

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais –

PPGE3M

Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina

TESE DE DOUTORADO

Msc. Leonardo Marasca Antonini

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia de Fraga Malfatti

Porto Alegre

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

PPGE3M

Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina

Leonardo Marasca Antonini

Químico Industrial

Trabalho realizado no âmbito da Escola de Engenharia da UFRGS, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre – RS

2016

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia, área de concentração ciência e tecnologia dos materiais e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia de Fraga Malfatti

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Shigueaki Takimi, DEMET, UFRGS.

Prof. Dr. Christian Viezzer, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA.

Prof. Dr. Denis Jardim Villarinho, Universidade Feevale.

Dr. Tiago Lemos Menezes, DEMET, UFRGS.

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coordenador do PPGE3M/UFRGS

Dedico este trabalho à minha família Marasca Antonini e à minha namorada Daniela Reis pela compreensão aos momentos de ausência e à todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar concluindo mais essa etapa da minha vida, aos meus pais Eva Terezinha Marasca Antonini e Dirceu da Silva Antonini, à minha vó Helena Ninfa de Oliveira Marasca (*In memoriam*) pelos momentos de compreensão, apoio, amor e carinho.

À minha namorada Daniela Reis pelo incentivo, motivação constante e apoio em todos os momentos, mesmo naqueles de ausência.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a. Célia de Fraga Malfatti pela confiança, pela oportunidade de trabalho e orientação em cada etapa do desenvolvimento desta tese.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a. Melissa Camassola da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) pelo auxílio no desenvolvimento dos testes com células e sobre os ensinamentos durante a discussão dos resultados. Além disso, agradeço a Valéria Rodrigues Pinhatti e Rafael Moraes por toda ajuda na realização dos testes com células sobre os biomateriais.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Shigueaki Takimi da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo auxílio durante a esterilização dos biomateriais e pelo tempo dispensado durante as conversas e discussões envolvendo propriedades superficiais dos biomateriais.

Agradeço ao Dr. Roberto Moreira Schroeder e à Prof.^a Dr.^a. Iduvirges Lourdes Müller por todos os ensinamentos e contribuições relevantes a este trabalho de pesquisa.

Ao Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço a equipe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) pelos testes bacteriológicos e micológicos nos biomateriais.

Agradeço a todos os colegas do LAPEC, em especial, Carol Antunes Corrêa pelo apoio e colaboração em análises de microscopia de força atômica (AFM), ao Leandro Brunholi e Leonardo Simoni com a preparação das amostras para análise

metalográfica, aos colegas de sala Joel da Silva Rodrigues, Thais Cristina Lemes dos Santos, Alexander Bervian, Lílian Rossa Beltrami, Estela Knopp Kerstner, Eliane Coser, Gustavo Alberto Ludwig, Matias de Angelis Korb, Sandra Raquel Kunst, Tiago Lemos Menezes, Elen Almeida, Maria Rita pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica André Camargo, Carolina, Remedi de Menezes, Maurício del Vecchio, Dimitri Rangel Muller, Juliana Grolli Luca, Júlio Enes Azzi, Júlio Queiroz Caselani, Martina Cadorin, Marina Milene Biscaro, Matheus Espindola de Souza, Tobias Bertoldi Agostini, Aquiles Ely Johann, Felipe Wasen Klein, Jordana Silveira de Souza, Karine Parise, Lucas Madalosso de Lemos, Pedro Glowatzki Pinheiro, Rafael Gomes Mielczarski, Raphael Basso Mariani, Thayse Miranda Macedo, Simone Vendruscolo Milesi pela ajuda na preparação das amostras.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante o período de doutorado.

A todos meus amigos e profissionais do Laboratório de Pesquisa em Corrosão pela amizade, auxílio e contribuição a este trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
3.1 Biomateriais.....	5
3.1.1 Classificação dos biomateriais	6
3.2 Ti6Al4V.....	7
3.2.1 Propriedades do TiO ₂	11
3.3 Tratamentos de superfícies para Ti e suas ligas	11
3.3.1 Ataque Ácido.....	11
3.3.2 Eletropolimento.....	12
3.3.3 Anodização.....	13
3.4 Rugosidade versus tratamentos químico-eletrouímicos	16
3.5 Limpeza e ativação de superfícies por plasma	16
3.5.1 Plasmas.....	16
3.5.2 Geração do plasma	17
3.5.3 Aplicações em biomateriais	17
3.5.4 Mecanismo de limpeza e ativação das superfícies	18
3.6 Esterilização de biomateriais metálicos.....	19
3.6.1 Autoclave	20
3.6.2 UV e Raios Gama.....	21
3.6.3 Plasma ou Esterilização a Plasma	22
3.6.4 Esterilização por Óxido Etileno	23
3.7 Definição das escalas de rugosidade macro, micro e nanométrica.....	24
3.8 Molhabilidade versus Energia de Superfície	24
3.9 Rugosidade micrométrica versus Molhabilidade	26
3.10 Interação célula-substrato	26
3.11 Adesão Celular	27
3.11.1 Rugosidade nano e micrométrica versus adesão celular	28
3.11.2 Energia de superfície/Molhabilidade versus adesão celular	31
3.11.3 Composição química da superfície versus Adesão Celular	31
3.12 Rugosidade micrométrica versus Tamanho da Célula	32
3.11 Osseointegração.....	33

3.12 Células-Tronco (CTs).....	36
3.12.1 Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs).....	37
3.13 Morfologia Osso trabecular e cortical	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Materiais empregados.....	44
4.2 Métodos empregados	46
4.2.1 Preparação do substrato metálico	46
4.2.2 Tratamento Eletroquímico.....	47
4.2.3 Caracterização das amostras de Ti6Al4V	48
4.3 Métodos de esterilização	50
4.4 Ensaio Microbiológico	51
4.5 Ensaio de Citotoxicidade em Ti6Al4V e Ti puro	51
4.6 Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de medula-óssea (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells – BMMSCs).....	52
4.7 Adesão das BMMSCs com os biomateriais	52
4.7.1 MEV após adesão das BMMSCs com os biomateriais	53
4.8 Ensaio de viabilidade celular.....	53
4.9 Diferenciação Celular	54
4.10 Análise Semi-quantitativa de Mineralização.....	54
4.11 Quantificação da Atividade de Fosfatase Alcalina (Alkaline Phosphatase - ALP)	54
4.12 Análise estatística dos dados	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
5.1 Estudo da influência do tempo de tratamento eletroquímico sobre a morfologia, estrutura e composição química superficial.....	56
5.1.1 Conclusões Parciais.....	66
5.2 Obtenção de superfícies nanoestruturas em 4 e 12 minutos de tratamento eletroquímico: limpeza por Plasma de Ar	68
5.2.1 Conclusões Parciais.....	83
5.3 Efeito dos métodos de esterilização sobre a morfologia de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V.....	85
5.3.1 Conclusões Parciais.....	91
5.4 Ensaio bacteriológico e micológico, determinação do potencial citotóxico, adesão e diferenciação celular para amostras esterilizadas por plasma de ar	93
5.4.1 Ensaio Microbiológico	93

5.4.2 Potencial citotóxico	93
5.4.3 Adesão Celular e Osteogênese	95
5.4.4 Diferenciação celular e Mineralização	100
5.4.5 Conclusões Parciais.....	104
6. CONCLUSÕES	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do diagrama de fases de equilíbrio pseudo-binário para Ti-6Al-4V. Adaptado de Wanhill et al. 2012 [30].....	9
Figura 2: Ilustração esquemática de uma célula eletrolítica para eletropolimento.....	12
Figura 3: Esquema representando o processo superficial de recombinação de átomos de O com a bactéria sobre um filme fino. Adaptado de U. Cvelbar et al. [92].....	19
Figura 4: Esquema do processo de esterilização por plasma de oxigênio após 40s de exposição. Adaptado de U. Cvelbar et al. [92].....	19
Figura 5: Ilustração dos eventos que ocorrem sobre a superfície do titânio durante os processos de limpeza, esterilização. Adaptação de Junkar et al. 2016 [96].....	20
Figura 6: Fibroblastos provenientes da gengiva humana crescendo sobre Araldite. (A,B) Sulcos com 2 µm de largura e 0,4 µm de profundidade. B é uma imagem aumentada de A. (C,D) Sulcos com 5 µm de largura e 0,4 µm de profundidade [].	33
Figura 7: Crescimento de Fibroblasto sobre titânio revestido com Araldite. Os sulcos são de 10 µm de largura e 3 µm de profundidade [166].....	33
Figura 8: Representação esquemática do processo de osseointegração e formação do osso na superfície do biomaterial: a) choques das plaquetas com o implante, b) liberação de citocinas e fatores de crescimento, c) migração das células osteogênicas para a superfície do implante, d) diferenciação das células em osteoblastos e) fixação dos osteoblastos no implante através da linha de cementária f) início da formação de uma nova matriz óssea [Adaptada de].....	35
Figura 9: Crescimento e diferenciação de osteoblastos. (a) estágios do crescimento e diferenciação de osteoblastos.	39
Figura 10: Imagem indicando a região do osso cortical e trabecular de um fêmur humano (a) Adaptado de N. M. B. K. Willems et al. []. Imagens obtidas pelo autor por MEV-FEG de seção transversal do osso cortical (b).....	40
Figura 11: Fluxograma da metodologia desenvolvida nesse trabalho de pesquisa.	43
Figura 12: Imagem obtida por Microscopia Óptica da microestrutura da seção transversal da liga Ti6Al4V.....	45
Figura 13: Imagens MEV-FEG da microestrutura da seção transversal da liga Ti6Al4V (a,b).....	45

Figura 14: Imagens MEV-EDS da microestrutura da seção transversal da liga Ti6Al4V: a) imagem obtida por eletrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti, c) mapeamento do elemento V e d) mapeamento do elemento Al.	46
Figura 15: Foto do sistema de tratamento eletroquímico utilizado nesse estudo.	47
Figura 16: Representação do ângulo formado entre a gota e a superfície: (a) Superfície hidrofóbica (b) Superfície hidrofílica [adaptada de 21].	49
Figura 17: Transientes de densidade de corrente da amostras de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente a 25V por 90 minutos, a 7°C.	56
Figura 18: Imagens obtidas AFM das amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8 minutos. (a) Lixada, (b) 2 min, (c) 4 min, (d) 8 min.	57
Figura 19: Imagens obtidas por Microscopia Óptica das amostras de Ti6Al4V sem tratamento eletroquímico e tratada eletroquimicamente a 25V, 2 minutos a 7°C. (a) Lixada, (b) 2 min, (c) 4 min, (d) 8 min.	59
Figura 20: Rugosidade (μm) para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos, 7°C.	61
Figura 21: Rugosidade em nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.	62
Figura 22: Medidas de ângulo de contato em DMEM e H ₂ O para as amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.	64
Figura 23: Difratomogramas de DRX para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8 e 12 minutos.	65
Figura 24: Difratomogramas de DRX para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 30, 60 e 90 minutos.	65
Figura 25: Resultados de DRX ângulo rasante (5°) para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8 e 12 minutos.	66
Figura 26: Transiente de densidade de corrente das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos pré-limpas com plasma de ar anterior ao tratamento eletroquímico.	69
Figura 27: Imagens obtidas por AFM das amostras após limpeza por Plasma de Ar e tratamento eletroquímico. (a) Lixada, (b) Trat. Eletroq. 4 min, (c) Trat. Eletroq. 12 min.	70

Figura 28: Espectro de XPS da superfície de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 4 minutos, a 25V e 7°C.....	73
Figura 29: Espectro de XPS da superfície de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 12 minutos, a 25V e 7°C.....	74
Figura 30: Picos do espectro de XPS após tratamento eletroquimico por 4 minutos, a 25V e 7°C. (a) C1s, (b) O1s.	74
Figura 31: Picos do espectro de XPS após tratamento eletroquimico por 12 minutos, a 25V e 7°C. (a) C1s, (b) O1s, (c) Ti 2p.	75
Figura 32: Imagens obtidas por MEV-FEG das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 4 minutos a 7°C.....	80
Figura 33: Imagen MEV-FEG das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C.	80
Figura 34: Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 4 minutos a 7°C: a) imagem obtida por eletrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti.....	81
Figura 35: Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C: a) imagem obtida por eletrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti.....	82
Figura 36: Imagens bidimensionais obtidas por AFM das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos: (a) Antes dos processo de esterilização, (b) Esterilizada por Plasma de Ar, c) Esterilizada em Etanol+PBS, (d) Esterilizada por Autoclave.....	87
Figura 37: Imagens tridimensionais obtidas por AFM das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos após os métodos de esterilização. (a) Antes dos métodos de esterilização, (b) Esterilização por Plasma de Ar, (c) Esterilização por Etanol+PBS, (d) Esterilização por Autoclave.	88
Figura 38: Medidas de ângulo de contato em DMEM antes e após os métodos de esterilização.	90
Figura 39: Citotoxicidade após 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias de exposição dos biomateriais.	95
Figura 40: Resultados de Adesão celular para todos os biomateriais avaliados.	96
Figura 41: Viabilidade celular de BMMSCs após 4 dias de contato com os biomateriais.	97

Figura 42: Imagens de MEV do Titânio puro lixado após ensaio de cultivo de BMMSCs por 4 dias. (d) Ampliação da região indicada na imagem (c).....	98
Figura 43: Imagens de MEV do Ti6Al4V lixado após ensaio de cultivo de BMMSCs por 4 dias. (h) Ampliação da região indicada na imagem (g).....	99
Figura 44: Imagens de MEV do Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos após cultivo de BMMSCs por 4 dias.	100
Figura 45: Imagens de MEV do Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 minutos após ensaio de Adesão Celular.	100
Figura 46: Atividade de fosfatase alcalina expressa em μM de produto/ μg de proteína (n = 3).....	102
Figura 47: Quantificação indireta da mineralização expressa em mM de cálcio/ 10^4 células.	103
Figura 48 (continuação): Imagens mostrando a superfície das amostras após ensaio de Alizarina (Deposição de matriz óssea). (c) BMMSCs associadas a Titânio puro em meio osteogênico, (d) BMMSCs associadas a Ti6Al4V em meio osteogênico. Barra de escala 50 μm , aumento 10x. (e) BMMSCs associadas a Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos em meio osteogênico e (f) BMMSCs associadas a Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 minutos em meio osteogênico.	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resultados de composição química da liga Ti6Al4V.....	44
Tabela 2: Descrição das amostras pré-limpas com Etanol e posteriormente tratadas eletroquimicamente por 2 min – 90 min.....	48
Tabela 3: Medidas de rugosidade (μm) para as amostras lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos, 7°C.....	61
Tabela 4: Medidas de rugosidade em escala nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.	62
Tabela 5: Ângulos de contato para as amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos em DMEM e H ₂ O.....	63
Tabela 6: % Atômico de cada elementos obtido a partir dos resultados de XPS das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos, 25V e 7°C.....	73
Tabela 7: Valores da rugosidade obtidas em escala nanométrica.	77
Tabela 8: Valores da rugosidade obtidas em escala micrométrica.	78
Tabela 9: Medidas do ângulo de contato em DMEM e H ₂ O (amostras limpas com plasma de ar antes da medida).	78
Tabela 10: Medidas de rugosidade em escala nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente por 4 min, 25V, 7°C.....	89
Tabela 11: Medidas de rugosidade em escala micrométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente por 4 min, 25V, 7°C.	89
Tabela 12: Medidas de ângulo de contato para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos em DMEM e H ₂ O antes e após os métodos de esterilização.....	90
Tabela 13: Atividade de fosfatase alcalina expressa em μM de produto/ μg de proteína.	102
Tabela 14: Quantificação indireta da mineralização expressa em mM de cálcio/ 10^4 células. (n=3).	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AAD	Amino Actinomycin D
AES	Auger electron spectroscopy
AFM	Atomic Force Microscope
ALP	Alkaline phosphatase
ASTM	American society for testing and materials
bcc	Estrutura cristalina cúbica de corpo centrado
BCM	Basal Culture Media
βGP	Beta-glycerolphosphate
BHI	Brain Heart Infusion
BMP 2	Bone morphogenetic protein 2
BMMSCs	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells
BSP	Bone sialoprotein
CA	Califórnia
ccc	Estrutura cúbica de corpo centrado
CCM	Cell culture media
CNC	Comando numérico computadorizado
cp	comercialmente puro
CTs	células-troncos
CTMs	células-tronco mesenquimais
Dex	Dexamethasone
DRX	Difração de Raios-X
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EBM	Electron Beam Melting
ECM	Extracelular Matrix
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FEGSEM	Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy
FEG-EDS	Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray spectrometry

FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
hAMSCs	Human adipose-derived mesenchymal stem cells
hcp	Estrutura cristalina hexagonal compacta
INSIGNEO	Insigneo institute for in silico medicine
ISO	International Organization for Standardization
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão
LCMicro	Laboratório e Centro de Microscopia
LD	Limite de Detecção
MEV-EDS	Microscópio Eletrônico de Varredura com Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X.
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
MO	Microscopia Óptica
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
OPN	Osteopontin
OPT	Oxygen plasma treatment
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSG	Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine
RF	Radio frequência
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SBF	Simulated body fluid
SCC	Squamous cell carcinoma
SHR	Spontaneously Hypertensive Rat
SLM	Selective Laser Melting
SPM	Scanning probe microscopy
TCP	Fosfato tricálcico
TGF β 1	Transforming Growth Factor beta 1
u.a.	unidade alternativa
UCS	Universidade de Caxias do Sul
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
VM/VP	Vermelho de Metila/Vogel Proskauer
vol.	Volume
XRD	X-Ray Diffraction
XRF	X-Ray Fluorescence
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
°	Ângulo de contato
#	Grana
Å	Angström
θ	Ângulo teta
pH	potencial de hidrogênio
μm	Micrometro
Ca	Cálcio
P	Fósforo
Sn	Estanho
Nb	Nióbio
Ta	Tântalo
wbc	White blood cell
rbc	Red blood cell
A/cm ²	Ampére por Centímetro Quadrado
mA	Miliampére
cm	Centímetro
HCl	Ácido Clorídrico
F-	Íon Fluoreto
HF	Ácido Fluorídrico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
α	Alfa
β	Beta
Zr	Zircônio
CrCo	liga cromo-cobalto
TiF ₆ ⁻	Íon hexafluoreto de titânio
Ti6Al4V	liga titânio, alumínio e vanádio
Ti-2,5Cu	liga titânio e cobre
Ti-5Al-2,5Sn	liga titânio, alumínio e estanho
Ti3Mo6Sn5,2Zr	liga titânio, molibdênio, estanho e zircônio

Ti-8Ta-3Nb	liga titânio, tântalo e nióbio
Ti-6Al-2Sn-4Zr-2Mo	liga titânio, alumínio, estanho, zircônio e molibdênio.
Ti-8Al-1Mo-1V	liga titânio, alumínio, molibdênio e vanádio.
Ti-6Al-2Sn-4Zr-6Mo	liga titânio, alumínio, estanho, zircônio e molibdênio.
Ti-15Mo-3Nb-3Al-0,2Si	liga titânio, molibdênio, nióbio, alumínio e silício.
Ti40Zr10Cu38Pd12	liga titânio, zircônio, cobre e paládio.
Ti-10V-2Fe-3Al	liga titânio, vanádio, ferro e alumínio.
Ti6Al7Nb	liga titânio, alumínio e nióbio.
Ti18Zr9,5Nb4Sn	liga titânio, zircônio, nióbio e estanho
Ti13Nb13Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti21,2Nb5,6Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti21,8Nb6Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti19,7Nb5,8Ta	liga titânio, nióbio e tantalo
Ti18,3Nb5,1Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti20,9Nb5,7Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti20,8Nb5,5Zr	liga titânio, nióbio e zircônio
Ti18Zr12,5Nb2Sn	liga titânio, zircônio, nióbio e estanho
Ti18Zr11Nb3Sn	liga titânio, zircônio, nióbio e estanho.
Ti-25Ta-25Nb	liga titânio, tantalo e nióbio
Ti-25Ta-25Nb-3Sn	liga titânio, tantalo, nióbio e estanho
Ti-22Nb-6Ta	liga titânio, nióbio e tântalo
E	Campo elétrico
M	Molar
mm	Milímetro
atm	atmosfera
mN	milinewton
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
Cu	Cobre
CF ₃	Trifluorometil
Pd	Paládio
μL	Microlitros
TiO ₂	Dióxido de Titânio
NH ₄ F	Fluoreto de Amônio

u.a.	Unidade Arbitrária
CO ₂	Dióxido de Carbono
TiN	nitreto de titânio
TiOH	hidróxido de titânio
mM	miliMolar
µL	microlitro
vol%	porcentagem em volume
mL	mililitro
nmol	nanomol
min	minuto
mA / cm ²	miliampère/centímetro quadrado
nmol pNP/min	nmol de p-nitrofenol por minuto
p/v %	porcentagem na relação entre peso e volume
NiTi	Níquel-Titânio (Nitinol)
S	enxofre
eV	elétron volt
% At.	porcentagem atômica
TiO ₂	óxido de titânio
M	Molaridade
Ti	Titânio
Zr	Zircônio
Hf	Háfnio
Al ₂ O ₃	trióxido de alumínio
V ₆ O ₁₃	Tridecaóxido de Hexavanádio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanádio
VO ₂	dióxido de vanádio
V ₂ O ₄	Tetróxido de Divanádio
V ₂ O ₃	Trióxido de Divanádio
Al ₂ O ₃	trióxido de alumínio
TiN	nitreto de titânio
TiOH	hidróxido de titânio
Ni-Cr-Be	liga de níquel, cromo e berílio
Al	Alumínio
V	Vanádio

s	segundo
μm	micrométrica
Ti-cp	titânio comercialmente puro
HNO_3	ácido nítrico
UV	ultravioleta
CO	monóxido de carbono
OH	hidroxila
h	hora
N	nitrogênio
F	flúor
Ra (nm)	média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação a linha média.
Ra (μm)	média aritmética de valores absolutos em todo o comprimento de amostragem.
Rz (nm)	média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial, considerando os pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média.
Rz (μm)	cinco picos mais altos e vales mais baixos ao longo de todo o comprimento de amostragem.
Mg	magnésio
cm^2	centímetros quadrado
Si	silício
μ	mícrons
Cl	cloro
$\text{K}\Omega$	quiloohm
$[\text{TiF}_6]$	Hexfluoreto de titânio
HCl	ácido clorídrico
NaCl	cloreto de sódio
KCl	cloreto de potássio
kV	quilovolt
kW	quilowatts

RESUMO

Propriedades superficiais como rugosidade nanométrica, micrométrica e molhabilidade têm influenciado na qualidade da interface osso-implante. Nesse contexto, processos de tratamento eletroquímico de superfícies de titânio e suas ligas têm sido desenvolvidos, visando controlar a morfologia através da escolha de parâmetros experimentais adequados, para a obtenção de superfícies com diferentes texturas. As células-tronco são células que se autorrenovam e possuem plasticidade; nessa última característica inclui a capacidade de diferenciação osteogênica. Além disso, estas células conseguem criar um ambiente favorável a regeneração e reparo de diversos tecidos e órgãos lesados. Como essas células respondem bem a superfícies de topografia nanométrica, a texturização dessas superfícies poderá influenciar de forma positiva na diferenciação osteogênica de células-tronco. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do processo de nanotexturização da liga de titânio Ti6Al4V por tratamento superficial eletroquímico, visando acelerar o processo de diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais. Os tratamentos superficiais foram realizados através de tratamento eletroquímico por 4 e 12 minutos, a 25V e 7°C. A caracterização morfológica das superfícies foi realizada por meio de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), microscopia óptica e perfilometria. Além disso, as superfícies foram caracterizadas quanto à composição química (fluorescência por raios-x), estrutural (difração de raios-x, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x) e molhabilidade. As superfícies com tratamento superficial foram avaliadas quanto a citotoxicidade. Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de rato SHR foram associadas às superfícies, e parâmetros como taxa de adesão e viabilidade celular foram identificados. As células associadas com os biomateriais ficaram expostas ao meio indutor de osteogênese por 14 dias, após esse período a atividade de fosfatase alcalina e a mineralização foram quantificadas. Os resultados mostraram que nenhum dos biomateriais foi citotóxico e que a superfície nanoestruturada associada com a esterilização por plasma de ar da amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos teve maior número de células aderidas, acelerando o processo de osteogênese e a mineralização das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSCs) quando relacionadas à este tipo de tratamento no biomaterial.

