<b><i>Composição</i></b>	<b><i>Topografia</i></b>
<b><i>Manipulação Física</i></b>		
<b>1. <u>Processamento mecânico</u></b>		
<b>Usinagem</b>	TiO <sub>2</sub> com contaminantes (C, H, Si, entre outros)	Linhas paralelas com rugosidade, protruções, rugosidade (Ra) entre 0,3 e 0,6 µm.
<b>Polimento</b>		
<b>Meios de polimento: SiC, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Diamante.</b>	TiO <sub>2</sub> contendo C, N, O, H, Si, Al	Superfície lisa com rugosidade Ra igual ou menor que 0,1.
<b>Jateamento: SiC, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> entre outros.</b>	TiO <sub>2</sub> , HA contendo partículas cerâmicas	Depressões (e gouges) produzidos por deformação plástica e



---

desbastes com Ra entre 0,5 e 6  $\mu\text{m}$ .

## **2. Tratamentos com plasma**

<b>Implantação iônica: N, O, Ca e P</b>	TiN ou $\text{TiN}_x$ com Ca e/ou P	Nenhuma alteração expressiva de topografia
<b>Limpeza com plasma: Ar, O</b>	$\text{TiO}_2$ com contaminantes inorgânicos ou $\text{TiO}_2$ estequiométrico	
<b>Plasma spraying</b>	Recobrimento de fosfatos de cálcio	Superfície porosa
<b>Plasma sputtering</b>	Filmes finos de fosfato de cálcio	Superfícies lisas

## **3. Tratamentos com Laser**

<b>Laser cladding (recobrimento)</b>	Recobrimento com fosfatos de cálcio	
<b>Deposição a laser pulsado</b>	Filmes de fosfato de cálcio	Micro e macro partículas esferoidais

## **4. Outros métodos**

<b>Ion sputtering</b>	Filmes finos de fosfato de cálcio	
<b>Magnetron sputtering</b>	Filmes finos de fosfato de cálcio	
<b>Oxidação térmica</b>	$\text{TiO}_2$	Nenhuma influência na topografia

### ***Manipulações***

#### ***Químicas***

<b>Ataque ácido</b>	Óxido de titânio com elementos residuais	Pits semelhantes a <i>dimples</i>
<b>Tratamento químico</b>	Grupos Ti-OH e	Camada microporosa

---

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CaP</b>	Camada CaP	
<b>Tratamento alcalino e térmico</b>	Grupo Ti-OH	
<b>Oxidação anódica</b>	TiO <sub>2</sub> com S, P, ou Ca/P	Superfície lisa ou porosa
<b>Tratamento hidrotérmico</b>	Fosfato de cálcio	Agulhas na superfície
<b>Deposição eletroquímica</b>	Fosfato de cálcio	Superfícies lisas
<b>Processamento biomimético</b>	Fosfato de cálcio	Superfície com estrutura em forma de flocos

Atualmente, há consenso sobre a importância de alterações superficiais na escala de dimensão de nanômetros com intuito de obter padrões de topografias superficiais; estas nanotopografias, nanotexturas, nanopadrões ou nanoarquiteturas aparentam influenciar significativamente nos processos celulares, tais como, adesão, espraiamento, mas principalmente proliferação e diferenciação celulares. Estas modificações podem ser uma forma de “guiar” as células no sentido de uma regeneração óssea e formar superfícies “inteligentes” aos implantes [11].

Objetos de pesquisas atuais vêm sendo o desenvolvimento de superfícies com óxidos organizados como a formação de nanotubos de óxido de titânio sobre as superfícies das diferentes ligas [27]. A aplicação de laser também tem recebido atenção especialmente por ser um processo que modica a topografia da superfície do material sem adição de material ou impurezas [28].

Na tabela 2.2, estão listados alguns processos disponíveis para modificações superficiais nesta escala de análise – a nanométrica [11]:

Tabela 2.2: Métodos para modificar em escala nanométrica a superfície de implantes de titânio (extraído e traduzido de [22–24]).

<b>Métodos</b>	<b>Características</b>
<i>Automontagem de monocamada</i>	O grupo funcional final pode ser uma

---

<i>(Self-assembly of monolayers)</i>	molécula com diferentes funções (osteointutiva ou molécula aderente à célula, por exemplo).
<i>Métodos físicos</i>	
Compactação de nanopartículas	Conserva a química sobre diferentes topografias. Ainda não aplicadas à implantes.
Implantação iônica (Ion beam deposition)	Produz nano características conforme o material utilizado.
<i>Métodos químicos</i>	
Ataque ácido	Combinado com outros métodos (jateamento de areia e ou peroxidação) pode induzir a formação de nano características sobre as superfícies e remover contaminantes.
Peroxidação	Produz uma camada de titânia gel. São produzidas alterações químicas e topográficas.
Tratamento alcalino (NaOH)	Produz uma camada de titanato de sódio gel que permite a deposição de hidroxiapatitas. São produzidas alterações químicas e topográficas
Anodização	Pode produzir nano características à superfície do material criando uma nova camada de óxido (baseado no material utilizado).
<i>Deposição de nanopartículas</i>	
Sol-gel (adsorção de partícula coloidal)	Cria um filme fino com Caracterísitcas químicas controladas.
Deposição cristalina discreta (discrete crystalline desposition)	Produz uma complexidade de topografias em nanoescala sobre as superfícies.

---

---

Litografia e técnica de impressão por contato (contact printing technique)	Muitas formas e materiais diferentes podem ser aplicados sobre as superfícies. Os desenvolvimentos são laboriosos e intensivos requerendo desenvolvimento considerável prévio à transferência para clínicas e para aplicações em implantes.
--	---

---

Existe um consenso na pesquisa de que as propriedades bioquímicas das superfícies de titânio podem ser modificadas pela imobilização de moléculas bioativas (BAM, siglas em inglês), ou seja, determinadas moléculas tais como peptídeos e proteínas são intencionalmente ligadas ou imobilizadas na superfície do material anterior à implantação para exercer uma determinada função no tecido hospedeiro. Algumas moléculas devem ser imobilizadas irreversivelmente, é o caso de alguns peptídeos; outras moléculas devem ser imobilizadas na superfície de forma reversível, por exemplo, antibióticos ou fatores de crescimento que devem ser liberados com determinada concentração e determinado tempo.

Na sequência temos as características de processos para modificação de superfície para implantes que se utilizam de métodos de imobilização, alguns em fase de pesquisa, mas que recebem atenção por potencialmente possuírem características que possam conduzir a osteocondução de forma controlada e melhorar o processo de osseointegração [29].

Abaixo estão listados processos não convencionais que objetivam a nano-funcionalização de superfícies [29]:

- **Adsorção:** método mais simples de imobilização no qual moléculas são adsorvidas por meio de interações fracas (p.e. Forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio) após a imersão do implante em uma solução específica. A estabilidade das espécies adsorvidas; dependerá das variáveis: pH, força iônica e concentração de proteína.

- **Imobilização covalente:** consiste em ligação estável das moléculas às superfícies por meio de grupos hidroxilas previamente formados na superfície. No entanto, pode haver necessidade de utilização de soluções não fisiológicas (solventes) que precisam ser removidas após o fim da imobilização.

- **Monocamadas automontadas (*self-assembled monolayers*):** procedimento utilizado para fixar cadeias de moléculas sobre as superfícies. Baseia-se na interação de grupos de ancoramento da molécula e de sítios de interação na superfície, tais como, fosfatos e fosfonatos. Não há formação de ligação covalente, característica explorada para produzir materiais biofuncionais [30].

- **Métodos eletroquímicos (polarização catódica e anódica):** Na polarização catódica é possível a formação de compostos a base de fosfatos de cálcio (hidroxiapatitas, por exemplo) sobre a superfície, podendo co-depositar elementos químicos de interesse. A polarização anódica pode ser utilizada para a deposição de polímeros, tais como, o colágeno ou outras proteínas, sobre as superfícies de metais.

Além destes métodos, atualmente outros vêm sendo pesquisados para a aplicação na área de biomateriais; são procedimentos que buscam a biofuncionalização da superfície e são muito minuciosos para controlar regiões de interesse das células. Nesses casos, são utilizados, por exemplo, os ácidos nucleicos e DNA[29].

Em todos estes casos, as moléculas bioativas (BAM) devem formar domínios bioativos semelhantes a uma conformação nativa, uma forma de mimeses, para favorecer a adesão das células do tecido hospedeiro. As moléculas imobilizadas devem estar acessíveis às células, ou seja, requerem uma determinada distância da superfície. [29,31].

## 2.4 Modificações das superfícies

As modificações das superfícies dos materiais geralmente têm como objetivo adequar a superfície do componente para uma determinada aplicação. No caso dos biomateriais metálicos intraósseos a modificação nas superfícies é aplicada com intuito de promover uma melhor constituição da interface entre o implante e osso. Vários processos estão listados nas Tabelas 2.1 e 2.2; em seguida estão explicados os utilizados neste trabalho: ataque ácido e tratamento alcalino.

### 2.4.1 Tratamento Ácido

Ataques ácidos da superfície de implantes a base de titânio têm sido amplamente aplicada para alterar a rugosidade, composição da superfície e a molhabilidade/energia superficial, além de serem utilizados com intuito de “limpar” a superfície das etapas de processamento previamente executadas, usinagem, por exemplo [32].

São de particular interesse os ácidos: clorídrico, sulfúrico, fluorídrico e também as misturas entre eles, por favorecerem consideravelmente a osseointegração sem adição de material à superfície do implante, por exemplo, de hidroxiapatitas, de partículas do jateamento [33].

A imersão de titânio por alguns minutos em uma solução concentrada de HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ataque duplo ácido) acima de 100° C provoca micro rugosidade superficial conforme Figura 2.5.

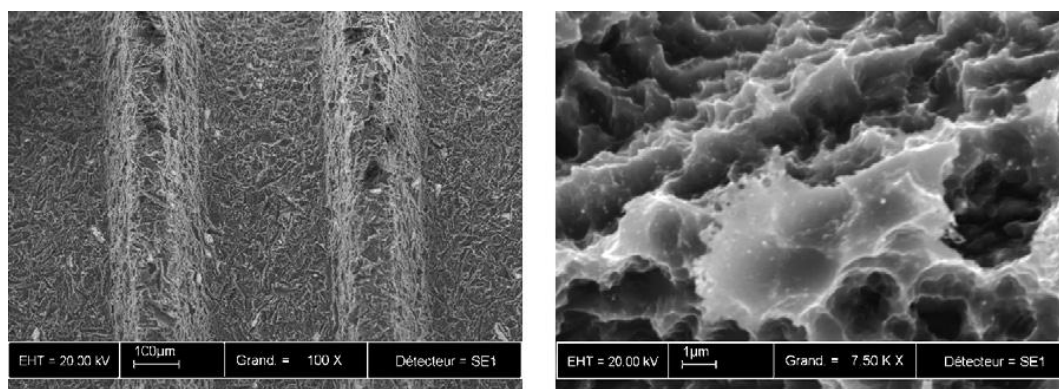


Figura 2.5: micrografias via MEV de uma superfície de um implante dental de titânio (Cortesia de Straumann AG, Suíça) [32] atacada por duplo ácido.

Métodos de ataques químicos têm sido avaliados quanto ao comportamento frente às células em ensaios *in vitro* na busca de compreender os fatores que regulam os processos de adesão, espreadimento, proliferação de células de várias linhagens e da diferenciação de células pluripotentes mesenquimais em osteoblastos bem como as expressões gênicas destas células em diferentes superfícies, ambas envolvidas no processo de osteogênese [2,8,21,34,35].

Na Figura 2.6, são observadas imagens das superfícies de implantes dentários de titânio nas seguintes condições: usinado (*a* e *c*) e atacado (*b* e *d*). O ataque químico consistiu na submersão do implante durante 4 horas em uma solução contendo volumes iguais (1:1) de  $H_2SO_4 + H_2O_2$  [36]. Nota-se que ocorreu a formação de uma topografia controlada micrometricamente provocada pela desoxidação e reoxidação da superfície do implante atacado. De acordo com os autores houve formação de micropits medindo entre  $5\mu m$  e  $20\mu m$  e, ao contrário do que era esperado, não houve a ocorrência de topografia na escala manométrica [36]. De qualquer maneira, os implantes foram testados para averiguar a porcentagem de contato osso-implante após três e oito semanas da implantação nas mandíbulas de cachorros. A eficiência da modificação de superfície foi comprovada por meio da porcentagem de contato implante/osso, durante a análise histológica na superfície dos implantes testados. Foi constatado que o ataque ácido promoveu maior osteogênese na

superfície dos implantes inseridos nas mandíbulas de cachorros, fato que sugere um aumento de bioatividade durante o remodelamento ósseo [36].

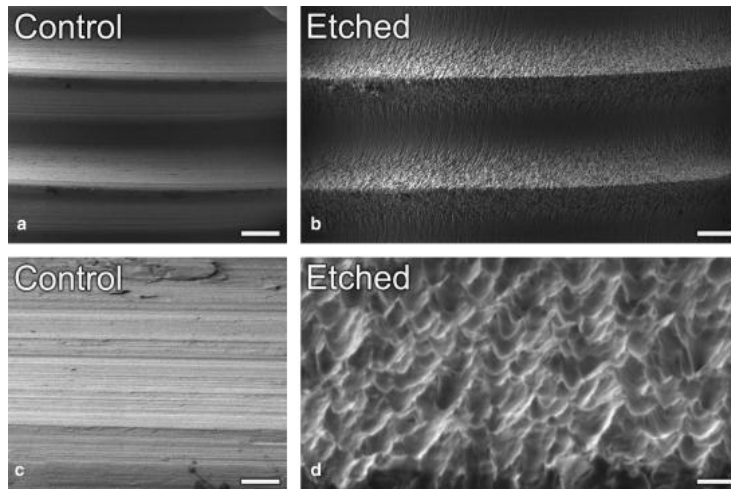


Figura 2.6: MEV das superfícies: controle (a,c) e atacadas com ácido (b,d). Barras de escala em a, b = 50  $\mu\text{m}$  e em c, d = 10  $\mu\text{m}$  (extraída de [36]).

Tambasco e Nanci, 2003, investigaram a formação de nanotopografia em amostras de Ti-CP e Ti-6Al-4V por meio de um método de desoxidação e reoxidação controlada após imersão dos materiais em uma solução com iguais quantidades de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrados e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% aquoso) durante 4 horas para o Ti-CP e 1 hora para o Ti-6Al-4V à temperatura ambiente. As imagens das morfologias das superfícies podem ser observadas com auxílio da Figura 2.7 (imagem C e G) [8]. Ainda na Figura 2.7 verifica-se que após 6 horas de cultura, pode ser detectado um crescimento de células semelhantes entre as superfícies usinadas (imagem B e F) e as tratadas com ácido (D e H)..



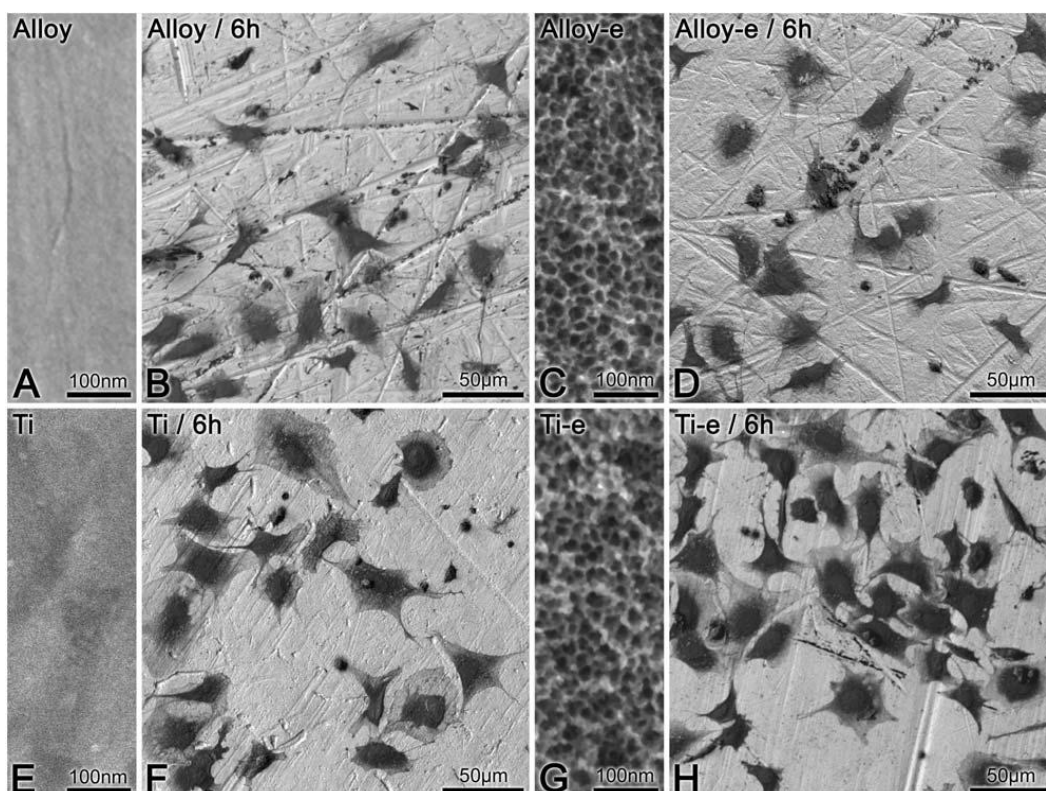


Figura 2.7: Micrografia eletrônica de varredura de células cultivadas em superfícies controle da liga Ti-6Al-4V (A) e do Ti-CP (E) que exibem superfície lisa, enquanto as atacadas: Ti-6Al-4V (C) e Ti-CP (G), são caracterizados por uma única nanotopografia. Em 6 horas, não foi detectado diferença significativa na forma das células aderidas à superfície controle (B and F) e nanotexturizada (D e H) (extraída de [8]).

No entanto, foi observado espreadimento mais pronunciado das células cultivadas sobre as superfícies contendo nanotexturas, conforme Figura 2.8, cujas imagens em grandes aumentos tornam possível observar o comportamento das regiões citoplasmáticas das células se espreado sobre as características de topografia da superfície nas escalas nanométricas [8].

Na imagem (F) da Figura 2.8 foram observados pits da ordem de 10 nm de diâmetro na superfície do metal, que atuaram como substrato no processo de aderência e crescimento das extremidades das células [8].

Observando-se a Figura 2.9, temos em (A), a amostra controle de Ti-CP. Em (B) temos a imagem de uma topografia nanométrica provocada pelo procedimento de reoxidação química controlada:  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$  (1:1) aquoso

por 2 horas. O gráfico da Figura 2.9 (C) refere-se à distribuição gaussiana dos diâmetros dos pits formados após o ataque químico, o diâmetro médio encontrado foi de  $22 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ . Adicionalmente, em D vemos a relação entre perímetro (P) e área (A) dos nanopits, observando-se a dimensão fractal encontrada de 1,17 [21].

A teoria dos fractais pode ser útil na descrição de superfícies ou topografias obtidas por modificação com tratamentos químicos, pois as topografias formadas tendem a se repetir conforme se amplia a imagem pelo microscópio. A estrutura fractal é definida como aquela que possui um padrão com *auto-similaridade* [37]. É possível com essa estrutura calcular a dimensão de fractal,  $D_f$ . Em geral, com o aumento de  $D_f$  a estrutura da superfície torna-se mais caótica. Além disso, a dimensão fractal das superfícies pode ser útil para explicar determinados comportamentos celulares [38].

A geometria dos fractais difere da geometria clássica ou Euclidiana no senso que os objetos analisados sob a ótica desta geometria apresentam dimensionalidade fracional, ou seja, o objeto deixa de possuir dimensões inteiras, tais como uma, duas ou três dimensões e passa a ter dimensão com valores intermediários entre 1 e 2 ou entre 2 e 3, por exemplo. Há extensa bibliografia disponível para se aprofundar sobre o tema, existe uma bibliografia

Em um estudo recente, foi avaliada a absorção de hidrogênio durante a modificação da superfície dos seguintes materiais: Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ni-Ti. Foram utilizados três tipos de ataques químicos nestes ensaios:  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  de HCl,  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de HCl +  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Verificou-se que todos os ataques químicos provocaram a absorção de hidrogênio na superfície até a condição de saturação que foi atribuída à formação de hidretos. A concentração de hidrogênio absorvida pôde ser estimada com auxílio de um ensaio de dessorção de hidrogênio. A quantidade de hidrogênio absorvida durante 60 min em ácido variou de 50 – 170 ppm em massa e teve a seguinte ordem decrescente de absorção de acordo com as soluções ácidas:  $\text{HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{HCl}$  [39].

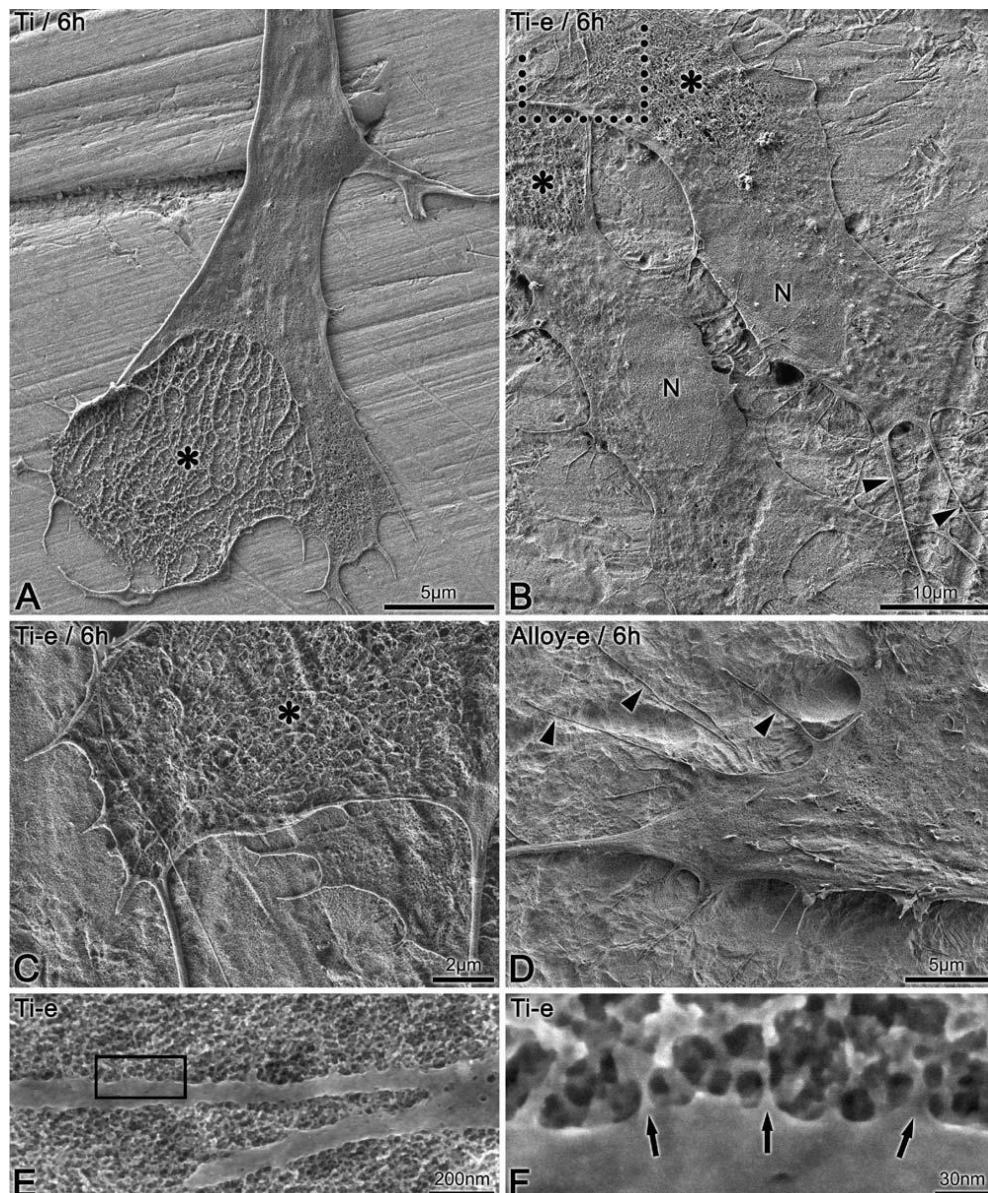


Figura 2.8: Micrografias por MEV de células em superfícies usinadas (A) e nanotexturizadas (B-F). Porções do citoplasma de algumas células exibem uma aparência reticulada (asteriscos em A-C). (C) maior aumento da região pontilhada destacada em (B). As células prolongam-se com filopodias sobre os metais, entretanto, esse comportamento foi mais evidente no Ti-liga nanotexturizado (pontas das setas em D) e no Ti-CP nanotexturizado (B-pontas das setas). Em (F), destacado a partir de (E) as extremidades das células (setas em F) tendem a seguir o caminho das paredes das nanocavitações (extraída e modificada de [8]).

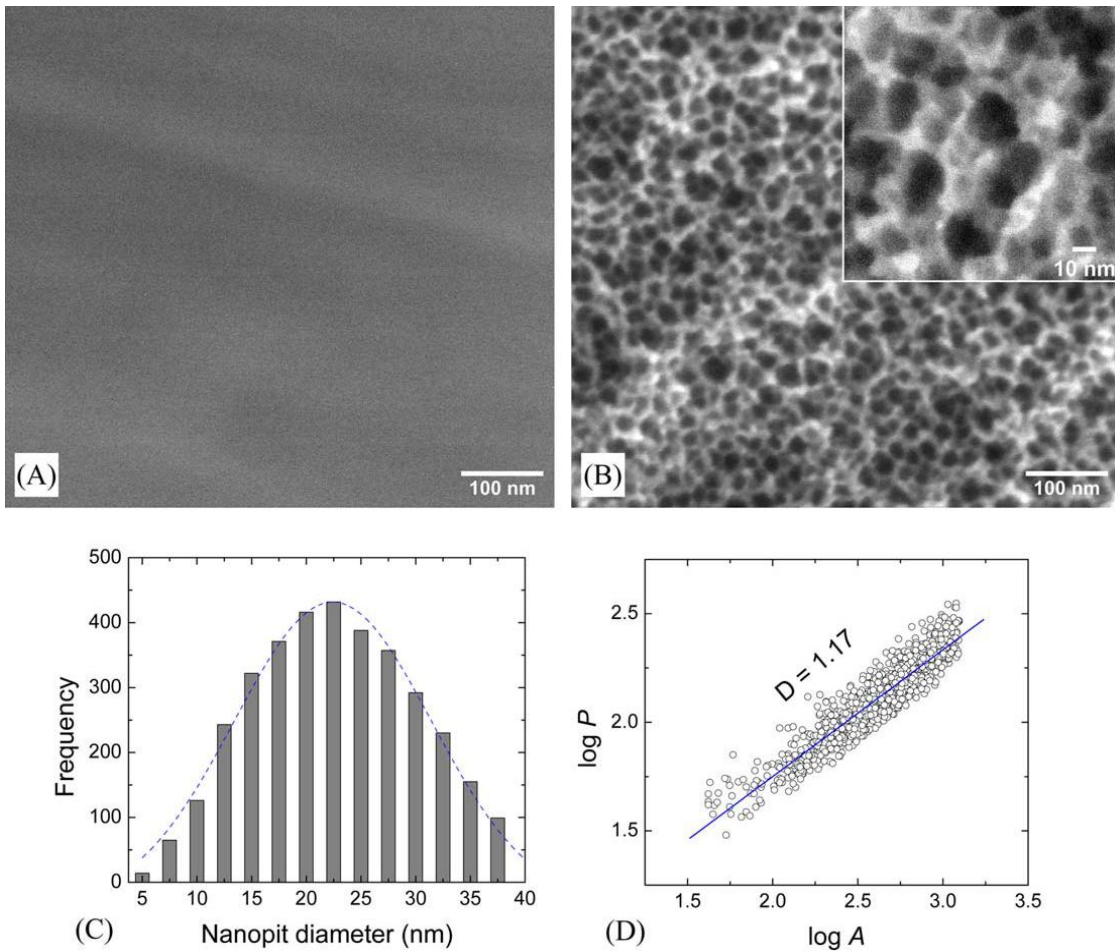


Figura 2.9: Micrografia por MEV de superfícies Ti-CP: controle (A) e tratada com ácido (B). Distribuição do tamanho de nanopits (C). Dimensão fractal dos nanopits da imagem B (extraída de [21]).

Com relação ao estudo da reação entre o titânio comercialmente puro e o ácido fosfórico, a termodinâmica comprova a viabilidade da formação de  $\text{TiO}_2$ , no entanto a formação de  $\text{TiO}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 = \text{Ti}(\text{OH})_2(\text{HPO}_4)$  possui energia livre de Gibbs a temperatura ambiente igual a  $-225.74 \text{ kJ/mol}$ , o que pode ser indicativa da formação predominante deste composto na superfície das amostras tratadas em ácido fosfórico [40].

Não obstante, os ataques ácidos podem provocar decréscimo de propriedades mecânicas do titânio, principalmente a ductilidade e resistência à fadiga, provavelmente em razão das irregularidades provocadas na superfície que tendem a serem sítios de nucleação de trincas, além da fragilidade ocasionada pela absorção superficial de hidrogênio.

## 2.4.2 Tratamento alcalino

O tratamento alcalino imprime alterações de composição química, rugosidade e topografia sobre a superfície tratada [41]. Este tratamento desperta interesse por tornar bioativos os materiais bioinertes por meio da formação de uma camada de titanato de sódio sobre a qual a precipitação de hidroxiapatita é estimulada.

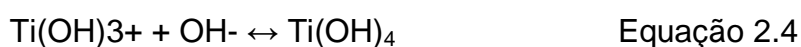
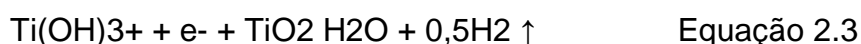
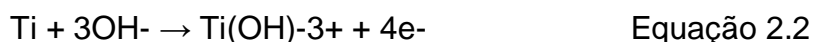
O que se sabe, portanto, é que esse tipo de tratamento estimula a formação de hidroxiapatitas sobre as superfícies dos materiais; no entanto, ainda é escassa a literatura que reporte respostas biológicas em relação a superfícies de materiais tratados alcalinamente sem acondicionamento prévio em SBF.

Em uma pesquisa liderada por Kokubo *et al.* (2004) foram estudadas as respostas de diferentes materiais, a saber, silício, tântalo, zircônio e titânio, submetidos ao acondicionamento alcalino em solução de NaOH com concentrações por volta de  $5,0 \text{ mol.L}^{-1}$  e mantidas a  $60^\circ \text{ C}$  por 24 horas. Em seguida, o material tratado alcalinamente é submetido a um tratamento térmico (por volta de  $600^\circ \text{ C}$ ) com objetivo de estabilizar as propriedades da camada formada [41]. Este tratamento térmico é geralmente realizado, no entanto, neste trabalho ele foi evitado com intuito de não provocar a difusão de alumínio e vanádio para a superfície dos materiais.

O que acontece durante o tratamento alcalino é a que a camada passiva de  $\text{TiO}_2$  dissolve parcialmente no meio alcalino por causa do ataque corrosivo dos grupos hidroxilas[42]:



Simultaneamente ocorre a hidratação do titânio [42]:



Um novo ataque ao  $\text{TiO}_2$  hidratado produz hidratos carregados negativamente nas superfícies dos substratos [42]:



Essas espécies carregadas negativamente são combinadas com íons alcalis em solução aquosa formando uma camada de hidrogel de titanato alcalino que pode em seguida ser tratada termicamente para torná-la mais densa.

Em seguida, as amostras tratadas em meio alcalino, como descritas acima, podem ser acondicionadas em uma solução desenvolvida por Kokubo, conhecida como SBF – *simulated body fluid*, na qual a precipitação de apatitas sobre o substrato tratado alcalinamente é estimulada. Para encontrar informações a respeito da preparação e testes com a solução mencionada, consultar [43].