ABSTRACT

Surface properties as nanometric and micrometric roughness and wettability have influenced in the quality of the bone-implant interface. In this context, electropolishing processes on the surface of titanium and its alloys have been developed aiming to control the morphology of the surface by choosing adequate experimental parameters to obtain different textures. The stem cells are self-renewal cells and they have plasticity, which represents the capacity of osteogenic differentiation. Moreover, the stem cells can create a favorable environment to regeneration and recover various damaged tissues and organs. Based on the knowledge that these cells respond well to surface of nanometric topography, the texturing of surfaces can influence positively osteogenic differentiation of stem cells. The objective of the present work was to evaluate the influence of the nanotexturing process over a Ti6Al4V titanium alloy by electrochemical superficial treatment, aiming to accelerate the osteogenic differentiation in stem cells. The surface treatments were realized by electrochemical treatment for 4 and 12 minutes, 25 V at 7°C. The morphological characterization of the surfaces was realized by atomic force microscope (AFM), Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEGSEM), optical microscopy and Perfilometry. Furthermore, the surfaces were characterized as to the chemical composition (X-Ray Fluorescence), structural (X-Ray Diffraction, X-ray photoelectron spectroscopy) and wettability. The surfaces with surface treatments were evaluated as to cytotoxicity. The Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells were associated to the surfaces, and parameters as adhesion rate and cellular viability were identified. The cells associated with the biomaterials were exposed to osteogenic media for 14 days, after that, the alkaline phosphatase and mineralization were quantified. The results showed that none of the biomaterials was cytotoxic and that the nanostructured surface associated with air plasma sterilization of the electrochemically treated sample for 4 minutes had greater number of adhered cells, it increasing the osteogenesis rate and the mineralization of the Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells when related to this type of treatment in the biomaterial.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente há uma constante e crescente procura por metais e suas ligas para aplicações como biomateriais. A partir dessa informação nota-se a importância em controlar as propriedades como resistência à corrosão, boa biocompatibilidade, resistência mecânica e resistência à fadiga. Embora haja uma variedade de materiais com diversas propriedades, é válido salientar que metais utilizados em implantes necessitam ser altamente resistentes a tensões mecânicas e à corrosão. Os produtos de corrosão são sais do metal, os quais estando no meio extracelular poderão ser nocivos aos tecidos, causando sua inflamação e conseqüentemente necrose.

Dos metais mais utilizados para esse fim, destaca-se o titânio e sua liga Ti6Al4V como sendo materiais de elevada resistência mecânica, alta resistência à corrosão e boa biocompatibilidade [1,2]. A partir do interesse em aplicações biomédicas e na melhora do processo de osseointegração osso-implante, processos de tratamentos superficiais e de texturização como o eletropolimento/anodização vêm sendo propostos.

A reparação de defeitos ósseos e a restauração da função normal do tecido ósseo são graves desafios da cirurgia ortopédica e oral-maxilofacial. A melhor alternativa era a reconstrução de defeitos de tecidos ósseos através do enxerto ósseo autólogo do paciente ou ainda o enxerto ósseo alogênico de um doador. No entanto, essas técnicas apresentam complicações como dor crônica e morbidade do local doador, além de infecções e hipersensibilidade de 10-30% dos pacientes, e portanto isso tem promovido a procura de alternativas mais adequadas [3].

S. O. Akintoye et al. [4] têm mostrado que células tronco-mesenquimais são uma promissora alternativa para a regeneração óssea. H. Petite et al. [5] têm mostrado que o osso orofacial e tecido dentário possuem uma variedade de células mesenquimais. O interesse nesse tipo de células cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados [6].

Nesse sentido, procedimentos menos invasivos poderiam ser utilizados para solucionar complicações pós-cirúrgicas com implantes. Para evitar isso, seria necessário a remoção de células de tecido adiposo (pele) para induzir a diferenciação osteogênica em células ósseas sobre as superfícies nanoestruturadas do biomaterial, promovendo a formação de uma matriz óssea a partir do material coletado do paciente. Essa metodologia evitaria que pacientes fossem submetidos à cirurgias mais invasivas para remoção do osso e coleta dessas células ósseas para posterior formação de matriz óssea.

F. Marini et al. [7] demonstraram que superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V e Ti13Nb13Zr possuem a capacidade de induzir o crescimento e diferenciação osteogênica de células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (hAMSCs), suportando a atividade de osteoblastos adultos em termos de deposição de cálcio mineral e produção de proteínas de matriz extracelular óssea. No entanto, esses mesmos autores chamam a atenção de que não há quase estudos na literatura indicando a influência de biomateriais metálicos nanoestruturadas sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco de tecidos.

I. Tognarini et al. [8] demonstraram que AMSCs possuem a mesma habilidade de se diferenciar em células osteoblásticas e produzir matriz óssea como células-tronco derivadas de medula óssea (BMSCs). Os resultados indicam que AMSCs são uma excelente fonte de precursores de osteoblastos e que são células promissoras para serem utilizadas em aplicações para engenharia de tecido ósseo autógeno e para a reconstrução de defeitos no osso.

D. R. Carvalho et al. [9] desenvolveram estudos com eletropolimento visando à modificação da textura da superfície de titânio e suas ligas; enquanto que S. Nishiguchi et al. [10] salienta que o processo de eletropolimento objetiva realizar um polimento superficial. O eletropolimento pode ser considerado um processo anódico em que ocorre a liberação de oxigênio simultaneamente com a remoção do material da superfície. Essa exposição do oxigênio à superfície poderá fazer com que ocorra a passivação da mesma por óxidos metálicos, aumentando desta forma a resistência à corrosão [11].

Estudos recentes têm mostrado que o ataque com ácidos, podem promover a formação de superfícies mais rugosas em escala micrométrica [9]. F. Lüthen et al. [12] e A. Bagno et al. [13] têm mostrado que além da rugosidade, a texturização da superfície influencia diretamente e de forma positiva sobre o processo de osseointegração.

A. Klymov et al. [14] mostraram que uma superfície inteligente proveniente do processo de texturização por tratamentos superficiais eletroquímicos (anodização, eletropolimento) tem a capacidade de atrair e estimular células mesenquimais derivadas de medula óssea e aumentar o contato osso-implante. Porém efeitos contrários podem ocorrer, onde determinadas topografias podem prejudicar ou repelir o crescimento desse tipo de célula. Dessa forma é importante conhecer e controlar o tipo de topografia obtida tanto em escala nanométrica como micrométrica a partir desses tratamentos superficiais eletroquímicos.

K. Yang et al. indicaram que em determinadas topografias na superfície podem influenciar na formação e dissociação da adesão e espraiamento de células-tronco

mesenquimais neurais humanas). Isso ocorre pelo contato dessa superfície com a membrana celular e compartimentos intracelulares da própria matriz celular [15].

Nesse contexto, no presente trabalho pretende-se estudar o efeito da nanotexturização da liga Ti6Al4V realizada por tratamento superficial eletroquímico na indução da osteogênese em células-tronco derivadas de medula óssea murina.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como estudar o efeito da nanotexturização da liga Ti6Al4V realizada por tratamento superficial eletroquímico na indução da osteogênese em células-tronco derivadas de medula óssea murina.

Objetivos específicos:

- Aproximar a nanotextura obtida por tratamento eletroquímico com a nanotextura do osso trabecular.
- Correlacionar o efeito do tempo de tratamento eletroquímico com a nanotexturização superficial.
- Investigar o efeito de diferentes processos de esterilização sobre a superfície tratadas eletroquimicamente para indicar um processo que não modifique a superfície testada.
- Compreender e correlacionar o efeito da nanotextura de Ti6Al4V sobre o crescimento, adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco em células ósseas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biomateriais

Biomaterial pode ser caracterizado como uma substância ou combinação destas, não farmacológica, natural ou sintética. Um biomaterial pode ser usado por um tempo ou definitivamente, em parte de um sistema ou em tratamento para este sistema, ajudando na regeneração ou substituição de tecidos e órgãos, ou nas funções do corpo [16].

A principal característica desses materiais é que eles devem ser biocompatíveis, não-tóxicos, não promoverem reações imunológicas e alérgicas, não devem interferir na cicatrização de tecidos durante e após intervenção cirúrgica. Os tecidos devem interagir sem dano com propriedades biomecânicas do material, imune a corrosão, e em alguns casos degradável [16].

Uma definição mais atualizada de biomateriais em termos de biocompatibilidade se resume à característica desse material de acordo com seu desempenho em termos de uma resposta biológica apropriada à aplicação a que se propõe [17].

Segundo L. Brown et al. [18] e J. Enderle et al. [19] um biomaterial deve apresentar características físicas e químicas que satisfaçam exigências severas do organismo. Os materiais usados nas substituições de articulações devem ser resistentes ao desgaste. Qualquer defeito que ocorra nesses materiais põe em risco a vida das pessoas que os recebem. Com relação a química, os biomateriais devem ser aprovados para serem usados em qualquer aplicação médica, e permanecer inócuo durante toda a vida, já que poderão ficar dentro do organismo por um longo período de tempo

A. Diener et al. [20] destaca que os biomateriais podem ser usados para implantação permanente no corpo humano ou como um suporte temporário de células e tecidos. A superfície desses materiais deve fornecer sinais químicos e físicos que guiem a diferenciação e agrupamento de células para formarem tecidos biofuncionais.

A. R. Santos [21] mostrou que um biomaterial precisa apresentar algumas características importantes, tais como: biocompatibilidade; biofuncionalidade; textura de superfície compatível com a adesão celular; resistência à corrosão, para manter as propriedades mecânicas e impedir a degradação do material frente aos fluídos corporais, entre outras propriedades.

Segundo F. Pfeiffer et al. [22], um bom biomaterial precisa estimular o ambiente biológico a responder de modo positivo. O titânio é o metal que reúne o maior número de requisitos para uso em cirurgias, enquadrando-se no grupo de metais chamados “metais

especiais”. Titânio e suas ligas têm sido utilizados frequentemente como dispositivos médicos na área dental, ortopédica e cardiovascular devido o seu baixo módulo de elasticidade, alta resistência a corrosão e excelente biocompatibilidade [23].

O titânio pode corroer rápido ou lentamente, dependendo das condições do meio. Pode corroer em duas condições: em anaerobiose, onde a água é o agente de oxidação e em aerobiose, onde o oxigênio é o agente de oxidação [20]. O titânio e suas ligas de nióbio, tântalo, zircônio e ródio são conhecidos por possuírem excelente resistência à corrosão em água. Quando implantados, esses metais são protegidos por uma camada de óxido densa e passiva com baixa solubilidade e baixa reatividade a moléculas orgânicas [24].

Há uma tendência de se considerar o titânio como sendo ideal para implantes, pois é bioinerte, ou seja, não libera íons que possam reagir com moléculas orgânicas, e apresenta boas propriedades mecânicas [25].

Para D. Arcos et al. [26], a busca futura se dará por biomateriais bioativos que combinem tipo de superfície, porosidade e sua capacidade de interagir com fatores biológicos.

3.1.1 Classificação dos biomateriais

Classificação dos biomateriais de acordo com a resposta do tecido biológico pode ser dividida da seguinte forma [27]:

Incompatíveis: A liberação de substâncias tóxicas em concentrações que conduzem a efeitos danosos ao organismo podendo resultar numa rejeição do implante.

Biotoleráveis: moderadamente aceitos pelo tecido receptor e geralmente envolvidos por tecido fibroso. A biointegração se dá pela interação das substâncias químicas, iônicas, óxidos do material com o tecido. Os materiais biotoleráveis são em geral polímeros sintéticos ou metais em sua maior parte. Ex.: aço inox e ligas Cr-Co.

Bioinertes: não provocam reações adversas no organismo e no tecido receptor, não apresentam toxicidade, não são cancerígenos, e a formação de tecido fibroso é quase nula. Ex.: titânio e suas ligas, zircônia, e alumina.

Bioativos: se observa nesses materiais a presença de ligações químicas entre os íons do material e o tecido; como no caso do tecido ósseo há o processo de osseointegração. Ex.: hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

Reabsorvíveis: são materiais lentamente degradáveis via organismo e gradualmente substituídos pelos tecidos. São ideais para casos que se deseja evitar novas intervenções cirúrgicas. Ex.: fosfato tricálcico (TCP) e os biovidros.

Os implantes de metais são utilizados principalmente em dois campos de aplicação, para a substituição total das articulações, como quadril, joelho ou ombro, ou em parafusos para a fixação placas para correção de fraturas e stents cardíacos. Além disso, no campo da ortodontia a utilização de metais nobres para as obturações dentárias. A elevada resistência mecânica de alguns metais é uma das características que os diferenciam dos outros materiais, bem como sua rigidez mecânica em contato com o osso [28]. Até agora, os seguintes grupos de materiais metálicos foram utilizado como biomateriais [29]:

- a) de aço inoxidável.
- b) ligas à base de CrCo (vitallium).
- c) titânio e ligas de titânio, por exemplo, Ti6Al4V.
- d) nióbio-cp
- e) tântalo-cp

Na seleção do material a ser utilizado deve-se levar em consideração as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material, tais como [29]:

- **Resistência:** aplicações que requerem alta resistência incluem entre outros implantes odontológicos e ortopédicos. Alguns desses dispositivos requerem propriedades bastante específicas.
- **Fadiga:** materiais devem suportar esforços cíclicos sem que haja a formação e propagação de trincas. Esses dispositivos funcionam em sua maioria como implantes ortopédicos, odontológicos e cardiovasculares.
- **Rugosidade:** Para aplicações de integração tecido-implante, como na osseointegração, é desejada uma alta rugosidade.
- **Absorção de água:** causa degradação da resistência a tração, à fadiga, à fluência, em seu módulo de elasticidade, torção ou flexão quando absorvem água.
- **Bioestabilidade:** dispositivos como liberadores de drogas devem ter sua degradação controlada, enquanto implantes permanentes devem ser estáveis.
- **Bioatividade:** se refere à propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. Essa camada constitui uma superfície bioativa para osseointegração.
- **Esterilização:** Pode alterar o estado energético da superfície de um implante, alterando a resposta celular.

3.2 Ti6Al4V

Segundo R. Wanhill et al. [30] o titânio não ligado possui duas formas alotrópicas: em baixas temperaturas a fase α que possui uma estrutura cristalina hexagonal compacta

(HC) e acima de 882°C a fase β , com uma estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (CCC). Quando elementos de liga são adicionados ao titânio, estes elementos exercem efeito sobre a transformação das fases α e β . Os elementos adicionados que aumentam ou mantém a faixa de temperatura de estabilidade da fase α são chamados de α -estabilizadores, e são eles alumínio, estanho e zircônio. Os elementos adicionados que estabilizam a fase β são chamados de β -estabilizadores, eles incluem o molibdênio, vanádio e ferro.

T. Terlinde et al. [31] destacam que há elementos considerados como impurezas que também são importantes em ligas de titânio, como oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e carbono. Oxigênio e o hidrogênio são as duas impurezas mais importantes, já que o oxigênio é um α -estabilizador e o hidrogênio é um β -estabilizador; esses elementos considerados impurezas possuem um tamanho atômico muito menor do que os elementos metálicos da liga e eles se acumulam nos interstícios entre as posições cristalográficas dos átomos metálicos nas fases α e β .

Para R. Wanhill et al. [30], ligas de titânio pode ser classificadas em quatro categorias: *ligas α* (Ti puro contendo quantidades bem definidas de oxigênio, Ti-2,5Cu e Ti-5Al-2,5Sn); *ligas quase- α* (possuem pequena quantidade de fase β , são tratados termicamente, exemplo: Ti-6Al-2Sn-4Zr-2Mo e Ti-8Al-1Mo-1V); *ligas α - β* (possuem uma quantidade limitada de β -estabilizadores e α -estabilizadores também são adicionados, entre eles temos Ti-6Al-4V e Ti-6Al-2Sn-4Zr-6Mo) e as *ligas β* (possuem alta quantidade de elementos β -estabilizadores e possuem na microestrutura a fase β como predominante, exemplo: Ti-15Mo-3Nb-3Al-0,2Si e Ti-10V-2Fe-3Al).

M. Peters et al. [32] salientam que propriedades mecânicas de ligas α - β dependem da quantidade relativa e da distribuição das fases α e β ; estas variáveis dependem fortemente do processamento termomecânico e das temperaturas de tratamento térmico na região da fase α + β . A manipulação destas variações cristalográficas através da adição de elementos de liga é a base para o desenvolvimento de uma vasta gama de ligas e propriedades [33].

Para C. G. Zimmer [34] a caracterização microestrutural do Ti6Al4V evidencia a presença de duas fases, α e β , onde é possível obter diferentes arranjos microestruturais através do histórico de processamento e também através do tratamento térmico da liga. A fase β pode ficar dispersa na matriz alfa, sendo que as microestruturas podem ser classificadas como globular, acicular ou equiaxial, dependendo da sua morfologia [35].

Na Figura 1 está representado o diagrama de fases para a liga Ti-6Al-4V. O diagrama mostra a influência da adição de V (vanádio) e da temperatura na formação das fases α e β . Observa-se o aumento do campo da fase β com o aumento da temperatura e com o aumento do % V o qual atua como β -estabilizador.

A liga Ti-6Al-4V é encontrada com maior frequência na condição recozida, contendo uma pequena quantidade da fase β (entre 10% do volume a temperatura ambiente) e fase α como a fase dominante (em torno de 90% do volume a temperatura ambiente).

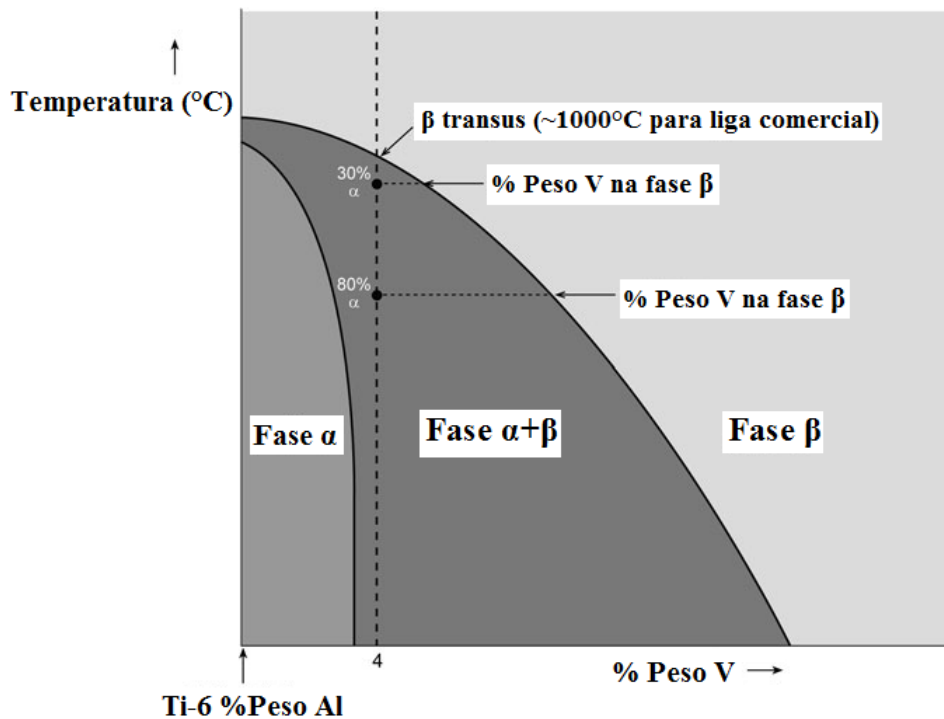


Figura 1: Esquema do diagrama de fases de equilíbrio pseudo-binário para Ti-6Al-4V. Adaptado de Wanhill et al. 2012 [30].

As ligas $\alpha + \beta$ apresentam uma composição que propicia uma mistura das fases α e β e podem conter entre 10 e 50% de fase β à temperatura ambiente. A liga de $\alpha + \beta$ mais comum é a liga Ti-6Al-4V. Embora esta liga em particular seja relativamente difícil de conformar, mesmo na condição de recozido, as ligas $\alpha + \beta$ geralmente possuem boa formabilidade. As propriedades destas ligas podem ser controladas através de tratamento térmico, o qual é utilizado para ajustar as quantidades e os tipos de fase β presentes. O tratamento de solubilização seguido pelo envelhecimento de 480 a 650 °C precipita α , resultando em uma mistura fina de α e β em uma matriz de β retida ou transformada.

A adição de quantidades controladas de elementos de liga com característica de serem β estabilizadores favorece a presença da fase β que persiste desde abaixo da

temperatura β transus até à temperatura ambiente, resultando num sistema de duas fases. Mesmo em pequenas quantidades, os elementos β estabilizadores garantem a presença desta fase à temperatura ambiente. O percentual de fase β é proporcional à quantidade de β estabilizadores que é adicionado [36].

C. N. Elias et al. [37] e D. F. Williams [38] desenvolveram experiências para a utilização do titânio como biomaterial a mais de 50 anos, inicialmente na ortodontia, a importância do titânio nessa área se dá pela sua maior resistência à corrosão a partir da formação espontânea de uma camada de óxido (TiO_2). Esta camada é inerte, estável, aderente e sua resistência à corrosão é um dos pré-requisitos mais importantes para a biocompatibilidade, diminuindo muito os riscos de rejeição. J. Acero et al. [39] salientou que este óxido é uma camada sólida e estável que cresce espontaneamente em contato com o ar e impede a difusão do oxigênio do ambiente proporcionando essa resistência à corrosão.

Segundo Y. B. Wang et al. [40] os metais mais utilizados como implantes para aplicação ortopédica são o aço inoxidável 316L (baixo teor de carbono), aço ASTM F138 [41], ligas de cobalto-cromo, titânio e a liga Ti6Al4V e com menos frequência, as ligas de tântalo e a liga com base em níquel-cobalto devido aos seus custos.

Y. X. Tong et al. [42] destaca que o titânio e suas ligas são amplamente utilizados na medicina e odontologia em virtude de sua biocompatibilidade. Titânio- α e Ti6Al4V são os dois biomateriais à base de titânio mais comuns, são classificados como biologicamente inertes, pois permanecem essencialmente sem alterações quando em contato com tecido vivo. O corpo humano o reconhece como um corpo estranho e o isola através de uma camada fibrosa tornando-o inerte ao organismo, sem qualquer reação adversa ao tecido, como reações alérgicas.

Para Y. Oshida [43] o titânio possui combinação favorável de propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas, como baixa densidade, alta resistência mecânica, elevada resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade, que podem ser melhoradas com a adição de elementos de liga.

O desenvolvimento de novas ligas à base de titânio estão sendo desenvolvidas, alguns exemplos podem ser citados: $\text{Ti}_3\text{Mo}_6\text{Sn}_5,2\text{Zr}$ [44] $\text{Ti}_{18}\text{Zr}_{12,5}\text{Nb}_2\text{Sn}$, $\text{Ti}_{18}\text{Zr}_{11}\text{Nb}_3\text{Sn}$ e $\text{Ti}_{18}\text{Zr}_9,5\text{Nb}_4\text{Sn}$ [45] (ligas com memória de forma); $\text{Ti}_{21,2}\text{Nb}_{5,6}\text{Zr}$, $\text{Ti}_{21,8}\text{Nb}_6\text{Zr}$ e $\text{Ti}_{19,7}\text{Nb}_{5,8}\text{Ta}$ [46] $\text{Ti}_{18,3}\text{Nb}_{5,1}\text{Zr}$, $\text{Ti}_{21,2}\text{Nb}_{5,6}\text{Zr}$ e $\text{Ti}_{20,9}\text{Nb}_{5,7}\text{Zr}$ [47] $\text{Ti}_{20,8}\text{Nb}_{5,5}\text{Zr}$ e $\text{Ti}_{19,7}\text{Nb}_{5,8}\text{Ta}$ [48] (aplicação como implante ortopédico); Ti-25Ta-

25Nb [49] e Ti-25Ta-25Nb [50] (implante ortopédico e elevada resistência à corrosão); Ti-25Ta-25Nb e Ti-25Ta-25Nb-3Sn [51] e Ti-22Nb-6Ta [52] (implantes dentários).

A liga Ti-6Al-4V é bastante conhecida por apresentar alta resistência mecânica, baixa densidade, alta resistência à corrosão e biocompatibilidade. No entanto, algumas preocupações têm surgido com relação a sua performance a longo prazo com relação a liberação de elementos como alumínio e vanádio que têm sido relacionados com problemas e saúde tais como Alzheimer e reações alérgicas [52].

3.2.1 Propriedades do TiO₂

M. P. Coutinho [53] salienta que o titânio se diferencia dos outros metais em sua maior parte pelo óxido formado (TiO₂) em sua superfície. Esse óxido oferece uma excelente resistência a corrosão, quando a superfície é exposta a meios oxidantes, formando uma camada de óxido com espessura de 10 a 100 Å, camada essa passiva, contínua, aderente e estável em condições fisiológicas

Esta estabilidade fisiológica que é conferida pelo TiO₂ o diferencia quando comparada a outros óxidos, devido a sua baixa constante dielétrica, conferindo ao titânio uma melhor biocompatibilidade. Interações eletrostáticas entre os óxidos e as biomoléculas podem ocorrer, tornando a superfície do TiO₂ com maior atividade catalítica para um número de reações orgânicas e inorgânicas [54].

3.3 Tratamentos de superfícies para Ti e suas ligas

Para implantes ósseos de titânio, têm sido utilizados tratamentos simples de jateamento e imersões em ácidos [55], tratamento termoquímico [56], tratamentos eletroquímicos de superfícies [56,57].

Os tratamentos químicos com ácidos, anodização e eletropolimento criam uma determinada rugosidade e ativam a superfície por meio de alteração estrutural da camada de óxido [21].

3.3.1 Ataque Ácido

O tratamento superficial de Ti e suas ligas pode ser realizado por meio do ataque com ácido fluorídrico (HF) e ácido nítrico, a fim de se obter uma camada estável de óxido [21]. S. F. Lamolle et al. [58] mostraram que o óxido TiO₂ formado sobre uma superfície de Ti puro tratado com HF aumentou a adesão de células osteoblásticas.

Um estudo relacionando o tempo de tratamento da superfície de titânio com HF evidenciou um importante efeito do tempo de tratamento sobre a morfologia da superfície

em escala micrométrica e nanométrica [58]. J. Isaac et al. [59] mostraram que houve um aumento no crescimento celular sobre superfícies de titânio tratadas termicamente e tratadas termicamente com posterior imersão em PBS (phosphate buffered saline). Superfícies sem tratamento superficial apresentaram uma camada passiva de óxido em torno 7,9 nm. Esses mesmos autores sugerem que tratamentos termoquímicos sobre superfícies de titânio e suas ligas podem aumentar a atividade biológica dos implantes e melhorar o processo de osseointegração.

3.3.2 Eletropolimento

O processo de eletropolimento envolve a remoção de material metálico a partir de um eletrodo de trabalho visando obter uma superfície menos rugosa [60]. Pode-se também dizer que o eletropolimento se refere a um processo eletroquímico que remove material a partir de um eletrodo de trabalho para realizar polimento, passivar e desbastar partes do metal [61].

Na Figura 2 está representada representação esquemática de um célula eletrolítica empregada para eletropolimento. Nesse sistema observa-se que o metal eletropolido atua como ânodo sendo conectado em um terminal positivo, com um terminal negativo atuando como cátodo.

Uma fonte de tensão produz uma corrente elétrica que passa do ânodo para o cátodo, resultando na oxidação do metal e remoção de material da superfície com uma taxa controlada [62]. A quantidade de metal removido depende do eletrólito, temperatura, densidade de corrente e metal a ser eletropolido [63].

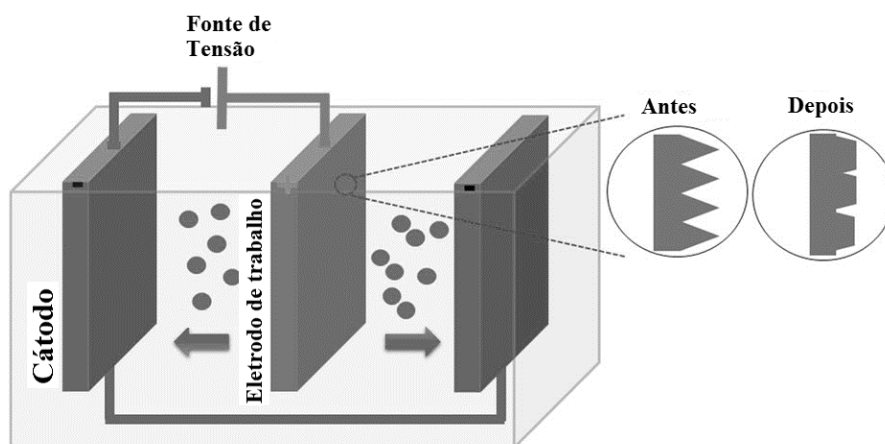


Figura 2: Ilustração esquemática de uma célula eletrolítica para eletropolimento.

T. M. Manhabosco [64] salienta que o eletropolimento revela a microestrutura do metal a ser eletropolido. Zinger et al. 2004 indicou que o eletropolimento permite obter

uma superfície nivelada e brilhante através da dissolução anódica em um eletrólito adequado. Espécies químicas que governam o mecanismo de controle da transferência de massa são fortemente dependentes do tipo de eletrodo e do eletrólito [65].

C. A. Huang et al. [66] realizaram um estudo de eletropolimento com Ti-cp em eletrólito ácido sulfúrico:etanol a 25°C sem adição de água, mostrou um aumento da densidade de corrente anódica com a diminuição da concentração de H₂SO₄ de 5 M para 1 M do eletrólito. Porém para uma diminuição da concentração de H₂SO₄ de 1 M para 0,5 M, houve uma diminuição da densidade de corrente anódica. Durante a polarização anódica de titânio tanto para o eletrólito etanol:H₂SO₄ 5 M e etanol:H₂SO₄ 1 M a dissolução anódica foi dependente da resistência à transferência de carga entre a amostra e o eletrólito, logo o eletropolimento não ocorre nas condições de etanol:H₂SO₄ 0,5 M e etanol:H₂SO₄ 1 M.

O eletropolimento em etanol:H₂SO₄ com adição de água, apresentou uma diminuição na densidade de corrente quando 0,5 vol.% H₂O foi adicionada ao eletrólito. Enquanto que com a adição de 0,3 vol.% H₂O em etanol:H₂SO₄ 3 M foi observada uma diminuição da densidade de corrente anódica com o aumento no tempo de eletropolimento. No entanto, a adição de 0,3 vol.% ou mais de H₂O em metanol:H₂SO₄ 3 M promoveu a formação de uma camada densa e estável de óxido sobre a superfície de titânio, dificultando o processo de dissolução anódica. Uma superfície regular e brilhante foi observada depois do eletropolimento em etanol:H₂SO₄ 1 M com 1 vol.% H₂O. Uma superfície opaca e rugosa de titânio foi obtida durante o eletropolimento com a adição de 5 vol.% H₂O ou mais no eletrólito 1-5 vol.% etanol:H₂SO₄ 0,5 M. Um filme formou-se sobre a superfície do titânio após adição de água ao eletrólito. Isso mostra que a formação do filme depende fortemente da concentração de ácido sulfúrico no eletrólito [66].

O. Piotrowski et al. [67] realizaram estudo de morfologia superficial e confirmaram que o eletrólito etanol:H₂SO₄ pode ser usado para eletropolimento de Ti-cp no lugar de eletrólitos à base de metanol. No entanto, observou-se ainda que a adição de pequenas quantidades de água no eletrólito 0,5 e 1 M H₂SO₄:etanol pode aumentar o brilho e o nivelamento da superfície do titânio. Porém, esses mesmos autores não encontraram efeitos significativos do eletropolimento sobre a superfície de Ti-cp após a adição de ~ 0,1 vol.% de água ao eletrólito.

3.3.3 Anodização

Para J. C. Puipe [68] e D. Velten et al. [69] durante a anodização do titânio é possível produzir uma camada de óxido estável e biocompatível sobre a superfície do

substrato. Esta camada irá adsorver ânions da solução, e tal processo será influenciado por parâmetros operacionais como temperatura, densidade de corrente e velocidade de agitação da solução. A camada de óxido formada é normalmente porosa e está firmemente aderida ao substrato. Tal porosidade pode beneficiar o crescimento celular e a resposta biológica do implante.

T. Kokubo et al. [70] realizaram estudos com implantes de titânio e demonstraram que o processo de anodização constitui um bom método de otimização biológica da superfície do metal.

A avaliação de propriedades mecânicas dos filmes de óxido de titânio produzidos por oxidação anódica apresentaram uma nano-dureza maior que o titânio comercialmente puro. Esses resultados sugerem que com o aumento do potencial aplicado e da espessura dos filmes, a dureza aumente. Além disso, esses resultados indicam que os filmes anódicos de titânio podem ter aplicações biomédicas quando submetidos à baixas solicitações mecânicas (cargas menores que 200 mN) [21].

D. G. Sulka et al. [71] realizaram algumas publicações com relação à anodização para formação de nanotubos e verificou que tais nanotubos eram tubos com poucas centenas de nanômetros e com um grande grau de desordem. Atualmente, nanotubos quase ideais com arranjos mais hexagonais e de comprimentos maiores são reproduzidos com sucesso. Controlando os parâmetros eletroquímicos de anodização (temperatura, potencial aplicado, espécies presentes no eletrólito, pH, viscosidade, etc.) podem-se obter diferentes morfologias de nanotubos para óxido de titânio obtido por anodização.

3.3.3.1 Crescimento Estrutural de Nanotubos por Anodização

A anodização de metais de transição como o titânio para formação de camadas de óxidos vem sendo utilizada por pelo menos um século. Entretanto, apenas recentemente foi estabelecido que nanoestruturas auto-organizadas possam ser feitas de forma satisfatória. Essas estruturas passam por um mecanismo composto por várias etapas de acordo com P. S. Albu et al. [72]:

(i) Ti^0 é oxidado a Ti^{4+} na interface metal-óxido e os íons de titânio oxidados migram para fora.

(ii) Íons O^{2-} são incorporados ao filme e se deslocam para a interface metal-óxido.

Dependendo do número de transferências de O^{2-} em relação ao cátion metálico, o filme de óxido tenderá a crescer para fora ou para dentro da interface (metal-óxido). Uma

voltagem constante está sendo aplicada e o campo elétrico age sobre o óxido que é progressivamente reduzido devido ao aumento da espessura do filme. O processo, então, continua a acontecer até que se torna auto-limitante e o filme não aumenta mais. A redução da força do campo aplicado lidera o crescimento de uma camada compacta de óxido.

Segundo G. D. Sulka et al. [73] e H. Tsuchiya et al. [74] no início do estudo com nanotubos eram necessárias condições eletroquímicas muito específicas para o crescimento de estruturas porosas auto-ordenadas. Metais como Ti, Zr e Hf formam óxidos que claramente apresentam nanotubos individuais e separados em suas estruturas. De início, esses nanotubos e os nanoporos eram tratados como coisas diferentes. Entretanto, nos últimos anos as semelhanças entre essas duas estruturas se tornaram mais claras.

X. Zhou et al. [75] mostraram a transição de poro para tubo em alguns sistemas. Durante o tratamento eletroquímico (eletropolimento ou anodização), a evolução de oxigênio pode tornar-se mais intensa. A intensidade irá influenciar na transformação de uma morfologia nanoestruturada na forma de tubo para esponja. Durante a formação de nanotubos de TiO_2 , íons fluoretos podem facilmente competir com íons O^{2-} que migram para o interior do tubo. Como resultado, o íon fluoreto acumula-se na interface metal/óxido e movem-se para cima com o crescimento do tubo. Esse movimento atua como um revestimento exterior, decorando as paredes dos nanotubos na forma hexagonal.

Para H. Mirabolghasemi et al. [76] a camada de óxido anódica frequentemente consiste de uma estrutura em dupla camada (o óxido formado pelo O^{2-} se encontra no interior do tubo, enquanto que o óxido contendo Ti^{4+} fica no exterior). Esse processo lidera a morfologia da parede de dupla camada dos nanotubos de TiO_2 ; sendo que a superfície interna do nanotubo é de inferior qualidade.

Segundo P. S. Albu et al. [72] os principais parâmetros eletroquímicos que afetam a formação de estruturas porosas são o pH, voltagem, temperatura e a presença de impurezas no material. A voltagem da anodização em si controla principalmente o diâmetro do poro ou tubo. No começo da oxidação eletroquímica, a superfície inteira do metal se mostra coberta com um compacto e uniforme óxido anódico.

A distribuição de um campo elétrico no óxido é influenciada pelas irregularidades da superfície, ocasionam a concentração do campo elétrico mais em algumas regiões do que outras. Como resultado, um aumento do campo elétrico causa a dissolução do óxido e os poros começam a aparecer. Sucessivamente, o crescimento do poro atinge um estado estacionário e são obtidos poros uniformemente distribuídos na amostra. O crescimento do óxido é controlado pelo transporte iônico (O^{2-} e Ti^{4+}) através do óxido que está crescendo.

Para o titânio, um baixo pH não é suficiente para criar camadas de nanoporos. Quase todas as condições de anodização, camadas de óxido compactas são obtidas. Apenas em presença de íons fluoretos que a situação se torna diferente [76].

3.4 Rugosidade *versus* tratamentos químico-eletroquímicos

A. R. Santos [21] realizou estudos do processo de anodização do titânio (H_3PO_4 1,4 M, 60 s e tensão de 50 V) e mostrou a obtenção de uma superfície irregular, porém com pouca porosidade. A morfologia superficial não apresentou diferenças quando comparada à morfologia do titânio sem tratamento superficial. Ao mesmo tempo houve a formação de pequenos sulcos na superfície, evidenciando a liberação de O_2 dentro do filme formado. A formação de poucos poros na superfície dentro dessas condições indica que a formação do óxido é muito rápida sendo posteriormente dissolvido na solução. Porém para esse mesmo estudo, uma tensão de 200 V, gerou poros na superfície com características irregulares e circulares. O aumento do potencial aplicado para uma mesma concentração de eletrólito aumentou o tamanho dos poros, a porosidade e a rugosidade da superfície. O número de poros foi diretamente proporcional ao aumento do potencial. Enquanto que o tamanho dos poros foi inversamente proporcional ao aumento do potencial aplicado, diminuindo quando a voltagem era aumentada.

Um estudo realizado por J. I. Rosales-Leal et al. [77] mostraram que o tratamento com polimento mecânico da superfície de Ti-cp apresentou-se lisa. A partir do tratamento ácido mostrou uma rugosidade com microporos na ordem de 1,5 μm para 2,5 μm . No tratamento com ácido e jateamento obteve-se uma morfologia menos irregular, mas com microporos. A texturização da superfície foi marcada pela formação de óxido de titânio, com alguma percentagem de titânio metálico. A morfologia das amostras de titânio tratadas com ácido apresentaram-se menos rugosa comparativamente à superfície jateada.

S. F. Lamolle et al. [58] realizaram o tratamento de uma superfície de titânio por imersão em HF em diferentes tempos de exposição e observaram o aumento da rugosidade (Ra) com o aumento do tempo de exposição.

3.5 Limpeza e ativação de superfícies por plasma

3.5.1 Plasmas

Segundo A. Fridman et al. [78], o Plasma é considerado o quarto estado da matéria, consiste em átomos neutros, elétrons, íons e radicais.

O plasma é um dos estados físicos da matéria, similar ao gás, no qual certa porção das partículas é ionizada. O aquecimento de um gás provoca a dissociação das suas ligações moleculares, convertendo-o em seus átomos constituintes. Esse aquecimento pode levar a ionização (ganho ou perda de elétrons) dessas moléculas e dos átomos do gás, transformando em plasma contendo partículas carregadas (elétrons e íons positivos) [79].

O plasma é um meio eletricamente neutro de partículas positivas e negativas, sua carga total é aproximadamente zero. Embora as partículas não tenham limites, elas não são livres, quando as cargas se movem, elas geram correntes elétricas com campos magnéticos e como resultado cada uma é afetada pelos campos das outras e isso determina o comportamento coletivo com muitos graus de liberdade [80].

3.5.2 Geração do plasma

Há várias formas para a geração de plasma, mas é comum entre todas elas que haja o fornecimento de energia para produzi-lo e sustentá-lo. O plasma é gerado quando uma corrente elétrica é aplicada através de um gás ou um fluido dielétrico [81].

A diferença de potencial e o campo elétrico atraem os elétrons em direção ao ânodo, enquanto que o cátodo (eletrodo negativo) atrai os núcleos. À medida que a tensão aumenta, a corrente leva o material por polarização elétrica além do seu limite dielétrico, num estágio de ruptura elétrica marcado por uma centelha elétrica, em que o material passa de isolante a condutor elétrico, tornando-se cada vez mais ionizado. Nesse estágio de ionização há colisões entre elétrons e átomos neutros de gás as quais criam mais íons e elétrons [82].

3.5.3 Aplicações em biomateriais

O tratamento por plasma de oxigênio é uma técnica de modificação de propriedades físico-químicas, incluindo hidrofobicidade/hidrofiliabilidade, e que busca melhorar as propriedades superficiais dos materiais. S. H. Hsu et al. [83] tem destacado que o tratamento por plasma de oxigênio (OPT) é muito efetivo na oxidação em uma longa faixa, indo até centímetros de profundidade e apresentando uma boa uniformidade. K. Duske et al. [84] salienta que a tecnologia de plasma tem sido utilizada para limpeza de superfícies de titânio para melhorar a adesão de materiais biocompatíveis em tecidos.

T. Nakamura et al. [85], S. Rupf et al. [86] e E. S. Brandt et al. [87] salientam que o processo por plasma gera partículas energeticamente ionizadas e radicais altamente reativos, por isso as tecnologias com plasma têm sido muito utilizadas para o pré-tratamento superficial ou limpeza de semicondutores e metais.

J. A. Jansen et al. [88] e K. M. Swart et al. [89] mostraram que a limpeza por plasma em superfície de titânio aumentou a adesão celular após exposição por 5 minutos, tendo uma diminuição na adesão celular em tempos maiores de exposição. Outros autores como J. M. Schakenraad et al. [90] e R. E. Baier et al. [91] acreditam que o método de limpeza por plasma tem a capacidade de promover o aumento da adesão celular devido à formação de uma superfície com elevada energia livre, favorecendo a interação da superfície do implante com o tecido biológico.

3.5.4 Mecanismo de limpeza e ativação das superfícies

Segundo U. Cvelbar et al. [92] há dois mecanismos de desativação das bactérias pela descarga elétrica por plasma. Primeiro ocorre a erosão do microorganismo, átomo por átomo, através da fotodessorção intrínseca, onde partículas energéticas (fótons e íons) induzem o processo de dessorção, quebrando ligações químicas entre o microorganismo e o material, formando compostos voláteis a partir de átomos intrínsecos para o microorganismo, tais produtos voláteis de não-equilíbrio químico são pequenas moléculas, como CO, OH e CH_x.

Para U. Cvelbar et al. [92], o segundo mecanismo é a adsorção de espécies reativas a partir do plasma sobre o microorganismo, com as quais elas conseqüentemente sofrem reações químicas para formar componentes voláteis. As espécies reativas podem ser radicais atômicos ou moleculares, por exemplo O ou OH, e moléculas excitadas como o ¹O₂. As condições de equilíbrio termodinâmico depois da recombinação como pequenas moléculas como CO₂ e H₂O que são o produto final do processo de oxidação podem ser vistas na Figura 3 e Figura 4. Durante estes processos as espécies reativas não interagem somente com os microorganismos, mas também com o material a ser esterilizado. A esterilização por plasma favorece recombinações entre os átomos e durante essas recombinações pode ocorrer a liberação de energia causando o aquecimento local do material e como conseqüência a desativação do microorganismo através do calor indesejado.

Segundo M. Moisan et al. [93], em algumas situações, o mecanismo de arrancamento é aumentado pela radiação, agindo sobre as espécies reativas e acelerando a taxa de eliminação de microorganismos. O plasma pode resultar na dessorção de radicais e moléculas, tanto no estágio intermediário como no estágio final de oxidação.

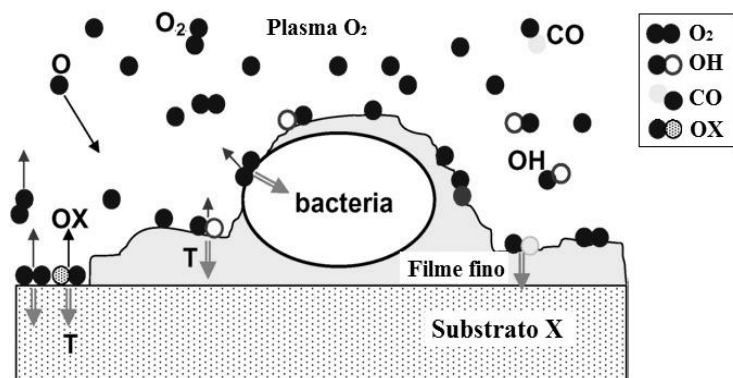


Figura 3: Esquema representando o processo superficial de recombinação de átomos de O com a bactéria sobre um filme fino. Adaptado de U. Cvelbar et al. [92].

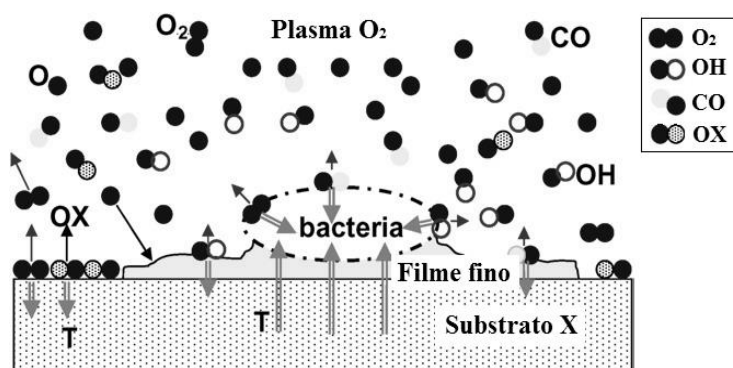


Figura 4: Esquema do processo de esterilização por plasma de oxigênio após 40s de exposição. Adaptado de U. Cvelbar et al. [92].

3.6 Esterilização de biomateriais metálicos

A esterilização de biomateriais metálicos refere-se a um processo que elimina ou desativa todas as formas de vida ou agentes biológicos, incluindo agentes transmissores presentes em determinadas superfícies. Na esterilização podem ser usados calor, produtos químicos, irradiação ou ainda sistemas de alta pressão [94].

Segundo D. V. Kilpadi et al. [95] limpeza e esterilização podem ser distinguidas em termos de função. O propósito da limpeza é remover ou reduzir partículas de sangue, proteína e debris presentes na superfície do substrato. Enquanto que a esterilização serve para eliminar ou parar a reprodução de microorganismos, incluindo bactérias e fungos. Normalmente a limpeza é realizada primeiramente, com o seguido processo de esterilização. I. Junkar et al. [96] mostram na Figura 5 uma ilustração indicando o que é removido em cada processo de limpeza e esterilização em biomateriais.

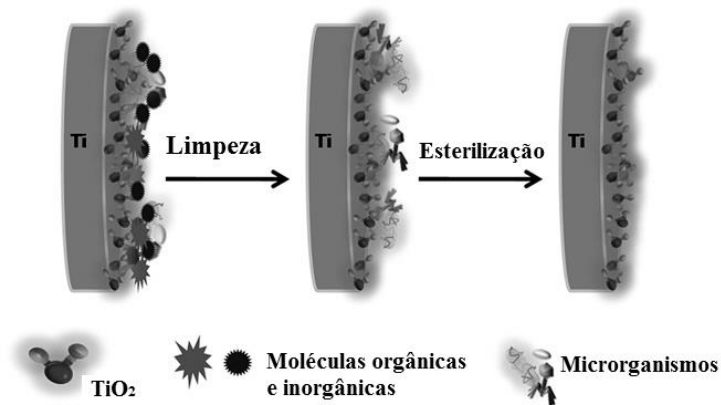


Figura 5: Ilustração dos eventos que ocorrem sobre a superfície do titânio durante os processos de limpeza, esterilização. Adaptação de Junkar et al. 2016 [96].

3.6.1 Autoclave

3.6.1.1 Autoclave a vapor

Conforme destacado por J. Lausmaa [97] e T. Suzuki et al. [98], o método de esterilização em autoclave causa uma maior heterogeneidade da superfície. J. H. Park et al. [113] realizaram a esterilização por autoclave a vapor (121°C, 18 psi, 20 min) e evidenciaram alterações na superfície de Ti puro, afetando sobre a hidrofobicidade e rugosidade. Além disso os autores salientam que as modificações ocorridas sobre as propriedades superficiais após esterilização afetaram negativamente na diferenciação osteogênica em células osteoblásticas.

J. Lausmaa [97] mostraram que o processo de esterilização por autoclave, além de alterar a morfologia da superfície, pode contaminar a superfície de titânio por N, F, Mg, Si e Cl. Enquanto que J. C. Keller et al. [99] realizaram esterilização por autoclave a vapor (121°C, 15 minutos) observando uma descoloração da superfície do implante, além de terem verificado um aumento da espessura da camada de óxido comparada as superfícies não esterilizadas e um aumento do ângulo de contato. Além disso, Keller e colaboradores mostraram que aquelas superfícies esterilizadas por autoclave a vapor tiveram uma diminuição da porcentagem de células aderidas.