Como pode ser observado pelos quadros da Figura 2.10, o tratamento alcalino, com NaOH, provoca inicialmente a formação de uma camada de titanato de sódio amorpho após dissolver a camada passiva de óxido de titânio. Quando há a imersão desta superfície em uma solução SBF, ocorre a formação de grupos funcionais bioativos (-OH) devido à troca de íons  $\text{Na}^+$  do titanato de sódio da superfície com os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  da solução. Os grupos Ti-OH então formados na superfície são carregados negativamente e combinam seletivamente com os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  do fluido para formar uma camada de titanato de cálcio amorpho. Devido ao acúmulo de cálcio, a superfície possui uma carga residual positiva que é compensada pela combinação de íons fosfatos carregados negativamente que formam então fosfato de cálcio amorpho e que espontaneamente se transforma em apatita cristalina.

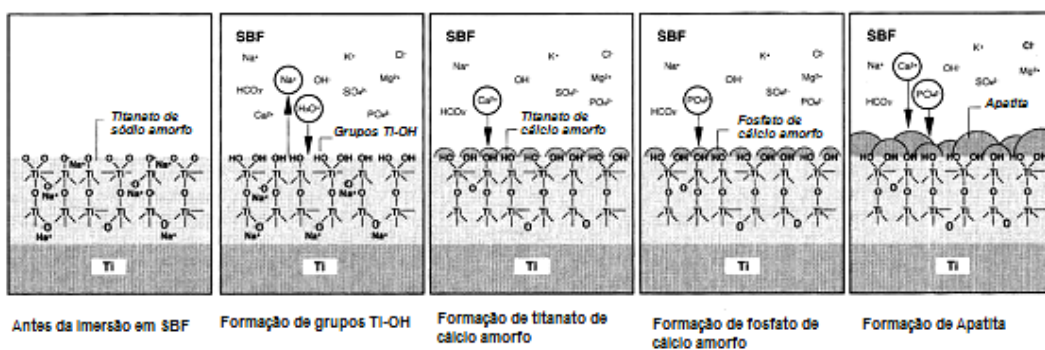


Figura 2.10: Mecanismo de formação de apatitas em superfícies tratadas com modificação alcalina NaOH (extraída e modificada de [41]).

Após o tratamento alcalino, o tratamento térmico é frequentemente realizado a uma temperatura próxima dos 600°C. O tratamento torna o titanato de sódio formado mais estável e favorece o recobrimento com apatitas após este ser acondicionado em soluções específicas que simulam os meios fisiológicos, ou seja, o *fluído corpóreo sintético* (SBF) [41,44,45]. Além disso, o tratamento alcalino mesmo associado ao tratamento térmico pode não provocar decréscimo na resistência à fadiga do material, como reportado por Kokubo e al. (2004) [41].

A Figura 2.11 mostra as superfícies de vários materiais após tratamento alcalino seguido por acondicionamento em SBF. Verifica-se, portanto, a formação de apatitas sobre diversos tipos de material [41].

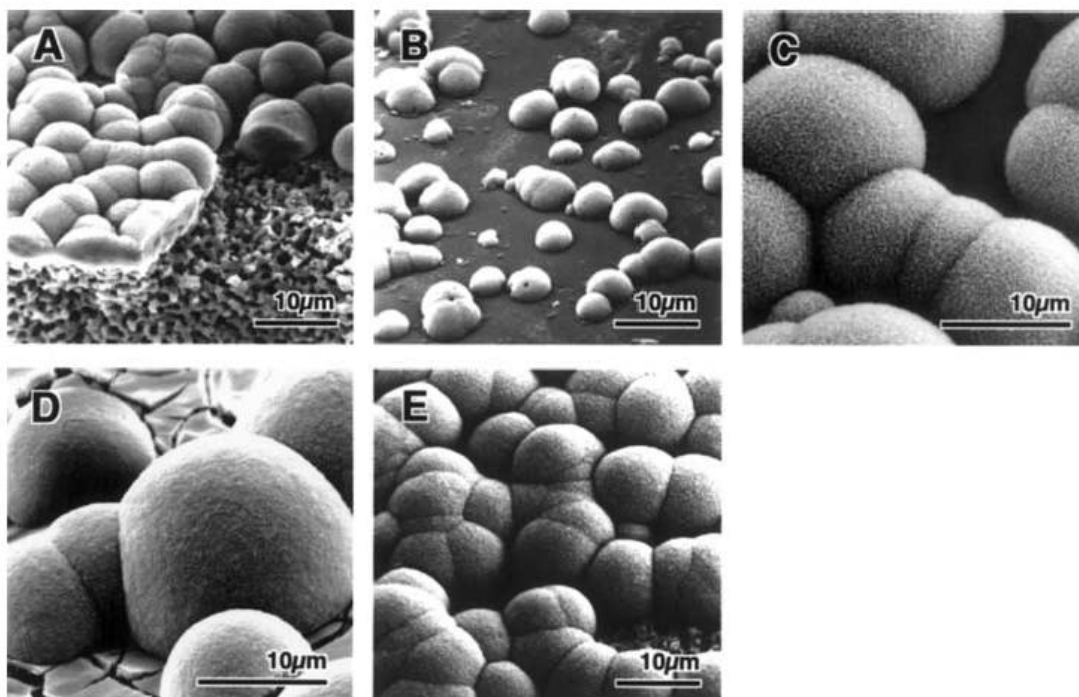


Figura 2.11: formação de apatitas nas superfícies com géis após tratamento com NaOH: (A) SiO<sub>2</sub>, (B) TiO<sub>2</sub>, (C) ZrO<sub>2</sub>, (D) Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, (E) Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (extraída de [41]).

No caso deste trabalho a opção por não realizar o tratamento térmico após o tratamento alcalino foi adotada para evitar a difusão, principalmente de alumínio, para a superfície do material e provocar citotoxicidade.

## 2.5 Efeito das propriedades das superfícies sobre as respostas biológicas

Como visto anteriormente quatro fatores relacionados às superfícies dos materiais regulam as características da interface implante/osso [16]:

- Energia da superfície;
- Rugosidade da superfície;
- Topografia da superfície;
- Composição da superfície.

Estes fatores são importantes, pois eles exercem influência sobre o comportamento das células da linhagem das osteoblásticas durante os processos biológicos que antecedem a osseointegração de um implante. No entanto é muito complicado avaliar o comportamento biológico sobre cada um desses fatores de superfície separadamente, uma vez que eles estão interligados.

A variação da **energia livre da superfície** pode ser modificada por meio da alteração da área específica da superfície ou da molhabilidade. Desta maneira, o comportamento da adesão de células e proteínas à superfície é alterado conforme às alterações energéticas da superfície do material. As superfícies que favorecem a adesão de osteoblastos são caracterizadas como predominantemente hidrofílicas e/ou com elevada área específica [35].

É importante notar que níveis de **rugosidade** interferem na adesão e espreadimento celulares e que há um intervalo de valores de rugosidade em que as respostas biológicas são melhores [46].

A **topografia** da superfície pode alterar fatores como a expressão gênica dos osteoblastos ou diferenciação de células mesenquimais estaminais [35,47].



Em adição, a **composição da superfície** é crucial para garantir a biocompatibilidade e exerce influência nos comportamentos biológicos, tais como, adesão e a diferenciação celular [48].

### 2.5.1 Efeito da energia da superfície

O diferencial da *Energia Livre de Gibbs de uma superfície* a temperatura e pressão constantes estão relacionados aos seguintes parâmetros, conforme Equação 2.6:

$$dG_{T,P}^s = \sigma dA + \sum \mu_i dn_i^s \quad \text{Equação 2.6}$$

$\sigma$ : tensão superficial;

A: área superficial;

$\mu_i$ : potencial químico do *ésimo* elemento químico;

$n_i^s$ : concentração em moles do *ésimo* elemento químico em excesso;

Partindo da Equação 2.6 é possível verificar que o aumento da área efetiva da superfície e da tensão superficial provoca um acréscimo no diferencial da energia livre de Gibbs da superfície do material implantado no interior de um corpo humano. Neste caso, pode-se pensar que o segundo fator da Equação 2.6 relacionado à composição química e concentração de espécies adsorvidas sobre a superfície do material ( $\sum \mu_i dn_i^s$ ) seja constante. Com esta consideração é de se esperar que o aumento do fator  $\sigma dA$  da Equação 2.6 cause portanto um favorecimento para a adesão de proteínas e de células melhorando a bioatividade do material de implantes. O aumento deste fator da água pode ser provocado, por exemplo, pelo aumento da hidrofiliabilidade e da área efetiva da superfície.

A interação entre a superfície mais externa do implante e o seu ambiente é um processo altamente dinâmico no qual a adsorção de proteína aparenta ser um fator chave [49]. A adesão e o comportamento inicial

desempenhado pelas células, em grande parte, dependem da estrutura e da química do substrato a ser aderido [50].

Com intuito de compreender melhor a influência das superfícies com relação à adesão em longo período, um parâmetro denominado **poder de adesão** foi desenvolvido e avaliado em diferentes superfícies [50]. A análise consistiu em avaliar a razão de células destacadas da superfície em função do tempo de tripsinização (variando de 5 a 60 minutos), ou seja, método utilizado para destacar células do substrato, após 1, 7, 14 e 21 dias de cultura celular. Dentre as superfícies investigadas, aquelas atacadas com ácido obtiveram bons resultados, tendo 50% de células destacadas da superfície após 60 minutos de tripsinização em 21 dias de cultura celular [50].

As medidas de ângulos de contato pela água na superfície dos materiais podem separar as superfícies em hidrofílicas e hidrofóbicas com relação à tensão superficial do material em análise. Com a Equação 2.7 é possível relacionar as três tensões superficiais representadas pelos vetores da Figura 2.12 (c) com o ângulo de contato ( $\Theta$ ), sendo:  $\gamma_{SV}$ : tensão superficial sólido-vapor;  $\gamma_{LV}$ : tensão superficial líquido-vapor;  $\gamma_{SL}$ : tensão superficial sólido-vapor.

$$\cos\Theta = (\gamma_{SG} - \gamma_{SL})/\gamma_{LG}$$

Equação 2.7

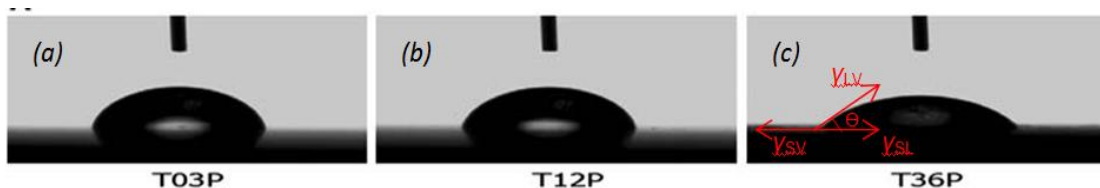


Figura 2.12: Ilustração de diferentes ângulos de molhamento de uma gota de água em três diferentes superfícies. Em (a) superfície hidrofóbica; (b) molhamento parcial e em (c) superfície hidrofílica. Esquematizados em fonte vermelha temos as tensões superficiais (SI:  $J/m^2$ ) e o ângulo de contato  $\Theta$  [51].

A energia da superfície influencia na adsorção seletiva de proteínas. Normalmente as superfícies hidrofílicas aparentam ter maior adesão de proteínas comparadas às superfícies hidrofóbicas [52–54]. Entretanto,

materiais com superfícies altamente hidrofílicas ( $\Theta \rightarrow 0^\circ$ ) exibem pouca tendência em adsorverem e manterem adsorvidas as proteínas. Isso pode ser explicado devido às condições energéticas serem desfavoráveis, como, por exemplo, supressão do filme de proteína provocado por comportamento altamente hidrofílico [49].

A adsorção de proteínas nos primeiros estágios de implantação exhibe influência na adesão celular, por exemplo, os osteoblastos podem ser estimulados a aderirem preferencialmente à superfície de materiais contendo vitronectina e fibronectina comparados aos com albumina, laminina e colágeno denaturado (gelatina), todas previamente adsorvidas à superfície de alumina com tamanho de grãos ao redor de 24 nm [55].

As proteínas tendem a manter uma conformação mais ativa em superfícies hidrofílicas, no entanto, o oposto foi observado para a proteína albumina [56].

Em um estudo relacionado, foi avaliado que a fibronectina, proteína presente no plasma sanguíneo, apresentou maior adesão em superfícies mais rugosas. Por exemplo, uma amostra com superfície submetida ao jateamento com areia e atacada quimicamente apresentou maior adesão de fibronectina quando comparada à superfície somente atacadas quimicamente ou somente usinada [57].

Com relação à adesão celular, apresentam melhores respostas superfícies hidrofílicas [23,53,58–61]. Na Figura 2.13 observam-se os resultados de ensaios de adesão celulares nas três superfícies com ângulos de contatos em relação à água aferidos e mostrados na Figura 2.12, que possuem diferentes composições de superfície, a saber: rutilo (A e D), titânia amorfa (B e E) e anatásio (C e F) [51]. Nas imagens A-C da Figura 2.13 observa-se o espriamento provocado pelas diferentes superfícies sobre as células fazendo com que os citoplasmas adquiram diferentes morfologias após o contato com a superfície.

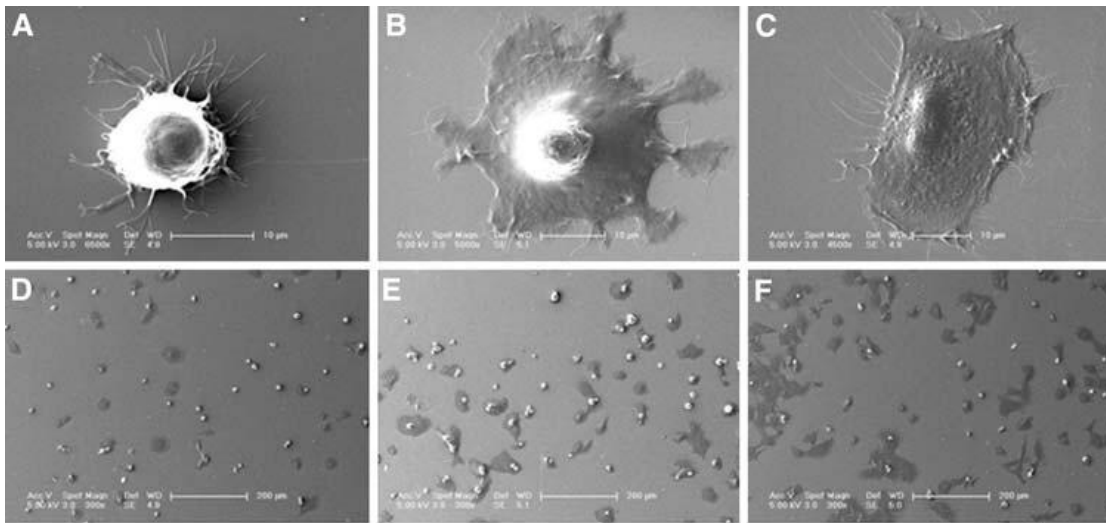


Figura 2.13: Imagens obtidas com auxílio de MEV das superfícies dos materiais mostrando a morfologia de osteoblastos primários de ratos após 8 horas de incubação. Há três características morfológicas: circular e hemisferoidal com filipodium (a) (6500X); plana com lamelopodium (b) (5500X); achatada com extensões citoplasmáticas (c) (4500X). A maior parte das células do T36P ( $\text{TiO}_2$  – anatásio) estava achatada e espreada (f), enquanto nos grupos T03P ( $\text{TiO}_2$ - rutilo) em (d) e a fase  $\text{TiO}_2$  amorfa denominado grupo T12P (e) estavam hemisferoidais e achatadas com um lamelopodium (extraída e traduzida de [51]).

Em adição, Schneider e Burrigde (1994) investigaram a adesão de células da linhagem dos osteoblastos sobre diferentes substratos e foi observada duas formas de contato das células com a superfície: contato proximal (*close contact*, na literatura inglesa) com separações da ordem de 30 a 100 nm e contato focal (*focal contact*) com distâncias entre 10 e 15 nm que está relacionado à adsorção das proteínas da célula à superfície, tais como, vitronectina ou fibronectina [62]. Com isso, materiais que contenham superfícies com estruturas nanométricas tendem a controlar a adesão focal das células e a aperfeiçoar respostas tais como, a porcentagem e a força de adesão das células sobre as superfícies dos implantes [48,63].

Como visto, fatores como a composição química, rugosidade e topografia das superfícies afetam a energia da superfície; por esse motivo, eles

devem ser combinados de forma a atingir o melhor resultado durante as etapas que antecedem a fixação biológica promovendo a osteocondução e em última instância a osseointegração de implantes [61]. Uma superfície ideal está além de nossa análise, no entanto, esses fatores podem ser combinados no sentido de criar superfícies bioativas “inteligentes”.

Nessa direção, há esforços de pesquisadores focados em procedimentos não convencionais para a nano-funcionalização biológica de superfícies de biomateriais em reparos ósseos através da imobilização de *moléculas bioativas (BAM, sigla em inglês)* [29].

Neste trabalho não será adotada esta estratégia, mas sim a de promover superfícies que propiciem a fixação de células e proteínas feitas pelo próprio organismo e não por métodos *a priori*. Estes resultados levaram a adotar modificações que gerem principalmente um filme de óxido de titânio na superfície sem adição de alumínio e vanádio, para isso optou-se por evitar tratamentos térmicos na metodologia adotada.

### 2.5.2 Efeito da Rugosidade

A rugosidade exerce influência significativa nas interações entre as células e proteínas com a superfície do material implantado [49].

Na Figura 2.14 podem ser observadas as influências da rugosidade de amostras de Ti-6Al-4V lixadas com lixas #1200, #600 e #180 no comportamento de adesão, proliferação de células humanas da medula óssea. As medidas de rugosidade média  $R_a$ , encontradas são iguais a 0,320  $\mu\text{m}$ ; 0,490  $\mu\text{m}$  e 0,874  $\mu\text{m}$ , respectivamente [61].

De acordo com os autores o aumento de rugosidade provocou aumento da adesão, de proliferação e de atividade da fosfatase alcalina, apesar desta última não ter sido considerada estatisticamente significativa, de acordo com os autores [61].

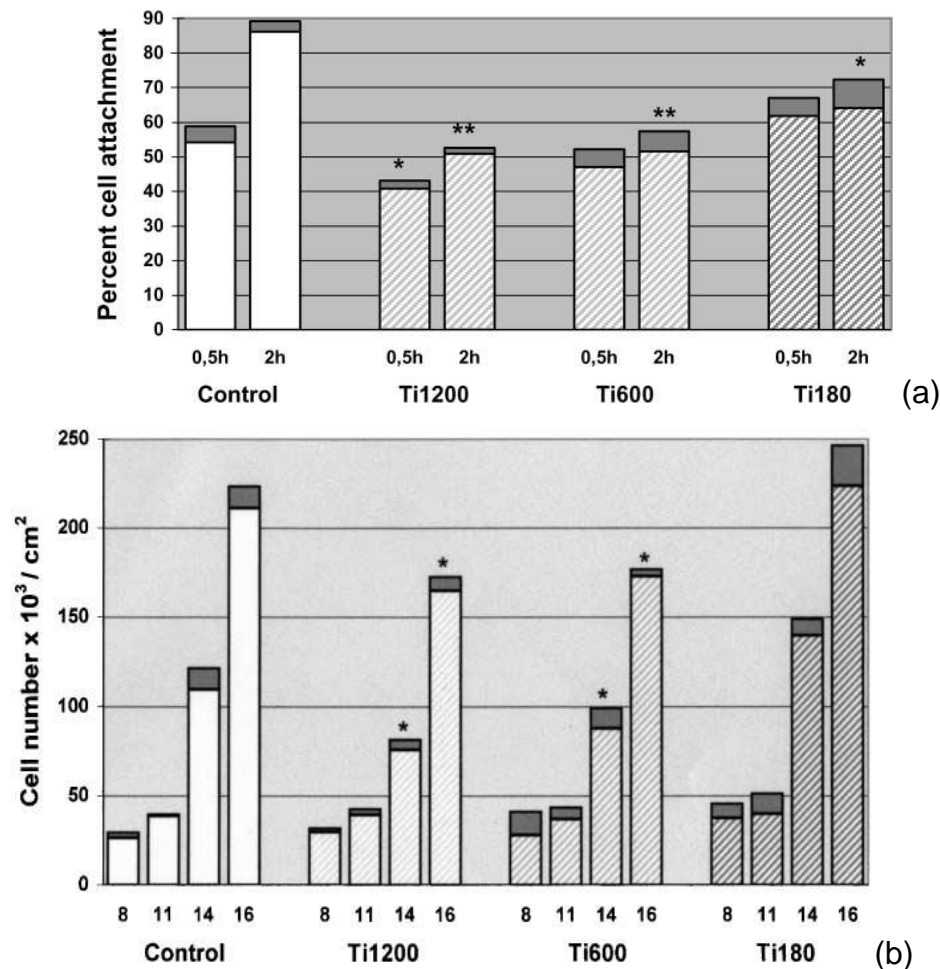


Figura 2.14: Comportamentos celulares de (a) adesão e (b) proliferação frente às diferentes superfícies submetidas aos processos de lixamento com diferentes granulometrias de abrasivos (meshs #: 180, 600 e 1200). O controle refere-se ao cultivo diretamente sobre a superfície do recipiente plástico utilizado para armazenar o meio (extraída de [61]).

Observa-se que em todos os casos o aumento da rugosidade possibilitou um aumento nos processos celulares analisados [61].

Quanto à interação de proteínas nas superfícies reportadas, observa-se que a superfície menos rugosa (Ti1200) proporcionou maior adesão das seguintes proteínas: albumina sérica bovina e fibronectina, ver Figura 2.15 [61].

Com base nos resultados, foi escolhida para a metodologia a utilização de lixas com abrasivos na granulometria de # 1500 durante o lixamento, uma vez que os processos de modificações causarão um aumento esperado de rugosidade.

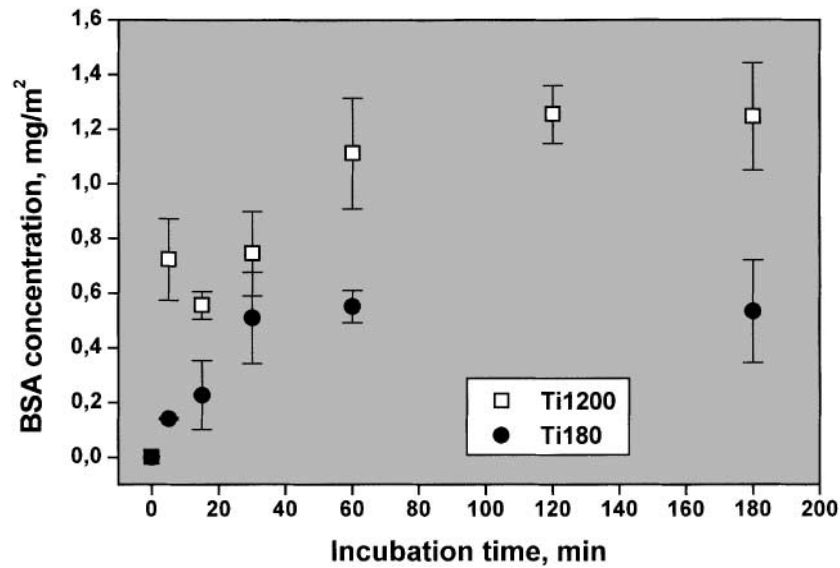


Figura 2.15: Adesão da proteína albumina sérica bovina nas superfícies de Ti-6Al-4V lixadas em papéis impregnados com SiC # 1200 e 180 (extraída de [61]).

Estudo semelhante foi realizado para avaliar respostas celulares da liga Ti-6Al-7Nb submetida ao processo de lixamento (#1200, #400, #180). Os processos de espraiamento e proliferação de células similares a osteoblasto humano (SaSO-2 cells) foram mais pronunciados com aumento de rugosidade. No entanto, com relação à adesão das células às superfícies os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as diferenças de rugosidade investigadas [64,65].

Dependendo do sistema adjacente à superfície do material, as condições de rugosidade e topografias induzem diferentes interações com os componentes biológicos, tais como, sangue, saliva ou com tecidos macios ou duros. Por esse motivo, um implante dentário deve atender propriedades híbridas de forma a atingir interações favoráveis entre os tecidos adjacentes à sua superfície – a gengiva, osso e os fluidos intracorpóreos, tais como, saliva e sangue para assim aperfeiçoar o desempenho biológico do material implantado.

### 2.5.3 Efeito da Topografia

A topografia da superfície aparenta ser significativa nos processos de adesão, de espraiamento, proliferação e na diferenciação celulares [50,66–68].

Superfícies que apresentaram rugosidade isotrópica (topografia), incluindo neste grupo superfícies atacadas com ácido, tenderam a possuir maior **poder de adesão** (parâmetro desenvolvido para avaliar adesão) celulares comparadas às superfícies mais lisas [50].

Os osteoblastos podem distinguir não somente diferença entre rugosidades, mas também superfícies com rugosidades semelhantes e topografias diferentes, ou seja, há uma correlação de sensibilidade dos osteoblastos com a organização e morfologia da rugosidade, além de sua amplitude [23,69].

Atualmente, de acordo com referências bibliográficas, as alterações topográficas nas superfícies dos implantes metálicos podem ser analisadas desde a escala micro até a ordem de nanômetros [11,70,71].

O nível de escala microtopográfico abrange dimensões de análise entre 1 e 10  $\mu\text{m}$ , a submicrométrica entre 100 nm e 1  $\mu\text{m}$  e a escala nanométrica é composta por dimensões abaixo de 100 nm.

O controle das variáveis em níveis micro e nanométricos aparenta provocar respostas mais sensíveis em ensaios a partir de culturas celulares *in vitro*. Controlar a topografia na escala de nanômetros é de suma importância para influenciar respostas nas escalas de interações de proteínas, células e dessa forma contribuir para a osseointegração [55]. No entanto, o controle das variáveis e, portanto a reprodutibilidade nesta escala de processamento é de extrema dificuldade [15].

Em um trabalho sobre a influência da nanotopografia sobre o fenótipo de células pluripotentes, foi reportado que biocompósitos nanoestruturados aplicados sobre a superfície de implantes metálicos representam alternativas não amplamente exploradas para aplicações ortopédicas [72]. Eles podem ser fabricados de forma a possuírem micro e nanoarquiteturas similares ao osso



fisiologicamente saudável. Como o comportamento das células depende das suas interações com seus ambientes, a superfície do componente implantável é determinante para o sucesso ou a falha do biomaterial. Topografia em nanoescala, propriedades mecânicas e químicas influenciam a adesão, proliferação e diferenciação de células estaminais mesenquimais (na literatura inglesa *mesenchymal stem cells* - MSC), que correspondem a células pluripotentes e, portanto, com potencial de diferenciação genética, dentre outras possíveis, em osteoblastos [72–74].

O processo de diferenciação das células pluripotentes mesenquimais em osteoblastos pode ser avaliado pela medida da atividade específica de fosfatase alcalina (ALP), ou seja, durante essa alteração fenotípica há um aumento de fosfatase alcalina no meio da cultura *in vitro* ou o aumento na produção de osteocalcina ou na expressão gênica referente à produção destas proteínas. [69,72,75].

Foram comparados ensaios de adesão de fibroblastos e osteoblastos em superfícies nanotopográficas de Ti-CP e constatou-se uma maior adesão de osteoblastos em detrimento de fibroblastos, o que é positivo, pois os fibroblastos são responsáveis pelo encapsulamento do implante por um tecido fibroso, tornando o componente suscetível à falha prematura [9].

Em sua tese de doutorado, Zhu 2005, analisou o comportamento celular em superfícies anodizadas (controle), controle e recobrimento com nano HA; e controle com recobrimento com HA/colágeno. Quanto às respostas celulares, as superfícies recobertas apresentaram menor adesão inicial e menor espraiamento comparadas à superfície controle. Por outro lado, foi observada maior força de adesão às superfícies recobertas. No entanto, quanto ao espraiamento e proliferação celular a superfície controle apresentou melhor comportamento, sugerindo a dependência desses fenômenos com relação tanto à composição quanto à estrutura da superfície [23].

Como consequência dos resultados desta revisão buscar-se-á nanotopografias como critério para seleção dos métodos de modificação de superfície que serão avaliados a comportamentos das células osteoblásticas durante as respostas biológicas.

## 2.5.4 Efeito da composição

A composição química e a fase presente têm influência na energia superficial de Gibbs do material por alterarem o potencial químico ( $\mu_i$ ) do filme formado na superfície dos materiais de acordo com a Equação 2.6.

Os tratamentos de superfícies, por sua vez, podem causar alterações não intencionais da composição química pela incorporação de impurezas ao óxido de titânio formado na superfície dos biomateriais metálicos compostos por titânio liga [5].

O dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) mantém-se como o principal constituinte dos óxidos formados nas superfícies de titânio-CP submetido aos diferentes processos de modificação de superfícies listados na Tabela 2.3 na qual podemos verificar a relação entre as proporções de fases encontradas (%) com relação a diferentes tratamentos das superfícies, sendo eles, usinagem (Branemark); Plasma spray de titânio (TPS); jato de areia e ataque ácido (SLA); tratamento eletroquímico (Osseotite) [76].

Porém, a fórmula resultante do óxido é majoritariamente não estequiométrica e dependendo do processo de modificação fica em torno de  $TiO_{2-x}$  [51].

Tabela 2.3: Resultados da deconvolução dos espectros Ti2p, C1s e O1s em análise por XPS: relativo às áreas dos picos dos componentes.

Implantes	Proporção relativa (área do pico) [%]								
	Ti2p			C1s			O1s		
	TiO <sub>2</sub>	Ti <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + TiO	Ti (met.)	C-C C-H	C-O	COO or C=O	TiO <sub>2</sub>	Tipo B	Tipo C
Brånemark	88.2	5.5	6.3	30.0	59.3	10.7	48.9	36.4	14.7
TPS	85.5	7.4	7.1	26.3	36.8	36.9	60.7	22.2	17.1
SLA	87.8	5.8	6.4	42.2	39.0	18.8	65.7	17.7	16.6
ICE	(100) <sup>1</sup>	—	—	81.1	14.5	4.4	15.3	84.7	—
Osseotite	86.3	6.1	7.6	47.7	43.0	9.3	37.7	34.0	28.3

<sup>1</sup> Devido a pouca intensidade não foi possível fazer a deconvolução de Ti2p para ICE

As fases minerais do óxido de titânio ( $TiO_2$ ) encontradas na natureza são: rutilo, anatásio e bruquita, sendo os dois últimos de ocorrência mais rara. Do ponto de vista da biocompatibilidade a fase cristalina que tem recebido

especial atenção de pesquisadores é o anatásio ( $\text{TiO}_2$ ) devido a bioatividade que tem demonstrado [45,77,78].

Na Figura 2.16 (c) podemos observar o resultado da adesão, espraiamento e proliferação de osteoblastos provenientes de rato (M3C3T3) sobre a superfície recoberta com nanotubos de titânia (c) na fase anatásio (b) amorfa e (a) Ti puro (polido), ou seja, sem formação de nanotubos. É possível observar que a topografia na forma de nanotubos exerce influência sobre as células, favorecendo respostas biológicas, como pode ser observado pelos pontos escuros que representam as células. Além disso, para as superfícies das amostras das imagens (b) e (c) da Figura 2.16 em que ambas são recobertas por nanotubos de titânia aquela com predomínio de anatásio, apresentou melhores respostas de adesão e espraiamento além de maior atividade de fosfatase alcalina, sinalizando atividade osteogênica com maior expressão [79].

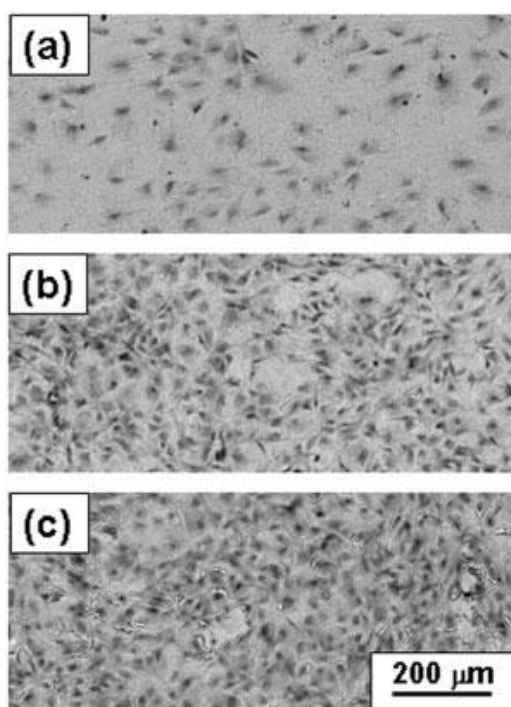


Figura 2.16: Imagens comparativas por MEV retroespalhados de células osteoblásticas crescendo em (a) Ti polido; (b) nanotubos de  $\text{TiO}_2$  amorfo e (c) nanotubos de  $\text{TiO}_2$  anatásio. Todas as imagens foram realizadas após 48 horas de incubação.

Com a revisão bibliográfica é possível observar a importância do óxido de titânio para a biocompatibilidade de implantes. A topografia pode ser aprimorada em escala nanométrica de dimensão e que com predomínio da fase cristalina anatásio aparenta ter um efeito sinérgico com relação às atividades celulares que antecedem a osseointegração.

## 2.6 Respostas Biológicas

As metodologias mais recentes para avaliação de respostas biológicas aos tratamentos de superfície de implante utilizam-se, por exemplo, do comportamento de células osteoblásticas em ensaios *in vitro*, que é a abordagem adotada neste trabalho. Este tipo de avaliação ajuda a esclarecer mecanismos que favoreçam a osseointegração e evita o uso indiscriminado de animais em ensaios biológicos *in vivo*.

As respostas biológicas dos osteoblastos frente às amostras com as diferentes superfícies podem ser avaliadas em intervalos de tempo por meio técnica de *reação de polimerase em cadeia – transcrição reversa em tempo real*, comumente referido como *real-time RT-PCR*, sigla proveniente da literatura inglesa – real-time reverse transcriptase - polymerase chain reaction.

A reação de polimerase em cadeia é uma técnica para amplificação *in vitro* de uma sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA) por extensões simultâneas de filamentos complementares de DNA [80].

### 2.6.1 Reação de polimerase em cadeia – Transcrição Reversa: *Reverse Transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)*

A técnica de *reação de polimerase em cadeia* (PCR) foi aquela que permitiu os avanços recentes na história da genética. Isso se deve ao fato das metodologias empregadas na reação de polimerase em cadeia permitirem a

amplificação de quantidades úteis de DNA a partir de muito pouca quantidade de material de partida [81].

PCR trata-se, de um método no qual a temperatura e ciclos de polimerização são empregados para reproduzir uma determinada região do DNA. A transcrição reversa (RT) é o meio pelo qual a cópia do DNA é feita a partir do RNA mensageiro (RNAm) [82].

A reação de polimerase em cadeia é baseada em três etapas simples para qualquer reação de síntese de DNA, sendo elas [81]:

- 1) *Denaturação* dos modelos de DNA em filamentos simples;
- 2) *Recozimento* dos iniciadores de cada filamento original para a síntese de novos filamentos.
- 3) *Extensão* dos novos filamentos de DNA dos iniciadores.

Durante o PCR a enzima denominada Taq DNA polimerase catalisa a síntese de filamentos de DNA complementares [83]. A Taq DNA polimerase é uma enzima termo estável purificada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq) e sua descoberta possibilitou sintetizar novos fios de DNA repetitivamente e amplificar exponencialmente uma região definida do material de partida.

A DNA polimerase executa a síntese de um filamento complementar de DNA na direção 5' – 3' usando uma amostra simples-estirada, mas parte de uma região duplamente estirada. Esta é a reação de extensão do *primer* ou iniciador e é a base para as inúmeras técnicas de sequenciamento [80]. A reação em cadeia polimerase usa esse mesmo princípio, mas emprega dois *primers* (iniciadores) que são uma sequência de nucleotídeos complementares ao início da sequência do DNA a ser amplificada. Os *primers* hibridizam em filamentos opostos estirados após a etapa de denaturação [80]. Assim, os *primers* ficam arranjados de tal forma que cada *primer* direcione a síntese de DNA em direção ao outro. O *primer* F, por exemplo, direciona a síntese do filamento de DNA que pode ser inicializado pelo *primer* R, da Tabela 2.4, sendo

F o primer forward e R primer reverse, *vice versa* ou o *primer a* e *primer b* da Figura 2.17.

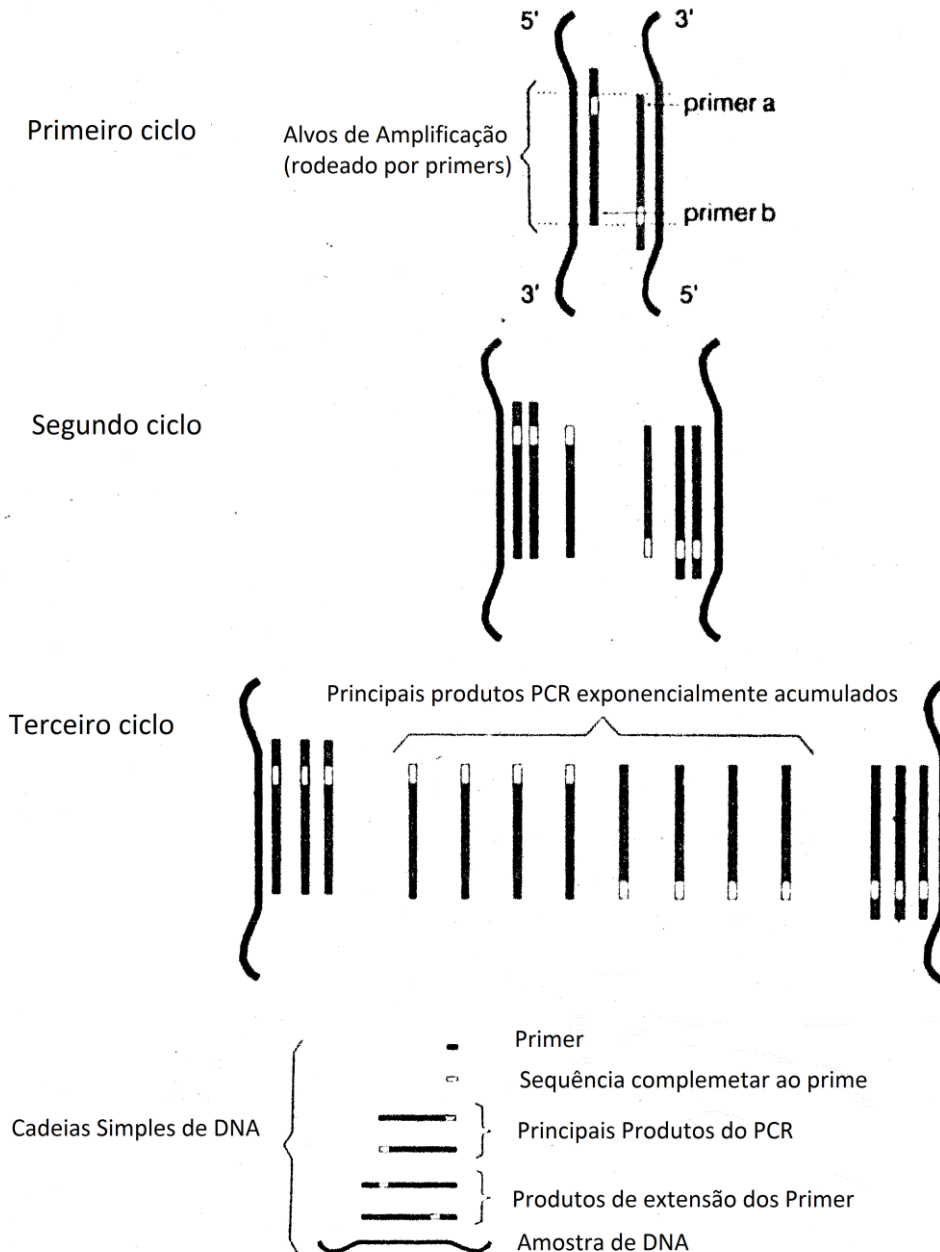


Figura 2.17: Esquema do mecanismo dividido em três etapas de amplificação que ocorre durante o ensaio com RT-PCR [extraída e traduzida de [81]].

A técnica de *real-time* RT-PCR é utilizada para amplificação do material genético de diversas espécies. O que é retornado como resultado refere-se às

expressões gênicas de proteínas que são componentes estruturais de células e tecidos e realizam diversas funções chave dos sistemas biológicos.

A produção das proteínas é controlada por genes, os quais são codificados em ácido desoxirribonucleico, comum a todos os seres. A produção da proteína envolve dois estágios: transcrição e tradução. Na transcrição, um filamento simples de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) é copiado do DNA e em seguida é usado como padrão para montar a cadeia de aminoácido e formar as proteínas no ribossomo da célula. A transcrição é, portanto, um processo baseado em um molde de DNA e depende da enzima denominada *RNA polimerase* ou *transcriptase*. A produção de DNA também pode ser realizada a partir de um modelo de RNA, desta forma, a enzima recebe o nome de *transcriptase reversa*, como é o caso do RT-PCR [84].

Várias são as técnicas disponíveis atualmente para medir expressões gênicas, que servem para medir a quantidade de mRNA transcrito em um sistema biológico, sendo o RT-PCR uma delas [85].

A Figura 2.18 contém o esquema descrito destes processos que fazem parte do denominado dogma central da biologia celular [85]

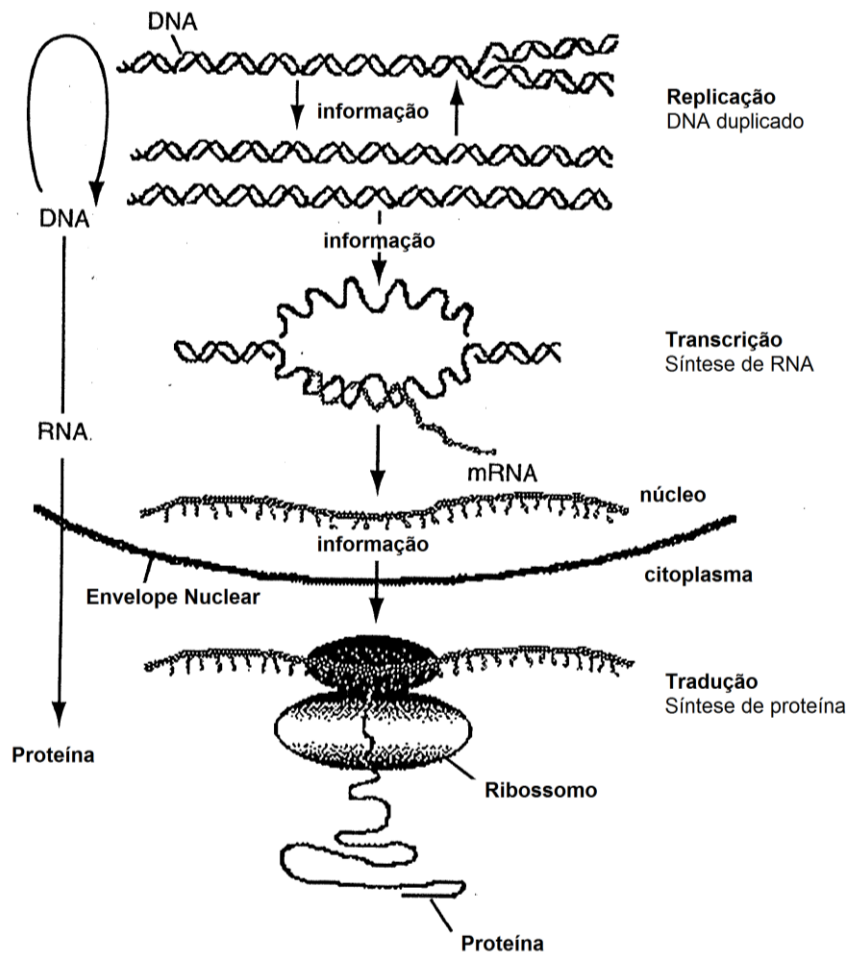


Figura 2.18: Figura esquemática do RNA na expressão gênica e produção de proteínas, o dogma central da biologia celular, modificada de [85].

### 2.6.2 Expressão gênica de osteoblastos humanos em ensaios *in vitro*.

Com relação à osteocondução, a expressão gênica de osteoblastos pode ser avaliada por meio de real time RT-PCR analisando os genes listados na Tabela 2.4 [86,87].

Tabela 2.4: Lista dos genes e da correspondente sequência *primer* e *probe* utilizada nos ensaios com RT-PCR.



Símbolo do gene	Nome do gene	Sequência Primer (5'>3')	Sequência Probe (5'>3')
SPP1	Osteopontina	F-GCCAGTTGCAGCCTTCTCA R-AAAAGCAAATCACTGCAATTCTCA	CCAAACGCCGACCAAGGAAAACCTCAC
COL1A1	collagen type I alpha1	F-TAGGGTCTAGACATGTTTCAGCTTTGT R-GTGATTGGTGGGATGTCTTCGT	CCTCTTAGCGGCCACCGCCCT
RUNX2	runt-related transcription factor 2	F-TCTACCACCCCGCTGTCTTC R-TGGCAGTGTCATCATCTGAAATG	ACTGGGCTTCCTGCCATCACCGA
ALPL	alkaline phosphatase	F-CCGTGGCAACTCTATCTTTGG R-CAGGCCCATGCCATACAG	CCATGCTGAGTGACACAGACAAGAAG
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	F-CCCCTATTATTTTGGCACAACAG R-AACGGATCCTGAGTCACAGACA	ATGTTCCCATCTTGGTCAGTCCTATGC
SPARC	Osteonectina	F-GCCTGATGAGACAGAGGTGG R-CTGGACAGGATTAGCTCCCA	TGGAAGAACTGTGGCAGAGGTGA
RPL13A	ribosomal protein L13	F-AAAGCGGATGGTGGTTCCT R-GCCCCAGATAGGCAAACCTTTC	CTGCCCTCAAGGTCGTGCGTCTG

SPP1: Osteopontina é uma sialoproteína altamente fosforilada secretada para as matrizes extracelulares em mineralização durante desenvolvimento de ossos [88]. A expressão gênica desta proteína é regulada por vários fatores de crescimento e de diferenciação celulares incluindo proteínas morfogenéticas dos ossos. O aumento da expressão de SPP1 induzidas por estímulos mecânicos em ensaios celulares *in vitro* e *in vivo* tem revelado mecano-transduções envolvendo tensões nos sítios de adesão celulares [89]. Essa proteína é importante na mediação da ligação com hidroxiapatita. Além disso, é importante no processo de adesão e migração das células [89]. O aumento de fosfato é um estímulo para expressão de osteopontina em condições de reparações ósseas [88].

COL1A1: colágeno tipo 1 subunidade alfa 1 é considerado um marcador tardio e a expressão em altos níveis desse gene é atribuída ao fim da proliferação e aos estágios de início da deposição de matriz extracelular ou em estágios que antecedem eventos de mineralização óssea [88].

RUNX2: é um fator de transcrição responsável pelo processo de diferenciação dos osteoblastos e sua deficiência pode causar deficiência de formação óssea. Foi observada relação entre os níveis de RUNX2 com os de marcadores progenitores, como, ALPL e SPARC da Tabela 2.4, mostrando a influência da expressão de RUNX2 sobre este mas não sobre osteopontina, que é um marcador para osteoblastos imaturos [90].

ALPL: fosfatase alcalina é considerado marcador de estágio inicial de mineralização óssea [88,91].

COL3A1: colágeno tipo 3 subunidade alfa 1 faz parte das famílias dos colágenos, é mais abundante em tecidos embrionários. Em outros tecidos também está presente, porém em menores quantidades comparado ao COL1A1 e COL1A2. O colágeno tipo 3 alpha 1 pode estar associado ao crescimento das células, como os osteoblastos [92].

SPARC: osteonectina é uma proteína específica do osso. Partindo de um ensaio de desmineralização (guanidina com e sem EDTA) de osso de um feto bovino foi possível avaliar a presença de uma proteína (presente no extrato guanidina com EDTA) que estava ligada concomitantemente à hidroxiapatita e ao colágeno, desta forma recebeu o nome de osteo (osso, em grego) nectere (unir, verbo em latim) [93]. A proteína denominada osteonectina liga-se aos cristais de hidroxiapatita e às fibras de colágeno I, unindo-os. Os autores sugerem que a proteína se liga preferencialmente ao cálcio contido na hidroxiapatita e é capaz de se unir ao colágeno. Este fato sugere que essa proteína seja importante por iniciar a mineralização e por ligar os minerais às matrizes [93].

RPL13A: proteína ribossômica L13 que serve como referência para eliminar possíveis interferências ocorridas durante as análises.

### 3. Materiais e Métodos

O procedimento experimental consistiu das etapas contidas no fluxograma da Figura 3.1.

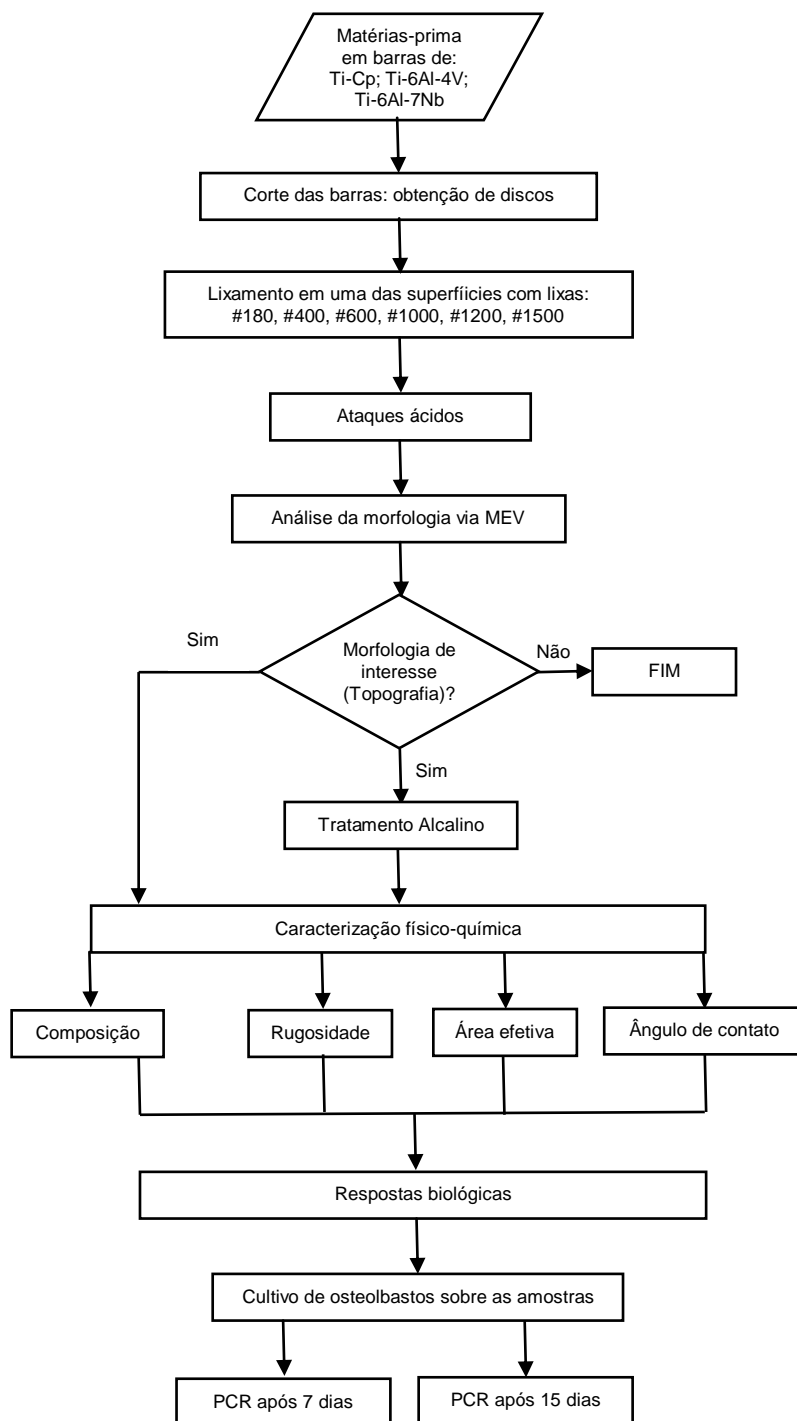


Figura 3.1: Fluxograma da etapa experimental.

### 3.1. Obtenção dos discos

Barras cilíndricas nas composições químicas estudadas (Ti-CP, Ti-6Al-4V ELI e Ti-6Al-7Nb) com diâmetros das seções transversais iguais a 25,4mm foram cortadas com discos de corte transversalmente em várias seções com cerca de 3 mm de espessura para obter inúmeros discos. Em seguida, cada disco passou por um lixamento em lixas metalográficas de SiC com meios abrasivos nas seguintes granulometrias – meshes (#): 180, 400, 600, 1000, 1200 e 1500, com auxílio de uma politriz (Aropol 2V da Arotec).

As amostras foram então lavadas com água deionizada em ultrassom (*Ultramet 2003 Sonic Cleaner* da Buehler) durante 7 minutos, seguido de lavagem com acetona por mais 7 minutos e depois as amostras foram secadas com jato de ar e armazenadas com cuidado. Com esse roteiro de lixamento foram então obtidas as amostras *controle*, denominadas **1A, 1B, e 1C**. Posteriormente, essas amostras foram modificadas com ataques ácidos somente ou com ataques ácidos combinados com tratamentos alcalinos, recebendo a nomenclatura de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Descrição dos parâmetros utilizados nas modificações das superfícies

Amostra	Material	Lixa Mesh	Reagente e ácido	T [°C]	t [min]	Reagente alcalino	T [°C]	t [horas]
1A	Ti- CP	1500	-	-	-	-	-	-
1B	Ti-6Al-4V	1500	-	-	-	-	-	-
1C	Ti-6Al-7Nb	1500	-	-	-	-	-	-
2A	Ti-CP	1500	HCl	60	30	-	-	-
2B	Ti-6Al-4V	1500	HCl	60	30	-	-	-
2C	Ti-6Al-7Nb	1500	HCl	60	30	-	-	-
3A	Ti- CP	1500	HCl	60	30	NaOH	60	24
3B	Ti-6Al-4V	1500	HCl	60	30	NaOH	60	24
3C	Ti-6Al-7Nb	1500	HCl	60	30	NaOH	60	24
4A	Ti- CP	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	-	-	-

4B	Ti-6Al-4V	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	-	-	-
4C	Ti-6Al-7Nb	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	-	-	-
5A	Ti- CP	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	NaOH	60	24
5B	Ti-6Al-4V	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	NaOH	60	24
5C	Ti-6Al-7Nb	1500	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	80	30	NaOH	60	24

### 3.2. Modificação das superfícies

Inicialmente foram feitos testes para determinar os reagentes e os parâmetros que seriam utilizados na metodologia para modificação de superfícies das amostras que passariam pela avaliação biológica. Nesta etapa exploratória foram utilizados os seguintes ácidos fortes, ácido clorídrico concentrado (HCl), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e ácido fluorídrico (HF). Como reagente alcalino foi utilizado o NaOH e adições de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em alguns casos. Alguns dos resultados desta etapa podem ser consultados no Apêndice C ao final da tese.

Com base na literatura investigada e nos resultados preliminares, os reagentes que apresentaram o desempenho favorável durante o trabalho em questão foram então os selecionados:

- ácido clorídrico concentrado (HCl<sub>conc.</sub>) de 36,5% a 38,0%);
- ácido fosfórico-orto concentrado (H<sub>3</sub>PO<sub>4 conc.</sub>) a 85,0%;
- Solução de NaOH 10 mol.L<sup>-1</sup>, preparada a partir do hidróxido de sódio sólido.

#### 3.2.1. Procedimento para o ataque ácido

Foram transferidos 150mL de cada reagente ácido citado para um béquer de 300 mL. A solução foi então mantida à temperatura de 60° C (± 5° C) durante os ataques com HCl e 80° C (± 5° C) para os ataques com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, com

auxílio de uma placa de aquecimento (MA 085 da marca Marconi). A temperatura foi controlada com auxílio de um termômetro. Quando a temperatura foi estabilizada, 6 discos de cada liga foram então mergulhadas nas soluções com as condições descritas na Tabela 3.1. O béquer foi então recoberto com um vidro de relógio para diminuir a volatilização de reagentes durante o procedimento. Das 6 amostras atacadas com cada ácido, três foram submetidas ao tratamento alcalino. Esse procedimento foi utilizado para os três materiais: Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb.

### **3.2.2. Procedimento para tratamento alcalino**

O tratamento alcalino consistiu em preparar 50 mL de solução de NaOH e transferi-la para um frasco de polietileno com tampa. Cada uma das 3 amostras atacadas anteriormente com ácido foram mergulhadas em solução de NaOH no interior de um frasco de polietileno com tampa. Uma estufa para Secagem e Esterilização (MA 033 da Marconi) com ajuste de temperatura digital foi estabilizada a 60° C para então os frascos contendo as amostras serem alocados no interior desta estufa e mantidos a uma temperatura de 60° C durante 24 horas. Esse mesmo procedimento foi utilizado para os três materiais: Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb.

Os parâmetros utilizados durante o procedimento podem ser encontrados na Tabela 3.1.

## **3.3. Caracterização das superfícies das amostras**

### **3.3.1. Morfologia e composição química**

As morfologias das superfícies das amostras foram investigadas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e as composições químicas foram obtidas via espectroscopia com energia dispersiva de raios-X

(EDS) acoplado ao MEV (Philips XL30-FEG-SEM equipado com Oxford Link ISIS 300 EDS)

As amostras foram analisadas quanto à morfologia da superfície ou topografia de superfície após os ensaios celulares com 15 dias de cultura. Os valores de EDS correspondem também às amostras que passaram previamente por incubação em cultura com osteoblastos humanos após 15 dias de incubação.

### **3.3.2. Medidas de Rugosidade**

As medidas de rugosidade sobre as superfícies das amostras foram realizadas com auxílio de um microscópio confocal a laser da marca OLYMPUS – LEXT OLS 4000 – com lentes objetivas MPLAPON de 20x e zoom de 1x com uma ampliação de 432 vezes a 3456 vezes e campo de visão de 640  $\mu\text{m}$  a 80  $\mu\text{m}$ .

Com esse equipamento foram então obtidas imagens de ampliação de 20x e reconstruções das superfícies estudadas no formato 3D. As imagens têm como objetivo uma análise qualitativa das modificações obtidas pelos tratamentos de superfície, através da visualização das características das rugosidades que posteriormente foram expressas em gráficos e tabeladas através do programa computacional do próprio equipamento. Foram realizadas 3 medidas por amostra de cada modificação superficial, ou seja, todas as amostras da Tabela 3.1.

O programa computacional do equipamento calcula e retorna vários parâmetros de rugosidade, tais como:  $R_p$ ,  $R_v$ ,  $R_z$ ,  $R_c$ ,  $R_t$ ,  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$ ,  $R_{ku}$ ,  $R_{sm}$ ,  $R_{\Delta q}$ ,  $R_{mr(c)}$ ,  $R_{\delta c}$ ,  $R_{mr}$ ,  $RZ_{JIS}$ . Sendo eles fornecidos em forma de tabelas na unidade dimensional de micrômetros.

Com base na revisão bibliográfica os parâmetros utilizados neste estudo são as rugosidades médias  $R_a$  e  $R_z$ .

### 3.3.3. Medida de Ângulo de contato (Molhabilidade).

Todas as amostras foram caracterizadas com relação à molhabilidade de suas superfícies com água, ou seja, foram caracterizadas quanto à hidrofiliicidade com auxílio de um goniômetro (KSV CAM200).

O ângulo de contato foi medido usando o método de gota sésil. Para cada amostra uma média de três medidas foram realizadas com gotas de água deionizada contendo volume aproximado de 4  $\mu\text{L}$  cada gota (Milipore) sobre a superfície de cada amostra (1A a 5C da Tabela 3.1). A medida do ângulo de contato corresponde à média do ângulo formado no lado esquerdo e do lado direito de cada amostra, conforme Figura 3.6. O erro calculado nesta etapa permaneceu abaixo de 5%. Durante a realização dos ensaios, a temperatura medida foi de 23,9° C e a umidade relativa do ar no ambiente estava em 62%, ambas as medidas mantiveram-se constantes do início ao fim dos ensaios.

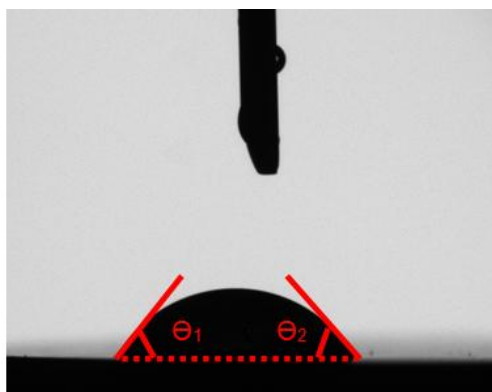


Figura 3.2: Gota de água deionizada sobre a superfície da amostra 5A. O ângulo medido refere-se à média dos ângulos  $\Theta_1$  (à esquerda) e  $\Theta_2$  (à direita) da gota, respectivamente.

Os ângulos de contato foram medidos a partir da aquisição de imagens e com auxílio de um software (CAM 200 Contact Angle Measurement System). Foram aguardados 60 segundos para a estabilização parcial da gota de água em contato com o substrato para obter uma medida, conforme variação do ângulo médio ( $\Theta$ ) em função do tempo, Figura 4.23.



### **3.3.4. Ensaios biológicos *in vitro*.**

Estes ensaios foram realizados com objetivo de distinguir quais superfícies apresentam melhores respostas com relação à expressão gênica dos osteoblastos humanos (HOb). O processo de expressão gênica frente às diferentes superfícies pode ser importante para elucidar potenciais mecanismos das respostas biológicas dos osteoblastos durante processos osteocondutivos, por exemplo, que são também regulados por características físico-químicas das superfícies dos materiais que estão em contato.

Todos os ensaios biológicos foram realizados sob a coordenação do Professor MD. Francesco Carinci na Seção de Cirurgia Maxilofacial e Plástica interna ao Departamento de Ciências Médico-cirúrgicas de Comunicação e Comportamento pertencente à Universidade de Ferrara (Ferrara, Itália). A realização dos procedimentos experimentais foi executada pela Doutora Annalisa Palmieri, responsável pelos experimentos *in vitro*. Esta etapa foi realizada no laboratório de Biologia Celular interno à Universidade de Ferrara.

Para mais informações com relação à metodologia envolvida consultar os trabalhos relacionados a estas análises, tais como: [35,47,78,94–98]

#### **3.3.5.1. Cultura primária de osteoblastos humanos (Human Osteoblasts - HOb)**

Durante cirurgia de um voluntário saudável com 55 anos, fragmentos de osso derivados do fêmur foram amostrados e transferidos para frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com soro bovino fetal a 20 %, antibióticos penicilina (100 U/ml) e estreptomina (100 µg/ml) (Sigma Aldrich, Inc., St Louis, Mo, EUA) e aminoácidos L-Glutamina (Sigma Aldrich, Inc., St Louis, Mo, EUA).