S. Oh et al. [100] reportaram que o tipo de método de esterilização (autoclavagem seca ou úmida) pode ocasionar alguma influencia negativa na adesão e proliferação de células osteoblásticas MC3T3-E1 sobre nanotubos de TiO₂ obtidos a partir da anodização de titânio.

Um estudo realizado por L. C. Huesca-Espitia et al. [101] mostrou que a esterilização a vapor sobre esporos de *Geobacillus stearothermophilus* foi eficiente, uma

vez que os resultados indicaram os esporos mortos não puderam ser revividos. Os autores destacam ainda que a morte dos esporos é causada provavelmente por danos às proteínas.

3.6.1.2 Autoclave à seco

Um estudo realizado por G. Spicher et al. [102] mostrou que esporos de *B subtilis* apresentaram baixa resistência ao processo de esterilização a seco. K. Fox et al. [103] realizaram a esterilização por autoclave a seco em esporos de *Bacillus subtilis* e verificaram que maior velocidade de passagem do gás pelo processo de esterilização causa maior desidratação dos esporos e que a perda de umidade dos esporos é o principal fator da sua destruição.

Nicholason et al. 2000 [104] mostrou que esporos de *Bacillus* são mais resistentes a autoclavagem a seco do que suas células vegetativas. A autoclavagem a seco a 90°C matou 90% de células vegetativas em 5 minutos enquanto que somente 10% dos esporos foram mortos depois de 60 minutos do mesmo tratamento. A morte dos esporos ocorre devido aos danos causados no DNA acumulados durante o tratamento de esterilização além de terem sido observadas mutações dos esporos após exposição a autoclavagem. Muitos fatores são responsáveis pela resistência a esterilização por autoclave a seco de esporos, dentre eles as variações na mineralização do núcleo de esporos afeta na resistência dos esporos, apresentando uma significativa diminuição da resistência à esterilização.

3.6.2 UV e Raios Gama

K. M. Kummer et al. [112], J. Yu et al. [105] e W. Att et al. [106] avaliaram a limpeza da superfície de nanotubos de TiO₂ por esterilização com luz UV e encontraram pouca alteração da morfologia, identificando uma diminuição da contaminação por hidrocarbonetos na superfície. Os autores acreditam que a esterilização por luz UV remove o carbono da superfície a partir da atividade fotocatalítica do TiO₂ ou pela decomposição dos outros contaminantes pela radiação UV.

Um estudo realizado por J. H. Tiburski [107] mostrou que esporos de *Bacillus* foram de 7-50 vezes mais resistentes a radiação UV (260 nm) do que as células em crescimento da mesma espécie.

A. J. Moreira et al. [108] esterilizaram por irradiação UV a 288 nm esporos de *Bacillus subtilis* e verificaram que a irradiação afetou pouco sobre a atividade dos esporos, enquanto que a esterilização de esporos de *B. stearotherophilus* por luz UV não foi eficiente.

A esterilização por irradiação de raios gama é bastante conhecida e é uma técnica de esterilização de baixa temperatura, porém o custo dos equipamentos utilizados para a geração da irradiação é elevado além das precauções que devem ser tomadas frente a segurança de operação do sistema. A elevada intensidade da irradiação não afeta somente a superfície do material tratado, mas também o seu interior e no caso de amostras poliméricas, podem degradar cadeias poliméricas ou ligações cruzadas. Isso afeta o tempo de uso do equipamento ou a funcionalidade de todos os dispositivos utilizados [109].

3.6.3 Plasma ou Esterilização a Plasma

A esterilização baseada na utilização do plasma é ambientalmente correta, não produz subprodutos tóxicos, é rápida e custo não é elevado. No processo de esterilização por plasma os microorganismos são expostos a espécies reativas, das quais são produzidas aplicando campos eletromagnéticos a um gás [110]. Há muitos mecanismos que podem ser responsáveis pela esterilização: interação da radiação UV com o DNA das células, remoção do material das células por espécies reativas (átomos de oxigênio) ou pela interação desses dois mecanismos [111].

I. Junkar et al. [96] estudaram a influência de diferentes métodos de esterilização sobre nanotubos de titânio, métodos como autoclave, luz UV e esterilização por plasma de oxigênio. Os autores mostraram que a esterilização por autoclave destruiu os nanotubos, enquanto que a esterilização por luz UV e a esterilização por plasma de oxigênio não causaram nenhuma mudança na morfologia. Esses mesmos autores destacaram que os métodos de esterilização por UV e autoclave utilizados na etapa final do tratamento da superfície de materiais com aplicação médica têm ocasionado alterações na morfologia de nanotubos e na composição química deles. A esterilização das superfícies com nanotubos apresenta um aspecto importante na avaliação de possíveis infecções mas também em termos das alterações que ocorrem nas propriedades superficiais e conseqüentemente nos testes de citocompatibilidade.

Para K. M. Kummer et al. [112] e J. H. Park et al. [113] os diferentes métodos de esterilização e as mudanças que eles podem causar sobre a morfologia de nanotubos e sobre a química da superfície ainda não está bem entendida.

Para I. Junkar et al. [96] a esterilização por plasma de oxigênio não gerou alterações na morfologia da superfície, enquanto que a esterilização por luz UV foi percebida uma leve alteração da morfologia.

A. J. Moreira et al. [108] aplicou plasma de oxigênio sobre indicador biológico de *Bacillus stearothermophilus* e confirmou a eficiência do método de esterilização por plasma de oxigênio. Os resultados mostraram que um curto período de tempo, em poucos minutos a mortalidade foi completa.

H. Liu et al. [114] avaliaram o efeito germicida da esterilização por plasma de oxigênio sobre *Escherichia coli*, os autores observaram a inativação de esporos de *E. coli* a partir do ataque de radicais de oxigênio na membrana celular. Além disso, os autores concluíram que a esterilização por plasma de oxigênio possui a capacidade de otimizar as propriedades superficiais de materiais para aplicação biomédica.

Um estudo realizado por K. Triandafillu et al. [115] mostrou que o tratamento por plasma de oxigênio tornou a superfície de PVC mais hidrofílica e reduziu o número de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* em mais de 70%, porém essa redução não foi suficiente para prevenir a colonização.

M. Ueno et al. [116] esterilizaram com plasma de oxigênio alguns instrumentos odontológicos contaminados com *Staphylococcus aureus* e demonstraram uma eliminação efetiva dos microrganismos testados, microrganismos gram-negativos foram destruídos em 1 minuto de exposição, enquanto gram-positivos em 10 minutos.

3.6.4 Esterilização por Óxido Etileno

A esterilização por óxido etileno é bastante comum, além de utilizar baixa temperatura de esterilização não afeta as características gerais do material [117]. No entanto, inicialmente o processo de esterilização por óxido etileno utilizava clorofluorcarbono mas essa substância não tem sido mais utilizada devido a sua toxicidade e impacto ambiental. O problema da esterilização por óxido etileno é que os seus resíduos ficam absorvidos sobre os substratos após a esterilização e estes apresentam propriedades carcinogênicas. Após o processo de esterilização é necessário ventilar a superfície em um reator de ventilação de ar por longos períodos de tempo, além da segurança dos operadores ficar comprometida [118].

A. H. Dadd et al. [119] observaram a resistência de esporos de *Bacillus subtilis* frente a esterilização por óxido etileno. Os autores acreditam que a resistência dos esporos se deve a formação de óxido sobre o substrato além da presença de grupos alquiláveis.

3.7 Definição das escalas de rugosidade macro, micro e nanométrica

Segundo B. W. Scheer et al. [120] a microrugosidade é o componente da rugosidade superficial com espaçamentos entre as irregularidades menos do que 100 μm . Uma definição de micro, submicro e nano se refere a características de dimensões menores do que 100 μm , 1 μm e 100 nm respectivamente [121].

Respostas biológicas são alteradas a partir das modificações da rugosidade superficial em diferentes dimensões. Há três diferentes escalas de rugosidade, em termos de rugosidade média (Ra); macro-rugosidade ficou compreendida de 1 mm até 10 μm ; micro-rugosidade de 1 μm até 10 μm e nanorugosidade com valores de rugosidade abaixo de 1 μm [122,123].

3.8 Molhabilidade *versus* Energia de Superfície

K. J. Kubiak et al. [124] mostraram que a molhabilidade da superfície pode ser fortemente influenciada pela rugosidade superficial. Nesse estudo os autores investigaram como a rugosidade influencia nas medidas de ângulo de contato e propuseram um modelo para explicar essa relação a partir das teorias de Wenzel e Cassie-Baxter. Os autores mostraram que segundo as teorias avaliadas, valores de Rz entre 5 e 10 μm tornaram a superfície mais hidrofílica.

Molhabilidade normalmente é quantificada em termos do ângulo de contato observado, a partir de um ponto prático de visualização, uma simples metodologia é necessária para avaliar como a rugosidade superficial influencia na molhabilidade. Esse modelo está baseado na teoria de Wenzel [125]. Essa teoria foi baseada em que a extensão da rugosidade da superfície vai até a área da interface sólido-líquido em comparação com a superfície de rugosidade projetada. Esse modelo se dedica a entender como o ângulo de contato sofre influência da rugosidade da superfície e relacionar com a sua capacidade de molhamento, onde a faixa prática do ângulo de contato pode variar entre 0° e 180°. Quando o ângulo de contato se aproxima de 180° indica que o líquido não penetra bem nas asperezas da rugosidade superficial, e as moléculas de gás podem ficar aprisionadas nos vales das asperezas. Como consequência a interface entre o líquido e o sólido não é contínua e há uma alteração nas interfaces sólido-gás e gás-líquido.

Cassie e Baxter tem investigado o fenômeno de molhamento de materiais compósitos [126], e a teoria deles é aplicada para superfícies também rugosas, sendo capaz de capturar no ar aprisionado nas asperezas da rugosidade.

A molhabilidade é a capacidade do líquido de se espalhar sobre uma superfície sólida. O líquido depositado sobre uma superfície sólida, sob gravidade tem tendência de se espalhar até a coesão do líquido (forças internas), as forças de gravidade e a capilaridade (forças da tensão superficial) estão balanceadas, e um estado de equilíbrio pode ser alcançado. A partir do momento em que o equilíbrio é atingido, um ângulo de contato, θ , entre a superfície sólida e líquida pode ser medida. Esse equilíbrio corresponde ao estado de energia mínima entre as três fases. Este estado pode ser descrito pela relação de Young [127] apresentada na Equação 1:

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cdot \cos \theta, \quad (1)$$

onde γ é o coeficiente de tensão superficial da interface sólido-gás (SG), sólido-líquido (SL) e líquido-gás (LG), mas essa relação só é válida para superfícies planas e superfícies sólidas homogêneas. Quando r é maior que 1 se refere a superfícies rugosas e superfície planas o r equivale a 1, logo $\cos(\theta) = \cos(\theta)$, onde θ é o ângulo de contato correspondente a uma superfície ideal [128]. Na prática essa teoria é válida para ângulos de contato de $0^\circ < \theta < 90^\circ$.

Para uma superfície com rugosidade conhecida a teoria de Wenzel pode ser usada, sendo $\cos(\theta) = r \cdot \cos(\theta)$, sendo θ , o ângulo de contato aparente e r o raio da área de rugosidade superficial real para uma superfície plana perfeitamente projetada.

Outra maneira de descrever a heterogeneidade da superfície em função da capacidade de molhamento, foi feita pela teoria de Cassie-Baxter que descreve o ângulo de contato aparente para materiais compósitos, dos quais são apresentados na Equação 2:

$$\cos(\theta) = \phi_1 \cdot \cos(\theta_1) + \phi_2 \cdot \cos(\theta_2) \quad (2)$$

Onde ϕ_1 é a fração do comprimento da interface e θ_1 é o ângulo de contato do primeiro componente. Essa relação é válida para ângulos de contato entre 90° e 180° .

Quando o ângulo vale 180° a equação pode ser reduzida a Equação 3:

$$\cos(\theta) = \phi_{LS} \cdot [\cos(\theta) + 1] - 1 \quad (3)$$

onde ϕ_{LS} é a fração da interface líquido-sólido e $1 - \phi_{LS}$ é a fração da interface líquido-ar. Sendo que $\phi_{LS} = R_{mr} / 100\%$, sendo R_{mr} a rugosidade vertical.

Outra propriedade importante durante as medidas de ângulo de contato e que pode ser influenciada pela rugosidade da superfície é a histerese [128] da qual é a diferença entre o ângulo de contato aparente e ângulo de contato real. A histerese é maior para superfícies rugosas e depende mais de interações químicas do que da própria heterogeneidade da superfície [129].

3.9 Rugosidade micrométrica versus Molhabilidade

J. I. Rosales-Leal et al. [77] avaliaram o efeito de tratamentos superficiais para texturização de titânio e mostraram que a molhabilidade é fortemente influenciada pela rugosidade. Uma superfície mais hidrofílica foi encontrada no titânio tratado com ácido, jateamento e ácido + jateamento.

S. F. Lamolle et al. [58] realizaram um estudo comparativo em superfície de titânio tratada com HF comparativamente com outros ácidos. Tal superfície tratada com HF apresentou superfície mais hidrofóbica com o aumento do tempo no eletrólito, indo de 70° aos 40 segundos para 82° aos 150 segundos de imersão no ácido.

3.10 Interação célula-substrato

A biocompatibilidade de um material está relacionada com a resposta fisiológica da célula em contato com a sua superfície. Segundo K. Anselme et al. os fenômenos de interação entre células e substratos podem ser definidos a partir da adesão, proliferação e diferenciação [130]. F. Pfeiffer et al. salientaram que é importante entender os mecanismos que influenciam no comportamento celular e de como poderiam auxiliar no desenvolvimento das superfícies de implantes com melhor desempenho [22].

Para F. Di Palma et al. [131] a adsorção, a adesão e o espraiamento pertencem à primeira fase da interação célula/material. Isso engloba vários fenômenos até que a célula esteja adsorvida sobre o material. A qualidade desta fase influenciará na capacidade da célula proliferar e se diferenciar quando em contato com o implante.

Segundo M. P. Coutinho [53] a interação entre os tecidos vivos e implantes se deve a três parâmetros de compatibilidade:

- Características da morfologia como rugosidade, influenciam diretamente na compatibilidade morfológica;
- Existência e intensidade do movimento do implante em relação aos tecidos adjacentes. Isso influencia diretamente na compatibilidade mecânica.

- Fatores químicos associados com a composição e estrutura dos óxidos influenciam na compatibilidade química.

A parte mais crítica num processo de biointegração se dá no início do contato implante/tecido. Como citado por S. Svensson et al. [132], esses estudos são feitos no sentido de melhorar condições da biointegração. Para A. Wennerberg et al. [133] as condições topográficas da superfície na escala micrométrica demonstram ter relação com o processo de osseointegração. A importância da química de superfície e topografia em escala nanométrica (< 100 nm) ainda não está bem compreendida. Isso acontece devido a complexa resposta de sistemas vivos, e da arquitetura desses sistemas que é constituído por estruturas em nanoescala.

P. T. Oliveira et al. [134] realizaram estudos *in vitro* de células ósseas cultivadas numa superfície nanoestruturada, e tem demonstrado uma melhor adesão no início da osseointegração. Para V. C. Mendes et al. [135] a topografia na escala micrométrica e macrométrica tem exibido um aumento da força biomecânica em comparação a topografia em apenas uma escala. Ao mesmo tempo em que alguns estudos validam esta afirmação outros falham, demonstrando a complexidade desse tema.

F. Di Palma et al. [131] perceberam que superfícies de titânio com rugosidades de dimensão maior que o tamanho da própria célula apresentaram menor aderência celular. Isso ocorre devido a sua inabilidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato.

Para X. Zhu et al. [143] as propriedades celulares como adesão, alterações morfológicas, e proliferação são afetadas pela composição química, rugosidade e tensão superficial do material. Enquanto que D. Botticelli et al. [144] mostraram que essas características controlam a quantidade da adesão celular e o crescimento do tecido.

3.11 Adesão Celular

Por muitos anos, cientistas de materiais, cirurgiões e bioengenheiros tem investigado maneiras de eliminar ou reduzir falhas no contato de implantes com o osso em humanos. Essas falhas são consequentes da incompleta osseointegração entre o osso vizinho e a superfície dos implantes [136].

Recentes pesquisas buscam aproximar a superfície de implantes ortopédicos à topografias nanométricas que se assemelham a uma matrix extracelular natural encontrada em tecidos ósseos. Estruturas nanométricas encontradas no tecido ósseo indicam que células formadoras de osso são acostumadas a interagir com a superfície de rugosidade

nanométrica [137,138,139]. Alguns estudos [140,141,142] já têm mostrado resultados positivos da adesão celular de células ósseas em superfícies com características nanométricas.

T. M. Manhabosco [64] mostrou que as células aderem menos a superfícies de titânio com irregularidades de dimensão maior que o tamanho da própria célula. Isso acontece devido a sua inabilidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato. Às vezes a adesão sobre uma superfície está diretamente relacionada com a afinidade química entre esses elementos químicos que entrarão em contato [64].

A. R. Santos [21] mostrou que células osteoblásticas se espalharam melhor sobre superfícies anodizadas indicando a compatibilidade dessas superfícies com osteoblastos humanos. Contudo, superfícies de titânio tratadas com H_2SO_4 0,5 M e 150 V mostraram uma porcentagem de adesão celular crescente ao longo do tempo. Enquanto que superfícies tratadas com H_3PO_4 1,4 M a 50 V e 200 V tiveram uma diminuição no total de células osteoblásticas aderidas após 120 minutos. A utilização de diferentes eletrólitos e parâmetros operacionais de anodização podem influenciar sobre a morfologia e crescimento celular.

J. I. Rosales-Leal et al. [77] investigaram quatro tratamentos superficiais sobre Ti-cp: polimento; ataque com ácido fluorídrico; jateamento com alumina e por último jateamento com alumina + ataque com ácido fluorídrico. A partir desses tratamentos foi evidenciado que a adesão celular foi melhor em titânio jateado e em titânio jateado + ataque ácido.

Segundo X. Zhu et al. [143] mostraram que algumas propriedades celulares como adesão, alterações morfológicas, proliferação e diferenciação são afetadas pela composição, rugosidade, energia de superfície, molhabilidade do titânio.

Para D. Botticelli et al. [144] as características superficiais de implantes são importantes na etapa de adaptação do tecido ósseo depois da implantação. Propriedades superficiais controlam a quantidade e a qualidade da adesão celular. As propriedades superficiais mais determinantes sobre a adesão celular são a topografia e a reatividade química da superfície.

3.11.1 Rugosidade nano e micrométrica *versus* adesão celular

M. Bigerelle et al. [145] salientaram que superfícies organizadas com mesma amplitude são definidas como isotrópicas e superfícies desorganizadas são chamadas de

anisotrópicas. Dessa forma a topografia deve ser considerada em várias escalas: a escala acima do tamanho da célula (microrugosidade) e abaixo do tamanho da célula (nanorugosidade). Quando a topografia está abaixo do seu tamanho, as células apreciam a superfície com menor rugosidade. Quando a topografia está acima do tamanho das células, uma rugosidade isotrópica formada por “ninhos” (*bowl-like nests*) favorece a adesão.

K. Anselme [146] destacou que a rugosidade da superfície deve ser considerada não apenas em termos de amplitude, mas também de organização. Superfícies de titânio caóticas tem promovido uma baixa adesão celular e proliferação ao substrato. Isso pode estar relacionado com a menor adesão das células às superfícies que apresentem muitas irregularidades. Tais irregularidades ocasionam uma inabilidade de estabelecer área de contato com o substrato.

Para D. Perizzolo et al. [147] a topografia em escala nanométrica exerce influência sobre a adesão celular e orientação do crescimento celular. Testes de migração celular demonstraram que células migram mais rapidamente em materiais com ranhuras mais profundas. Porém trabalhos mais recentes mostraram que ranhuras superficiais de baixa amplitude, induzem a orientação de grupos ou células individuais ao longo do seu eixo. Isso indica que o melhor parâmetro para a orientação da célula é a largura dos sulcos e não a sua profundidade. Enquanto que para M. Wieland et al. [148], osteoblastos orientados tendem a mineralizar mais rapidamente, possibilitando uma osseointegração tecido/implantes mais eficiente.

T. Albrektsson et al. [149] descrevem que a rugosidade de uma superfície pode ser dividida em três níveis de escala: macro, micro ou nano. O nível macro é definido por características topográficas na faixa de milímetros a dezenas de microns. Essa escala está diretamente relacionada com a geometria do implante, e com rugosidade superior a 10 μm . Para H. Khashu et al. [150], rugosidades macrométricas podem resultar em um aumento de peri-implantitis (processo inflamatório que afeta tecidos moles e duros que circundam implantes dentários). A melhor rugosidade para esse caso ficaria em torno de 1-2 μm .

Segundo K. Conner et al. [151], a escala micro apresenta uma rugosidade na faixa de 1-10 μm . Nessa faixa de rugosidade há um bloqueio entre a mineralização do osso e a superfície do implante. A principal indicação clínica do contato de um implante com uma superfície rugosa se dá pela baixa qualidade do implante ou pelo volume de perda óssea. V. Papalexiou et al. [152] têm mostrado para essa faixa de rugosidade, uma melhora no contato osso-implante. Tal contato aumenta a resistência ao torque quando comparado com

outros tipos de topografias. P. M. Brett et al. [153] mostraram que determinados perfis de superfícies nanométricas atuam de forma importante na adsorção de proteínas, adesão de células osteoblásticas e na taxa de osseointegração. A reprodutibilidade da rugosidade em escala nanométrica se torna mais difícil através do uso de tratamentos químicos.

O processo de texturização de superfícies é um fator importante dentro da engenharia de biomateriais. Tal processo influencia a adesão e proliferação celular [77]. O tratamento de texturização busca alcançar um melhor contato osso-implante. Segundo A. Bagno et al. [154] esse tratamento pode reduzir o tempo de cura e acelerar a integração do implante com o tecido ósseo. Para S. -W. Ha et al. [155] a topografia da superfície de um biomaterial é importante para promover respostas biológicas durante a osseointegração e no tempo de cura da interface osso-implante. A maior dificuldade surge na escolha de parâmetros topográficos que serão relevantes na interação entre a superfície do biomaterial e o meio biológico.

Contudo, F. Rupp et al. [156] mostraram que superfícies rugosas em escala nanométrica e micrométrica podem promover uma melhor osseointegração em implantes com titânio e que as células são fortemente influenciadas pela molhabilidade e pela rugosidade encontrada em diferentes áreas da superfície de um implante. Para K. Kieswetter et al. [157] as irregularidades em diferentes escalas podem influenciar a diferenciação dos osteoblastos, proliferação e produção da matriz celular. K. Kieswetter et al. ainda destaca que a rugosidade é um fator determinante sobre a molhabilidade da superfície e que ambas interferem no processo de adsorção de proteínas, tornando condições favoráveis para reações celulares.

L. F. Cooper realizou modificações superficiais para alterar a topografia da superfície de implantes de titânio. Essas modificações objetivaram aumentar o contato osso-implante e melhorar a fixação biomecânica com o osso [158]. S. F. Lamolle et al. [159] trataram a superfície de Ti-cp com HF e obteve uma superfície com rugosidade favorável, menor nível de citotoxicidade e boa biocompatibilidade. Células ósseas interagem com a superfície do titânio através de ligações químicas e mecânicas. As primeiras ligações que ocorrem incluem ligações iônicas e covalentes entre o ambiente biológico e a área exposta do metal. Um estudo realizado por D. Perrin et al. mostraram que a rugosidade macro e micro obtida de uma superfície de titânio jateada e com ataque ácido HCl/H₂SO₄ também apresentaram uma melhora no contato osso-implante [160].

3.11.2 Energia de superfície/Molhabilidade *versus* adesão celular

K. Anselme salienta que a energia superficial pode influenciar a adsorção de proteínas [146]. Sítios específicos na superfície irão facilitar a adsorção de proteínas através de afinidades químicas. Dessa forma, A. R. Santos destacou que a aproximação celular também é dirigida, pela energia de superfície por meio dessas afinidades químicas [21].

Segundo F. Rupp et al. [156] as propriedades físico-químicas como molhabilidade e energia superficial de TiO₂ atuam como um fator-chave para uma melhor adsorção de proteínas e posterior crescimento celular. Além disso Rupp e colaboradores observaram que o aumento da rugosidade em superfícies de titânio tem ocasionado o aumento do ângulo de contato com água.