Em seguida, as células foram cultivadas a uma temperatura de 37 °C, em atmosfera controlada e mantida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura das células foi inicialmente trocado no dia seguinte e a cada três dias durante todo o período de cultivo. Após 15 dias, os pedaços de tecido ósseo foram removidos do frasco de cultura celular. As células foram então coletadas após os 30 dias de incubação.

### **3.3.5.2. Cultura celular**

Para o ensaio, osteoblastos humanos (Hob) em subconfluência foram tripsinizadas e semeadas em diferentes superfícies modificadas de discos de Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb. O meio foi continuamente trocado a cada três dias. As células foram cultivadas a uma temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. No sétimo e no décimo quinto dia do ensaio, as células foram então coletadas para extração do RNA.

### **3.3.5.3. Processamento de RNA**

As reações de transcrição reversa para síntese da fita de cDNA (DNA complementar) foram realizadas a partir de células lisadas provenientes da cultura celular descrita acima, utilizando o TaqMAN Gene Expression Cells-to-Ct Kit (Ambion Inc., Austin, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células cultivadas foram lisadas com tampão de lise e RNA aplicadas nesta solução. As células lisadas sofreram a transcrição reversa em cDNA através do Enzyme Mix RT e tampão RT adequado (Ambion Inc., Austin, TX, EUA). Finalmente, o cDNA foi amplificado por PCR em tempo real usando

TaqMan Gene Expression Master Mix e o ensaio específico concebido para os genes estudados.

#### 3.3.5.4. PCR em tempo real

A expressão gênica foi quantificada em tempo real utilizando RT-PCR. Os níveis de expressão de genes foram normalizados pela expressão do gene *housekeeping* RPL13A e foram expressos como *fold change* em relação à expressão de células das superfícies não tratadas (amostras 1A ou 1B ou 1C, quando forem os casos). A quantificação foi realizada com o método de cálculo de delta /delta (27). Os primers *forward* e *reverse* e as sondas para os genes selecionados foram desenhados usando software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e estão listadas na Tabela 2.4. Todas as reações de PCR foram realizadas em volume total de 20 µl usando o ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação contendo 10 µl de 2X TaqMan Universal Master PCR Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 400 nM de concentração de cada iniciador e 200 nM de sonda, e cDNA. O perfil de amplificação foi iniciado por 10 minutos de incubação a 95 °C, seguido por dois passos de amplificação de 15 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C, durante 40 ciclos. Todos os experimentos foram realizados incluindo controle não alvo, ou seja, sem DNA (*non template control* - NTC) para excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes utilizados.



## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Características das superfícies

#### 4.1.1. Morfologia da superfície (Topografia)

Por meio das imagens obtidas com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) é possível caracterizar a morfologia das superfícies formadas nos materiais Ti-CP, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb após os diferentes tratamentos de superfície propostos. Foram obtidas imagens da superfície em diferentes ampliações para verificar a variação de topografia de acordo com as escalas de aumento.

##### 4.1.1.1. Titânio comercialmente puro (Ti-CP)

A seguir estão expostas análises micrográficas de superfícies de Ti-CP submetidas ao processo de lixamento, descrita como superfície da amostra 1A na Tabela 3.1.

Na Figura 4.1, podem ser notadas marcas unidirecionalmente distribuídas provocadas pelo lixamento, Figuras 4.1(a) e 4.1(b). Este processo foi realizado em todas as amostras, previamente ao tratamento químico com intuito de ser a *superfície controle* ou *referência* e que simulasse uma superfície usinada.

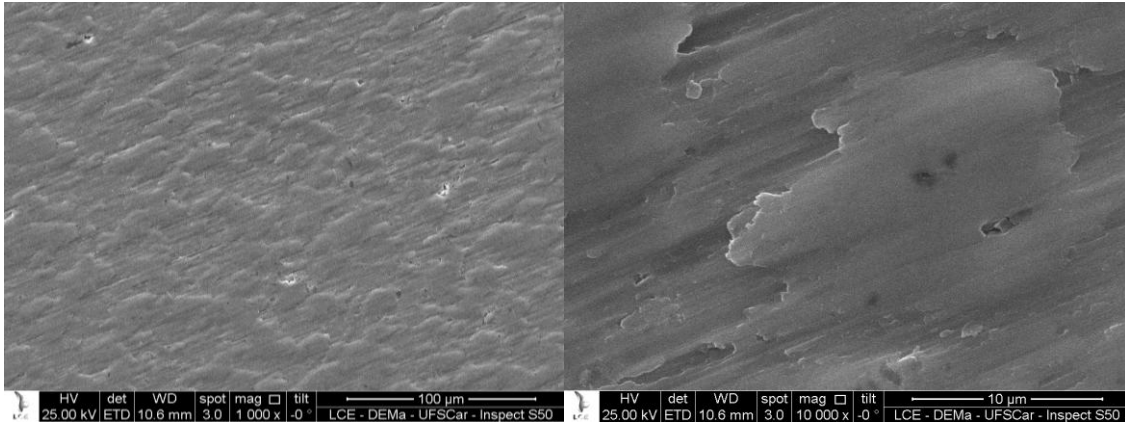


Figura 4.1: Imagens da surface da amostra 1A de Ti-CP lixada, com dois aumentos no MEV: (a)1000x and (b)10000x (sentido horário).

A amostra 2A, constituída de Ti-CP, após tratamento com ácido clorídrico apresentou sobre sua superfície uma estrutura com porosidades distribuídas uniformemente nos aumentos de 1000 a 10000 vezes (Figura 4.2a a 4.2c), assemelhando-se a estrutura de *dimples* encontradas em superfície de fratura de materiais dúcteis. Em aumentos superiores, Figura 4.2(d), observa a formação de uma morfologia de *alpes* da ordem de microns ( $1\ \mu\text{m}$ ) e a formação de porosidade na superfície dos *alpes* que diminuem fractalmente no interior dos poros. Os poros fractais formam, portanto, *topografia micrométrica e submicrométrica*, neste caso.

Superfície de Ti-CP com morfologia semelhante a da amostra 2A foram descritas por Buser *et al.* (1998) para implantes jateados com areia e atacados com HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [99].

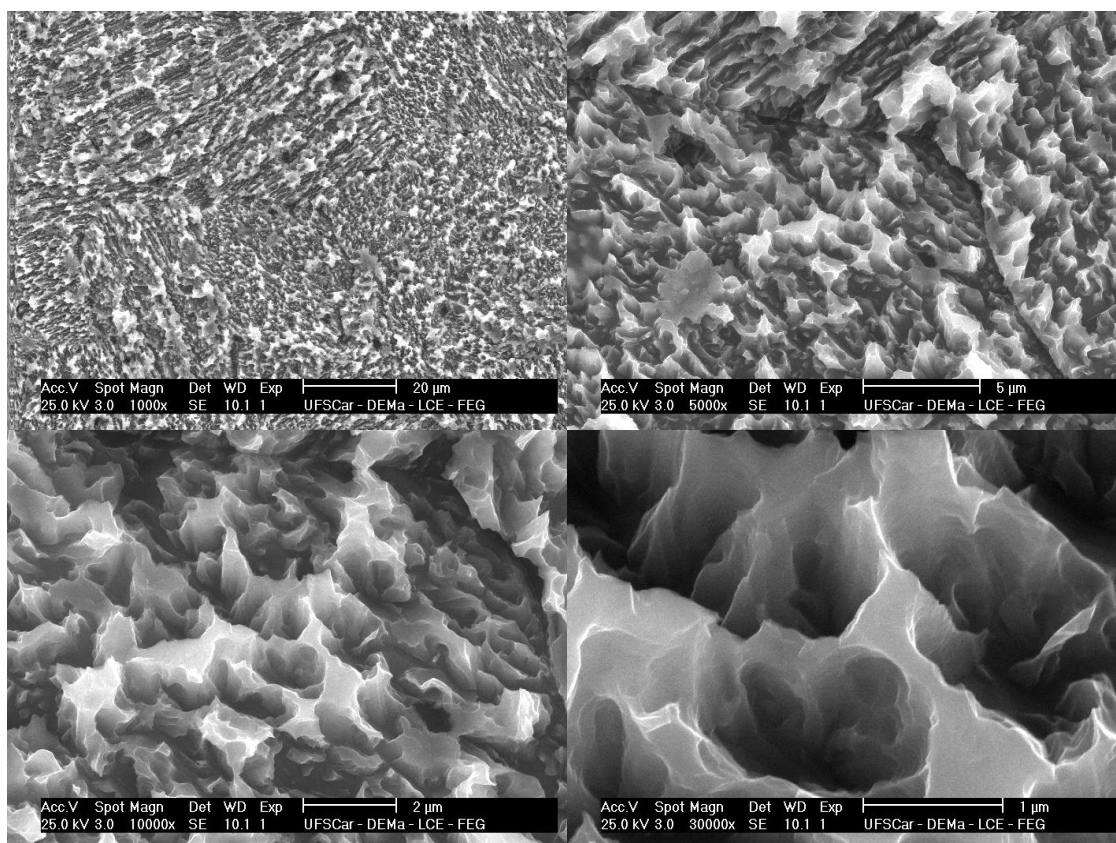


Figura 4.2: Imagens da superfície da amostra 2A (Ti-CP #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

Analisando as imagens da Figura 4.3a e 4.3b nota-se que em magnificações baixas a superfície da amostra 3A apresenta a formação de estrutura porosa uniformemente recoberta por uma camada de material com aparência de *esponja* observada em aumentos maiores (Figs. 4.3c e 4.3d). A estrutura porosa foi obtida por meio do ataque com ácido clorídrico e a estrutura na forma esponjosa, constituída principalmente por titanato de sódio, foi formada devido ao tratamento alcalino em solução de hidróxido de sódio, as variáveis do procedimento estão listadas na Tabela 3.1.

A topografia apresentada por essa amostra no mesmo plano geométrico de análise apresenta estrutura formada na escala micrométrica e submicrométrica. Desta forma, a aparência de estruturas menores deve-se ao fato das camadas de esponjas se sobreporem e darem efeito de estruturas nanométricas, isso pode ser comprovado aumentando o contraste da imagem

da Figura 4.3 d e gerando, portanto a imagem da Figura 4.3 e, onde prevalecem características, micrométrica e submicrométrica de topografia.

Resultados similares foram obtidos por Nebe *et al.* (2008) com um procedimento muito semelhante de tratamento com HCl e NaOH, no entanto, os autores classificaram a superfície como topografia nanoestruturada que não foi adotada neste trabalho, por julgar que as características topográficas são acima de 100nm.

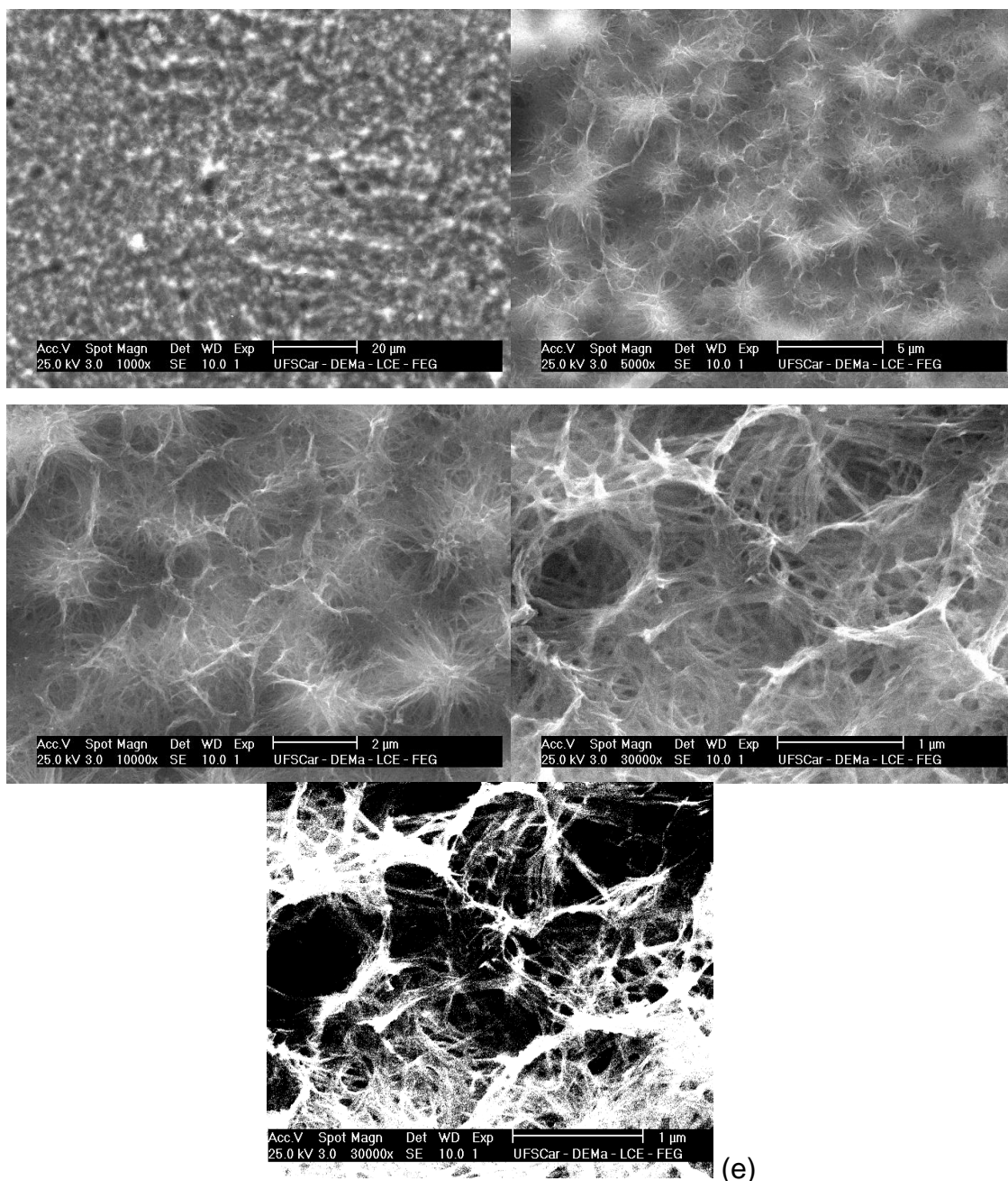




Figura 4.3: Imagens da surface da amostra 3A (TiCP#1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000, (d) 30000 vezes e (e) 30000 vezes com aumento da intensidade de contraste (sentido horário).

As imagens da Figura 4.4 apresentam a superfície da amostra 4A modificada com ataque de ácido fosfórico. A superfície apresentou porosidades esféricas e uniformemente distribuídas. Há a presença de poros nas escalas de dimensões micrométrica e submicrométrica com formação de topografia apresentando distribuição geométrica de poros de forma fractal, desde poros contendo diâmetros com cerca de 12  $\mu\text{m}$  a poros em torno de 500 nm, ocasionado pelo ataque com ácido. Trata-se de uma superfície que apresenta topografia micrométrica e submicrométrica.

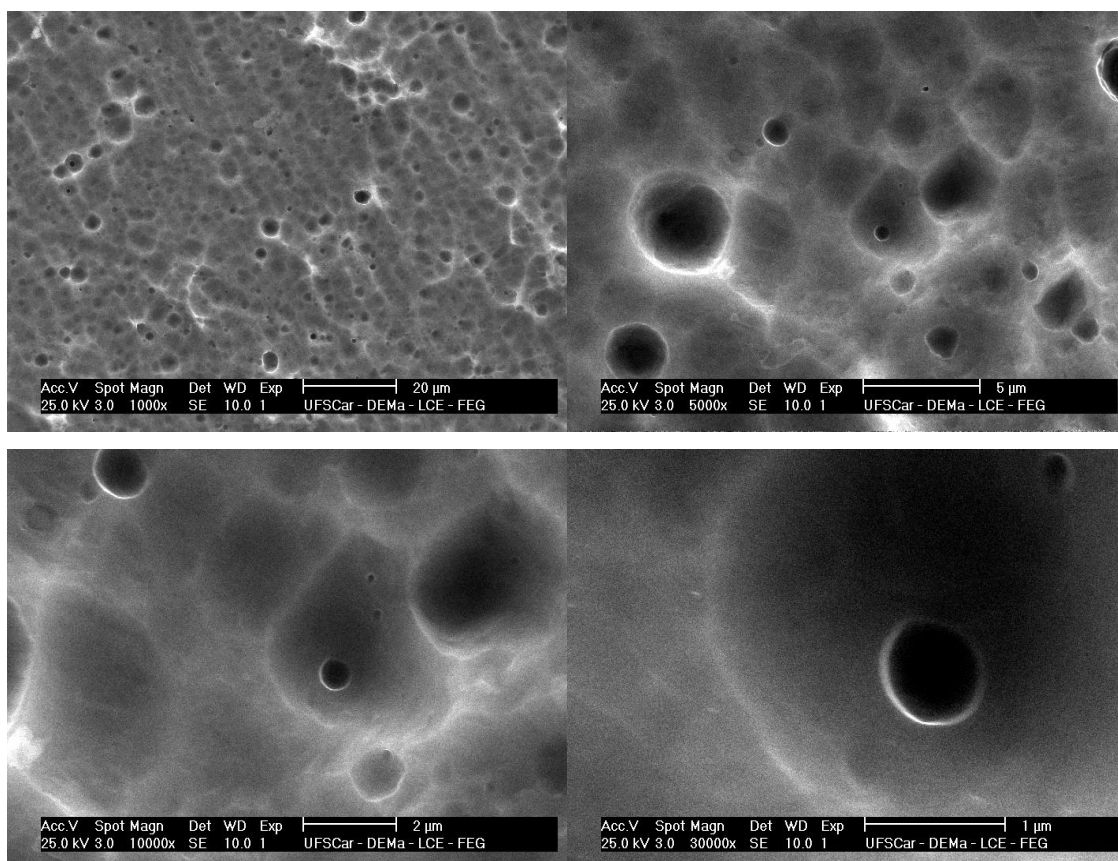


Figura 4.4: Imagens da surface da amostra 4A (TiCP#1500+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

A amostra 5A da Figura 4.5 apresenta porosidade uniformemente distribuída sobre sua superfície. Na Figura 4.5d, com 30000 vezes de aumento, observa-se a formação da estrutura em forma de esponja depositada na superfície devido ao tratamento alcalino. Temos, portanto, uma superfície com topografia microestruturada porosa e submicroestruturada na forma de esponja.

Pattanayak *et al.* (2011) descreveram como camadas nanoestruturadas a morfologia de superfícies de amostras de Ti-CP lixadas com partículas de SiC na granulometria #400 e tratadas com NaOH a uma concentração de 5 mol.L<sup>-1</sup> durante 24 horas [100], semelhantes às encontradas na amostra 5A, que por sua não foi classifica aqui como nanotopográfica.

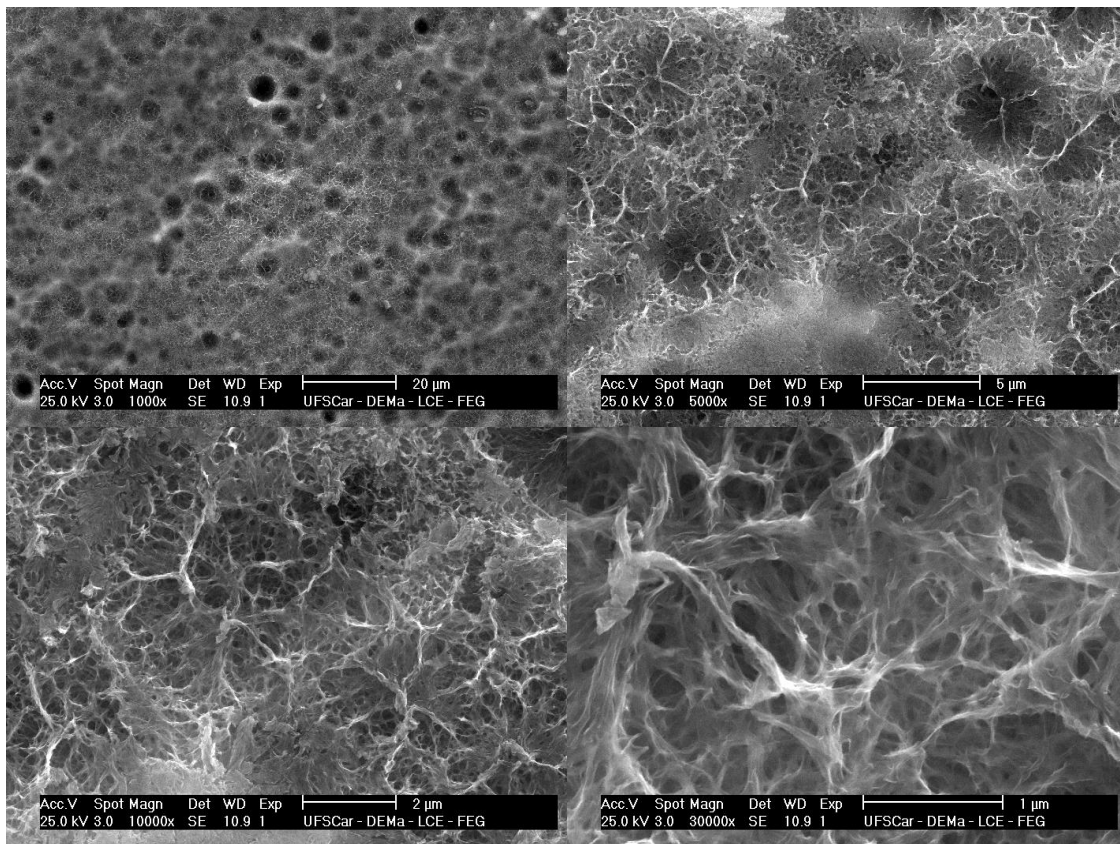


Figura 4.5: Imagens da surface da amostra 5A (TiCP#1500+ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes. (sentido horário).

Com bases nas micrografias obtidas com o microscópio eletrônico de varredura das diferentes superfícies no Ti-CP foi proposta a Tabela 4.1 para auxiliar na avaliação da existência de topografias em três grandezas dimensionais micrométricas, submicrométricas e nanométricas distribuídas uniformemente sobre as superfícies das amostras.

Tabela 4.1: Resumo das características para as amostras de Ti-CP.

Amostras	Escala de alteração das superfícies			Características Morfológicas
	Micrométrica	Submicrométrica	Nanométrica	
1A	Não	Não	Não	Marcas de lixamento ou deformação em um sentido.
2A	Sim	Sim	Não	Porosidades, estrutura semelhante à <i>dimples ou alpes</i> .
3A	Sim	Sim	Não	Estrutura em forma de esponjas com diâmetros com cerca de 1 $\mu\text{m}$ .
4A	Sim	Sim	Não	Porosidade esférica com medidas de diâmetros fractalmente distribuídos.
5A	Sim	Sim	Não	Estrutura em forma de esponjas distribuídas e unidas com cerca de 1 $\mu\text{m}$

#### 4.1.1.2. Titânio-6Alumínio-4Vanádio (Ti-6Al-4V-ELI)

Na Figura 4.6 (a) observa-se a superfície da amostra 1B após ser lixada com lixa #1500 e que apresenta marcas de lixamento e deformação,

proveniente deste processo, maior aumento em *(b)*. O referido processo de lixamento foi realizado em todas as amostras previamente aos tratamentos químicos, e foi utilizada com amostra controle.

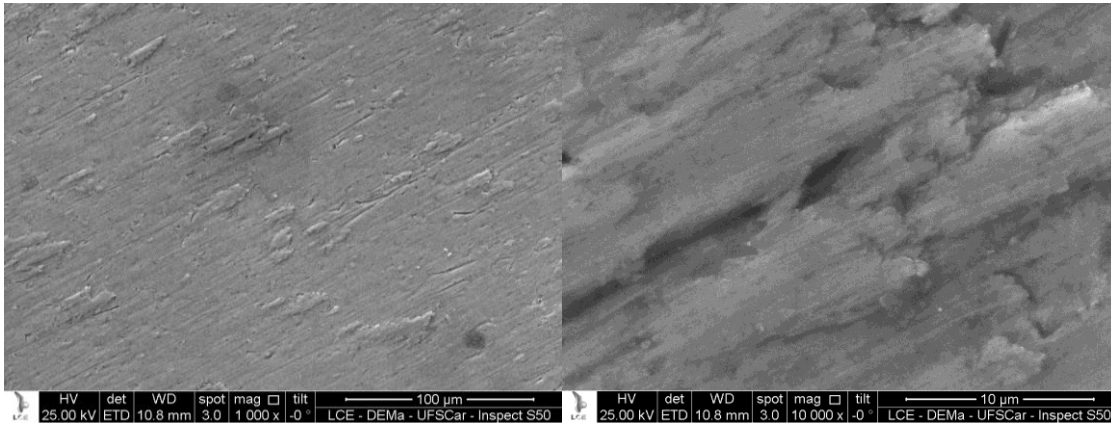


Figura 4.6: Imagens da surface da amostra 1B (Ti6Al-4V #1500) em dois aumentos no MEV: *(a)* 1000 e *(b)* 10000 vezes (sentido horário).

Por meio da Figura 4.7 *(a)* é possível observar que o tratamento ácido aplicado à superfície lixada, alterou a morfologia da superfície formando poros uniformemente distribuídos em 1000X de aumento, amostra nomeada 2B. No entanto, em maiores aumentos (10000X e 30000X) verifica-se que não há formação de topografia submicrométrica.

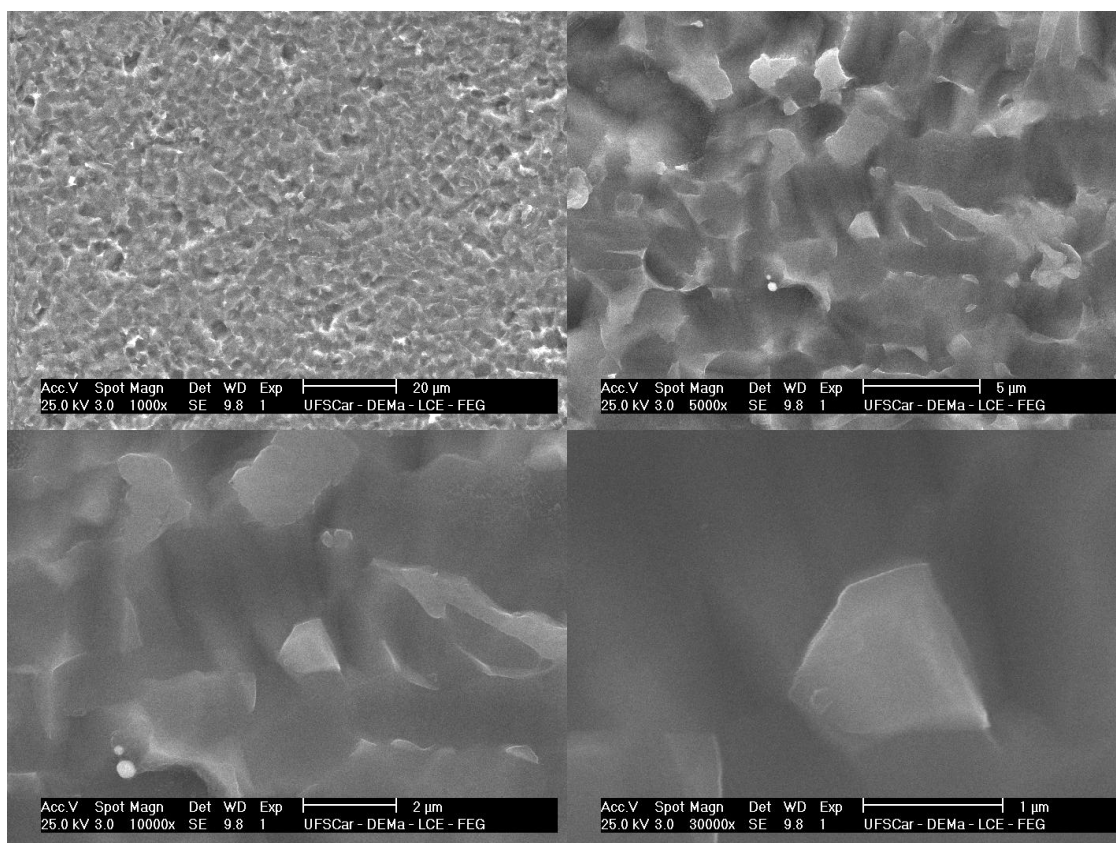


Figura 4.7: Imagens da superfície da amostra 2B (Ti6Al-4V #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

Em adição, quando a amostra 2B, tratada com ácido, é submetida ao tratamento alcalino (amostra 3B) ela passa a apresentar uma morfologia homogênea e organizada sobre a sua superfície, observada entre 1000 a 10000 vezes de aumento, o que configura formação de micro e submicrotopografia em forma de esponja, conforme imagens da Figura 4.8 (a-c). Por meio da Figura 4.8 (d) é possível observar que o tratamento alcalino não produziu a formação nanotopográfica. Resultados semelhantes de topografia foram encontrados em superfícies de amostra de Ti-CP submetidas ao tratamento alcalino, amostras 3A e 5A.

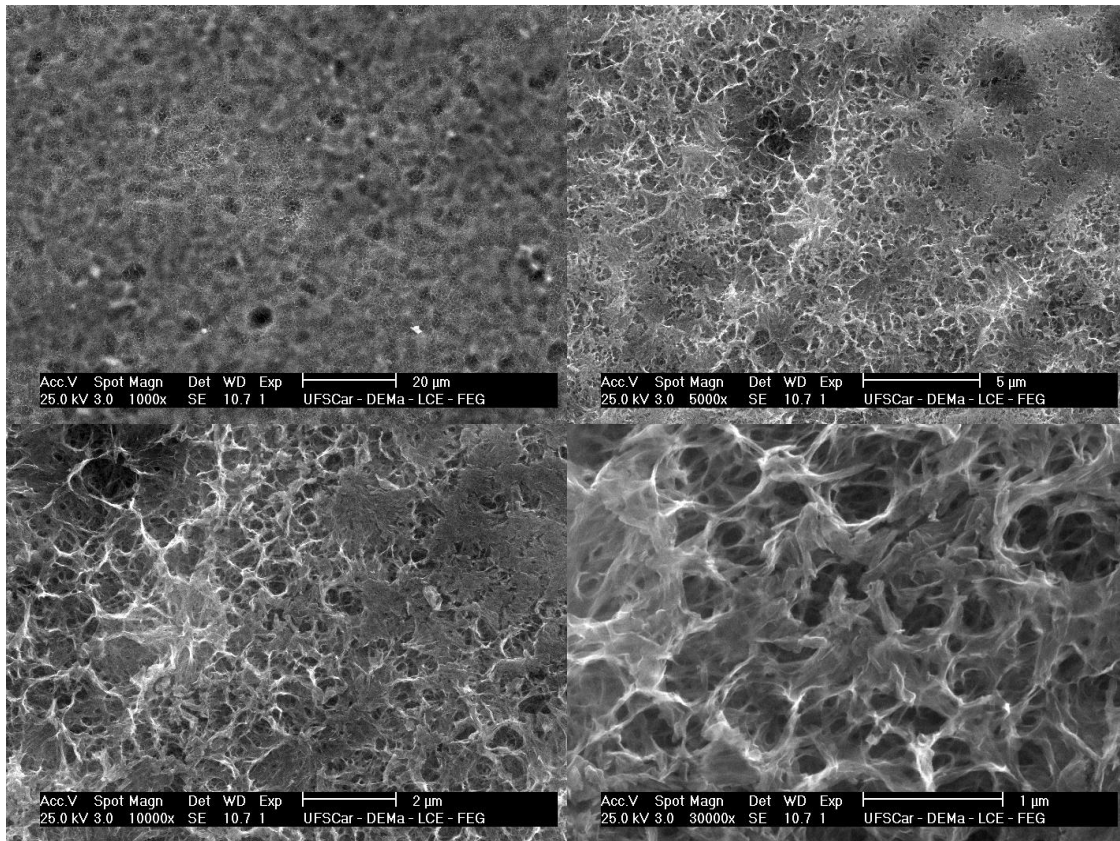


Figura 4.8: Imagens da superfície da amostra 3B (Ti6Al-4V #1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

O tratamento 4B provocou à superfície da amostra lixada, formação de poros homogeneamente distribuídos para 1000 e 5000 vezes de aumento.