X. Zhu et al. evidenciaram que a energia de superfície está intimamente relacionada com a molhabilidade, a qual está fortemente relacionada com a interação biológica. Dessa forma, a molhabilidade do implante se torna determinante para a adsorção de proteínas e para a adesão celular [143]. Segundo L. Le Guéhennec et al. [161] as células aderem em maior quantidade sobre superfícies hidrofílicas.

A. R. Santos estudou superfícies de titânio tratadas com H₂SO₄ 0,5 M e 150 V e mostrou um comportamento mais hidrofílico do que superfícies tratadas com H₃PO₄ 1,4 M a 200 V. Após 90 minutos, as células osteoblásticas mantiveram-se aderidas na superfície de titânio tratada com H₂SO₄ 0,5 M a 150 V, enquanto que na superfície tratada com H₃PO₄ 1,4 M a 200 V, ocorreu o desprendimento das mesmas [21]. Esses resultados evidenciam o favorecimento da adesão celular sobre superfícies hidrofílicas.

D. Buser et al. [162] mostraram que a composição química sobre a superfície de um implante também afeta na hidrofiliabilidade. Superfícies mais hidrofílicas são mais favoráveis a interagir com fluidos biológicos, células e tecidos do que superfícies hidrofóbicas.

3.11.3 Composição química da superfície *versus* Adesão Celular

A. R. Santos destaca que variações na composição química da superfície do implante irão afetar a adesão e proliferação celular [21]. A taxa de osseointegração de implantes de titânio depende da composição e da rugosidade da superfície. Para L. Le Guéhennec et al. [161] a rugosidade favorece o ancoramento ósseo e a estabilidade biomecânica.

S. F. Lamolle et al. [58] avaliaram a superfície de titânio com tempos de exposição em HF (120 – 150 segundos) a qual apresentou uma elevada quantidade de óxido de titânio (TiO₂) e íons fluoretos. Por análise de XPS, a concentração de titânio e oxigênio aumentou gradualmente em tempos de exposição maiores. As superfícies de titânio tratadas com HF apresentaram uma maior rugosidade micrométrica, menores níveis de citotoxicidade e maior crescimento celular do que o controle (titânio sem tratamento com ácido).

L. Le Guéhennec et al. [161] mostraram que a composição química ou mudanças sobre a superfície de implantes dependem dos tratamentos superficiais, tais parâmetros são fundamentais para uma melhor adsorção de proteínas e ancoramento celular.

3.12 Rugosidade micrométrica versus Tamanho da Célula

D. M. Brunette salientou que a textura superficial de um implante tem a capacidade de selecionar certas populações de células e alterar as funções delas [163]. Para J. Meyle et al. [164] a orientação das células é influenciada pelo alinhamento da topografia da superfície e pelas propriedades mecânicas do citoesqueleto. Segundo A. Bagno et al. o crescimento celular sobre um substrato microestruturado apresentou mais finas extensões conhecidas como *filopodia* do que aquele crescimento de células em substratos lisos [13].

Para J. Meyle et al. [165] quando as células reagirem com a topografia da superfície do substrato chamamos de *guia de contato*. A reação de diversos tipos de células, como por exemplo, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos, com uma variedade de topografias, tem sido estudada.

Na Figura 6, é possível ver fibroblastos gengivais humanos crescendo sobre Araldite, aderindo e se adaptando sobre a topografia do substrato. Na Figura 7 é possível ver o crescimento de fibroblastos sobre titânio revestido com Araldite, sendo que a camada de titânio aparece como uma estrutura contínua.

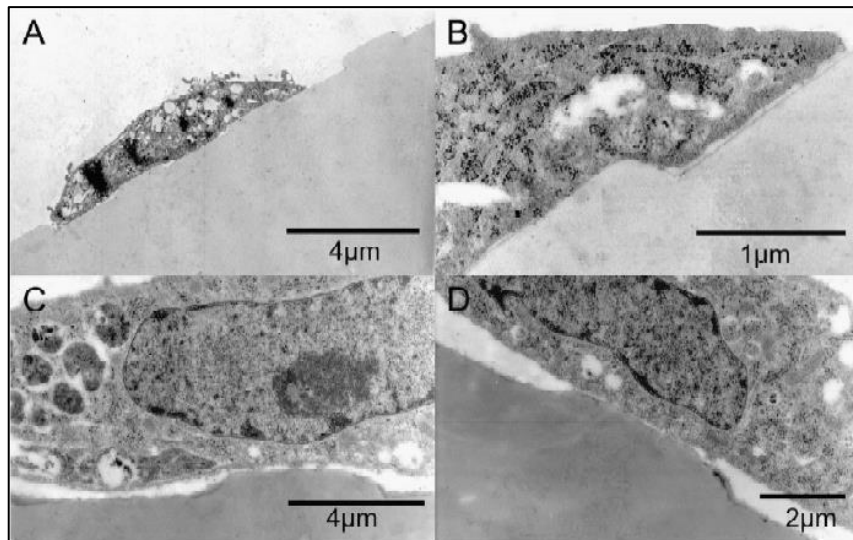


Figura 6: Fibroblastos provenientes da gengiva humana crescendo sobre Araldite. (A,B) Sulcos com 2 μm de largura e 0,4 μm de profundidade. B é uma imagem aumentada de A. (C,D) Sulcos com 5 μm de largura e 0,4 μm de profundidade [166].

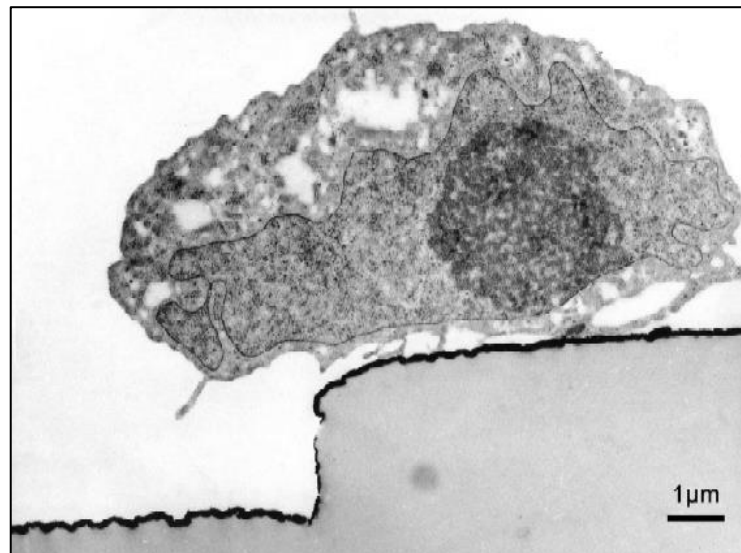


Figura 7: Crescimento de Fibroblasto sobre titânio revestido com Araldite. Os sulcos são de 10 μm de largura e 3 μm de profundidade [166].

F. Pfeiffer et al. [166] têm reportado que padrões de expressão e adesão de moléculas atuam como um tipo de resposta frente a microtopografia. Foi encontrado que o contato das células está predominantemente localizado nas ranhuras de diferentes larguras, não somente naquelas de 10 μm .

3.11 Osseointegração

M. Ninomi [167] mostrou que a preferência do titânio na osseointegração deve-se a alta resistência à corrosão e a formação de uma camada inerte de óxido de titânio. Essa camada de óxido promove a deposição da matriz óssea mediante a fixação do implante. Essa fixação promove uma troca de informações mecânico-químicas entre a superfície do

implante e o microambiente. Essa troca determinará o efetivo sucesso da osseointegração. Neste caso, o conhecimento da dinâmica molecular e celular associado à superfície do implante é fundamental. Segundo L. M. Gil et al. [168] diferentes áreas de estudo tem demonstrado um esforço no sentido de entender como as propriedades superficiais promovem a ancoragem das células.

Para J. M. Kanczler et al. [169] o fenômeno da ancoragem celular na superfície de titânio se dá pelo contato entre as células eletronegativamente carregadas e o substrato com baixa carga positiva. Isso possibilita a criação de um sistema hidrofílico na interface superfície-célula. Esse sistema promove a adsorção protéica e sua orientação no sentido que ocorra a ancoragem na superfície do titânio. O processo de adsorção das células/moléculas é o resultado favorável das condições e sinais recebidos da interação entre as partes biológicas e a superfície do titânio, sendo que o tipo e a orientação das primeiras moléculas adsorvidas na superfície serão decisivos para o sucesso da osseointegração. Portanto, a osseointegração esta intimamente relacionada com as características da superfície do titânio e pode favorecer a indução de sinais físicos e químicos do organismo para adesão e formação de um novo osso.

A Figura 8 mostra esquematicamente como se dá a interação das proteínas e células responsáveis pela osseointegração na superfície do titânio. Este processo começa com o contato do sangue na superfície do implante. Isso irá originar um meio para a migração das células formando redes de fibrinas (fibronectinas). As fibronectinas são proteínas fibrosas estruturais e adesivas. Nesta etapa, os primeiros sinais positivos para a migração das células ocorreram. A fibrina possui domínios de ligação para outras moléculas da matriz e receptores da superfície celular instruindo em suas funções.

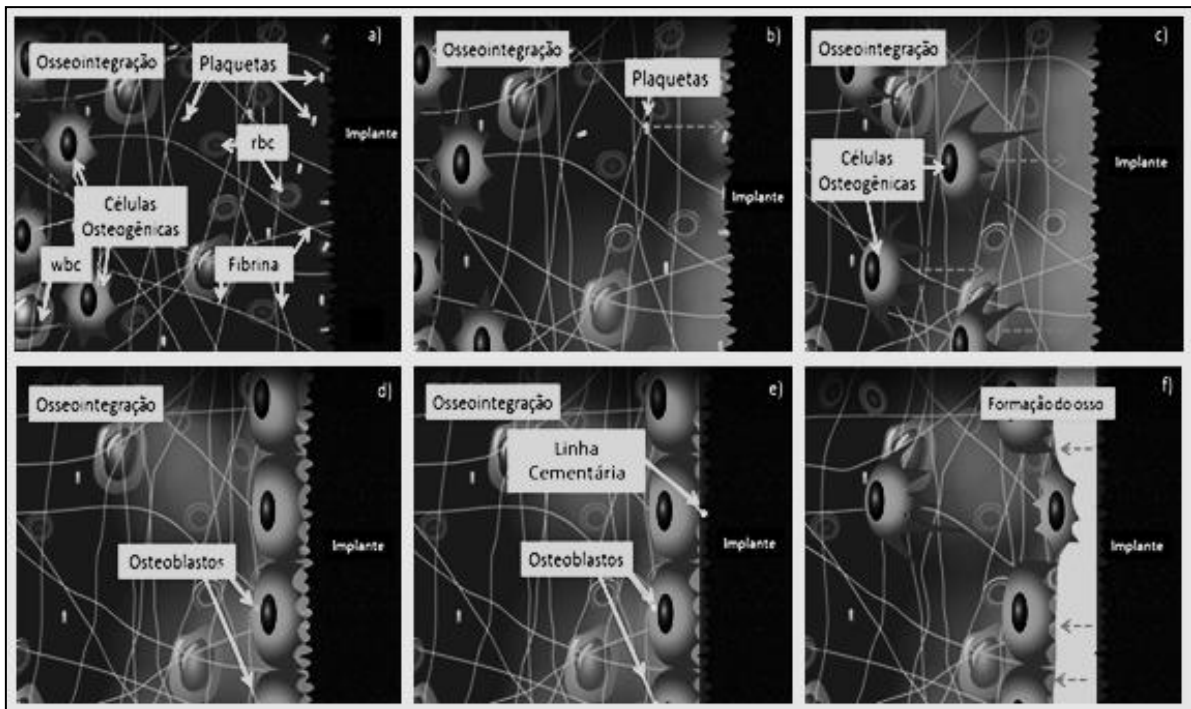


Figura 8: Representação esquemática do processo de osseointegração e formação do osso na superfície do biomaterial: a) choques das plaquetas com o implante, b) liberação de citocinas e fatores de crescimento, c) migração das células osteogênicas para a superfície do implante, d) diferenciação das células em osteoblastos e) fixação dos osteoblastos no implante através da linha de cementária f) início da formação de uma nova matriz óssea [Adaptada de 170].

Para S. F. Badylak et al. [171] as características que influenciam a adesão da fibrina, podem ser físicas (tensão e adesão), químicas (tipos moleculares), estruturais (tipo de arranjo das moléculas). A soma desses fatores resultará ou não na osseointegração. Caso essas características sejam negativas, a malha formada pela fibrina simplesmente não se conecta com a superfície. Se forem positivas, uma malha é formada com ligações de fibrina sobre a superfície e o processo de osseointegração se inicia. A função das plaquetas na osseointegração é secundária. Elas indiretamente auxiliam na movimentação das células osteogênicas através da rede de fibrinas que vai até a superfície do implante. No começo da osseointegração o implante é considerado como um objeto estranho pelo organismo, o que causa a ativação das plaquetas para cicatrização. Isso ocasiona o choque dessas contra a superfície, liberando citocinas (emissão de sinais) que estimulam a movimentação de leucócitos (wbc) e eritrócitos (rbc). Os leucócitos e eritrócitos se chocam com as células osteogênicas acelerando seu movimento pela rede de fibrina até a superfície do implante.

Ocorrida à migração, a superfície do implante fica povoada por células osteogênicas. Essas células dão início a formação de uma matriz denominada linha cementária orgânica. A linha cementária é formada das proteínas produzidas pelas células osteogênicas, osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP). Na linha cementária ocorre

a produção de fosfato de cálcio, com subsequente mineralização e formação do colágeno. Como consequência da mineralização, ocorre o aparecimento da matriz óssea, e formação dos osteoblastos com deposição do tecido ósseo na superfície do implante [171].

3.12 Células-Tronco (CTs)

Para Z. Miao [172] a utilização de células-tronco (CTs) tem sido feita a partir de uma diversidade de tecidos fetais e adultos, além da medula óssea, sangue, fígado fetal, cordão umbilical, e polpa de dente decíduo [173]. Segundo Y. A. Romanov et al. [174] células-tronco são capazes de originar diversos tipos de tecidos, além disso para P. A. S. Lara et al. [175] células-tronco também têm sido utilizadas como células promissoras na engenharia de tecido do osso craniofacial.

Enquanto que L. P. A. Sanchez et al. [176] indicaram que células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se dividir e se renovar por longos períodos de tempo. São células não especializadas, mas podem produzir e se especializar em vários tipos de células. São provenientes de células-tronco, as quais podem se dividir em Hematopóéticas (originam células do sangue e do sistema imune) e as Mesenquimais (originam tecidos ósseos, cartilagosos e adiposos).

J. Suchaneka et al. [177] definiram células-tronco como células auto-renováveis e capazes de se diferenciar em vários tecidos especializados. Suas principais funções são de tecido desenvolvimento, a homeostase e, no caso de dano ao tecido, reparação. Células mesenquimais multipotentes foram consideradas células vivas raras em vários tecidos mesenquimais, como por exemplo, na medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária.

D. W. Wang et al. [178] destacaram que células-tronco mesenquimais de medula óssea possuem um elevado potencial para aplicação na regeneração óssea in vivo, além disso elas são facilmente isoladas a partir de um processo de aspiração de medula óssea e gerando conseqüentemente colônias a partir de uma única célula. Segundo P. Hematti [179] as células-tronco são consideradas células multipotentes e que podem se diferenciar em, pelo menos, três linhagens mesenquimais incluem osso, cartilagem, e gordura. Para o autor essas células podem fornecer uma fonte ilimitada de células mesenquimais, as quais possuem um elevado potencial para aplicação clínica no futuro.

N. L. Boynd et al. [180] destacam que células-tronco possuem um potencial enorme para produção de todas as células do corpo. Elas são capazes de se autorenovarem indefinitivamente, isso faz potencialmente delas uma fonte para produção em larga escala de linhagens celulares terapêuticas. Os mesmos autores sugerem que as células

mesenquimais derivadas de células-tronco são células multipotentes com potencial uso na engenharia de tecido e medicina regenerativa; proporcionando uma elevada quantidade de células capazes de se reproduzir em células adultas, como células progenitoras.

3.12.1 Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

Para P. Macchiarini et al. [181] estas células são utilizadas na medicina regenerativa e também como uma ferramenta para ajudar na restauração do osso e do dente. Células-tronco mesenquimais estão sendo muito utilizadas em terapias celulares devido à sua capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células funcionais, atuando na recuperação de tecidos nativos. O uso de células-tronco mesenquimais está baseado na engenharia de tecidos utilizando células juntamente com os biomateriais. Esse conjunto faz com que ocorra uma imitação do microambiente *in vivo* (fatores de crescimento, contatos célula-célula, e as interações célula-matriz extracelular). Esta abordagem tem mostrado resultados promissores no tratamento de danos irreparáveis de tecidos causados por doenças ou lesões.

K. Kulangara et al. [182] destacaram que células-tronco dão origem a vários tipos de células, incluindo adipócitos, condrócitos, mioblastos e osteoblastos e que o seu potencial de diferenciação é influenciado pela dureza do substrato, topografia e capacidade hidrofílica.

O primeiro grupo de células tronco-mesenquimais colonizadas sobre a superfície do implante é capaz de migrar através do coágulo do peri-implante. Para A. I. Caplan [183] estas células são provavelmente células progenitoras multipotentes. D. Le Guillou-Buffello et al. [184] salientaram que a composição química da camada de adsorção da superfície pode impactar o progresso da linhagem das CTMs. Segundo Y. Yang et al. [185] superfícies nano e microestruturadas e a maneira em que as CTMs atacam o substrato irão influenciar na adsorção de proteínas.

R. J. Mc Murray [186] destacou que em células-tronco mesenquimais a diferenciação pode ser provocada como também inibida pelo uso de uma determinada topografia; onde foi possível verificar pelo autor que superfícies com nano-pits podem manter as células em um estado não diferenciado, mantendo-as auto-renováveis. Para L. D. S. Meirelles et al. [187] este efeito pode ser visto na natureza das células mesenquimais, tal processo irá afetar as suas propriedades bioquímicas. A partir disso as células tronco-mesenquimais precisam ter uma capacidade de recombinar, diferenciar e ter preferências por determinados padrões.

R. Navarrette-Olivares et al. [188] mostraram que a diferenciação em osteoblastos aumentou após os parâmetros da superfície exercerem efeito positivo sobre células tronco-mesenquimais multipotentes. R. Navarrette-Olivares et al. ainda mostraram que superfícies de titânio tratadas com ácido apresentaram uma diferenciação de CTMs em osteoblastos mais sensível a propriedades superficiais como microestrutura e hidrofiliabilidade [188].

R. J. Mc Murray [186] tem mostrado que propriedades como dureza do substrato, a nanotopografia da superfície de adesão, e as forças extracelulares são capazes de influenciar o crescimento celular, mesmo na ausência de fatores bioquímicos. H. C. Lai et al. [189] salientaram que osteoblastos aderem mais em superfícies micrometricamente rugosas do que as superfícies lisas exibindo uma maior diferenciação celular.

M. A. Wood et al. [190] mostraram que CTMs apresentaram melhor interação com determinadas superfícies quando comparadas em células diferenciadas em fibroblastos. Células-tronco são extremamente sensíveis ao seu ambiente e isso mostra que o conhecimento sobre a topografia da superfície onde essas células serão cultivadas é de importância para o processo de diferenciação.

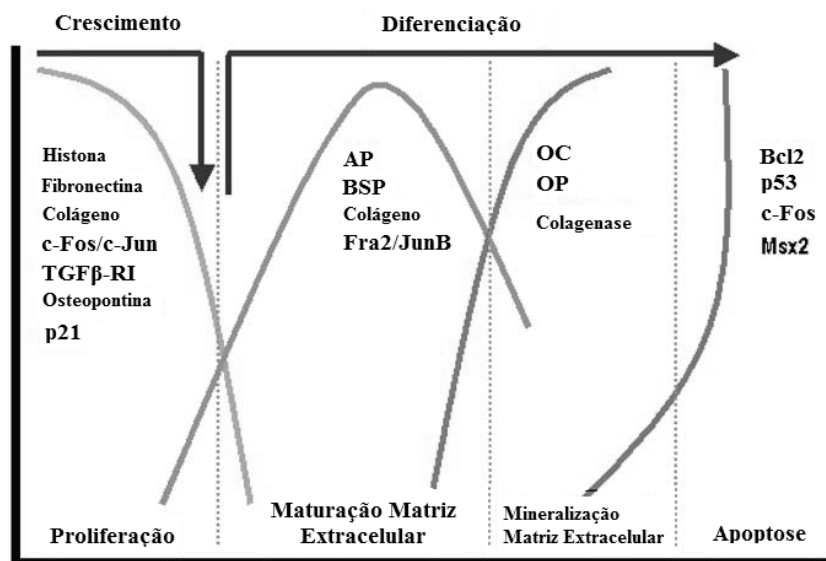
Segundo R. Navarrette-Olivares et al. [188] a expressão gênica osteoblástica em CTMs é afetada pelas propriedades da superfície do substrato. Um exemplo disso ocorreu, quando os pesquisadores observaram um aumento da expressão *RUNX2* sobre uma superfície de titânio tratada com imersão em ácido. As CTMs apresentaram um aumento da produção de fatores locais que criaram um ambiente osteogênico mais promissor. Isso sugere que propriedades superficiais como microestruturas ou energia de superfície tem um papel importante para modular a diferenciação osteoblástica pela regulação autócrina e parácrina. Esses mesmos autores ainda salientaram que células osteoprogenitoras são mais propensas do que osteoblastos à migrarem para a superfície do implante a partir do tecido que circunda o implante e que sua diferenciação ainda é pouco estudada, porém são células importantes para se ter sucesso na osseointegração.

A. J. Engler et al. [191] reportaram que a dureza da superfície pode influenciar sobre a diferenciação celular e que células-tronco crescem sobre essas superfícies podendo sofrer diferenciação neurogênica, miogênica ou osteogênica. Células tronco-mesenquimais ou células progenitoras totalmente diferenciadas em uma linhagem osteoblástica produzem fatores em resposta a topografia da superfície em escala micrométrica e submicrométrica e estes fatores influenciam sobre o crescimento ao redor do tecido, o qual irá induzir a formação do osso e influenciar no processo da osseointegração.

Segundo M. H. Lee et al. [192] a diferenciação de CTMs na linhagem osteogênica é inicialmente regulada por um determinado grupo de fatores: *RUNX2*, fator-beta 1 (TGF β 1) e proteína morfogenética óssea 2 (BMP 2). Posteriormente as CTMs são diferenciadas em preosteoblastos. Os preosteoblastos são elípticos na forma com um núcleo alongado e são capazes de se proliferar. Eles expressam *RUNX2*, *DIX5*, *MSX2*, *P2Y4* e *P2Y14* e alguns marcadores de osteoblastos, como ALP, colágeno tipo I, e osteopontina (OPN). A fosfatase alcalina é uma das primeiras proteínas que irá regular a mineralização óssea. Segundo D. Pavlin et al. [193] quando osteoblastos são completamente diferenciados, produzem uma matriz orgânica auto-mineralizada.

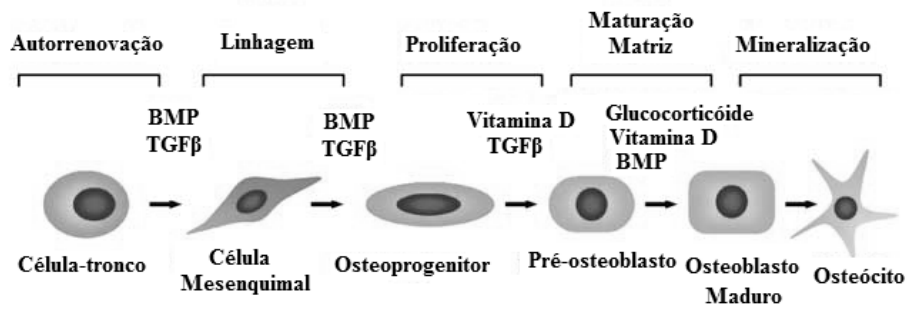
G. S. Stein et al. [194] apresentou claramente em seu trabalho os estágios do crescimento e diferenciação de células-tronco em células ósseas baseado nos diferentes marcadores (Figura 9 (a)). A proliferação de osteoblastos é marcada pela indução de vários marcadores celulares que incluem histonas; enquanto que a matriz extracelular é caracterizada pela expressão de proteínas como colágeno, já a mineralização de osteoblastos requerer a indução de osteocalcina.

Na Figura 9(b) está apresentada a progressão da linhagem de osteoblastos a partir de células mesenquimais pluripotentes para osteócitos maduros. Durante a diferenciação de osteoblastos, há uma notável mudança de morfologia da célula de forma cuboidal para uma morfologia estrelar do osteócito, essa última morfologia favorece o contato mecanossensorial de células ósseas.



(a)

Figura 9: Crescimento e diferenciação de osteoblastos. (a) estágios do crescimento e diferenciação de osteoblastos.



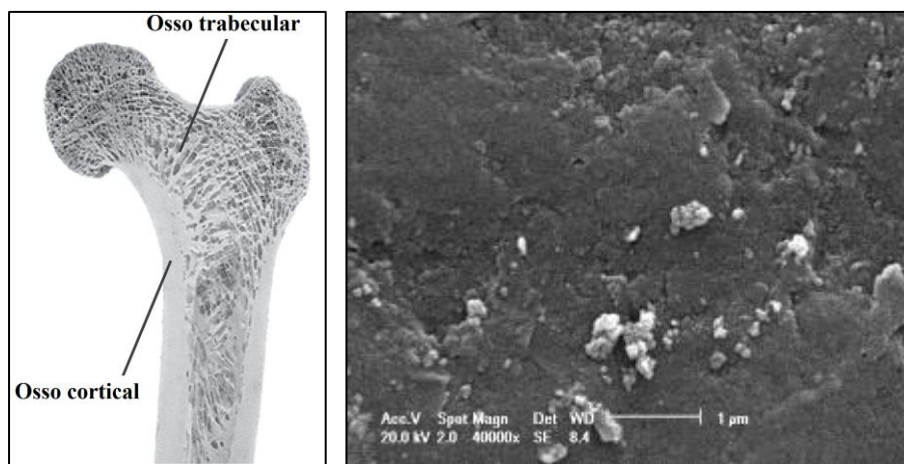
(b)

Figura 9 (continuação): (b) progressão da linhagem de osteoblastos a partir de células mesenquimais pluripotentes para um osteócito maduro. Adaptado de G. S. Stein et al. [194].

3.13 Morfologia Osso trabecular e cortical

Uma vez que no primeiro estudo dessa tese de doutorado visará encontrar a morfologia nanométrica dentre as amostras tratadas eletroquimicamente nos diferentes tempos que mais se aproxima da morfologia do osso trabecular (Figura 10 (c)), nesse tópico serão apresentadas informações a partir da literatura que comprovem a relação entre a morfologia do osso trabecular e a morfologia de superfícies nanoestruturas.

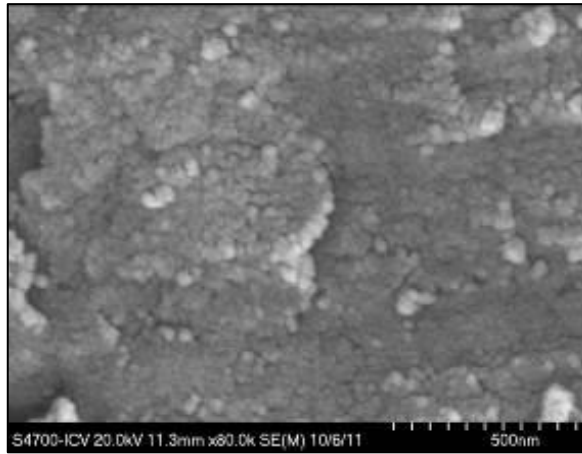
Partindo disso, N. Teng-Amnuay et al. [195] mostraram que modificações na superfície de novas ligas de Ti (como por exemplo, Ti₄₀Zr₁₀Cu₃₈Pd₁₂) estão sendo desenvolvidas para imitar ou se aproximar da estrutura do osso trabecular, buscando melhores resultados de biocompatibilidade



(a)

(b)

Figura 10: Imagem indicando a região do osso cortical e trabecular de um fêmur humano (a) Adaptado de N. M. B. K. Willems et al. [196]. Imagens obtidas pelo autor por MEV-FEG de seção transversal do osso cortical (b).



(c)

Figura 10 (continuação): Imagem obtida pelo autor por MEV-FEG de seção transversal do osso trabecular (c).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O primeiro estudo apresentado nessa tese de doutorado foi encontrar a morfologia nanométrica dentre as amostras tratadas eletroquimicamente nos diferentes tempos que mais se aproximou da morfologia do osso trabecular.

Enquanto que num segundo momento do desenvolvimento desse trabalho de pesquisa, aquelas superfícies nanoestruturadas e que apresentaram a dissolução anódica predominantemente durante o tratamento eletroquímico foram encaminhadas para o estudo do efeito da limpeza por plasma de ar sobre a morfologia e molhabilidade.

Numa terceira parte da pesquisa fez-se a avaliação do método de esterilização por Plasma de Ar, Autoclave e Etanol+PBS sobre as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos.

Após o estudo dos métodos de esterilização, aquele método que menos alterou a morfologia e a molhabilidade das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos, foi o método selecionado para seguir com os testes micológico e bacteriológico, e conseqüentemente com os testes de citotoxicidade, adesão celular, diferenciação celular e deposição de cálcio.

A metodologia utilizada neste trabalho está representada no fluxograma abaixo (Figura 11) e detalhada posteriormente.

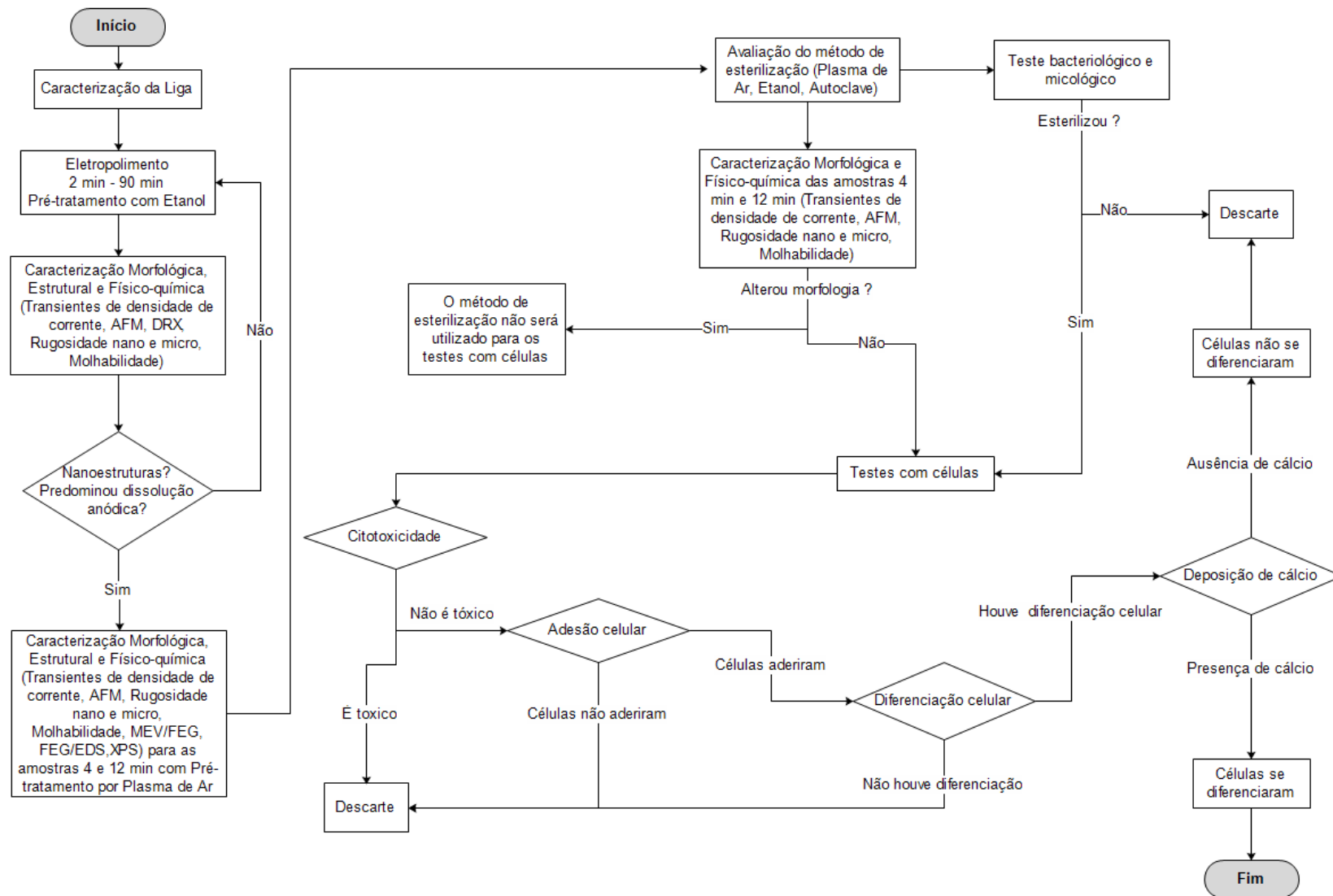


Figura 11: Fluxograma da metodologia desenvolvida nesse trabalho de pesquisa.

4.1 Materiais empregados

Amostras de Ti6Al4V foram utilizadas para avaliar o crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSCs) tinham aproximadamente 14 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Essas amostras foram cortadas em torno CNC Romi de rotação máxima 4000 rpm e potência máxima de 10KW a partir de um tarugo. Foram obtidas de barras brutas fornecidas pela empresa TiBrasil Titânio Ltda provenientes do processos de forjamento.

A análise de composição química das amostras de Ti6Al4V foi realizada por Fluorescência por Raios-X (equipamento usado foi Niton® XL3t GOLDD+ Series x-ray fluorescence (XRF). Como pode-se observar, a liga utilizada nesse estudo é predominantemente composta por Ti, Al e V. Segundo a norma ASTM B348-13 [197] a concentração em % peso indicada para o Al é de 5,5-6,5 e V de 3,5-4,5.

Tabela 1: Resultados de composição química da liga Ti6Al4V.

Elemento	Concentração (% peso)
V	4,3 ± 0,1
Ti	88,2 ± 0,7
Al	7,4 ± 0,8

A microestrutura das amostras de Ti6Al4V foi avaliada por análise metalográfica realizada no Laboratório de Pesquisa em Corrosão – LAPEC/UFRGS e teve como propósito revelar a microestrutura do substrato Ti6Al4V a partir do corte transversal. Foi empregado para isso o ataque com o reagente de Kroll (10 ml HF + 5 ml HNO₃ + 85 ml H₂O), durante 15 segundos. Após o ataque metalográfico, a microestrutura das amostras foi analisada por microscopia óptica em um microscópio da marca OLYMPUS CX31, planC N, FN22.

A microestrutura das amostras de Ti6Al4V utilizadas nesta pesquisa, mostra a presença de duas fases metálicas: α (estrutura hexagonal) e β (estrutura CCC) (Figura 12), o que era esperado para essa liga [198]. Observa-se a presença da fase β (região escura) predominantemente no contorno de grão, enquanto o grão, com geometria equiaxial, é constituído pela fase α . M. Armendia et al. [199] apresentaram a microestrutura da liga Ti6Al4V e destacaram que a fase α consiste numa geometria equiaxial, enquanto que a fase β predomina no contorno de grão.

As imagens de MEV-EDS por mapeamento de elementos Ti, Al e V da seção transversal da liga Ti6Al4V estão representadas nas Figura 14. Foi observado que o elemento vanádio apresentou uma maior intensidade na fase β ; enquanto que na fase α predominou titânio e alumínio. Isso está de acordo com R. Wanhill et al. [30], os quais deixaram claro que os elementos que estabilizam a fase β são molibdênio, vanádio e ferro.

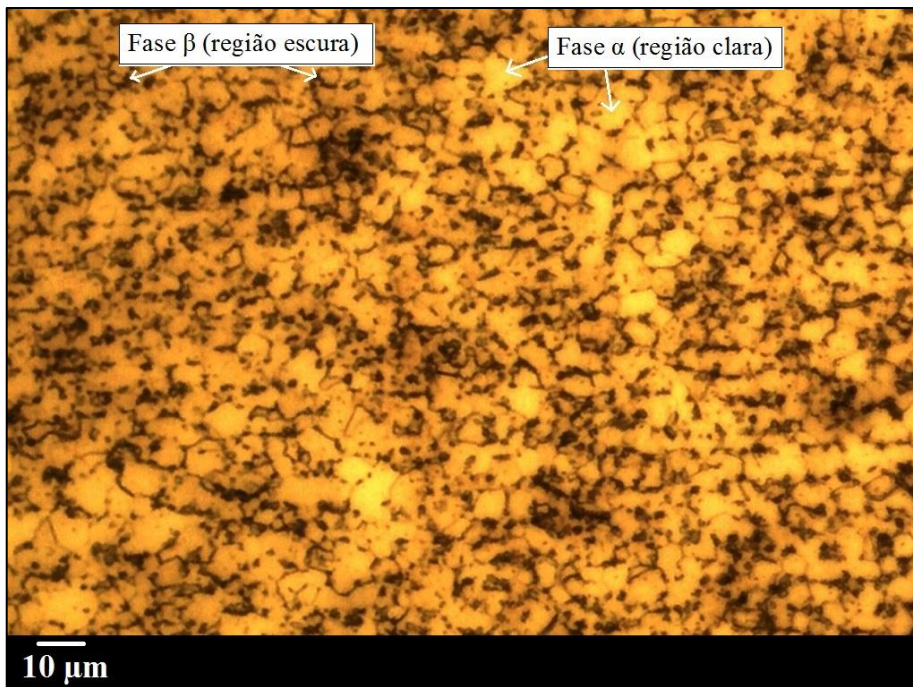


Figura 12: Imagem obtida por Microscopia Óptica da microestrutura da secção transversal da liga Ti6Al4V.

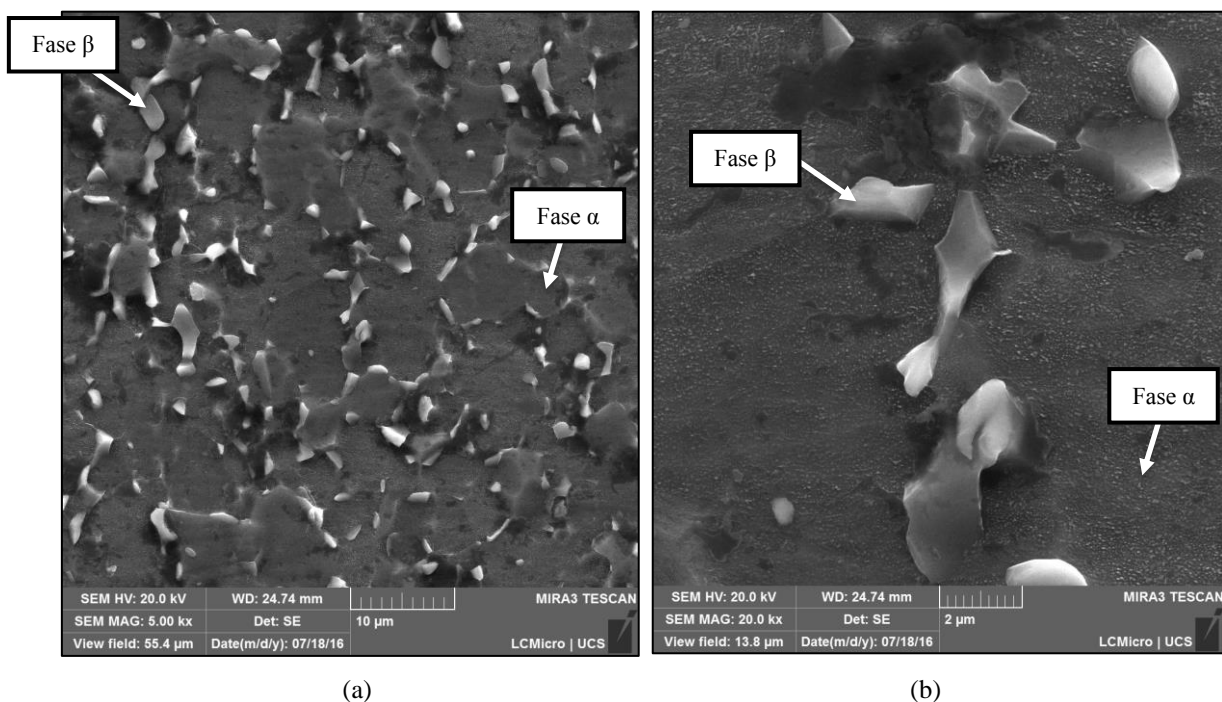


Figura 13: Imagens MEV-FEG da microestrutura da seção transversal da liga Ti6Al4V (a,b).

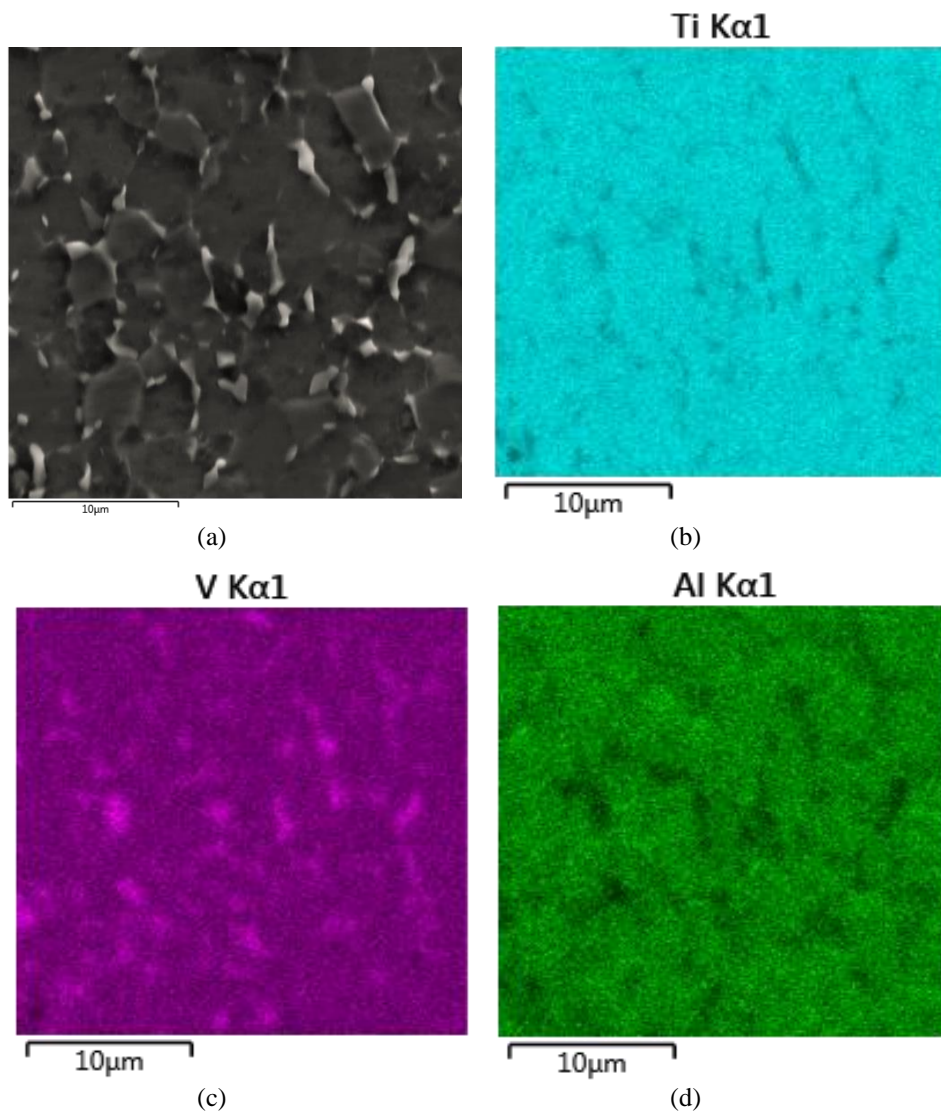


Figura 14: Imagens MEV-EDS da microestrutura da seção transversal da liga Ti6Al4V: a) imagem obtida por elétrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti, c) mapeamento do elemento V e d) mapeamento do elemento Al.

4.2 Métodos empregados

4.2.1 Preparação do substrato metálico

Para o lixamento das amostras de Ti6Al4V utilizaram-se lixas de carbeto de silício de grana 220 até 4000; sabão neutro e água. Após, as amostras foram limpas com água deionizada, álcool etílico e secas em ar frio.

O método de limpeza das amostras antes do tratamento eletroquímico foi inicialmente realizado com etanol (por imersão em banho ultrassônico), mas posteriormente, em função dos resultados obtidos foi alterado para limpeza com plasma de ar visando obter uma superfície mais limpa e sem a presença de possíveis espécies

adsorvidas que pudessem prejudicar o controle da morfologia das amostras tratadas eletroquimicamente.

A limpeza por plasma de ar foi realizada com uma descarga do tipo RF (radiofrequência), com potência máxima de 65W e tempo de limpeza de 1 minutos em atmosfera de N₂ e O₂ na mesma proporção do ar atmosférico [200]. Para a limpeza por plasma de ar as amostras foram colocadas dentro de um recipiente de vidro e fixadas verticalmente em um suporte de alumínio adaptado, visando facilitar a passagem do plasma por toda a superfície das amostras garantindo ao mesmo tempo uma maior limpeza da superfície; dentro desse recipiente de vidro foi realizado vácuo em torno de 500 μ de pressão, monitorado por um vacuômetro eletrônico CPS VG100A e utilizando-se uma bomba de vácuo de 12 cfm duplo estágio bivolt.

4.2.2 Tratamento Eletroquímico

Para o tratamento eletroquímico da superfície das amostras, foi utilizada uma fonte geradora (MPC-303DI, Minipa). A solução para o tratamento eletroquímico foi composta por 60% ácido sulfúrico, 30% ácido fluorídrico e 10% glicerina [64]. Como cátodo utilizou-se um fio de platina e como ânodo a amostra, conforme pode ser visto pela Figura 15 (a,b). O contato elétrico com o ânodo era feito através de uma haste de cobre no interior de um suporte onde era colocada a amostra e nesse suporte as amostras ficavam isoladas do eletrólito, com somente uma área exposta (aprox. 13 mm de diâmetro, aproximadamente 1,3 cm²) a ser tratada eletroquimicamente. A área do cátodo (contra-eletrodo) foi de aproximadamente 1,5 cm².



Figura 15: Foto do sistema de tratamento eletroquímico utilizado nesse estudo.

Nesse estudo foi avaliada a influência do tempo de tratamento eletroquímico. Na Tabela 2 a nomenclatura das amostras de Ti6Al4V com seus respectivos parâmetros de tratamento eletroquímico estão apresentados.

Tabela 2: Descrição das amostras pré-limpas com Etanol e posteriormente tratadas eletroquimicamente por 2 min – 90 min.

	Amostras	Potencial (V)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
	Lixada	Somente lixada até # 4000		
Tratadas Eletroquimicamente	2 min	25	2	7,0 ± 0,5
	4 min		4	
	8 min		8	
	12 min		12	
	30 min		30	
	60 min		60	
	90 min		90	

4.2.3 Caracterização das amostras de Ti6Al4V

Após o tratamento eletroquímico as amostras de Ti6Al4V foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS), ataque metalográfico, microscopia óptica, microscopia de força atômica, Interferometria óptica, MEV-FEG, molhabilidade em SBF (Simulated body fluid) [201] e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium). Antes do tratamento eletroquímico, a composição química das amostras foi analisada por Fluorescência de Raios-X.

Após a etapa de caracterização, as amostras estas foram encaminhadas para os testes: microbiológico, potencial citotóxico (citotoxicidade), adesão celular, diferenciação celular e deposição de cálcio.

4.2.3.1 Microscopia Óptica (M.O.)

A caracterização morfológica das amostras foi auxiliada por microscopia óptica, antes e após tratamento eletroquímico. As análises de microscopia óptica foram realizadas por meio de um microscópio óptico da marca OLYMPUS CX31, planC N, FN22.

4.2.3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens foram obtidas com o microscópio de força atômica SPM-9500J3 SHIMADZU. Operou-se em modo de contato, com sondas de nitreto de silício

(NANOSENSORS) e scanner com variação vertical de 8 μm e área de varredura de 125 μm x 125 μm . A avaliação da rugosidade da superfície por AFM foi realizada através das medidas de R_a (média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média), R_z (média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial, considerando os pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média). As medidas de rugosidade nanométrica foram realizadas em triplicata.

4.2.3.3 Método da gota séssil

A molhabilidade foi avaliada neste trabalho pelo valor do ângulo de contato formado entre a linha tangente à superfície do líquido e a superfície horizontal do substrato. Quando este ângulo estiver acima de 90° , a superfície é considerada hidrofóbica. Se o ângulo estiver abaixo de 90° , a superfície será chamada de hidrofílica. Segundo E. Burkarter [202], quanto menor o ângulo formado entre a gota e o substrato, mais hidrofílica será a superfície.