Observando com 10000 vezes de aumento nota-se a presença de algumas estruturas em forma de linha distribuída sobre a superfície homogeneamente. Desta forma, a amostra 4B apresentou microtopografia, porém não apresentou características nanométricas organizadas, conforme imagens pertencentes à Figura 4.9.

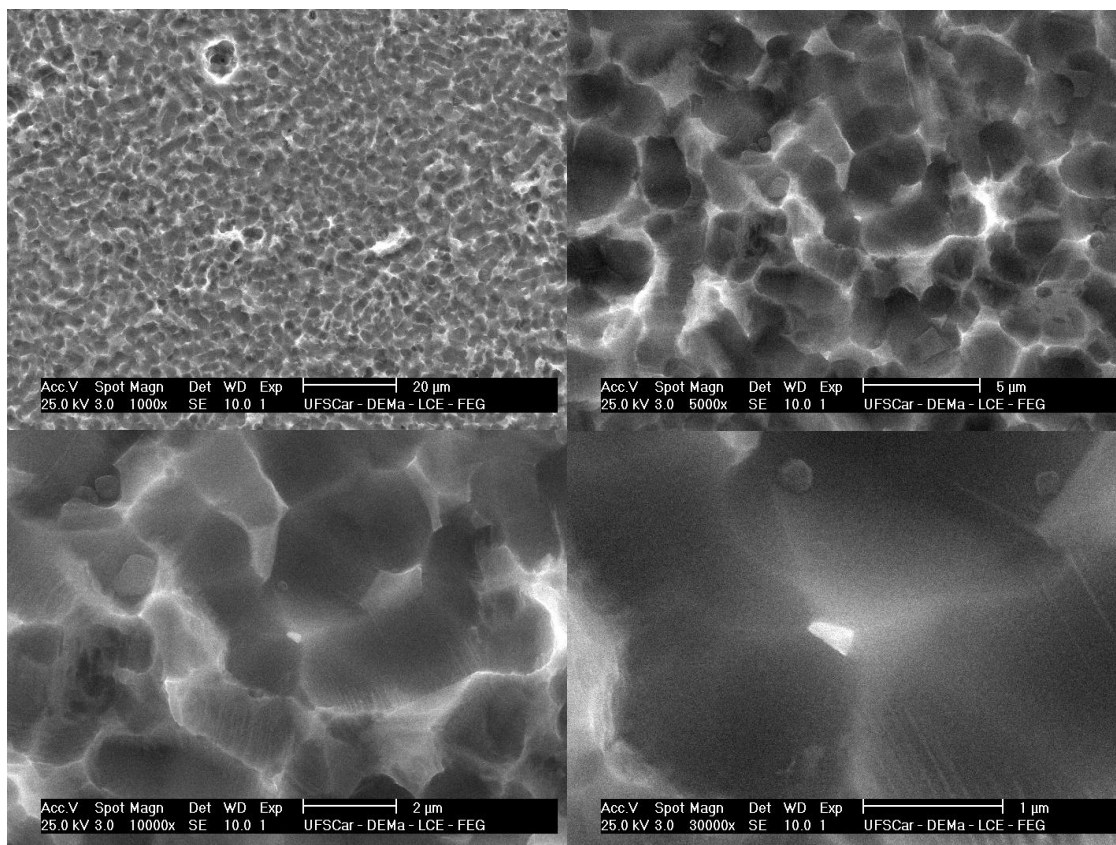


Figura 4.9: Imagens da superfície da amostra 4B ( $\text{Ti6Al-4V} \#1500+\text{H}_3\text{PO}_4$ ) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

As imagens da Figura 4.10 referem-se à amostra 5B onde aparece sua superfície uniformemente recoberta com uma estrutura homogênea em forma de esponja distribuída apresentando topografia nas dimensões micro e submicrométricas.

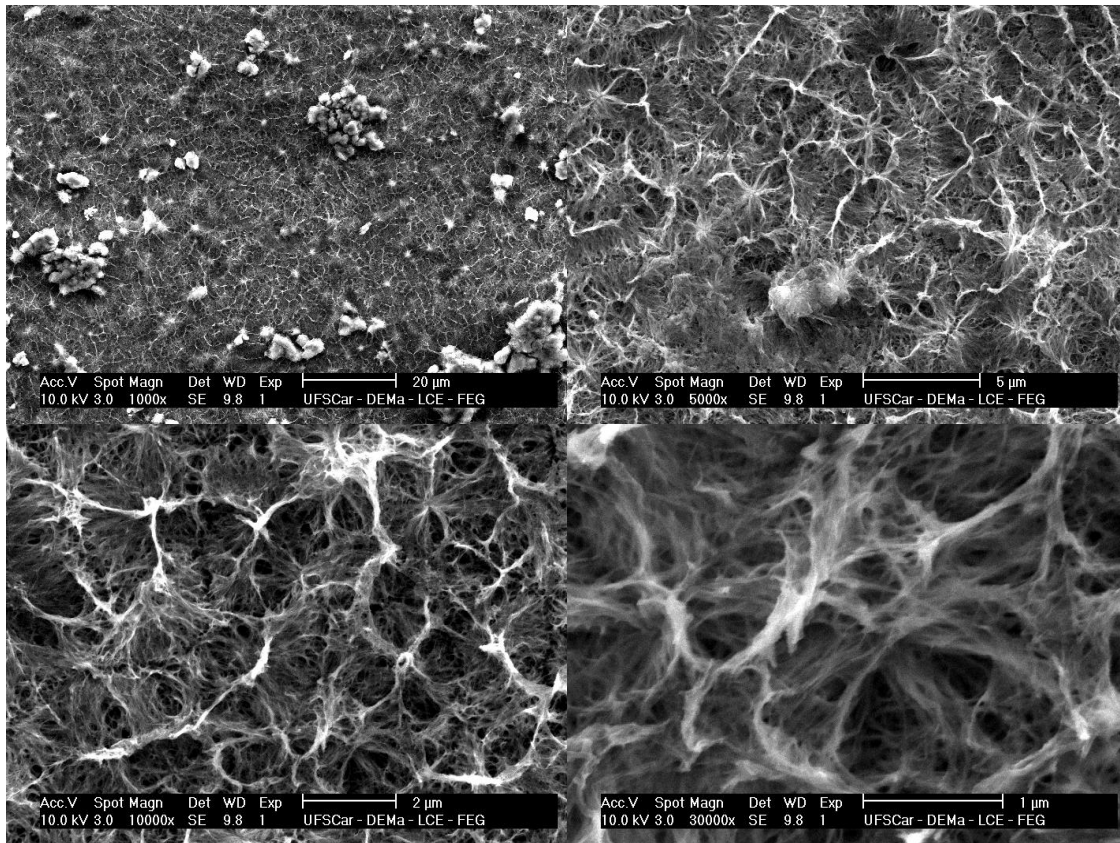


Figura 4.10: Imagens da superfície da amostra 5B (Ti6Al-4V #1500+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+NaOH) com quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

Com bases nas micrografias obtidas com o microscópio eletrônico de varredura das diferentes superfícies no Ti-6Al-4V foi proposta a Tabela 4.2 para auxiliar na avaliação da existência de topografias em três grandezas dimensionais, a saber, micrométricas, submicrométricas e nanométricas distribuídas uniformemente sobre as superfícies das amostras.

Tabela 4.2: Resumo das características para as amostras de Ti-6Al-4V.

Amostras	Escala de alteração das superfícies			Características
	Micrométrica	Submicrométrica	Nanométrica	
1B	Não	Não	Não	Marcas de lixamento ou deformação no sentido.



2B	Não	Não	Não	Porosidade sem formação de topografia nestas escalas.
3B	Sim	Sim	Não	Estrutura em forma de esponjas com diâmetros com cerca de 1 $\mu\text{m}$ .
4B	Sim	Não	Não	Porosidade ou pits aleatórios.
5B	Sim	Sim	Não	Estrutura em forma de esponjas distribuídas e unidas com cerca de 1 $\mu\text{m}$

#### 4.1.1.3. Titânio-6Alumínio-7Nióbio (Ti-6Al-7Nb)

A Figura 4.11 contém a superfície da amostra 1C onde se observam algumas linhas de deformação e de lixamento sobre a superfície. Este processo foi realizado em todas as amostras previamente ao tratamento químico.

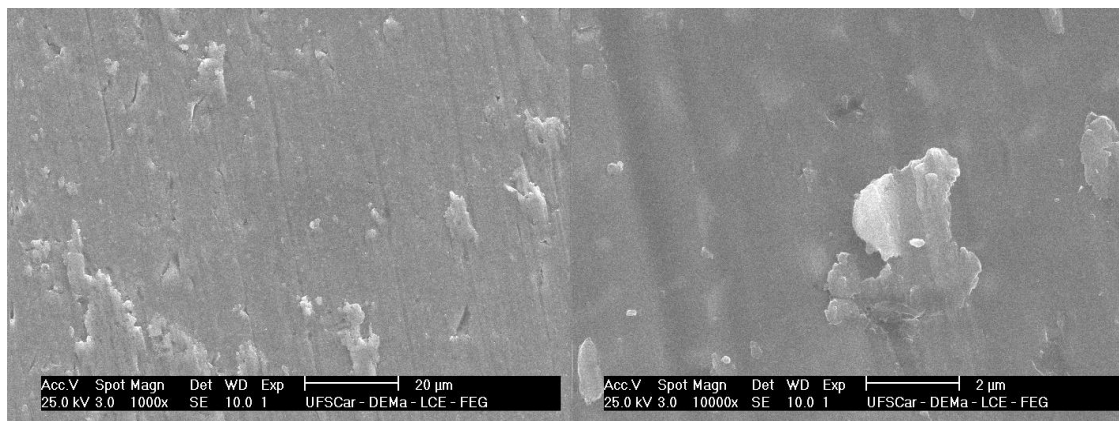


Figura 4.11: Imagens da superfície da amostra 1C (Ti6Al-7Nb #1500) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

A Figura 4.12 mostra que o tratamento com ácido clorídrico aplicado a superfície 2C alterou a morfologia da superfície uniformemente no aumento de 1000X. No entanto, em maiores aumentos (10000X e 30000X) a superfície da amostra passa a não ter morfologia homogênea, ou seja, não há topografia na escala nanométrica, conforme, Figura 4.12.

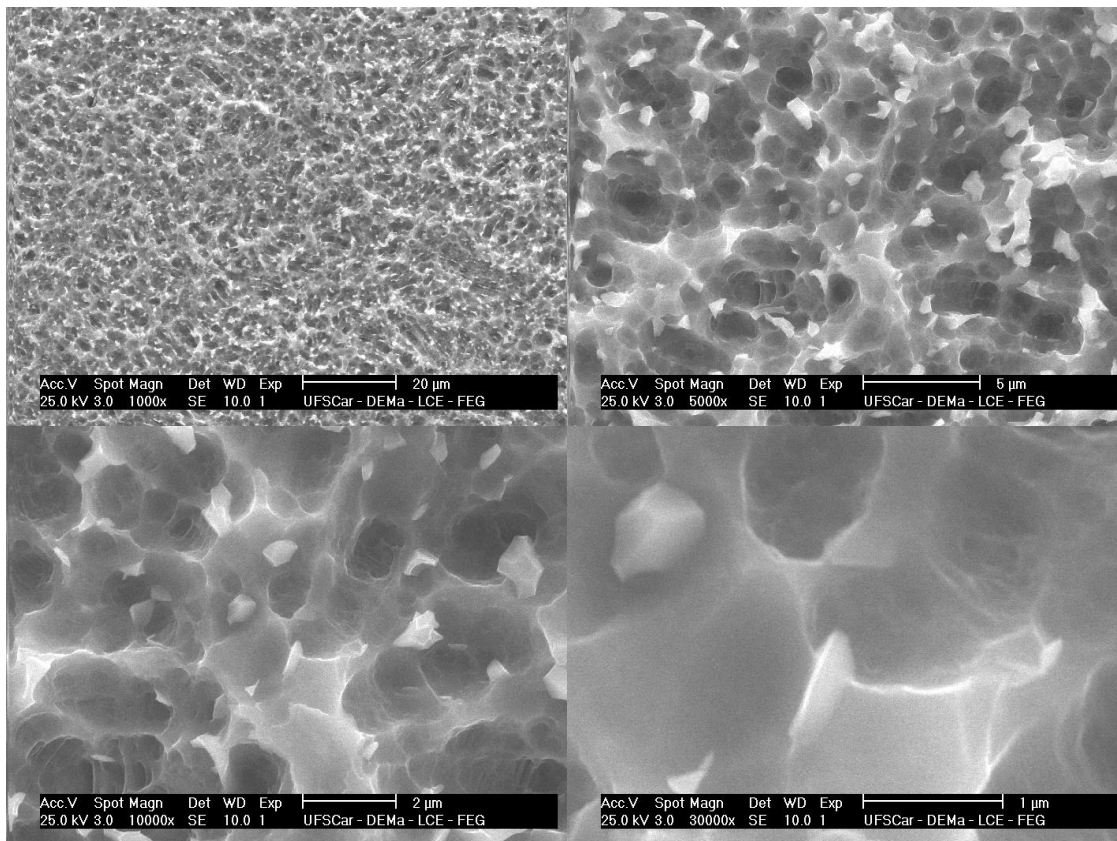


Figura 4.12: Imagens da surface da amostra 2C (Ti-6Al-7Nb #1500+HCl) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

Com base na Figura 4.13, observamos a superfície da amostra 3C. Nota-se a formação de uma estrutura porosa em menores aumentos, portanto há características microtopográficas. Para aumentos maiores aparece a formação de uma estrutura nanométrica homogeneamente distribuída na forma

de “coral” ou “colméia de abelhas” com tamanho de poros ao redor de 100 nm. Essa modificação de superfície apresenta a formação de microtopografia e nanotopografia em Ti-6Al-7Nb como pode observado com 30000 vezes de aumento ao MEV.

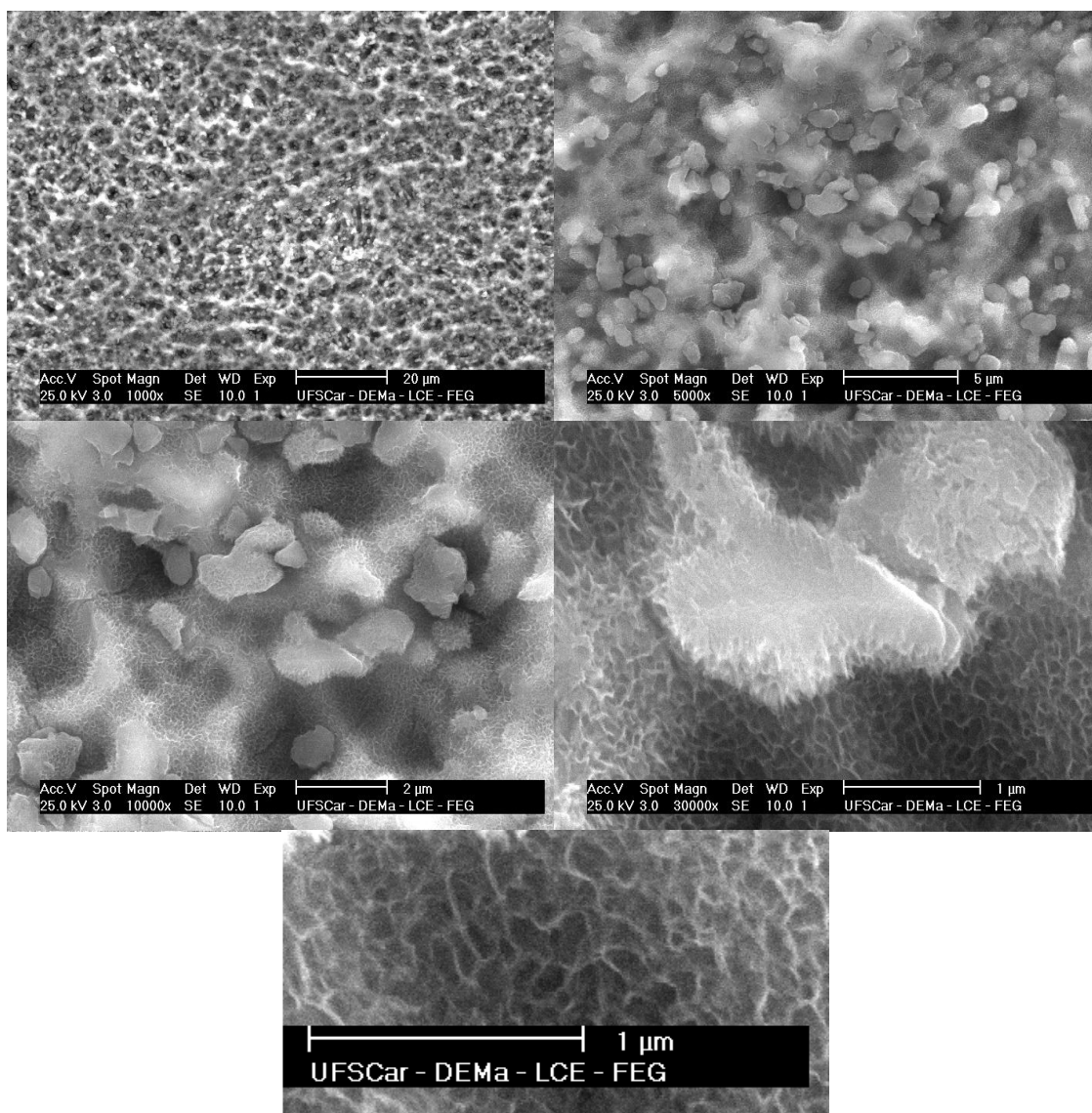


Figura 4.13: Imagens da surface da amostra 3C (Ti-6Al-7Nb #1500+HCl+NaOH) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes e (e) ampliada do original (sentido horário).

De acordo com a Figura 4.14 houve a formação de porosidade distribuída homogeneamente sobre a superfície da amostra 4C, formando uma

microtopografia. Em aumentos maiores verifica-se a presença de estrutura em forma de linhas (listrada), podendo, portanto, observar características nanométricas de topografia.

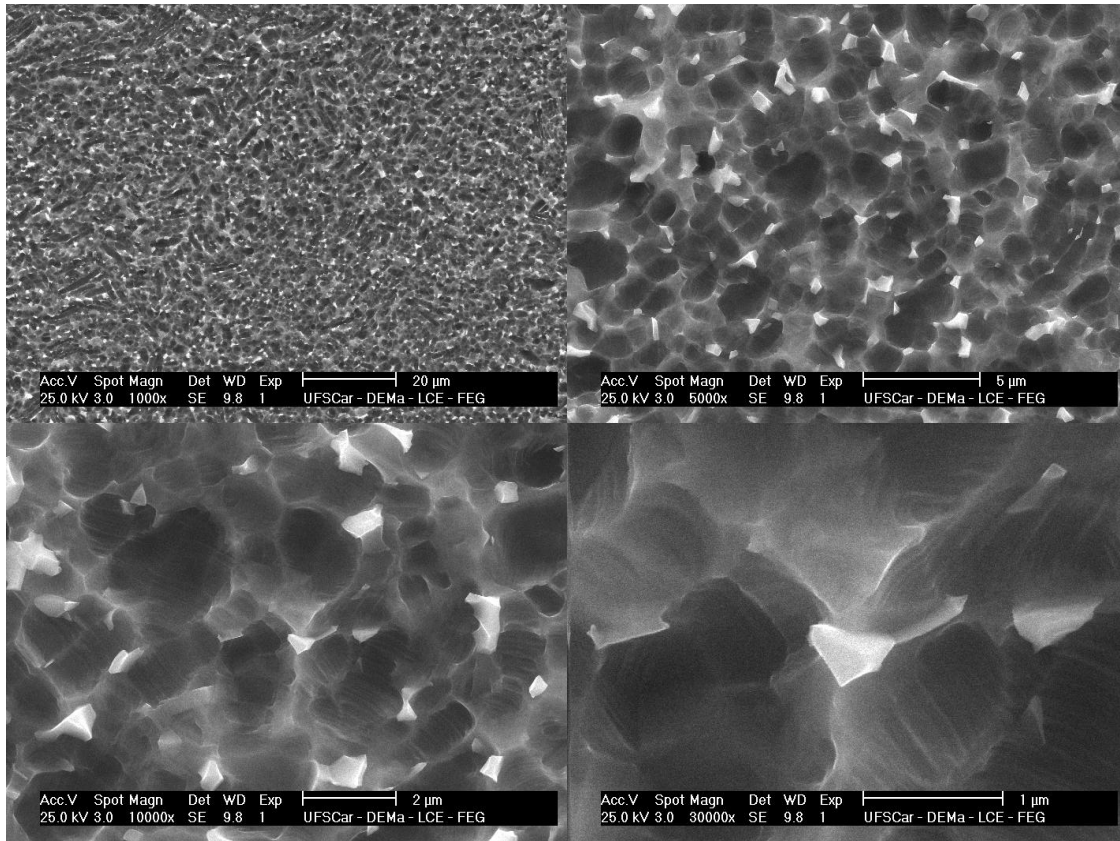


Figura 4.14: Imagens da superfície da amostra 4C (Ti-6Al-7Nb #1500+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) em quatro aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000 e (d) 30000 vezes (sentido horário).

A superfície da amostra 5C, onde se observa a formação de uma estrutura porosa com aumentos de 1000 e 5000 vezes, pode ser vista na Figura 4.15 (a) e (b). Em maiores aumentos observa-se a formação de uma estrutura em forma de corais ou colmeias de abelha distribuída uniformemente sobre a superfície da amostra 5C. Na Figura 4.15 (e) com 50000 vezes de aumento é possível observar que a superfície apresenta estruturas porosas em formas de coral com diâmetros com cerca de 100 nm que se repetem homogeneamente sobre a superfície da amostra. Portanto, a amostra 5C apresenta topografia em escalas micrométricas e nanométricas.

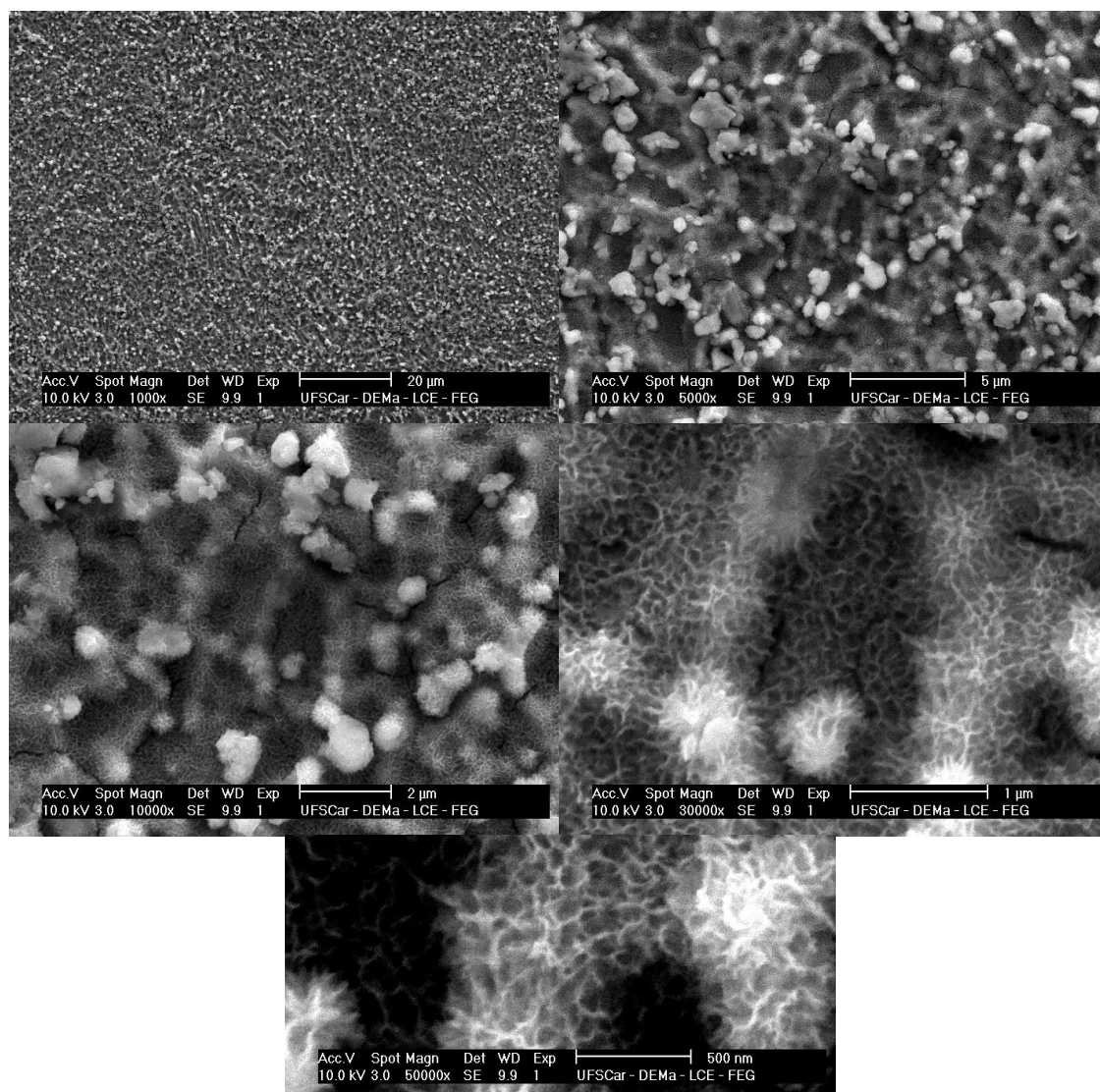


Figura 4.15: Imagens da superfície da amostra 5C (Ti-6Al-7Nb #1500+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+NaOH) em cinco aumentos no MEV: (a) 1000, (b) 5000, (c) 10000, (d) 30000 e (e) 50000 vezes (modificada do original) (sentido horário).

Com bases nas micrografias obtidas com o microscópio eletrônico de varredura das diferentes superfícies do Ti-6Al-7Nb foi proposta a Tabela 4.3 para auxiliar na avaliação da existência de topografias em três grandezas dimensionais: micrométricas, submicrométricas e nanométricas, distribuídas uniformemente sobre as superfícies das amostras.

Oliveira e Nanci (2004) obtiveram após um tratamento simples com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superfícies em Ti-CP e Ti-6Al-4V com morfologias semelhantes às encontradas nas amostras 3C e 5C. Há diferenças com relação ao tamanho de

poros, no entanto, ambas apresentaram nanotopografias e induziram comportamentos biológicos de interesse [8].

Tabela 4.3: Resumo das características para as amostras de Ti-6Al-7Nb.

Amostras	Escala de alteração das superfícies			Características morfológicas
	Micrométrica	Submicrométrica	Nanométrica	
1C	Não	Não	Não	Marcas de lixamento ou deformação em um sentido.
2C	Sim	Sim	Não	Formação de pits nas escalas micro e submicro
3C	Sim	Não	Sim	Estrutura em forma de coral homogênea, poros de 100 nm ou maiores.
4C	Sim	Não	Sim	Porosidades micrométricas e listras entre cerca de 100 nm.
5C	Sim	Sim	Sim	Estrutura em forma de coral homogênea com poros menores de 100 nm

#### 4.1.2. Rugosidade

Neste trabalho foi também incluído os valores de Rugosidade média  $R_z$  para auxiliar na exposição dos resultados e nas discussões.

Os resultados encontrados nas Figs. 4.16 a 4.18 referem-se aos gráficos distribuídos para cada material após diferentes tratamentos de superfície.

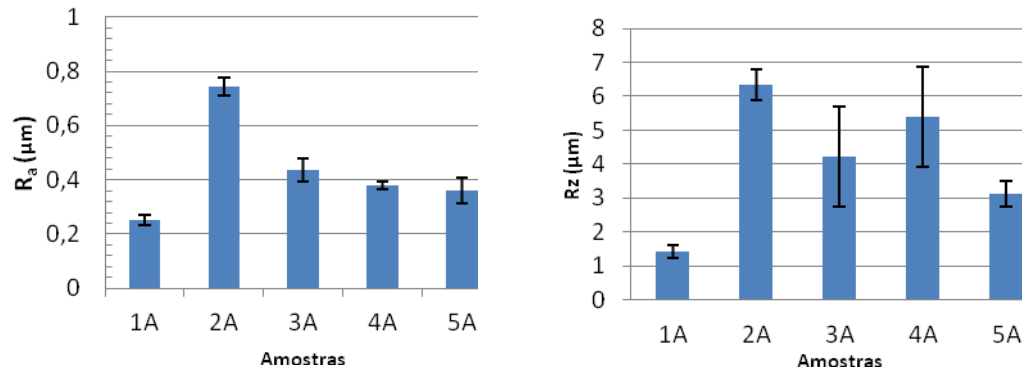


Figura 4.16: gráfico representando as medidas de rugosidade,  $R_a$  e  $R_z$  para as amostras de Ti-CP.

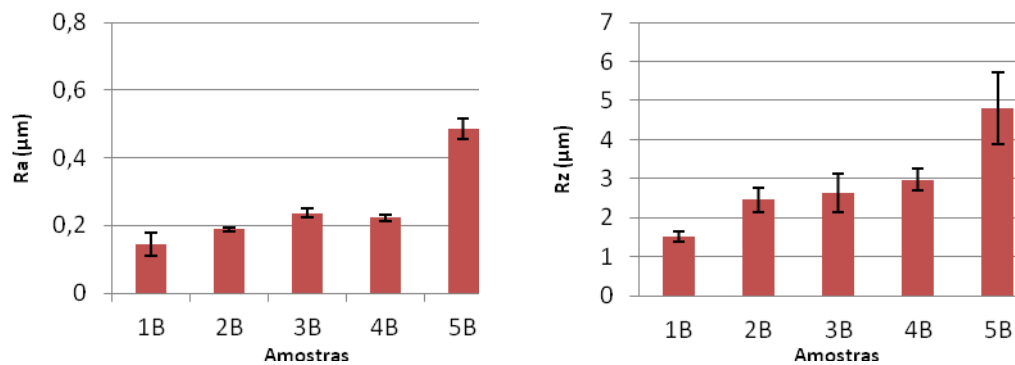


Figura 4.17: gráfico representando as medidas de rugosidade,  $R_a$  e  $R_z$  para as amostras de Ti-6Al-4V.

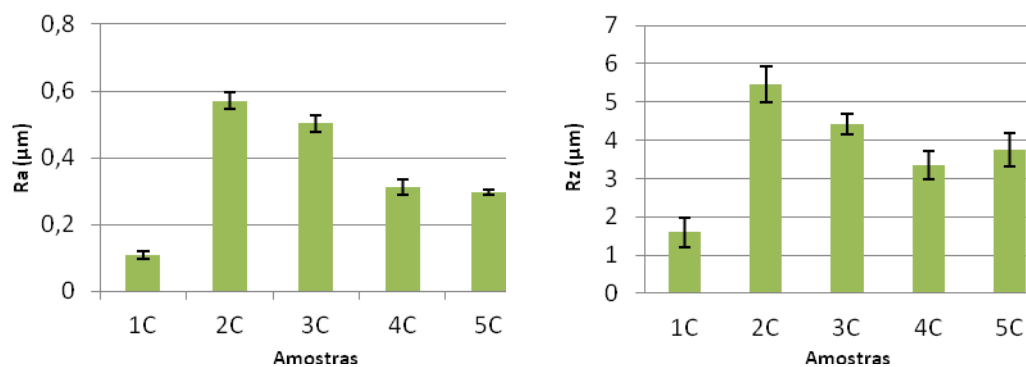


Figura 4.18: gráfico representando as medidas de rugosidade,  $R_a$  e  $R_z$  para as amostras de Ti-6Al-7Nb.