A Figura 16 mostra a diferença entre uma superfície hidrofóbica e hidrofílica.

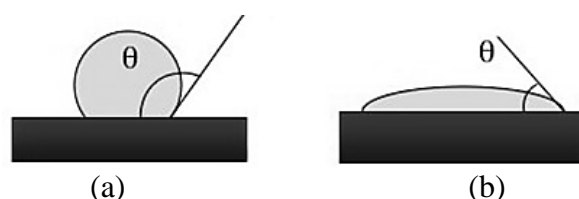


Figura 16: Representação do ângulo formado entre a gota e a superfície: (a) Superfície hidrofóbica (b) Superfície hidrofílica [adaptada de 21].

Os testes foram realizados com um aparato desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este determina o ângulo de contato formado através da interação entre a gota do líquido e o substrato analisado. O ângulo de contato foi determinado por meio de um programa de análise de imagens. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

O ângulo de contato foi medido utilizando-se uma água deionizada e o meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's essential medium) com $\text{pH} \approx 7,4$.

4.2.3.4 Rugosidade Micrométrica

A rugosidade micrométrica das amostras foi medida através de um perfilômetro da Marca MITUTOYO SJ-400, obtendo-se os valores de R_a (μm) e R_z (μm); todas as medidas foram realizadas em triplicata. Segundo as informações disponibilizadas pelo fabricante do

perfilômetro, Ra é a média aritmética de valores absolutos em todo o comprimento de amostragem, enquanto que o Rz é baseado nos cinco picos mais altos e vales mais baixos ao longo de todo o comprimento de amostragem.

4.2.3.5 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

Para as imagens obtidas por MEV-FEG foi utilizado um microscópio por emissão de campo, da marca MIRA3 TESCAN, operado a 10 kV e disponível na LCMicro da Universidade de Caxias de Sul (UCS).

4.2.3.6 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

Essa técnica foi utilizado para identificar os possíveis elementos químicos presentes na superfície e ao mesmo tempo confirmar a presença de óxido após os tratamentos eletroquímicos por 4 e 12 minutos.

A análise por XPS foi conduzida usando um XPS AXIS ULTRA da Krator. A medida foi realizada por radiação Al K α (1486,6 eV). O espectro Survey foi determinado por um passe de energia de 160 eV e o passe de energia dos elementos específicos foi fixado em 40 eV. A posição de energia dos elementos foi corrigida usando uma energia de Ag, como referência, obtida a partir de uma amostra pura de Ag.

4.3 Métodos de esterilização

Os métodos de esterilização inicialmente avaliados nesse trabalho foram esterilização por Plasma de Ar, Etanol+PBS e Autoclave.

Aquele método que não alterou a morfologia nanométrica e foi eficiente frente a esterilização foi o método escolhido para os testes microbiológicos, citotoxicidade, adesão celular, diferenciação celular e deposição de cálcio.

A escolha do método de esterilização por plasma de ar para continuar os testes com células, se deu pelo fato de que esse método foi o método que não alterou a morfologia da superfície, conforme poderá ser visto no comparativo entre a Figura 36(a) e Figura 36(b). Além disso, esse método foi eficiente, já que após o teste bacteriológico e micológico não foi detectada a presença de bactérias, fungos ou leveduras.

A esterilização a plasma de ar foi realizada com uma descarga do tipo RF (radiofrequência), com potência máxima de 65W e tempo de limpeza de 5 minutos em atmosfera de N₂ e O₂ na mesma proporção do ar atmosférico (78,1% N₂, 20,9% O₂ e 1% Argônio e outros gases) [200].

A esterilização por Etanol+PBS foi realizada a partir da imersão das amostras em etanol 70% durante 3h em ultrassom; com posterior imersão das amostras em PBS por 3 vezes de 20 min no ultrassom. Com relação a esterilização por Autoclave a vapor, as amostras foram submetidas a temperatura de 121°C por 30 minutos a 1,2 bar.

A etapa de caracterização das propriedades superficiais foi realizada nas amostras de Ti6Al4V com e sem esterilização. Para as amostras sem esterilização utilizaram-se 9 amostras, sendo 3 amostras para cada sistema (tratadas eletroquimicamente por 4 min, tratadas eletroquimicamente por 12 min e somente lixadas).

4.4 Ensaio Microbiológico

Os ensaios para detecção de crescimento bacteriológico e micológico foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário da ULBRA (Universidade Luterana do Brasil). Após a esterilização por plasma de ar, os materiais para exame consistiram na incubação dos biomateriais em meios específicos para crescimento bacteriano e fúngico. Os materiais foram inoculados em placas de Agar sangue com 8% de sangue ovino, em placas de agar MacConkey e caldo BHI® (Brain Heart Infusion), incubados a 37°C por 24 horas. Para a cultura fúngica foi utilizado um Agar Sabouraud.

As colônias bacterianas foram identificadas através da visualização em placa (morfologia de colônia, presença ou ausência de hemólise, e em microrganismos gram negativos fermentação ou não de lactose), coloração de gram, testes rápidos (catalase, oxidase, coagulase) e testes de indol, utilização de citrato, uréia, fermentação de açúcares (glicose, sacarose, maltose, dulcitol, trehalose, manose) VM/VP, SIM e fenilalanina, conforme indicado por S. T. Cowan [203] e S. J. Oliveria [204].

4.5 Ensaio de Citotoxicidade em Ti6Al4V e Ti puro

O teste de citotoxicidade tem como objetivo avaliar a viabilidade celular de células da linhagem L929 (fibroblastos de rato) em contato indireto com as amostras de biomateriais, a partir da técnica de extração do meio de cultura. O teste seguiu as instruções da ISO 10993-5. Para o ensaio as amostras ficaram em meio por 24 h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias e após este período o meio foi colocado em contato com as células (L929) por mais 24 h. Como controle positivo de morte celular utilizou-se DMSO 10% e as células L929 em contato com meio de cultura sem biomaterial como controle negativo (100% de sobrevivência celular).

4.6 Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de medula-óssea (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells – BMMSCs)

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos/ULBRA. Todos os reagentes utilizados nesse estudo foram da sigma-Aldrich Co LLC. Utensílios de plásticos foram de BD Falcon (São Paulo, Brasil). O meio de cultura completo (CCM) foi composto de Dulbecco's modified Eagle's com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES), e 100 U de penicilina ml⁻¹ e 10 mg de solução de streptomina ml⁻¹ (Gibco Invitrogen). Solução salina balanceada de Hank livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ foi utilizada para lavagem das células. Todos os experimentos foram feitos com células em passagem 3-6, sendo que todos os experimentos foram realizados em triplicata. O motivo do uso desse tipo de células se deu pelo fato de que essas células possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos de células, entre elas estão as células ósseas.

As células de medula óssea foram obtidas a partir da tíbia e do fêmur de machos de ratos SHR com 60 dias de vida. O uso destes animais foi aprovado pelo Comitê de Ética da FEPPS (MEMO n. 02/201, 7 de Agosto de 2013). As cavidades de medula óssea dos ratos foram lavadas com CCM usando seringa de 18 a 25 G. A camada celular e o conteúdo total da medula foi plaqueado e cultivado em CCM a 5% CO₂ a 37°C em ambiente umidificado. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana com a remoção das células não aderidas. Quando atingida a confluência, as células foram repicadas e mantidas em cultura. Células de passagem 3-6 foram usadas para os experimentos.

4.7 Adesão das BMMSCs com os biomateriais

Os biomateriais utilizados foram Ti puro lixado até grana # 4000, Ti6Al4V lixado até grana # 4000, Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 minutos e Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos. As BMMSC ressuspendidas em CCM foram adicionadas à superfície dos biomateriais na densidade de 5x10⁴ células/cm² e incubadas para adesão durante 90 minutos em ambiente umidificado a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação as amostras foram lavadas, removendo as células não aderidas. As células não aderidas foram mantidas em placas de cultura e ficaram aderindo durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente as células foram coradas com Giemsa e o número de células foi contado diretamente. Para obtenção da taxa de adesão celular, os resultados foram expressos em % de células aderidas.

4.7.1 MEV após adesão das BMMSCs com os biomateriais

Para a obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura de superfície com células aderidas é necessário uma boa preparação das amostras. A etapa mais importante nesse processo é a fixação, a primeira etapa, e é a qual se deixa a superfície do material o mais resistente possível. O fixador ideal para Microscopia Eletrônica de Varredura é a base de Glutaraldeído. O fixador faz com que o material fique exatamente como estava na forma viva, deixando o tecido mais rígido, para que quando a amostra receba o feixe de elétrons ou passe pelo aparelho de ponto crítico não venha a ocorrer danos na superfície. Após a fixação, o material é lavado em uma solução tampão, que serve para retirar o excesso de fixador. Posteriormente, o material será desidratado de maneira lenta e gradual. A partir do momento em que o desidratante esteja puro (100%) as amostras estão prontas para o Ponto Crítico.

Para a etapa de fixação foram utilizados 1,2 mL de Glutaraldeído 25%, 5 mL de solução Tampão Fosfato 0,2 M e 3,8 mL de água destilada. A fixação do material, por imersão, deve ser feita imediatamente após a coleta. O período de fixação varia conforme a amostra, normalmente o período indicado é de no mínimo uma semana.

Para a lavagem foi utilizado solução tampão de fosfato 0,2 M + água destilada na proporção 1:1. Na desidratação, inicialmente as amostras ficaram em contato 10 minutos com solução de acetona 30%, posteriormente seguiu-se a seqüência de 10 minutos em acetona 50%, 10 minutos em acetona 70%, 10 minutos em acetona 90%, 20 minutos em acetona 90%, 10 minutos em acetona 100% e por último mais 20 minutos em acetona 100%.

A etapa de dessecação utilizou-se um aparelho de Ponto Crítico, após as peças devem ser colocadas no Stub, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse. Posteriormente, para finalizar as amostras são metalizadas no metalizador.

4.8 Ensaio de viabilidade celular

As células foram mantidas sobre os biomateriais por 4 dias, após esse período foi analisada a viabilidade celular. O teste de Alamar Blue foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Invitrogen Alamar Blue (10% v/v em HDMEM) foi adicionado em cada poço, e a placa foi incubada por 3 horas. 100 µl de cada poço foi transferido para uma placa preta de 96 poços e realizou-se a leitura em um Spectramax M2 e fluorômetro (Molecular Devices), usando uma excitação de 544 nm e uma emissão de 590 nm. Os

dados foram normalizados pela quantidade inicial de células e expressos como intensidade de fluorescência / 10^4 células.

4.9 Diferenciação Celular

A diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de medula-óssea (BMMSCs) isoladas foi induzida por células entre passagem 3 e 6 com 3×10^4 células/cm² em meio específico e cultivadas por 14 dias, com troca do meio a cada 3 dias. Para a diferenciação osteogênica, meio de cultura completo (CCM) foi suplementado com 10^{-8} M de dexametasona, 5 mg de ácido ascórbico 2-fosfato/mL e 10 mM de β -glicerofosfato. Foram usados como controle BMMSCs plaqueadas em placas de 24 poços, pelo mesmo período, em meio CCM e meio indutor.

4.10 Análise Semi-quantitativa de Mineralização

Após coloração da diferenciação osteogênica (3 e 11 dias), as células foram fixadas com etanol 70% por 15 minutos, e lavadas 3 vezes com água destilada. 1 mL de Alizarina foi adicionada nas células e elas foram incubadas por 30 minutos a uma temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido através de 4 lavagens com água destilada. Depois da lavagem, as células foram incubadas com 500 μ l de isopropanol por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram distribuídas em uma placa de 96 poços para leitura electrospectrofotométrica (Multiskan Ex original, Serial RS-232c) com uma densidade óptica de 540 nm. Para a quantificação da mineralização uma razão molar 1:2 entre Alizarina e cálcio foi aplicada.

4.11 Quantificação da Atividade de Fosfatase Alcalina (Alkaline Phosphatase - ALP)

As proteínas totais foram extraídas em solução de lise (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7,6], 0,1% TritonX-100, 200 mM KCl, 0,5 mM EDTA) e quantificadas segundo o método de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) seguindo instruções do fabricante. A atividade de ALP foi analisada usando a conversão colorimétrica de p-nitrofenil fosfato no produto p-nitrofenol baseadas no kit 85L-2 (Sigma Aldrich). Brevemente, 20 μ L de solução de proteínas totais foram incubadas a 37 °C em uma solução de 4-Nitrofenilfosfato a 6,7 mM diluída em tampão carbonato (0,1 M) - MgCl₂ (2 mM) (pH 9,8). O ensaio foi feito em placa de 96 poços, em triplicata, com volume total de 120 μ L. Na mesma placa foi incubada uma curva padrão de p-Nitrofenol (produto) diluído a partir de 0,5 mM. Uma solução de 0,2 M de NaOH foi utilizada para parar a reação (volume final 200 μ L).

4.12 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Todos os testes foram realizados 3 vezes independente do experimento. Os dados foram analisados e plotados usando o software Prism 5 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Os resultados foram avaliados por uma análise de variância unidirecional seguida por um teste Tukey ou pelo teste t do Student. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudo da influência do tempo de tratamento eletroquímico sobre a morfologia, estrutura e composição química superficial.

Este item visa apresentar os resultados de caracterização morfológica, estrutural e físico-química das superfícies com pré-limpeza em etanol e posteriormente tratadas eletroquimicamente em diferentes tempos de eletropolimento (2 min – 90 min). Resultados de DRX serão utilizados para verificar se houve a formação de óxido nas superfícies. Enquanto, que imagens obtidas por microscopia de força atômica serão utilizadas para evidenciar as topografias e os valores de rugosidade nanométrica. Além disso, também serão apresentados os resultados de molhabilidade e avaliação por microscopia óptica e rugosidade micrométrica dessas superfícies submetidas a diferentes tempos de tratamento eletroquímico.

Como pode-se observar na Figura 17, a morfologia da superfície das amostras varia com o tempo de tratamento eletroquímico.

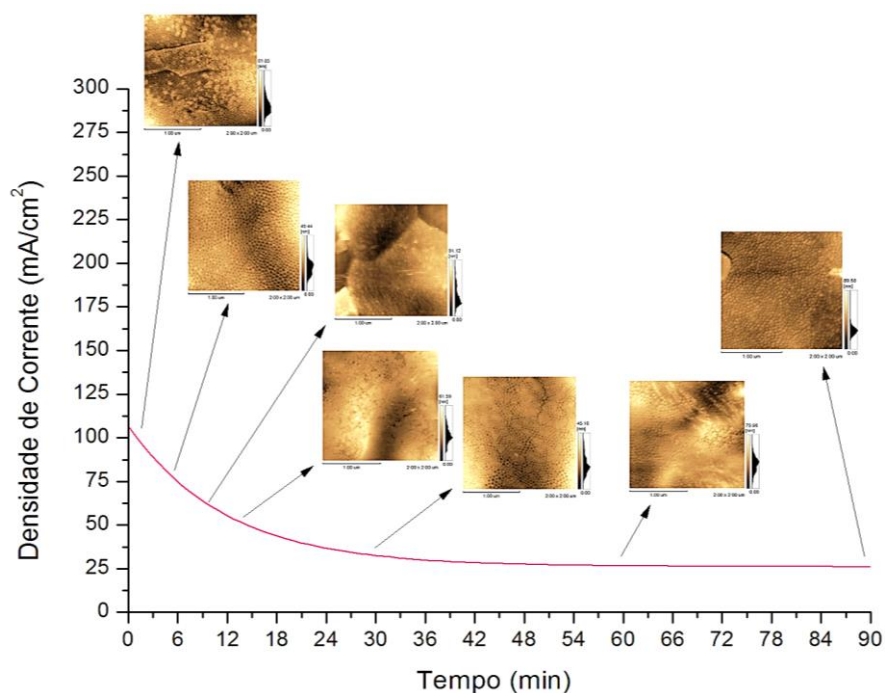


Figura 17: Transientes de densidade de corrente da amostras de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente a 25V por 90 minutos, a 7°C.

Na Figura 18 estão apresentadas as imagens obtidas por AFM das amostras somente lixadas e tratadas eletroquimicamente até 90 minutos.

Foi possível verificar que a amostra tratada eletroquimicamente em 4 minutos (Figura 18c) apresentou em sua superfície com nanoestruturas bem definidas. Esse

comportamento pode estar relacionado ao processo de dissolução anódica que foi favorecido em menores tempos de tratamento eletroquímico. Na amostra de 8 minutos, verificou a formação de nanoestruturas sobre regiões de grão e contorno de grãos, conforme pode ser visto na Figura 18(d).

Para tempos maiores de tratamento eletroquímico, como pode-se observar para a amostra de 12 minutos (Figura 18 (e) é possível perceber o aparente espessamento da camada de óxido sobre as nanoestruturas. Na Figura 18 (h), observa-se que a amostra tratada eletroquimicamente aos 90 minutos, ou seja, o maior tempo de tratamento eletroquímico, apresentou uma superfície com nanoestruturas revestidas por uma camada, possivelmente de óxido. Isso indica que o espessamento da camada de óxido é favorecido em relação ao processo de dissolução e formação das nanoestruturas para tempos maiores do tratamento eletroquímico.

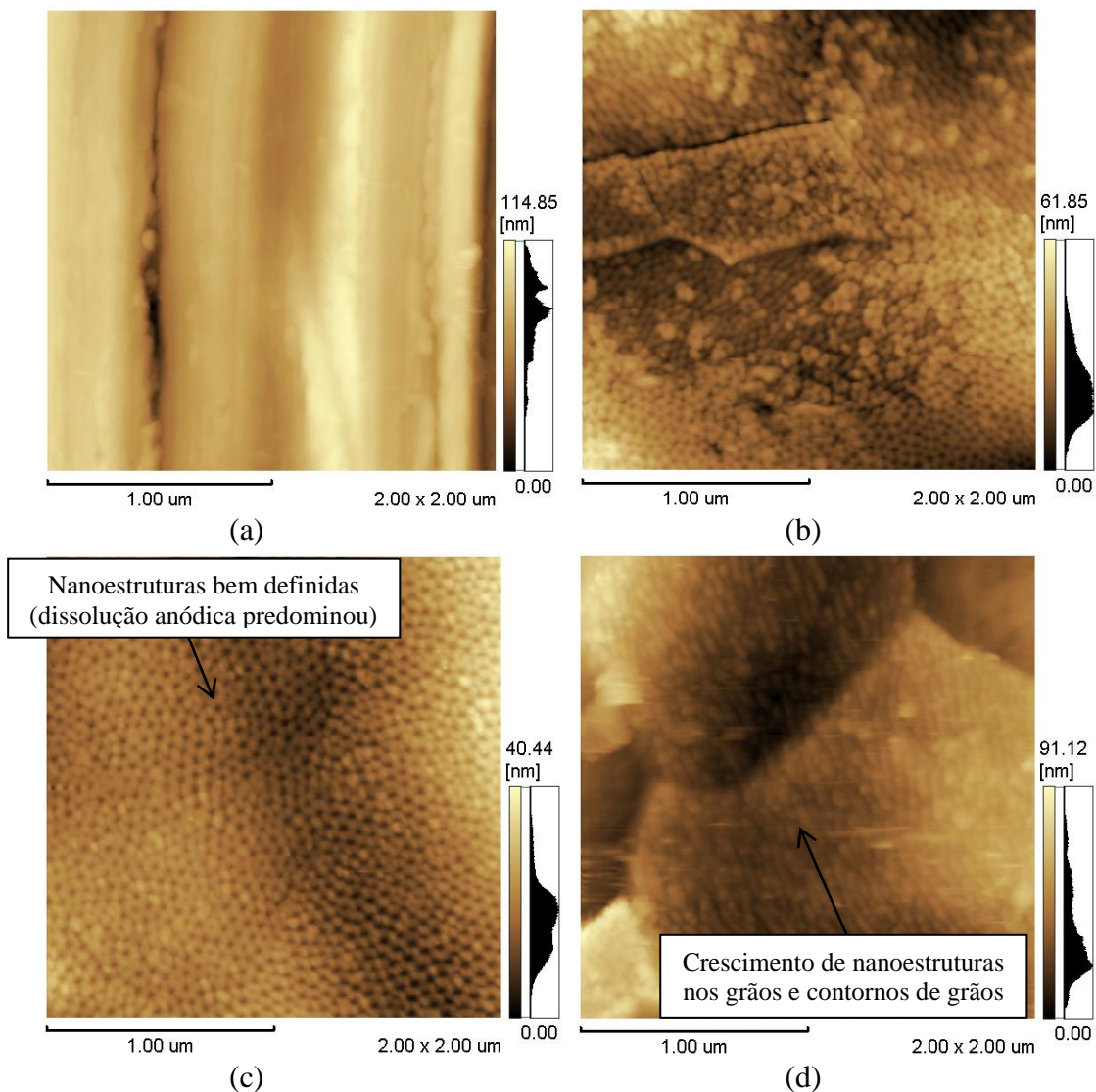


Figura 18: Imagens obtidas AFM das amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8 minutos. (a) Lixada, (b) 2 min, (c) 4 min, (d) 8 min.

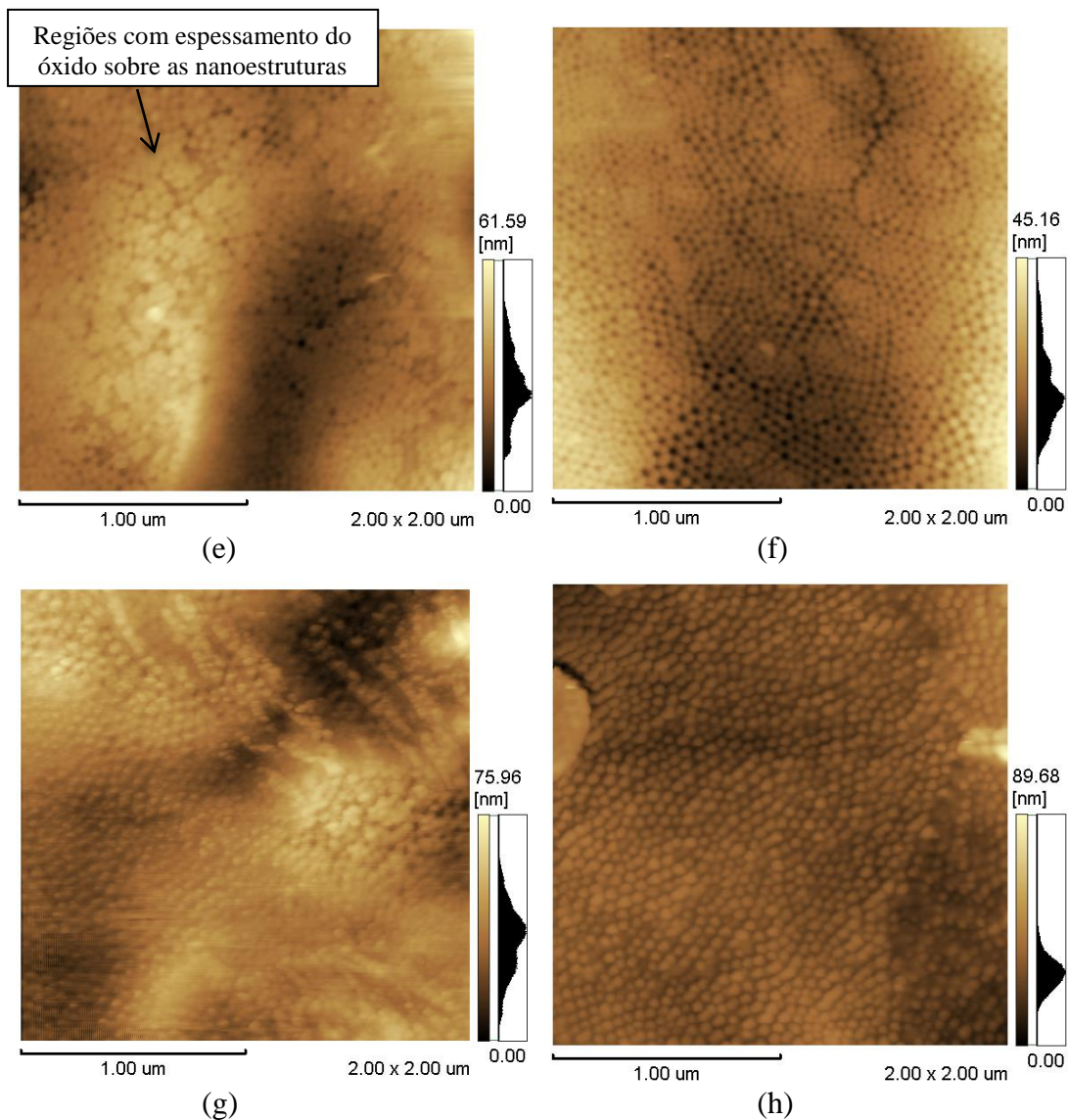


Figura 18 (continuação): Imagens obtidas AFM das amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8 minutos. (e) 12 min, (f) 30 min, (g) 60 min, (h) 90 min.