O parâmetro  $R_a$  para medida de rugosidade média é amplamente utilizado em estudos referentes à superfície de biomateriais e a partir dos valores desta propriedade, podemos ter uma classificação proposta por Albrektson e Wennerberg (2004) quanto às condições de rugosidade da superfície, conforme se segue [101]:

- Lisa: definida com medidas de  $R_a$  menores que  $0,5 \mu\text{m}$ . Implantes com superfícies polidas possuem essa característica.
- Minimamente áspera: definida no intervalo de  $R_a$  entre  $0,5$  e  $1,0 \mu\text{m}$ . Estão contidas as superfícies usinadas de implantes.
- Moderadamente áspera: valores de  $R_a$  compreendidos entre  $1,0$  e  $2,0 \mu\text{m}$ . Implantes atacados com ácido, anodizados ou jateados se enquadram nesta categoria.
- Áspera: valores de  $R_a$  maiores que  $2,0 \mu\text{m}$ . Implantes tratados com spray de plasma possuem valores desta magnitude.

A literatura sugere que o aumento de rugosidade tende a possibilitar maior adesão de células, porém, os resultados evidenciam que a existência de rugosidade na escala nanométrica apresenta respostas celulares mais pronunciadas [102].

#### **4.1.3. Área efetiva da superfície**

Os tratamentos das superfícies dos materiais estudados provocaram aumento da área superficial devido ao aumento da rugosidade das amostras modificadas durante os experimentos.

Com auxílio de um microscópio confocal a laser foi possível calcular uma região da amostra de  $643 \mu\text{m} \times 643 \mu\text{m}$  o que corresponde à área de



413449  $\mu\text{m}^2$ . A área efetiva, medida, refere-se à área equivalente a um quadrado com aresta de 643  $\mu\text{m}$  e a área obtida com o microscópio corresponde aproximadamente à área da superfície do material levando em consideração as irregularidades ou diferentes morfologias presentes, ou seja, devido à existência de rugosidade ou topografia.

No entanto, a limitação da medida deve-se à resolução do equipamento que consiste em cerca de 0,2  $\mu\text{m}$  e que possibilita concluir que o equipamento não distingue bem as características nanométricas e portanto os valores atribuídos à área da superfície são restrito as escalas submicro e micrométricas.

Na Tabela 4.4 estão listados os resultados referentes à área medida pelo microscópio confocal a laser e as porcentagens de aumento da área com relação à área da superfície projetada em um plano. De forma correspondente temos os resultados em porcentagem de aumento da área das superfícies projetados na Figura 4.22.

Com esses resultados verifica-se que a amostra 2A possui um aumento pronunciado de área (108%) e que as amostras da liga Ti-6Al-7Nb de forma geral tiveram aumentos de área pronunciados. Além disso, a amostra 5B teve a área aumentada em 54%, maior variação para a liga Ti-6Al-4V.

Tabela 4.4: Áreas da superfície e a porcentagem de aumento com relação à área geométrica do plano, medidas com microscópio confocal a laser para todas as amostras do estudo.

<b>Amostras</b>	<b>Área da superfície</b>	<b>% de aumento da área geométrica</b>
1A	432685	5
1B	434937	5
1C	426754	3
2A	861880	108
2B	496158	20
2C	720885	74
3A	585654	42

3B	530522	28
3C	696254	68
4A	527958	28
4B	523803	27
4C	691780	67
5A	558704	5
5B	628109	52
5C	596638	44

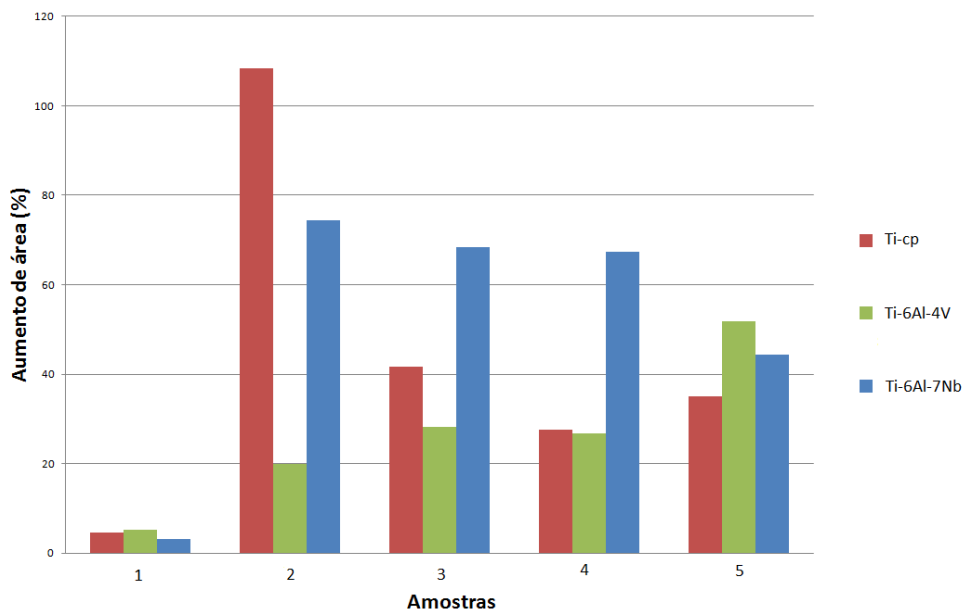


Figura 4.19: Porcentagem de aumento das áreas de todos os materiais e todos os tratamentos de 1 a 5 descritos na Tabela 3.1.

#### 4.1.4. Composição química

A caracterização de superfície por meio de microanálise com EDS (espectroscopia com energia dispersiva de raios-X) foi realizada em cada uma das superfícies das amostras para a verificação da existência dos elementos contaminantes utilizados nos tratamentos químicos.

Os resultados revelaram os elementos das composições nominais com adição das contaminações provenientes dos ataques ácidos: presença de cloro devido à incorporação de cloretos e de fósforo proveniente do ataque com ácido fosfórico. Os tratamentos alcalinos causaram a incorporação de sódio às superfícies e a incorporação do elemento cálcio, possivelmente oriundo da água utilizada para preparar as soluções.

Após a conclusão dos ensaios com as células osteoblásticas, com 15 dias de incubação, as células foram removidas da superfície e transferidas para a etapa de avaliação com RT-PCR. As amostras foram então lavadas com água deionizada e as microanálises com EDS foram realizadas nas superfícies para avaliar em adição os reflexos dos ensaios *in vitro* sobre composição química das superfícies. De acordo com as Figuras 4.20, 4.21 e 4.22 houve a ocorrência do aumento da incorporação do elemento cálcio sobre as superfícies das amostras 3A, 3B, 3C, 5A, 5B e 5C, ou seja, daquelas atacadas com ácido (HCl ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e tratadas alcalinamente com NaOH.

Com isso, é difícil certificar a origem do cálcio ligado à superfície, podendo ser proveniente tanto de contaminação da água utilizada durante o tratamento com NaOH, mas pode ser proveniente de uma possível mineralização óssea realizada pelos osteoblásticos, como sugerido pelos resultados de EDS, Figuras 4.20, 4.21, 4.22, que apontam um aumento da concentração de cálcio após os ensaios com cultura de osteoblastos. Assumindo esta hipótese correta, pode-se perceber que nestas amostras a expressão gênica de ALPL foi consideravelmente elevada, o que torna essa hipótese elegível. Outros autores reportaram esse fenômeno de osteogênese em ensaios com células *in vitro* [103]. No entanto, como já havia a contaminação com cálcio nas amostras anteriormente a realização dos ensaios *in vitro*, análises minuciosas devem ser executadas para o esclarecimento deste evento.

Observando as microanálises realizadas com as análise com EDS nas Figuras 4.20, 4.21 e 4.22, é possível observar que de forma geral, os tratamentos alcalinos provocaram um acréscimo da concentração de oxigênio.

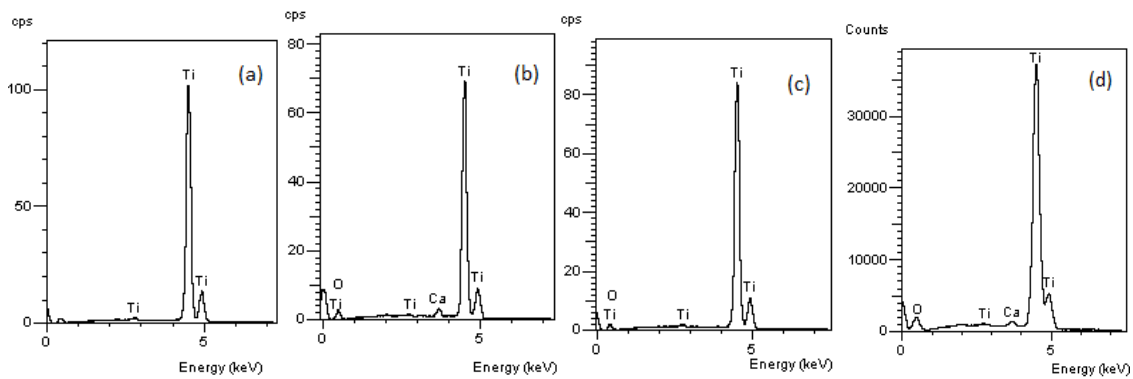


Figura 4.20: Composição química via EDS nas amostras (a – d) 2A, 3A, 4A, 5A, respectivamente.

Com base na Figura 4.21, os processos de modificação não causaram aumento da difusão de vanádio, ocorreu somente a presença de traços deste elemento na liga Ti-6Al-4V após análise via EDS.

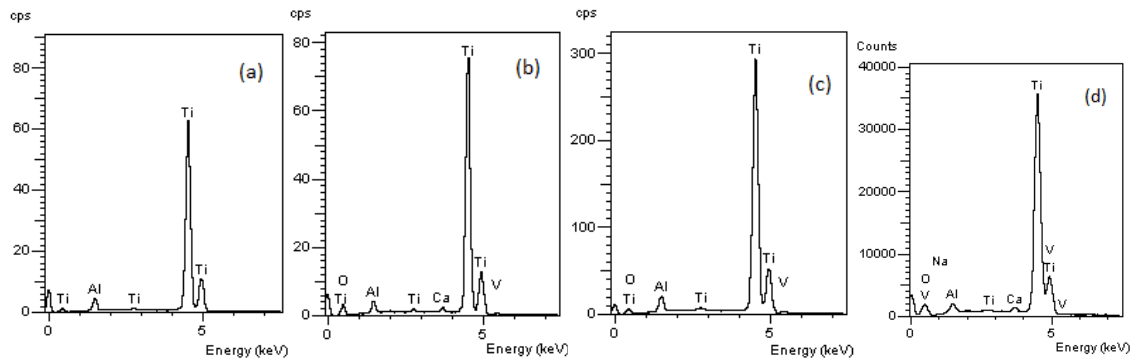


Figura 4.21: Composição química via EDS nas amostras (a – d) 2B, 3B, 4B, 5B, respectivamente.

Por outro lado o elemento nióbio que não apresenta citotoxicidade foi encontrado em quantidades apreciáveis após os tratamentos de superfície utilizados, como pode ser vista na Figura 4.22.

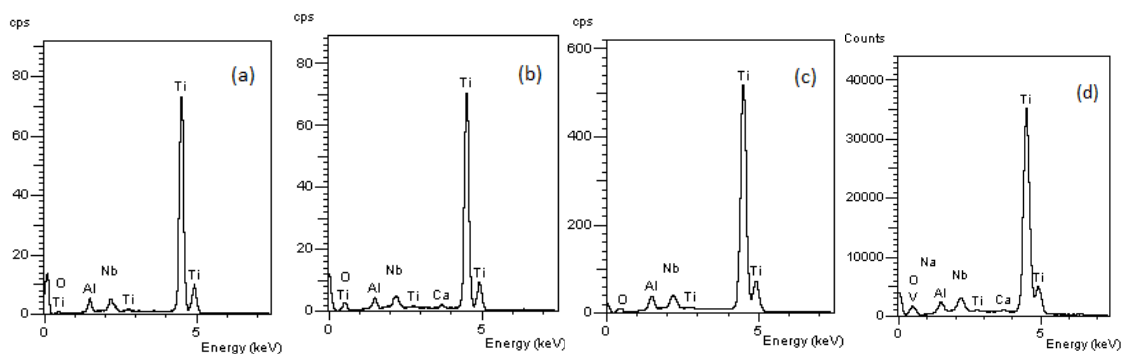


Figura 4.22: Composições químicas via EDS nas amostras (a-d) 2C, 3C, 4C, 5C, respectivamente.

#### 4.1.5. Ângulo de contato ou molhabilidade

Todas as amostras foram caracterizadas com relação à molhabilidade com água deionizada medindo-se o ângulo de contato formado com água na superfície das amostras. Na Figura 4.23 estão ilustradas como exemplo imagens das gotas de água deionizada em contato com as superfícies 2A (Fig. 4.23 (a)) e 5C à direita (Fig. 4.23 (b)). Foram realizadas duas medidas em cada amostra dos ângulos de contato em ambos os lados da gota entre a superfície das amostras e a água, conforme visto na Figura 4.23 o esquerdo e o direito após 60 segundos de ensaio. Esse período foi considerado para aguardar a estabilização momentânea da gota sobre a superfície, a variação do ângulo de contato de 0 a 60 segundos para a amostra 5C pode ser observada na Figura 4.24, onde nota-se o decréscimo de um ângulo de contato médio por volta de  $100^\circ$  com 2 segundos de ensaio e após 60 segundos foi reduzido a  $40^\circ$  devido às interações eletrostáticas com a superfície exemplificada.

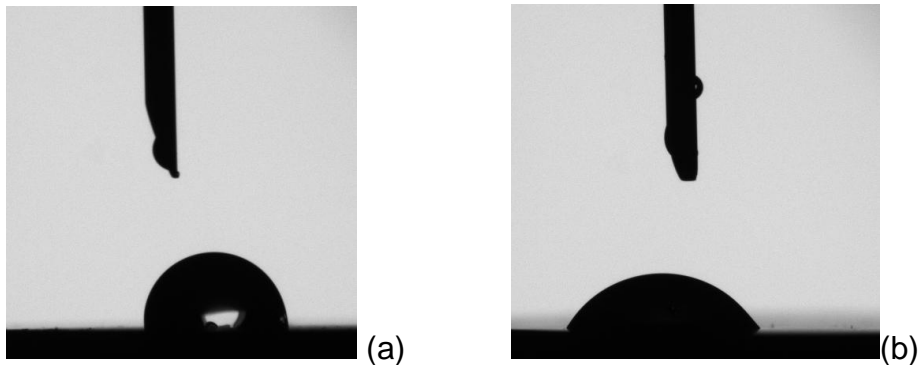


Figura 4.23: Gota de água deionizada sobre a superfície da amostra 2A e 5C nos ensaios de molhabilidade para determinar o ângulo de contato médio.

O ângulo de contato utilizado para caracterizar cada amostra e que foi utilizado para compor o gráfico da Figura 4.24 equivale, portanto, à média de duas medidas por amostra que representam por sua vez a média dos ângulos médios dos lados esquerdo e direito de cada gota da figura abaixo após 60 segundos de ensaio.

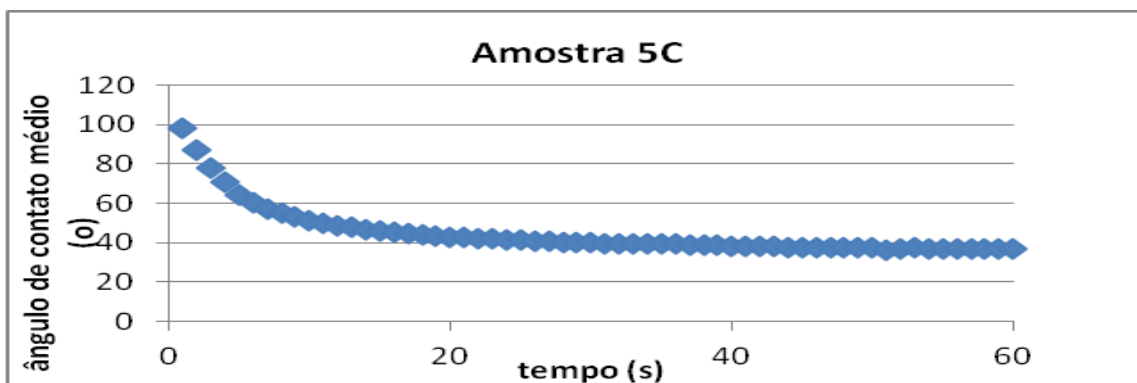


Figura 4.24: O ângulo médio observa-se o formato da gota de água (miliQ) com aproximadamente 4,0  $\mu\text{L}$  sobre as superfícies com diferentes tratamentos químicos. As medidas foram realizadas com auxílio do software (KSV Contact Angle Measurement System).

Com esse ensaio é possível investigar o comportamento das superfícies estudadas com relação hidrofiliicidade ou hidrofobicidade da amostra e desta forma correlacionar principalmente com a etapa de adesão

das células osteoblásticas e portanto a expressão de osteopontina, importante proteína nesta etapa de interação osteoblasto/material. Pesquisas vêm demonstrando que comportamento predominantemente hidrofílico tem promovido maior adesão celular [53,54,104].

No gráfico da figura 4.25 pode-se observar que para todas as amostras o comportamento foi predominantemente hidrofílico, uma vez que os ângulos medidos durante os ensaios não ultrapassaram  $90^\circ$  após 60 segundos, período para estabilização da gota.

As amostras nomeadas por 3 e 5 para os três materiais (A, B e C) apresentaram maior hidrofiliabilidade comparadas as amostras 2 e 4, como poder ser observado no gráfico da Figura 4.28. Esse fato era esperado e pode ser explicado devido ao tratamento alcalino provocar a formação de Ti-OH nas superfícies do titânio e de suas ligas [41].

As amostras 2A, 2B e 2C apresentaram comportamento pouco hidrofílico, que pode ser explicado pelo aprisionamento de ar favorecido pela rugosidade das amostras, conforme exemplo abaixo [105,106].

A figura ilustra que o aumento da amplitude da rugosidade provocou o aumento do ângulo de contato [105].

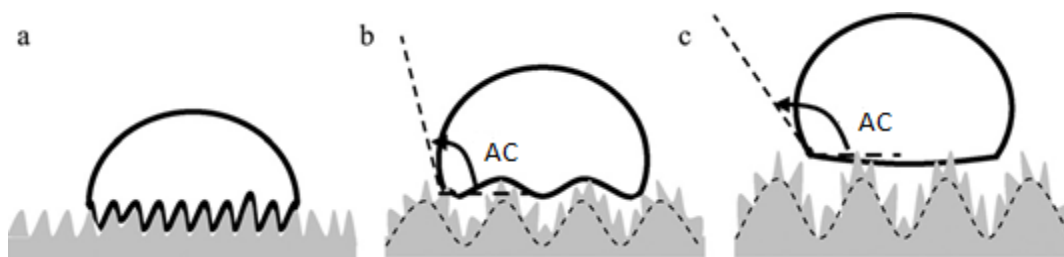


Figura 4.25: Esquema de gotas sobre superfície com texturas. Comportamento no caso do (a) modelo de Wenzel (b) e (c) modelo de Cassie-Baxter [105].

O comportamento hidrofílico pode ser intensificado com a formação da camada de titanato de sódio na superfície do material após o tratamento alcalino com NaOH, formando as amostras 3A, 3B e 3C, portanto.

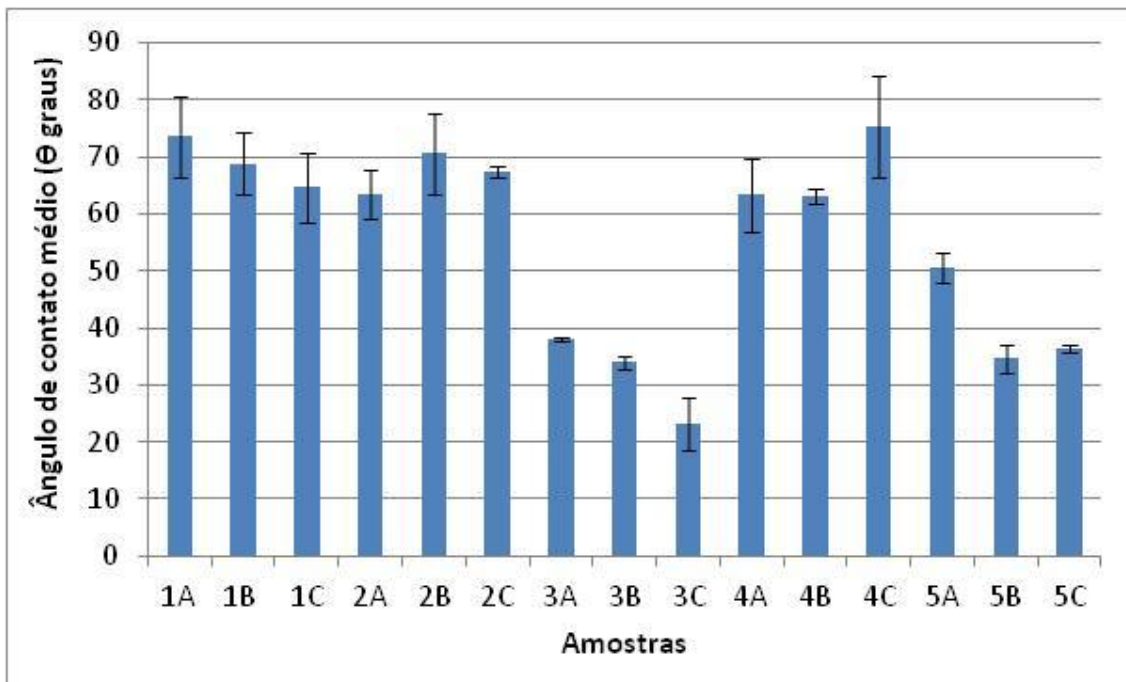


Figura 4.26: Ângulos de contato de todas as amostras testadas.

#### 4.1.6. Respostas Biológicas

As respostas biológicas buscaram avaliar os níveis de expressão gênica dos osteoblastos após respectivamente 7 e 15 dias de cultura sobre as diferentes superfícies nos três materiais estudados. Os resultados estão relatados na forma de gráficos, expostos nas Figuras 4.27 a 4.33, nas quais podem ser verificados os diferentes genes codificados por ALPL, SPP1, RUNX2, Col1A1, Col3A1, SPARC, relacionados aos processos de osteocondução e do gene RPL13 (denominado *housekeeping*, gene guardião, que possui a função de normalizar os valores do ensaio) como referência para o ensaio em *real time* RT-PCR.

Observa-se nas Figuras 4.27 a 4.33 que as amostras 1A, 1B e 1C não aparecem nas legendas; isso se deve ao fato das superfícies pertencentes a estas amostras serem adotadas como controle, ou seja, todas as análises



realizadas para cada material são relativas a essas amostras de referência ou superfície controle. Em outras palavras, pode-se dizer, por exemplo, que o gene codificado como RUNX2 que atingiu um valor igual à log 1,0 no gráfico apresenta um nível de expressão gênica desse referido gene 10 vezes superior ao nível encontrada pela superfície controle.

Neste trabalho, foram investigadas as respostas celulares em quatro diferentes superfícies desenvolvidas a partir de tratamentos químicos em comparação com as superfícies *controle* (somente lixadas, amostras 1A, 1B e 1C), simulando uma superfície usinada. Todos os tratamentos foram aplicados em três materiais a base de titânio contendo as seguintes composições nominais: Ti-CP, Ti-6Al-4V-ELI, Ti-6Al-7Nb.

As respostas celulares relativas à expressão gênica é uma forma de avaliar o potencial de osteocondução das células, uma vez que a análise traz respostas com relação às expressões gênicas dos osteoblastos sobre diferentes superfícies e avalia a sequência ou a ordem das expressões bem como as quantidades relativas destas expressões, sendo assim possível observar a tendência de comportamento dos osteoblastos perante às diversas superfícies.

De acordo com a definição proposta por Albrektson e Johansson (2001) a **osteocondução** está atrelada ao crescimento do osso sobre uma superfície de um determinado material [13].

A Figura 4.27 traz respostas sobre as amostras constituídas de Ti-CP. As amostras 2A e 4A, apresentaram em 7 dias de cultura celular valores de expressão de SPP1 (osteopontina, importante para a etapa de adesão das células) mais elevados que as amostras 3A ou 5A, mesmo possuindo menor hidrofilicidade. No entanto, isso pode ser explicado, pelo fato da amostra 2A ter, em comparação às demais, área efetiva de sua superfície aumentada drasticamente (acima de 100%), além do aumento da rugosidade, conforme Tabela 4.4 e Figura 4.16, o que pode ter induzido a expressão elevada de osteopontina pelas células [64,66]. Em adição, a amostra 4A, que também apresentou níveis elevados de SPP1, contém fósforo ou fosfato incorporados à superfície, o que pode ser a causa da expressão do referido gene, fato

reportado com resultados de tratamento com ácido fosfórico no trabalho de Park *et al.* [14].

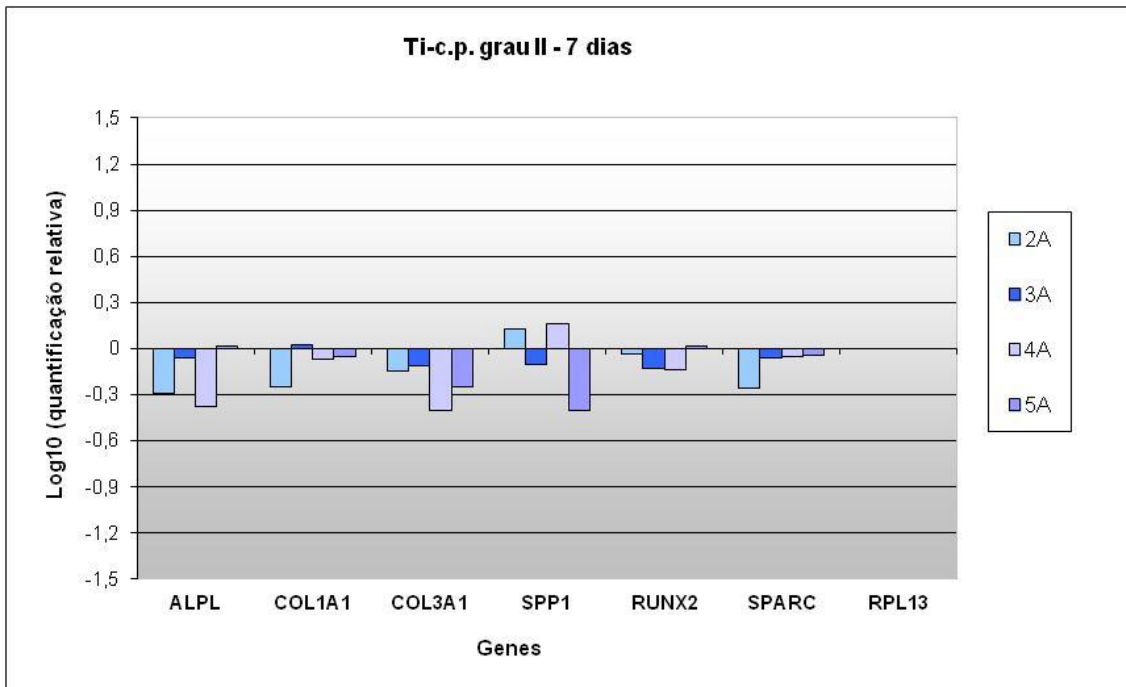


Figura 4.27: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-CP grau II com diferentes modificações de superfície (2A, 3A, 4A, 5A) após sete dias.

Após 15 dias de cultura as amostras da Figura 4.28 apresentaram expressão gênica de RUNX2 superiores, principalmente as amostras 3A e 4A o que pode ser explicado pela topografia favorável em ambas as amostras, conforme Tabela 4.1.

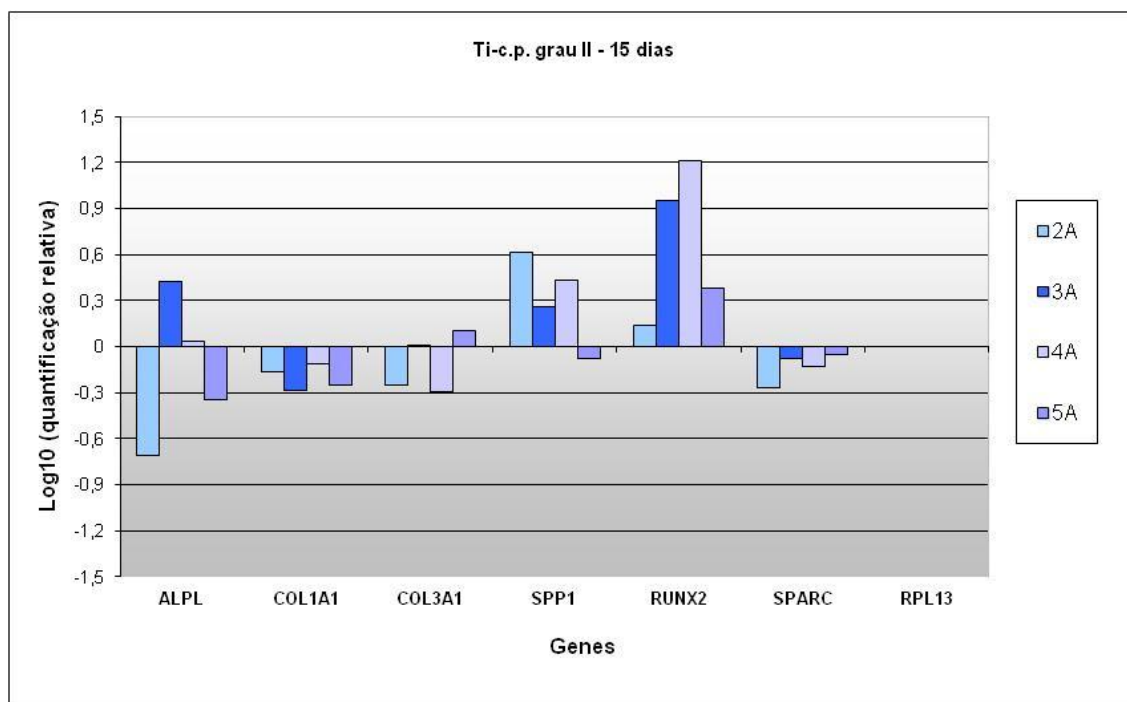


Figura 4.28: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-CP grau II com diferentes modificações de superfície (2A, 3A, 4A, 5A) após quinze dias.

De acordo com as Figuras 4.29 e 4.30 a amostra 2B apresentou expressão gênica inferior para todos os genes analisados em comparação a amostra 1B, a controle. Este fato decorre provavelmente do fato do ataque ácido com HCl não ter provocado a corrosão uniforme da superfície do material Ti-6Al-4V, liga composta pela presença de fases alfa mais beta que possuem potenciais químicos diferentes. A consequência foi a não formação de uma topografia (rugosidade isotrópica) na escala observada, além da ocorrência da formação de rugosidade que pode não ter favorecido o aumento da hidrofiliabilidade (Fig. 4.26), conforme modelos apresentados na Figura 4.24, o que culminou em um comportamento muito pouco efetivo com relação à pretendida osteocondução e possível mineralização óssea no tempo estudado.

Observa-se que as amostras 3B, 4B e 5B, Figura 4.29, apresentam níveis elevados de expressão gênica referente à SPP1, osteopontina, importante proteína produzida pela célula durante a etapa da adesão celular. Essa consideração pode ser explicada pelo fato do tratamento alcalino ter

aumentado a hidrofiliçidade da superfície tratada tanto com ácido clorídrico como ácido fosfórico previamente ao tratamento com NaOH, e ter, portanto, induzido a expressão deste gene vinculado a adesão celular nas amostras 3B e 5B. Em adição, o tratamento realizado com ácido fosfórico, amostra 4B, também induziu níveis elevados de expressão de osteopontina apesar de moderada hidrofiliçidade, ângulo de contato igual a  $\Theta=63^\circ$ , o que sugere que a amostra apresenta incorporação de fósforo ou fosfatos na sua superfície, proveniente do ataque com  $H_3PO_4$ , o que pode explicar a expressão de osteopontina [88]. Essa consideração está em acordo com resultados encontrados com Park *et al.* (2010) que avaliaram a expressão de osteopontina em superfícies tratadas com ácido fosfórico em diferentes condições e encontraram a correlação entre aumento da expressão gênica de SPP1 em amostras tratadas hidrotermicamente com ácido fosfórico [14].

Os resultados para a liga Ti-6Al-4V demonstram que o ataque realizado com ácido fosfórico combinado com NaOH causou um decréscimo esperado de  $\Theta$  (Figura 4.26), ou seja, um aumento do comportamento hidrofílico da superfície associado a um aumento da área efetiva da superfície (Tabela 4.4), sugerindo serem estas as causas do aumento da expressão de osteopontina e a formação de uma topografia serem as responsáveis pela expressão gênica de RUNX2 e de ALPL superiores aos encontrados pela amostra 1B, sinalizando uma possível atividade osteogênica aos 7 dias de cultura de osteoblastos humanos no ensaios *in vitro*, conforme Figura 4.29.

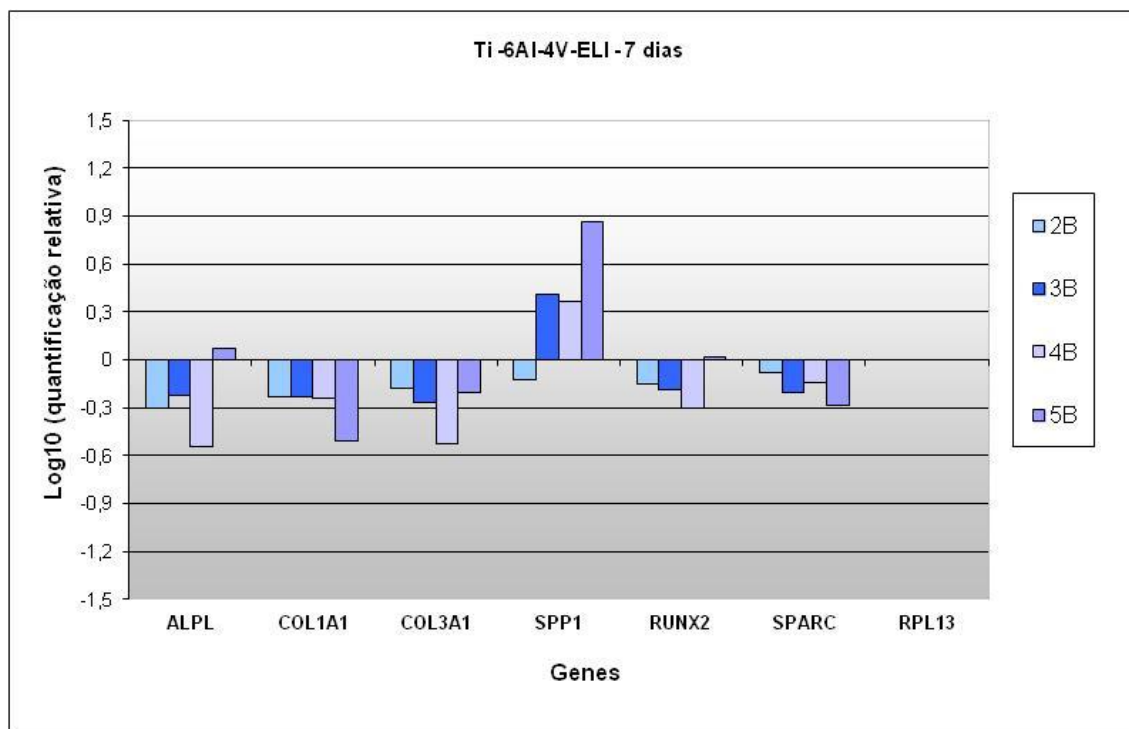


Figura 4.29: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-6Al-4V com diferentes modificações de superfície (2B, 3B, 4B, 5B) após sete dias.

A Figura 4.30, com 15 dias de incubação sobre as superfícies da liga Ti-6Al-4V, mostra que as respostas das expressões gênicas dos osteoblastos sobre as amostras 3B e 5B foram consideravelmente maiores que as demais o que sugere a maior osteocondutividade a estas amostras após os tratamentos utilizados. Isso pode ser explicado devido a formação de topografia (rugosidade isotrópica) micrométrica que pode ter induzido a expressão de RUNX2 seguida pela expressão de ALPL [70,107,108].

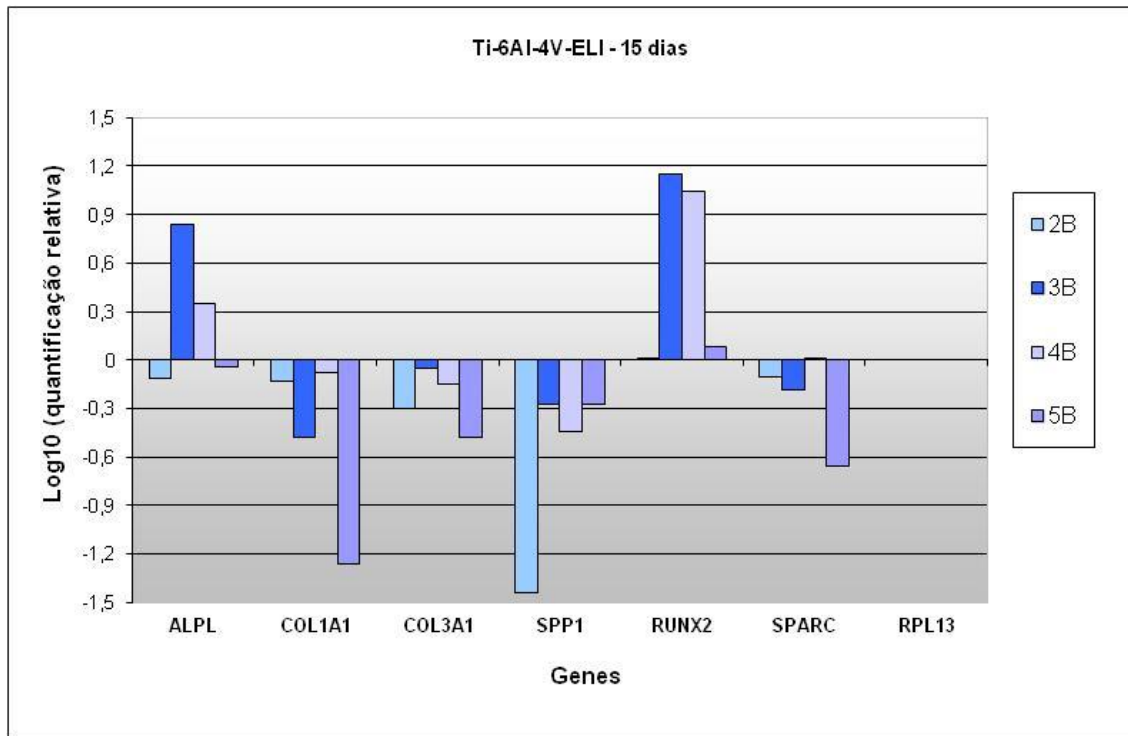


Figura 4.30: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOB) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-6Al-4V-ELI com diferentes modificações de superfície (2B, 3B, 4B, 5B) após sete dias

Resumidamente, após análise das modificações executadas no material Ti-6Al-4V e conforme os resultados encontrados, observa-se que as amostras 3B e 4B foram mais eficazes haja vista as expressões elevadas de SPP1 com 7 dias e de RUNX2 e ALPL com 15 dias o que sugere um comportamento osteocondutivo da superfície dessas amostras comparado aos da superfície controle (1B).

Paralelamente, analisando os tratamentos sobre as superfícies da liga Ti-6Al-7Nb, podemos afirmar que eles foram muito eficientes, haja visto, os comportamentos físico-químicos encontrados nas superfícies das amostras 2C, 3C, 4C e 5C e as respectivas respostas biológicas que corroboram com estas análises.

Na literatura há resultados comparando respostas celulares *in vitro* entre Ti-6Al-7Nb e Ti-CP, utilizando-se células similares aos osteoblastos humano (SaOS-2 cells) na qual a liga citada, contendo alumínio e nióbio, promoveu respostas boas quanto a espraiamentos celulares, sínteses de

fibronectina e osteopontina em ambos os métodos de análise, tanto através de mRNA quantificado via PCR quanto através da avaliação *in situ* dos níveis de proteínas sintetizadas sobre as superfícies dos dois materiais, Ti-CP ou Ti-6Al-7Nb [65]. Os resultados demonstraram que a liga possui respostas biológicas superiores mesmo quando comparada ao Ti-CP, possuindo os dois materiais o mesmo tratamento de superfície, polimento seguido por um jateamento com alumina (50  $\mu\text{m}$ ) [65].

Em outro estudo, amostras de Ti-6Al-7Nb passaram por diferentes processos de lixamento e apresentaram superfícies contendo riscos provocados por abrasivos com diferentes granulometrias: #180, #400 e #1200. O valor de  $R_a$  igual a  $0,2435 \pm 0,0690$  foi medido na amostra lixada com lixa #180, a mais áspera, sendo aquela que apresentou respostas superiores com relação espriamento e proliferação celulares, no entanto, a adesão foi pouco influenciada pela rugosidade [64].

Analisando as respostas dos osteoblastos para as amostras da liga Ti-6Al-7Nb, todas elas apresentaram níveis de expressão gênica consideráveis com 7 dias de cultura celular. Porém, com 15 dias as amostras que mantiveram níveis elevados de expressão gênica são: 3C, 4C e 5C. As respostas dos osteoblastos foram induzidas provavelmente pela presença de estruturas nas escalas submicrométricas (4C), mas, principalmente nanométricas (3C e 5C) formando, portanto nanotopografias de interesse (Figuras 4.13 e 4.15) e que aparentam ter influência significativa na expressão de RUNX2 seguida pela expressão de ALPL e das proteínas colagenosas (COL1A1 e COL3A1) com base nos resultados encontrados nos ensaios de RT-PCR após 7 e 15 dias das amostras de Ti-6Al-7Nb, conforme Figuras 4.31 e 4.32. Resultados que corroboram com esta análise foram encontrados por You *et. al* (2010) e Gredes *et. al* (2012) [109,110].

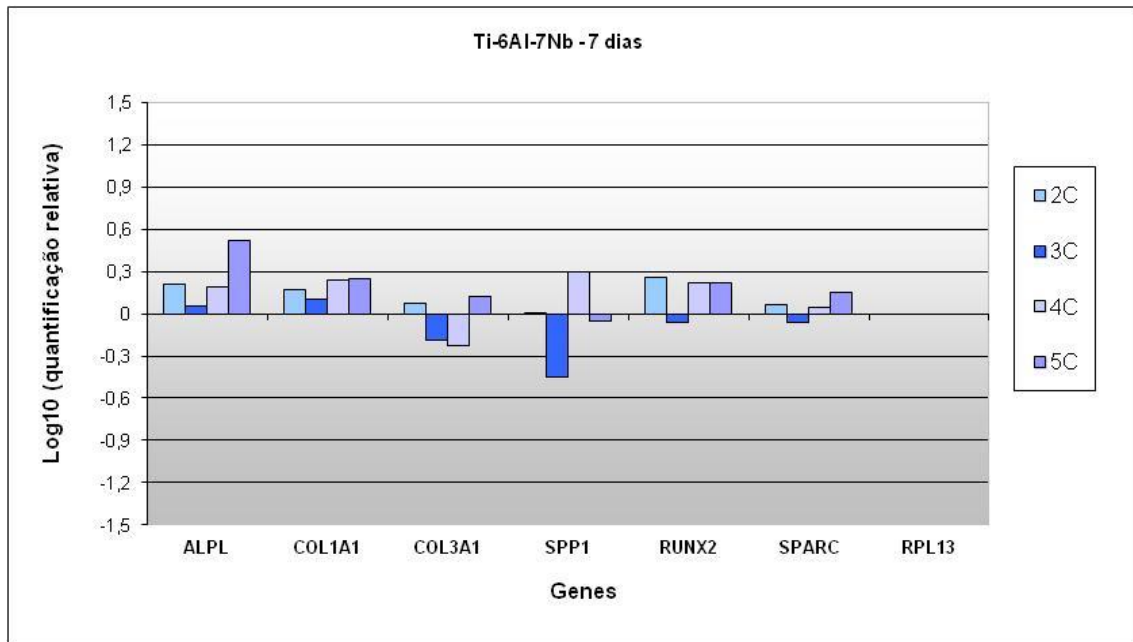


Figura 4.31: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-6Al-7Nb com diferentes modificações de superfície (2C, 3C, 4C, 5C) após sete dias.

Adicionalmente, é importante salientar que para as amostras avaliadas na Figura 4.31 houve indícios da expressão gênica de osteonectina, codificada como SPARC, o que pode ser um sinal da ligação destas proteínas aos cristais de cálcio presentes no osso, sinal do estágio avançado de mineralização óssea [111].

De forma geral, pode-se observar que os tratamentos propostos influenciaram os processos celulares nos estágios que antecedem a fixação biológica. Foi observada uma sequência de eventos relacionados à expressão gênica dos osteoblastos humanos em ensaios *in vitro* sobre as diferentes superfícies contendo distintas propriedades físico-químicas.



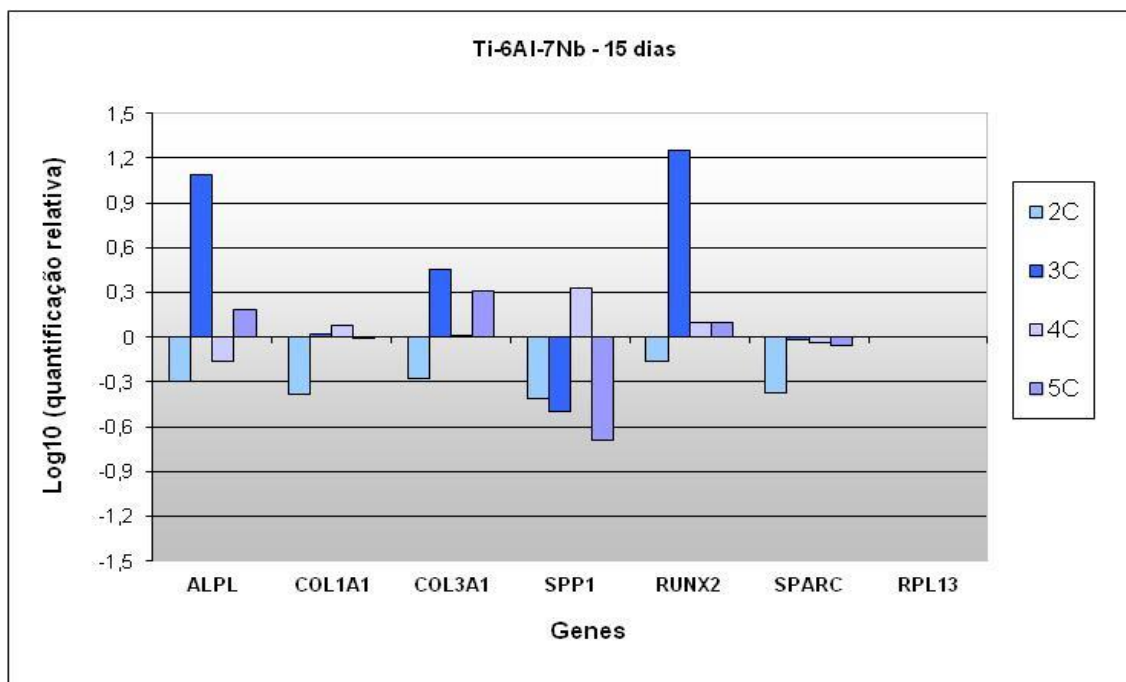


Figura 4.32: Análise da expressão gênica de osteoblastos humanos (HOb) em cultura *in vitro* sobre discos de Ti-6Al-7Nb com diferentes modificações de superfície (2C, 3C, 4C, 5C) após quinze dias.

Os resultados sugerem que os comportamentos predominantemente hidrofílicos e as incorporações de fosfatos além do aumento da área efetiva, aparentam influenciar a expressão gênica de SPP1 – osteopontina. Diversos autores avaliaram a quantidade de células relacionadas aos eventos de formação óssea e foi possível constatar que em 7 dias de cultivo a maioria das células estavam aderidas ou a expressão de osteopontina já atingira o máximo, ambos os sinais do processo de adesão [14,112].

Em adição, os resultados sugerem que a formação de **topografia** teve influência na expressão gênica de RUNX2, gene chave para manter os osteoblastos em homeostases (equilíbrio biológico) e induzir as expressões gênicas no sentido da osteocondução, a se confiar nos resultados obtidos com relação às expressões das proteínas, sinalizando eventos de mineralização óssea, como expressão de ALPL, como pode ser observada na análise realizada por outros autores [14,112] e por meio da expressão gênica de SPARC, que atingiu o máximo após 14 dias na análise realizada por Neel *et al.* (2013) [113].

Principalmente a formação de topografias nas superfícies das amostras 4A, 2C, 4C após os respectivos ataques ácidos conferiram a essas amostras superfícies com dimensões fractais que aparentam ter influenciado nas respostas celulares e podem ser levadas em consideração na busca de uma superfície altamente osteocondutiva e osteogênica [21,37,114,115].

De qualquer maneira, há muito que se elucidar a respeito da manipulação das propriedades físico-químicas para potencializar as respostas celulares e provocar a fixação assintomática de implantes em um cada vez mais curto período de tempo, traduzindo assim em incontáveis benefícios aos pacientes.

Ao final, com intuito de orientar os efeitos das diferentes variáveis contidas nas superfícies com relação às respostas biológicas, está proposto um Diagrama de Ishikawa ou Causa e Efeito. Neste caso, temos os efeitos das propriedades superficiais nas respostas biológicas das células, para que possa guiar as modificações superficiais no sentido que possibilitem em última instância a osseointegração, Figura 4.33.

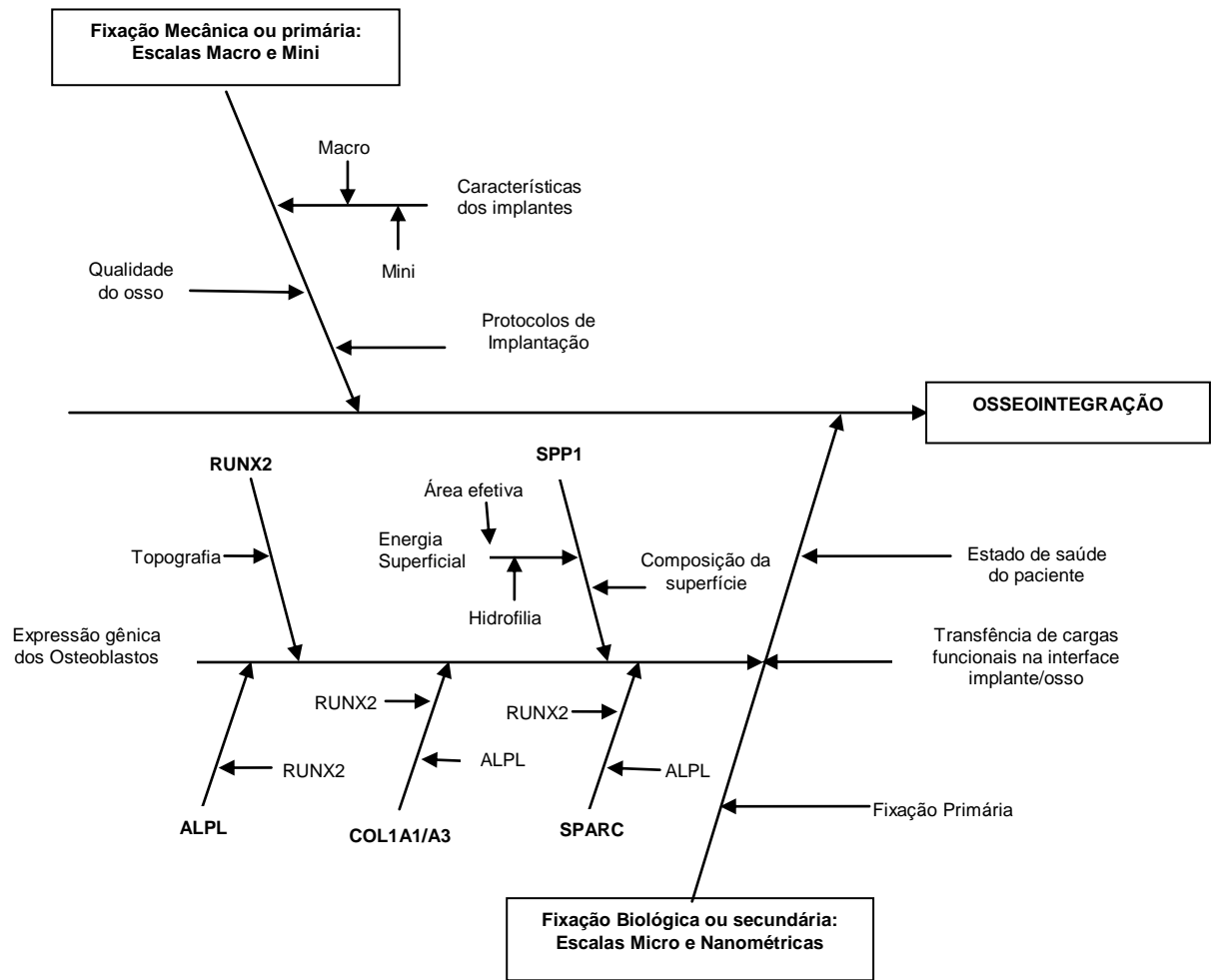


Figura 4.33: Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) dos processos que antecedem o fenômeno de osseointegração.



## 5. CONCLUSÕES

Os tratamentos realizados atingiram os objetivos de alterarem as características físico-químicas de Ti-CP, Ti-6Al-4V-ELI e Ti-6Al-7Nb, de tal forma a obter-se uma combinação de propriedades que podem ser correlacionados aos eventos de expressões gênicas em osteoblastos humanos a partir de 7 e 15 dias de cultura *in vitro*.

A hidrofiliabilidade, a área efetiva e a incorporação de fosfatos aparentam regular a expressão de osteopontina nos estágios iniciais de cultura de osteoblastos humanos.

A formação de topografias em escalas micrométricas, submicrométricas e principalmente nanométricas sugerem ter influência sobre a expressão de RUNX2 e de ALPL e na sequência dos processos de osteocondução.

As medidas de rugosidade entre as amostras não apresentaram diferenças significativas e mesmo assim as amostras apresentaram comportamentos distintos, o que denota a baixa correlação da rugosidade quando comparada à topografia com relação aos eventos celulares estudados.

Quanto às medidas de rugosidade, as amostras apresentaram comportamento classificado como liso ou minimamente áspero e influenciaram nas respostas dos osteoblastos, esse resultado sugere que a indução de comportamentos osteocondutivos das superfícies se dá em uma escala de dimensão deveras reduzida.

Os tratamentos ácidos associados ao alcalino demonstraram ser eficientes para o processo de osteocondução, uma vez que as expressões gênicas de proteínas relacionadas aos processos de osteogênese foram elevadas nessas superfícies para os três materiais.

O ataque ácido simples com  $H_3PO_4$ , apesar de possuir poucas referências na literatura com essa aplicação aparentou ter influência na expressão do gene SPP1, devido à incorporação de fosfatos e influenciou a

expressão de RUNX2, devido provavelmente a formação de topografia, com dimensão fractal.

A combinação de um comportamento altamente hidrofílico, moderadamente áspero com aumento de área efetiva associado a uma nanotopografia homogeneamente distribuída sobre a superfície da amostra de Ti-6Al-7Nb atacada com ácido clorídrico e tratada alcalinamente (amostra 3C), provocou elevados níveis de expressão gênica, sugerindo um comportamento altamente osteocondutivo comparado aos demais tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados para a amostra atacada com ácido fosfórico e tratada alcalinamente (amostra 5C).

## 6. Sugestões para trabalhos futuros

- Aperfeiçoar os parâmetros dos tratamentos químicos propostos.
- Explorar novos tratamentos químicos que privilegiem a incorporação de íons presentes no meio fisiológico.
- Comparar outros processos de modificação quanto às respostas celulares.
- Realizar ensaios *in vitro* com células osteoblásticas para verificar *in situ* os fenômenos de adesão, espraiamento, proliferação, mineralização óssea, etc.
- Avaliações *in vivo* podem ser requeridas para melhor interpretação dos fenômenos e da validação da proposta.
- Obtenção de topografias diferentes na mesma escala (preferência nanométrica) para comparar aquela que aparenta induzir determinadas respostas biológicas (expressão de RUNX2, por exemplo).





## 7. Referências bibliográficas

[1] RAUTNER, B. et al. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2004. p. 851

[2] MATSUNO, H. et al. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants , titanium , hafnium , niobium , tantalum and rhenium. v. 22, p. 1253–1262, 2001.

[3] *web of knowledge*. Disponível em: <<http://apps.webofknowledge.com>>. Acesso em: 30 mar. 2013.

[4] BOVAN, B. D. et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. v. 17, n. 2, p. 137–146, 1996.

[5] PONCHE, A.; BIGERELLE, M. e ANSELME, K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: Physico-chemical effects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers , Part H: Journal of Engineering in Medicine*, doi:10.1243/09544119JEIM900, 2010.

[6] ZINGER, O. et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. v. 26, p. 1837–1847, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.035, 2005.

[7] SELA, J. et al. PRIMARY MINERALIZATION AT THE SURFACES OF IMPLANTS. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, doi:10.1177/10454411000110040301, 2000.

[8] OLIVEIRA, P. T. DE e NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*, v. 25, n. 3, p. 403–413, doi:10.1016/S0142-9612(03)00539-8, 2004.

[9] RICHERT, L. et al. Surface Nanopatterning to Control Cell Growth. *Advanced Materials*, v. 20, n. 8, p. 1488–1492, doi:10.1002/adma.200701428, 2008.

[10] BAGHERZADEH, R. et al. Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 101, n. 3, p. 765–74, doi:10.1002/jbm.a.34379, 2013.

[11] MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D. B. S. e ARAGA, F. J. L. Biomaterials Advancing dental implant surface technology – From micron- to

nanotopography. v. 29, p. 3822–3835, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.05.012, 2008.

[12] ZHANG, L. e WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. p. 66–80, doi:10.1016/j.nantod.2008.10.014, 2009.

[13] ALBREKTSSON, T. e JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. p. 96–101, 2001.

[14] PARK, J. et al. Acta Biomaterialia Effects of phosphoric acid treatment of titanium surfaces on surface properties, osteoblast response and removal of torque forces. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 4, p. 1661–1670, doi:10.1016/j.actbio.2009.10.011, 2010.

[15] HIN, T. S. *Engineering Materials For Biomedical Applications*. [S.l.]: World Scientific, 2004. v. 1

[16] GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, v. 54, n. 3, p. 397–425, doi:10.1016/j.pmatsci.2008.06.004, 2009.

[17] ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. e WENNERBERG, A. State of the art of oral implants. *Periodontology 2000*, v. 47, p. 15–26, doi:10.1111/j.1600-0757.2007.00247.x, 2008.

[18] ZHAO, G. et al. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clinical oral implants ...*, p. 258–264, doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01195.x, 2006.

[19] BRÅNEMARK, R. et al. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: A review. v. 38, n. 2, p. 175–181, 2001.

[20] HANAWA, T.; ASAMI, K. e ASAOKA, K. Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. *Journal of biomedical materials research*, v. 40, n. 4, p. 530–8, 1998.

[21] YI, J.-H. et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surface Science*, v. 600, n. 19, p. 4613–4621, doi:10.1016/j.susc.2006.07.053, 2006.

[22] TAKEUCHI, M. et al. Acid pretreatment of titanium implants. v. 24, p. 1821–1827, doi:10.1016/S0142-9612(02)00576-8, 2003.

[23] ZHU, X. Nano Hydroxyapatite / Collagen, Nano Hydroxyapatite and Anodic Oxides on Titanium. 2005.

- [24] CHENG, H.-C. et al. Titanium nanostructural surface processing for improved biocompatibility. *Applied Physics Letters*, v. 89, n. 17, p. 173902, doi:10.1063/1.2361279, 2006.
- [25] MENDONÇA, G. et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*, v. 30, n. 25, p. 4053–62, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.010, 2009.
- [26] VARIOLA, F. et al. Influence of Treatment Conditions on the Chemical Oxidative Activity of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Mixtures for Modulating the Topography of Titanium. *Advanced Engineering Materials*, v. 11, n. 12, p. B227–B234, doi:10.1002/adem.200900122, 2009.
- [27] MINAGAR, S. et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta biomaterialia*, v. 8, n. 8, p. 2875–88, doi:10.1016/j.actbio.2012.04.005, 2012.
- [28] BRÅNEMARK, R. et al. Bone response to laser-induced micro- and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, v. 7, n. 2, p. 220–7, doi:10.1016/j.nano.2010.10.006, 2011.
- [29] BEUTNER, R. et al. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, v. 7 Suppl 1, n. November 2009, p. S93–S105, doi:10.1098/rsif.2009.0418.focus, 2010.
- [30] MURPHY, W. L. e COLLIER, J. H. Self-assembling biomaterials. *Acta biomaterialia*, v. 5, n. 3, p. 803–4, doi:10.1016/j.actbio.2008.12.010, 2009.
- [31] MORRA, M. et al. Surface engineering of titanium by collagen immobilization . Surface characterization and in vitro and in vivo studies. v. 24, p. 4639–4654, doi:10.1016/S0142-9612(03)00360-0, 2003.
- [32] L. LE GUÉHENNEC, A. SOUEIDAN, P. LAYROLLE, Y. A. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. v. 3, p. 844–854, doi:10.1016/j.dental.2006.06.025, 2006.
- [33] BAGNO, A. e BELLO, C. DI. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 15, n. 9, p. 935–49, doi:10.1023/B:JMSM.0000042679.28493.7f, 2004.
- [34] KASEMO, B. Biological surface science. *Surface Science*, v. 500, n. 1-3, p. 656–677, doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X, 2002.
- [35] OLIVEIRA, D. P. et al. Osteoblasts behavior on chemically treated commercially pure titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 00A, p. 000–000 (no prelo), 2013.

- [36] TAVARES, M. G. et al. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. *Clinical oral implants research*, v. 18, n. 4, p. 452–8, doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01344.x, 2007.
- [37] DEGIDI, I. M. et al. implant surfaces and fractals. p. 7–13, [S.d.].
- [38] BIGERELLE, M. e IOST, A. A N e w M e t h o d t o C a l c u l a t e t h e Fractal D i m e n s i o n o f S u r f a c e s : A p p l i c a t i o n t o H u m a n C e l l P r o l i f e r a t i o n. *Journal, An International computer and math with applic.*, v. 42, p. 241–253, 2001.
- [39] NAGAOKA, A.; YOKOYAMA, K. e SAKAI, J. Evaluation of hydrogen absorption behaviour during acid etching for surface modification of commercial pure Ti, Ti–6Al–4V and Ni–Ti superelastic alloys. *Corrosion Science*, v. 52, n. 4, p. 1130–1138, doi:10.1016/j.corsci.2009.12.029, 2010.
- [40] JIAN-SHU, L. U. Corrosion of titanium in phosphoric acid at 250 °C. v. 6326, n. February, p. 0–4, doi:10.1016/S1003-6326(08)60311-8, 2008.
- [41] KOKUBO, T.; KAWASHITA, M. e NAKAMURA, T. Bioactive metals: preparation and properties. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 5, p. 99–107, 2004.
- [42] KIM, H.-M. et al. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, p. 409–417, 1996.
- [43] TADASHI KOKUBO e TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, p. 2907–2915, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017, 2006.
- [44] FATEHI, K.; MOZTARZADEH, F. e TAHRIRI, M. In vitro biomimetic deposition of apatite on alkaline and heat treated Ti6Al4V alloy surface. v. 31, n. 2, p. 101–108, 2008.
- [45] PATTANAYAK, D. K. et al. Effect of heat treatments on apatite-forming ability of NaOH- and HCl-treated titanium metal. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 22, n. 2, p. 273–8, doi:10.1007/s10856-010-4218-y, 2011.
- [46] BOYAN, B. D. et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alfa , 25- ( OH ) 2 D 3. 1998.
- [47] PERROTTI, V. et al. In vitro analysis with human bone marrow stem cells on Ti-15Mo alloy for dental and orthopedic implants. v. 1, n. March, p. 27–33, 2011.

- [48] MEREDITH, D. O. et al. Is surface chemical composition important for orthopaedic implant materials? *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 18, n. 2, p. 405–13, doi:10.1007/s10856-006-0706-5, 2007.
- [49] JIMBO, R. et al. Protein Adsorption to Surface Chemistry and Crystal Structure Modification of Titanium Surfaces. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, v. 1, n. 3, p. 1–9, doi:10.5037/jomr.2010.1303, 2010.
- [50] ANSELME, K. e BIGERELLE, M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia*, v. 1, p. 211–222, doi:10.1016/j.actbio.2004.11.009, 2005.
- [51] HE, J. et al. The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 19, n. 11, p. 3465–72, doi:10.1007/s10856-008-3505-3, 2008.
- [52] BELÉM, A. et al. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. v. 21, p. 471–481, 2010.
- [53] SCHWARZ, F. et al. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, v. 88, n. 2, p. 544–57, doi:10.1002/jbm.b.31233, 2009.
- [54] CHAKRAVORTY, N. et al. The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation. *Acta biomaterialia*, v. 8, n. 9, p. 3516–23, doi:10.1016/j.actbio.2012.05.008, 2012.
- [55] WEBSTER, T. J. et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of biomedical materials research*, v. 51, n. 3, p. 475–83, 2000.
- [56] ANSELME, K.;; PONCHE, A. e BIGERELLE, M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers , Part H: Journal of Engin'ering in Medicine*, doi:10.1243/09544119JEIM901, 2010.
- [57] SELA, M. N. et al. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clinical oral implants research*, v. 18, n. 5, p. 630–8, doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01373.x, 2007.
- [58] PADIAL-MOLINA, M. et al. Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces. *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 2, p. 771–778, doi:10.1016/j.actbio.2010.08.024, 2011.

- [59] SHEU, T. et al. A Phage Display Technique Identifies a Novel Regulator of Cell Differentiation \*. v. 278, n. 1, p. 438–443, doi:10.1074/jbc.M208292200, 2003.
- [60] CUNHA, A. et al. Wetting behaviour of femtosecond laser textured Ti–6Al–4V surfaces. *Applied Surface Science*, v. 265, p. 688–696, doi:10.1016/j.apsusc.2012.11.085, 2013.
- [61] DELIGIANNI, D. D. et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. v. 22, p. 1241–1251, 2001.
- [62] SCHNEIDER, G. e BURRIDGE, K. Formation of Focal Adhesions by Osteoblasts Adhering to Different Substrata. *Experimental Cell Research*, v. 214, p. 264–269, 1994.
- [63] TEIXEIRA, A. I. et al. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. doi:10.1242/jcs.00383, 2003.
- [64] OSATHANON, T. et al. Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *Journal of oral science*, v. 53, n. 1, p. 23–30, 2011.
- [65] OSATHANON, T. et al. Ti-6Al-7Nb promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 17, n. 7, p. 619–25, doi:10.1007/s10856-006-9224-8, 2006.
- [66] ANSELME, K. e BIGERELLE, M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 17, n. 5, p. 471–9, doi:10.1007/s10856-006-8475-8, 2006.
- [67] VARIOLA, F. et al. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials*, v. 29, n. 10, p. 1285–98, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.040, 2008.
- [68] ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. v. 21, 2000.
- [69] LAURENT LE GUEHENNEC, MARCO-ANTONIO LOPEZ-HEREDIA, BENEDICTE ENKEL, PIERRE WEISS, YVES AMOURIQ, P. L. *Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces.pdf*. . [S.l.]: Acta Biomaterialia, 2008.
- [70] TOMSIA, A. P. et al. Nanotechnology Approaches for Better Dental Implants. *Int J Oral & Maxillofacx Implants*, v. 26, p. 25–49, 2011.

[71] POPAT, K. C. et al. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. v. 28, p. 3188–3197, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.020, 2007.

[72] RAVICHANDRAN, R. et al. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World journal of stem cells*, v. 1, n. 1, p. 55–66, doi:10.4252/wjsc.v1.i1.55, 2009.

[73] KAIVOSOJA, E. et al. Cell adhesion and osteogenic differentiation on three-dimensional pillar surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 101, n. 3, p. 842–52, doi:10.1002/jbm.a.34378, 2013.

[74] GARDIN, C. et al. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 1, p. 737–57, doi:10.3390/ijms13010737, 2012.

[75] RAMIRES, P. a et al. In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 13, n. 8, p. 797–801, 2002.

[76] MASSARO, C. et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 13, n. 6, p. 535–48, 2002.

[77] SOLLAZZO, V. et al. Anatase Coating Improves Implant Osseointegration In Vivo. *THE JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY*, v. 18, n. 4, p. 806–810, 2007.

[78] PALMIERI, A. et al. Comparison between titanium and anatase miRNAs regulation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 3, n. 2, p. 138–43, doi:10.1016/j.nano.2007.03.004, 2007.

[79] OH, S. et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. doi:10.1002/jbm.a, 2006.

[80] MCPHERSON, M. J.; TAYLOR, G. R. e QUIRKE, P. *PCR 1: A Practical Approach*. [S.l: s.n.], 1991. p. 276

[81] BALDI, P. e HATFIELD, G. W. *DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling*. [S.l: s.n.], 2002. p. 207

[82] DOMACH, M. M. *Introduction to Biomedical Engineering*. [S.l.]: Pearson Education, Inc., 2004. p. 244

[83] KAUFMAN, P. B. et al. *Gene Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2011. p. 575

[84] JUNQUEIRA, L. C. U. e CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 3. ed. [S.l: s.n.], 1986. p. 270

- [85] GIOVANNI PARMIGIANI (EDITOR), ELIZABETH S. GARETT (EDITOR), R. A. I. (Editor) e (EDITOR), S. L. Z. *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software (Statistics for Biology and Health) [Hardcover]*. [S.l: s.n.], 2003. p. 475
- [86] OLIVEIRA, N. T. C. et al. In vitro analysis with human bone marrow stem cells on Ti-15Mo alloy for dental and orthopedic implants. v. 1, n. March, p. 27–33, 2011.
- [87] LOPEZ, M. et al. Titanium disk surface Modulate dental implants osseointegration. *European Journal of Inflammation*, v. 10, n. No. 2 (SUPPLEMENT),, p. 6, 2012.
- [88] BECK, G. R.;; ZERLER, B. e MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 15, p. 8352–7, doi:10.1073/pnas.140021997, 2000.
- [89] SODEK, J.;; GANSS, B. e MCKEE, M. D. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 11, n. 3, p. 279–303, doi:10.1177/10454411000110030101, 2000.
- [90] STEIN, G. S. et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, v. 23, n. 24, p. 4315–29, doi:10.1038/sj.onc.1207676, 2004.
- [91] BILEZIKIAN, J. P.;; RAISZ, R. G. e MART, J. T. *Principles of Bone Biology*. 3. ed. [S.l: s.n.], 208AD.
- [92] MAEHATA, Y. et al. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 26, n. 5, p. 371–81, doi:10.1016/j.matbio.2007.01.005, 2007.
- [93] TERMINE, J. D. et al. Osteonectin, A Bone-Specific Proetein Linking Mineral to Collagen. v. 26, n. October, p. 99–105, 1981.
- [94] ARCELLI, D. et al. Genetic effects of a titanium surface on osteoblasts: a meta-analysis. *Journal of oral science*, v. 49, n. 4, p. 299–309, 2007.
- [95] SOLLAZZO, V. et al. Genetic Effect of Anatase on Osteoblast-Like Cells. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v. 9360, [S.d.].
- [96] PERROTTI, V. et al. Effect of titanium surface topographies on human bone marrow stem cells differentiation in vitro. *Odontology*, doi:10.1007/s10266-012-0067-0, 2012.



- [97] FANALI, S. et al. BIO GRIP AND MACHINED TITANIUM STIMULATE DENTAL PULP STEM. v. 9, n. 3, p. 0–4, 2011.
- [98] PALMIERI, A. et al. Biological Effect of Resorbable Plates on Normal Osteoblasts and Osteoblasts Derived From Pfeiffer Syndrome. v. 22, n. 3, p. 860–863, doi:10.1097/SCS.0b013e31820f7d34, 2011.
- [99] BUSER, D. et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface : A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. 1998.
- [100] PATTANAYAK, D. K. et al. Nanostructured positively charged bioactive TiO<sub>2</sub> layer formed on Ti metal by NaOH, acid and heat treatments. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 22, n. 8, p. 1803–12, doi:10.1007/s10856-011-4372-x, 2011.
- [101] WENNERBERG, A. e ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*, v. 20 Suppl 4, p. 172–84, doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x, 2009.
- [102] PUCKETT, S. e WEBSTER, T. J. Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. v. 3, n. 2, p. 229–241, 2008.
- [103] MONJO, M. et al. In vitro osteogenic properties of two dental implant surfaces. *International journal of biomaterials*, v. 2012, p. 181024, doi:10.1155/2012/181024, 2012.
- [104] RUPP, F. et al. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 76, n. 2, p. 323–34, doi:10.1002/jbm.a.30518, 2006.
- [105] BIZI-BANDOKI, P. et al. Modifications of roughness and wettability properties of metals induced by femtosecond laser treatment. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 12, p. 5213–5218, doi:10.1016/j.apsusc.2010.12.089, 2011.
- [106] QUÉRÉ, D. Wetting and Roughness. *Annu. Rev. Mater. Res.*, p. 71–99, doi:10.1146/annurev.matsci.38.060407.132434, 2008.
- [107] HYUN, M.; HO, J. e WON, S. The effect of surface microgrooves and anodic oxidation on the surface characteristics of titanium and the osteogenic activity of human periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*, p. 1–8, doi:10.1016/j.archoralbio.2012.05.010, 2012.
- [108] CHUG, A. et al. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery , Medicine , and Pathology Osseointegration — Molecular events at the bone – implant interface : A review &. v. 25, p. 1–4, doi:10.1016/j.ajoms.2012.01.008, 2013.

- [109] YOU, M. et al. Synergistically Enhanced Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Culture on Nanostructured Surfaces with Induction Media. p. 1856–1862, 2010.
- [110] GREDES, T. et al. Bone substitution materials on the basis of BONITmatrix® up-regulate mRNA expression of IGF1 and Col1a1. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, v. 194, n. 2, p. 179–84, doi:10.1016/j.aanat.2011.10.003, 2012.
- [111] RIBEIRO, N.;; SOUSA, S. R. e MONTEIRO, F. J. Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *Journal of colloid and interface science*, v. 351, n. 2, p. 398–406, doi:10.1016/j.jcis.2010.08.013, 2010.
- [112] MATTISSON, I.;; GRETZER, C. e AHLBERG, E. Surface characterization, electrochemical properties and in vitro testing of hierarchically structured titanium surfaces. *Materials Research Bulletin*, v. 48, n. 2, p. 389–398, doi:10.1016/j.materresbull.2012.10.037, 2013.
- [113] ABOU NEEL, E. A. et al. In vitro bioactivity and gene expression by cells cultured on titanium dioxide doped phosphate-based glasses. *Biomaterials*, v. 28, n. 19, p. 2967–77, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.018, 2007.
- [114] CHOU, C.-C. e LIN, H.-H. Fractal dimension and surface topography on the diamond deposition of seeded WC–Co substrates. *Journal of Applied Physics*, v. 107, n. 7, p. 073510, doi:10.1063/1.3359657, 2010.
- [115] LÖBERG, J. et al. Characterisation of Titanium Dental Implants I: Critical Assessment of Surface Roughness Parameters. p. 18–35, 2010.
- [116] NOVASKI, O. *Introdução à Engenharia de Fabricação Mecânica*. [S.l.: s.n.], 1994. p. 128
- [117] CHEN, C. Q.;; SCOTT, W. e BARKER, T. M. Effect of metal surface topography on mechanical bonding at simulated total hip stem-cement interfaces. *Journal of biomedical materials research*, v. 48, n. 4, p. 440–6, 1999.
- [118] KLOKKEVOLD, P. R. e DAVIES, J. E. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. p. 350–357, 2001.

## APÊNDICE A

- **CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS:** células indiferenciadas com capacidade de multiplicação e auto renovação e que podem diferenciar-se em outras linhagens, como em osteoblastos, por exemplo.
- **CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS OU OSTEOLASTOS\*:** células de origem mesenquimal interessadas na formação do tecido ósseo.
- **CITOTOXICIDADE:** toxicidade provocada à célula, por exemplo, pela liberação de íons tóxicos pelos implantes.
- **EXPRESSÃO GÊNICA:** é o processo pelo qual a informação contida no gene é usada para a “montagem” da molécula de proteína.
- **GENE\*:** todo fator hereditário; a menor unidade de transmissão de caracteres hereditários considerados como partículas ultramicroscópicas, capazes de auto reprodução e imitação, que ocupa um lugar definido no cromossomo. Todo gene conhecido é modificado do desenvolvimento e considerado agente celular fisiológico que atua como centro de atividade química específica.
- **IMPLANTAÇÃO\*:** colocação de alguma substância dentro dos tecidos do organismo.
- **IMPLANTES:** material natural ou sintético inserido no interior de algum tecido do organismo.
- **OSTEOCLASTO\*:** uma das grandes células multinucleadas encontradas em associação com a reabsorção óssea.
- **PRIMERS:** pedaços de DNA sintéticos.
- **SUBCONFLUÊNCIA:** estágio de crescimento celular no qual as células atingem uma determinada porcentagem de cobertura do fundo do frasco no qual estão sendo cultivadas as células. Está associada ao estágio de finitude da proliferação celular..
- **TRIPSINIZAR:** método para desprender as células do substrato onde estão aderidas.

\*extraído de DICIONÁRIO MÉDICO ILUSTRADO. Editor Edmondo Andrei.  
Copyright. The McGraw-Hill Book company Inc. 1970. 1104 pgs.

## APÊNDICE B

### Rugosidade, algumas definições:

Quando se trata de medidas de rugosidade, referimo-nos aos desvios em relação à forma ideal de um determinado corpo. É imprescindível, portanto, usar uma forma ideal como a linha de referência, que no caso adotado neste trabalho é a linha média [116].

A **linha média** é definida como uma linha disposta paralelamente a direção do perfil, dentro do percurso de medição ( $l_m$ ) de modo que a soma das áreas superiores sejam exatamente iguais a soma das áreas inferiores, ilustrado na Figura B.1.

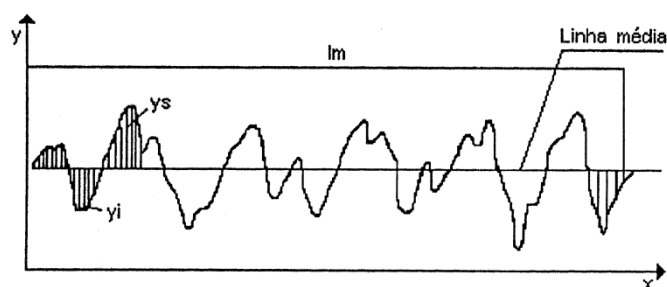


Figura B.1: esquema de representação da linha média (extraído de [116]).

**Percorso inicial ( $l_v$ )** é a primeira parte do trecho apalpado e que é descartada para o cálculo da rugosidade por ser o trecho que contém oscilações de medida.

**Percorso de medição ( $l_m$ )** trata-se da extensão do trecho útil do perfil de rugosidade projetado sobre a linha média.

**Comprimento de amostragem ( $l_e$ )** é tomado como um quinto do percurso de medição.

**Percorso final ( $l_n$ )** é a última parte do trecho apalpado descartado por conter prováveis oscilações e amortecimentos intrínsecos ao ensaio.

**Percorso de apalpamento ( $l_t$ )** é a soma dos percursos: inicial, medição e final.

Todas essas variáveis estão ilustrados no esquema da Figura B.2.

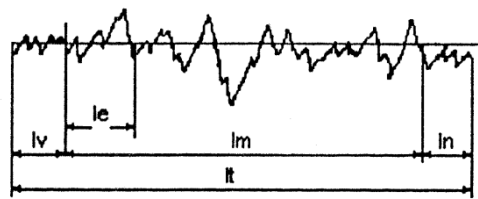


Figura B.2: Percurso de apalpamento para a medição de rugosidade (extraído de [116]).

Após definição dos termos, passamos a definir os parâmetros de avaliação de rugosidade:

**Rugosidade média ( $R_a$ )** é a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos de perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição  $l_m$ , como pode ser observado pela Figura B.3.

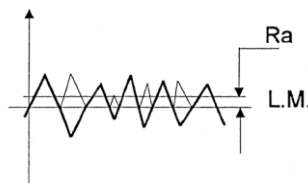


Figura B.3: Perfil de rugosidade média,  $R_a$  (extraído de [116]).

**Rugosidade média ( $R_z$ )** é a média aritmética dos 5 valores de rugosidade parcial  $Z_i$ . A rugosidade parcial  $Z_i$  é definida como a soma dos valores absolutos das ordens dos pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, existentes dentro de um comprimento amostragem ( $l_e$ ), vide Figura B.4.

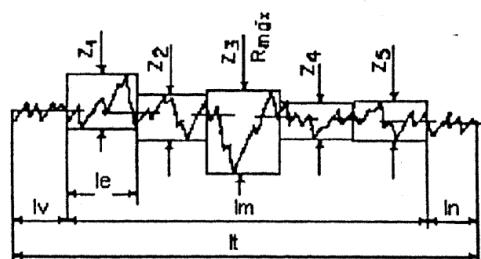


Figura B.4: Esquema dos parâmetros de cálculo de  $R_z$  e  $R_{m\acute{a}x}$  (extraído de [116])

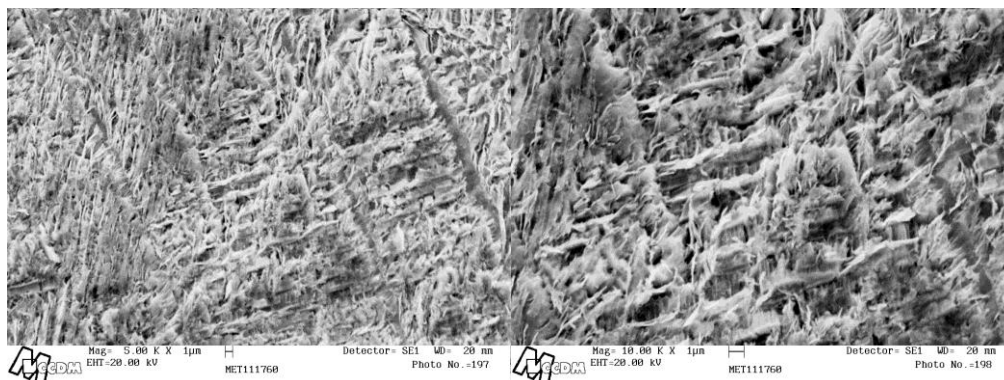
**Rugosidade máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ )** é o maior valor das rugosidades parciais ( $Z_i$ ), que se apresenta no percurso de medição  $l_m$ .

As medidas de rugosidade relatadas em vários trabalhos por diversos autores que dizem respeito à superfície de intraósseos são geralmente reportadas utilizando-se os parâmetros de rugosidade média, principalmente  $R_a$  [9,32,117,118].



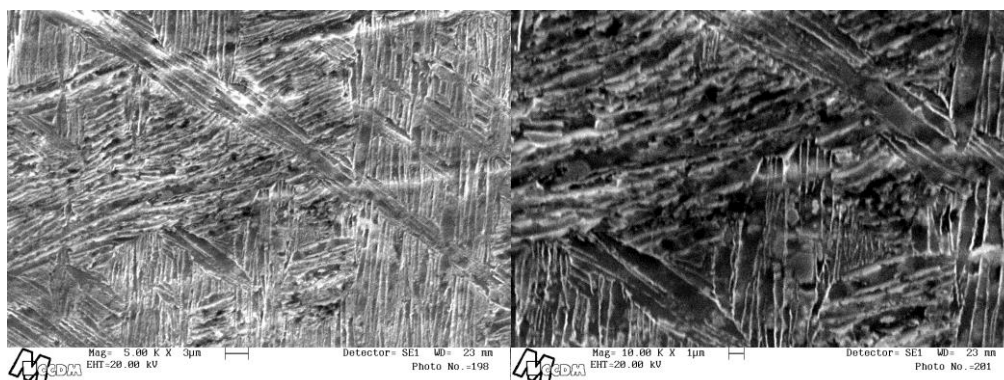


## APÊNDICE C



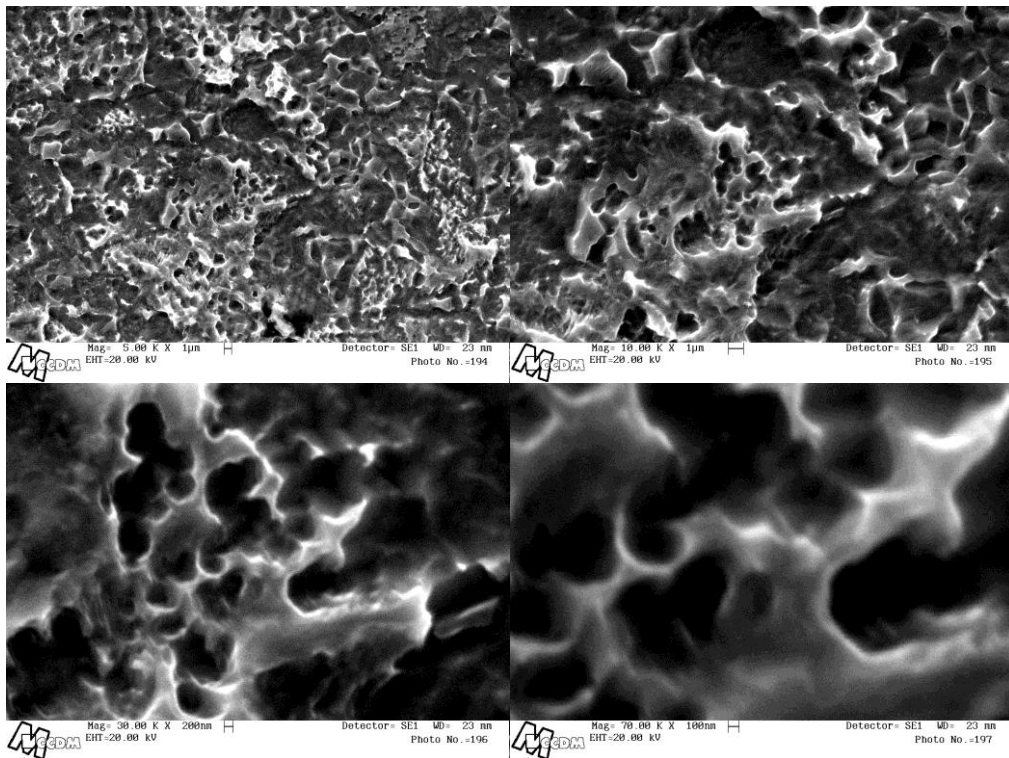
**Ti-6Al-7Nb as cast atacado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 60 °C por 30 min.**

**2467**



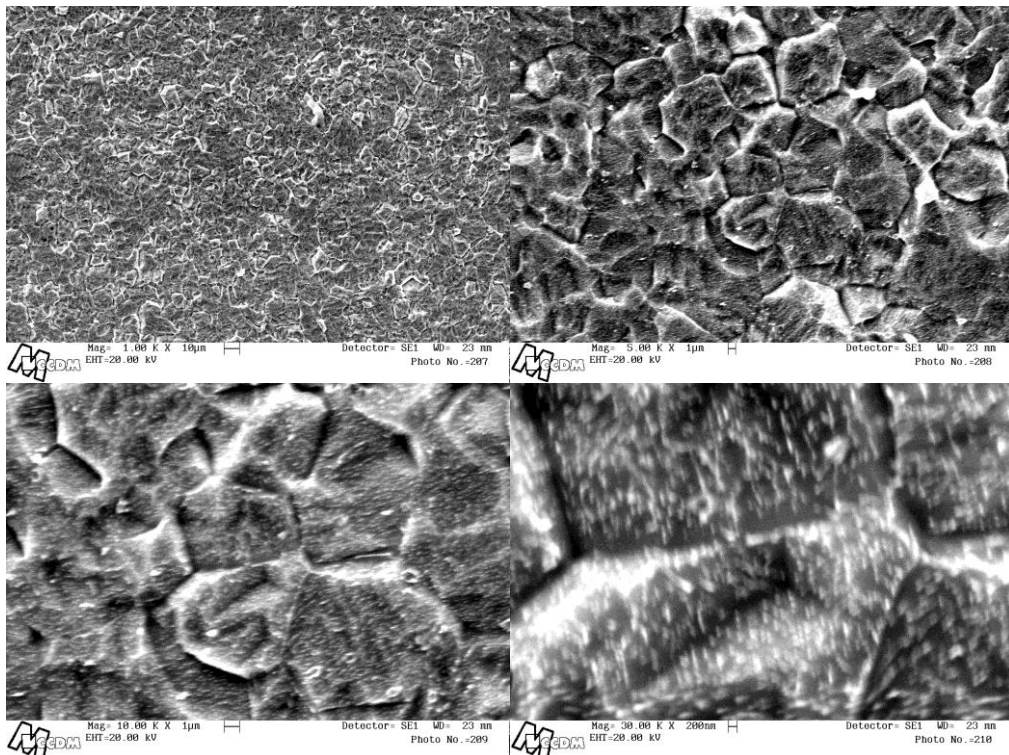
**2267**

**Ácido fosfórico: Ti-6Al-7Nb as-cast.**



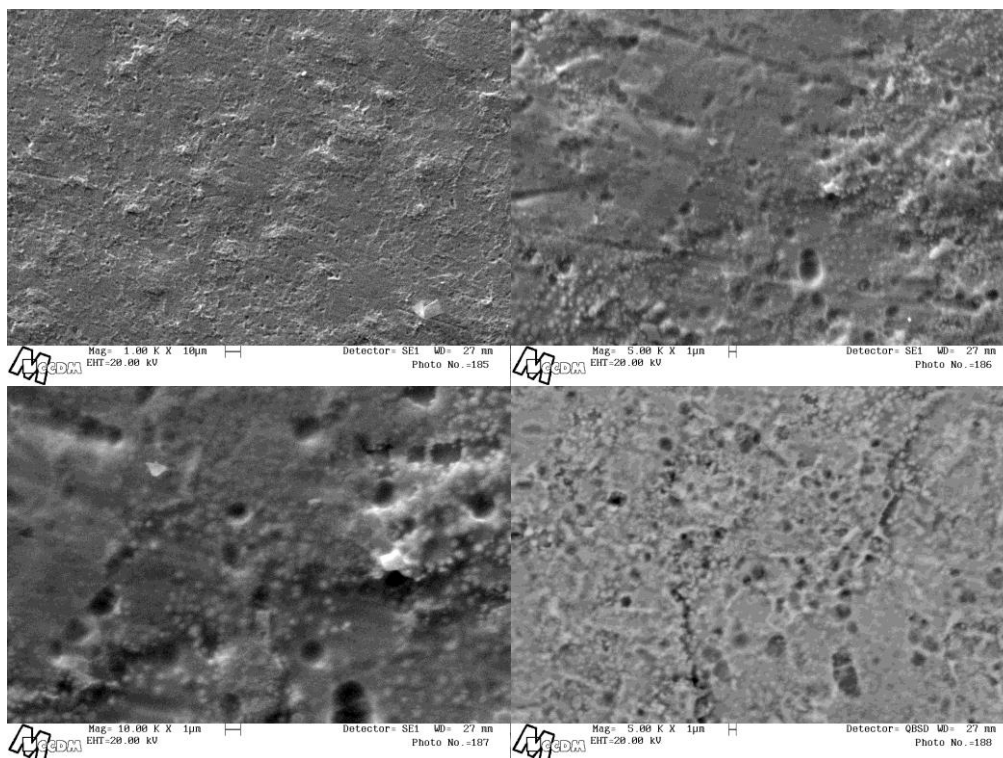
**Ti-6Al-4V em barra atacado com HCl a 60 °C por 30 min.**

1164

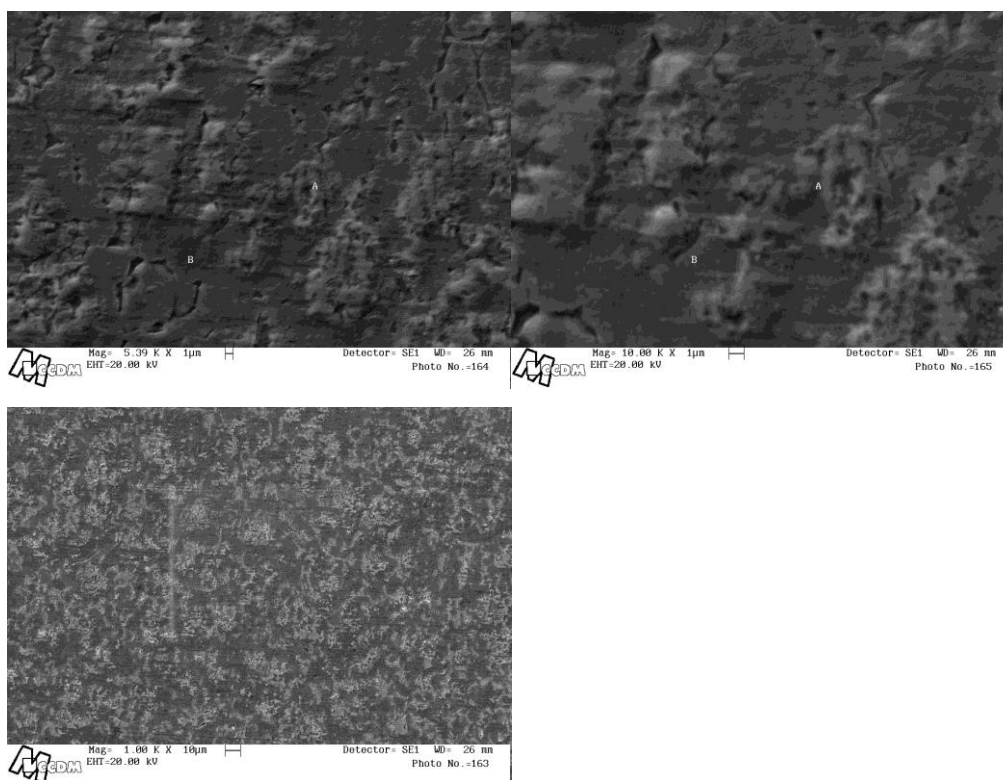


**Ti-CP em barra atacado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 60 °C por 30 min.**

24Ti

Ti-6Al-4V em barra atacado com  $H_2SO_4$  a  $60^\circ C$  por 30 min.

2664

Ti-6Al-4V em barra atacado com  $H_2SO_4 + H_2O_2$  a  $60^\circ C$  por 4 horas.