P. S. Albu et al. [205] têm mostrado que o aumento do potencial ou aumento do tempo de eletropolimento induz ao processo de dissolução do óxido e os poros começam a aparecer. O crescimento dos poros atinge um estado estacionário e são obtidos poros uniformemente distribuídos na superfície. N. A. Kyeremateng et al. [206] mostraram que durante o eletropolimento/anodização ocorre um aumento da concentração de oxigênio sobre a superfície, o que favorece o espessamento da camada de óxido.

Em uma escala micrométrica é possível evidenciar visualmente na superfície tratada eletroquimicamente que em menores tempos de tratamento eletroquímico (2 e 4 minutos), houve uma maior quantidade de pontos (regiões) de dissolução (Figura 19 (b,c)). Essas regiões apresentaram menores diâmetros. Já para os maiores tempos de tratamento eletroquímico (a partir de 8 minutos) visualiza-se uma diminuição na quantidade de regiões de dissolução, porém o seu diâmetro aumenta. Acredita-se que isso possa ter sido

influenciado pela formação de regiões com espessamento do óxido que predomina sobre o mecanismo de dissolução anódica.

Nas Figura 19(g) e Figura 19(h) é possível perceber que em maiores tempos de tratamento eletroquímico (60 e 90 minutos) houve uma diminuição na quantidade das regiões de dissolução, tais regiões apresentaram um aumento no diâmetro. Analisando em escala microscópica, o aumento do tempo de tratamento eletroquímico das regiões de dissolução que antes eram de diâmetro menor, se agregaram para formar regiões de maior área superficial e consequentemente de maior dissolução.

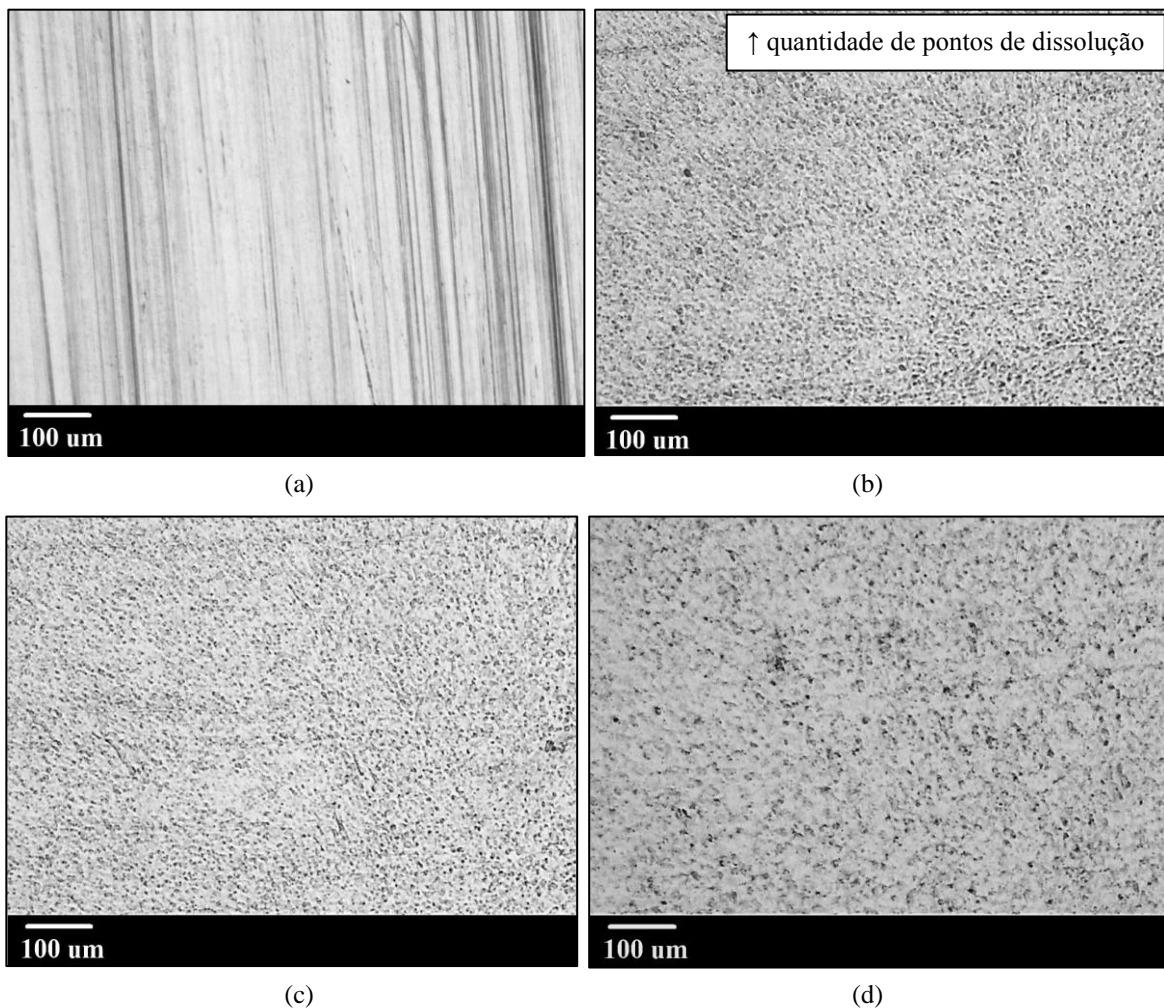


Figura 19: Imagens obtidas por Microscopia Óptica das amostras de Ti6Al4V sem tratamento eletroquímico e tratada eletroquimicamente a 25V, 2 minutos a 7°C. (a) Lixada, (b) 2 min, (c) 4 min, (d) 8 min.

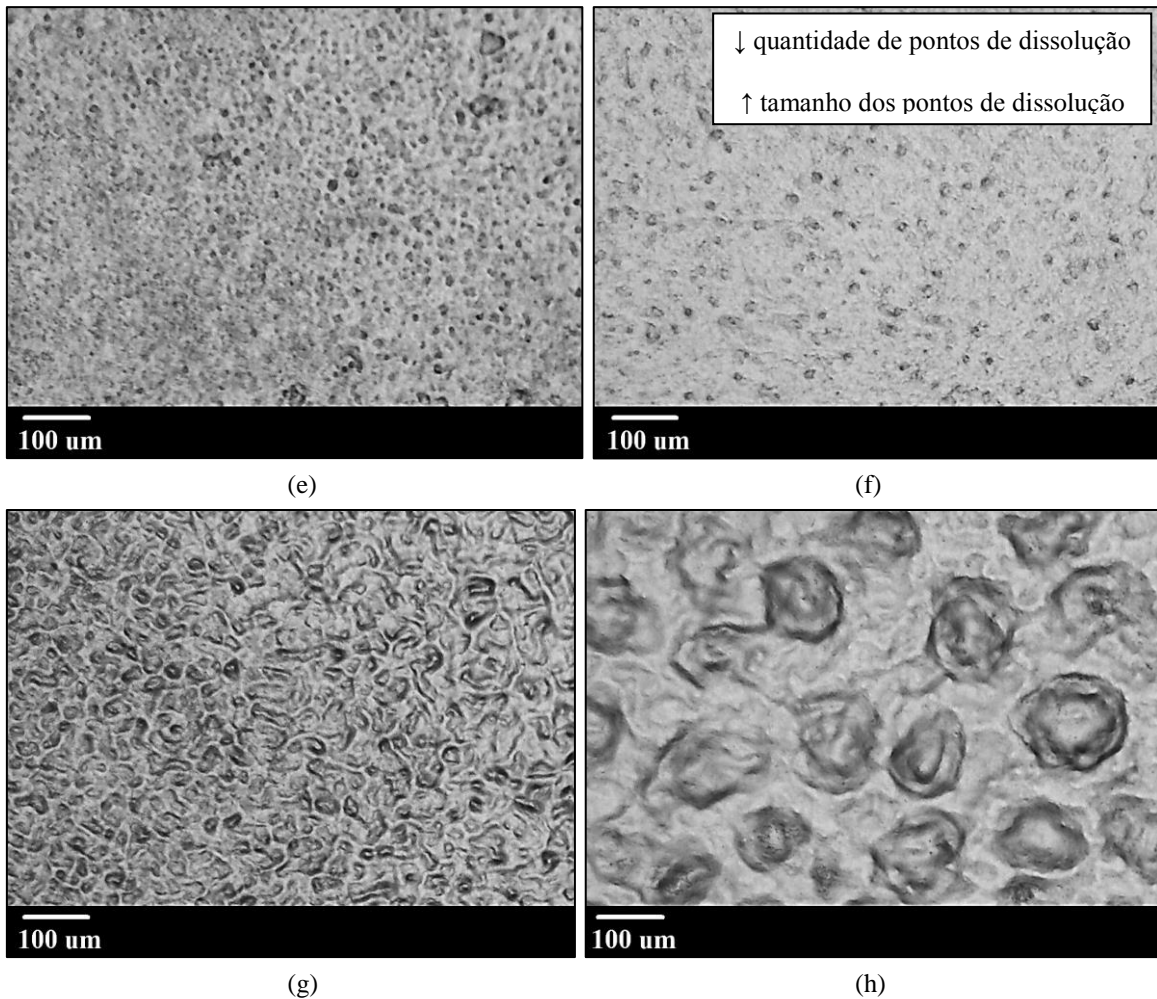


Figura 19 (continuação): Imagens por Microscopia Óptica das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, aos 4, 8, 12, 30 e 90 minutos a 7°C. (e) 12 min, (f) 30 min, (g) 60 min, (h) 90 min.

Na Tabela 3 e na Figura 20 estão apresentados os resultados das medidas de rugosidade micrométrica para as amostras somente lixadas e tratadas eletroquimicamente em 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos. Independente do tempo de tratamento eletroquímico foi observado que todos os valores de rugosidade micrométrica (R_a e R_z) foram muito semelhantes entre as amostras tratadas até 60 minutos (R_a na ordem de 0,1 a 0,4 μm). Enquanto a amostra tratada por 90 minutos apresentou R_a na ordem de 1 μm . D. D. Deligianni et al [207] e P. Linez-Bataillon et al. [208] indicaram que superfícies com rugosidade $< 2 \mu\text{m}$ podem contribuir para a osseointegração e fixação do implante. Dessa forma, quanto à rugosidade micrométrica, tais superfícies obtidas favoreceriam a osseointegração. Os autores H. J. Kim et al. [209] mostraram que o crescimento de células osteoblásticas em Ti6Al4V foi maior em superfícies menos rugosas ($R_a \approx 0,2 \mu\text{m}$). De qualquer forma, é importante considerar também a influência da estrutura em escala nanométrica.

Tabela 3: Medidas de rugosidade (μm) para as amostras lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos, 7°C.

Amostra	Rugosidade (μm)	
	Ra	Rz
Lixada	$0,1 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,22$
2 min	$0,2 \pm 0,02$	$3,5 \pm 0,3$
4 min	$0,3 \pm 0,001$	$4,6 \pm 0,6$
8 min	$0,3 \pm 0,01$	$4,5 \pm 0,1$
12 min	$0,3 \pm 0,01$	$4,4 \pm 0,1$
30 min	$0,3 \pm 0,004$	$5,0 \pm 0,1$
60 min	$0,4 \pm 0,01$	$6,4 \pm 0,1$
90 min	$1,1 \pm 0,02$	$12,7 \pm 1,6$

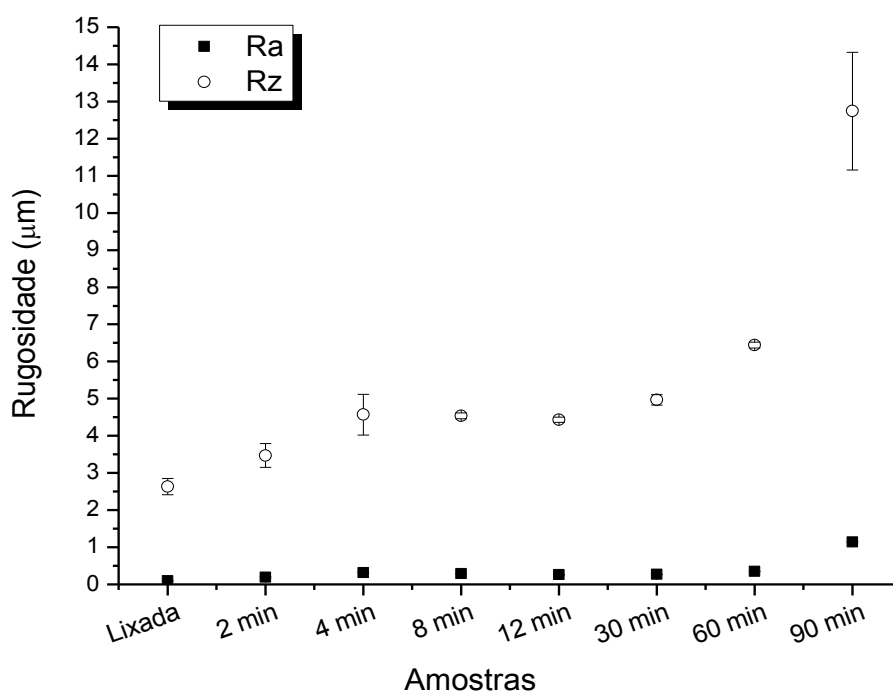


Figura 20: Rugosidade (μm) para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos, 7°C.

Com relação aos valores de rugosidade obtidos em escala nanométrica (Tabela 4 e Figura 21) foi verificado que os valores de Ra variaram entre 6 e 13 nm e não foi observada uma relação de tendência entre tempo de tratamento eletroquímico e a rugosidade nanométrica (Ra e Rz).

Tabela 4: Medidas de rugosidade em escala nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.

Amostra	Rugosidade (nm)	
	Ra	Rz
Lixada	13 ± 1	57 ± 0,3
2 min	13 ± 0,2	36 ± 9
4 min	5 ± 1	20 ± 0,2
8 min	12 ± 2	40 ± 7
12 min	8 ± 1	37 ± 1
30 min	12 ± 2	31 ± 12
60 min	7 ± 3	30 ± 1
90 min	6 ± 1	36 ± 8

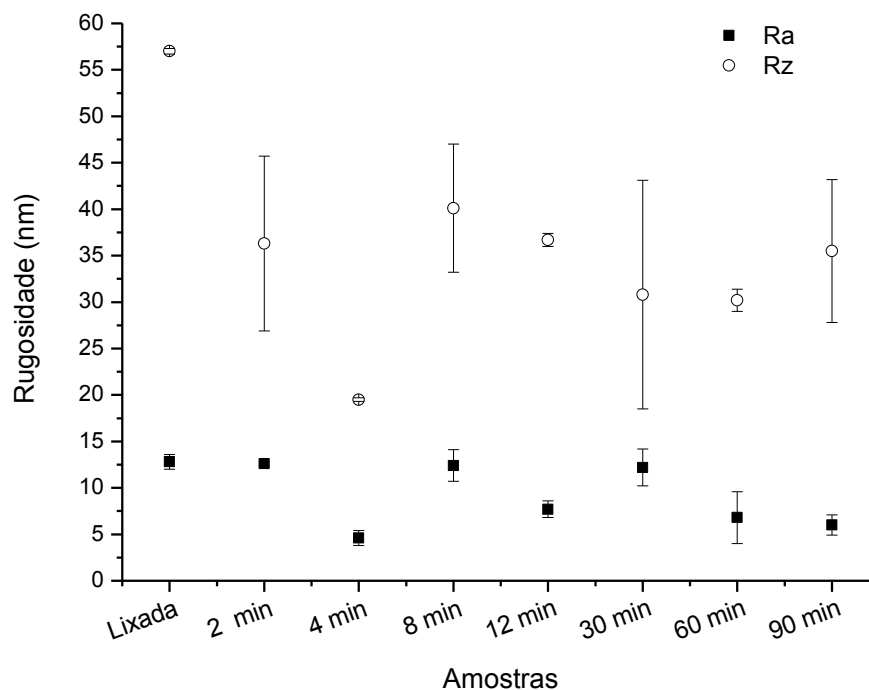


Figura 21: Rugosidade em nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores dos ângulos de contato obtidos com meio de cultura DMEM e água para as amostras lixadas e tratadas eletroquimicamente. As amostras tratadas eletroquimicamente apresentaram valores de ângulos de contato dentro da faixa de 80° a 90° em água enquanto que em contato com meio de cultura DMEM entre 47° e 87°. N. Faucheux et al. [210] e Y. Ikada [211] mostraram uma melhor adesão celular sobre superfícies com hidrofobicidade intermediária (cerca de 70°). R. Narayanan et al. [212] mostraram que superfícies com nanotubos de TiO₂ e valores de ângulo de contato na

faixa de 70–80° apresentaram uma boa viabilidade celular. G. Altankov et al. [213] e T. Groth et al. [214] observaram uma diminuição nos ângulos de contato (comportamento mais hidrofílico) naquelas superfícies com nanoestruturas. Esses autores ainda destacam que a molhabilidade teve um papel importante sobre a adesão celular em superfícies com nanotubos e que células tendem a aderir mais naquelas superfícies hidrofílicas do que nas superfícies hidrofóbicas. A. Nakajima et al. [215] realizaram um estudo em superfícies de titânio e perceberam que aquelas superfícies que tiveram um aumento da concentração de dióxido de titânio (TiO₂) apresentaram maiores valores de ângulo de contato.

De um modo geral as amostras obtidas nessa etapa do trabalho apresentaram um ângulo de contato elevado e comportamento tendendo a hidrofóbico em água, independentemente do tempo do tratamento eletroquímico, ou mesmo da rugosidade micrométrica (Tabela 3 e na Figura 20). Enquanto que para as amostras em contato com meio de cultura DMEM observa-se um aumento do ângulo de contato entre 2 minutos e 30 minutos de tratamento eletroquímico podendo este comportamento estar relacionado com o espessamento da camada de óxido que prevalece com o aumento do tempo de tratamento eletroquímico. Porém aos 60 minutos evidencia-se uma diminuição do ângulo de contato, dessa forma não fica claro a real tendência entre o ângulo de contato e o tempo de tratamento eletroquímico. As amostras foram limpas com etanol antes da determinação do ângulo de contato e nos itens seguintes desse trabalho, será mostrado que isso pode ter mascarado o resultado de molhabilidade obtido aqui, já que a molhabilidade é influenciada pela presença de espécies adsorvidas na superfície.

Tabela 5: Ângulos de contato para as amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos em DMEM e H₂O.

Amostra	DMEM (°)	H ₂ O (°)
Lixada	57 ± 0,3	75 ± 1
2 min	47 ± 4	80 ± 1
4 min	51 ± 6	85 ± 1
8 min	66 ± 6	86 ± 2
12 min	79 ± 0,4	86 ± 1
30 min	85 ± 0,4	89 ± 1
60 min	82 ± 1	90 ± 1
90 min	87 ± 0,4	90 ± 0,4

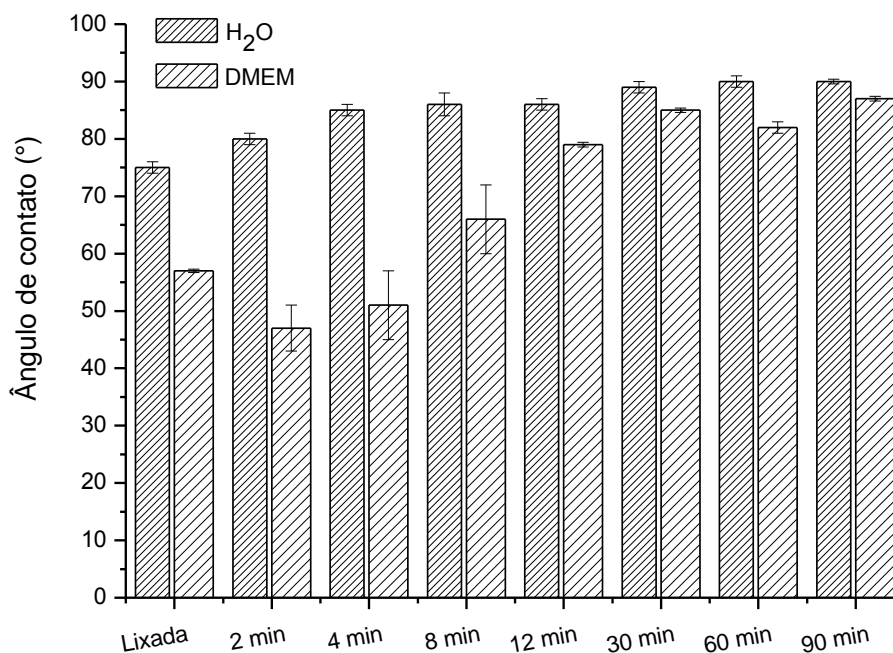


Figura 22: Medidas de ângulo de contato em DMEM e H₂O para as amostras de Ti6Al4V lixadas e tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8, 12, 30, 60 e 90 minutos.

Nas Figura 23 e Figura 24 estão apresentados os resultados de difração de Raios-X e na Figura 25, os resultados de DRX com ângulo rasante (5°) para as amostras após tratamento eletroquímico. Com relação a identificação dos picos do difratograma foi utilizado o software X'Pert HighScore e os resultados foram comparados com a literatura. A. E. Morcelli [216], S. W. Lu et al. [217], Ajami et al. [218], entre outros autores [219,220,221,222,223,224] têm reportado a presença de Ti β em 38° e 40° e de Ti α entre 51° - 53° e 71° - 76°.

Ainda que as imagens obtidas por AFM evidenciem a formação de uma camada sobre a nanoestrutura, os resultados de DRX mostraram para todos os tempos de tratamento eletroquímico que não foi possível detectar picos associados à formação de óxido de titânio. Isso pode ser devido à baixa espessura do filme de óxido formado. Conforme reportado por C. Larsson et al. [225], C. Larsson et al. [226] e J. Lausmaa et al. [227], filmes de óxido de titânio eletropolido apresentaram espessura < 5 nm, desta maneira os autores indicam o uso de técnicas como AES ou XPS para a identificação dos óxidos.

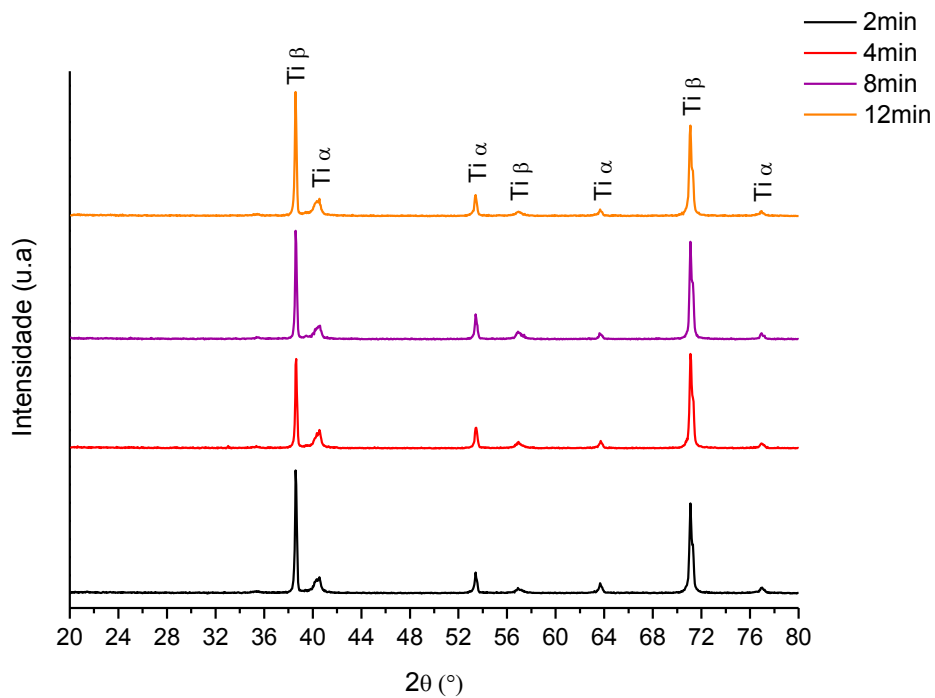


Figura 23: Difratomogramas de DRX para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8 e 12 minutos.

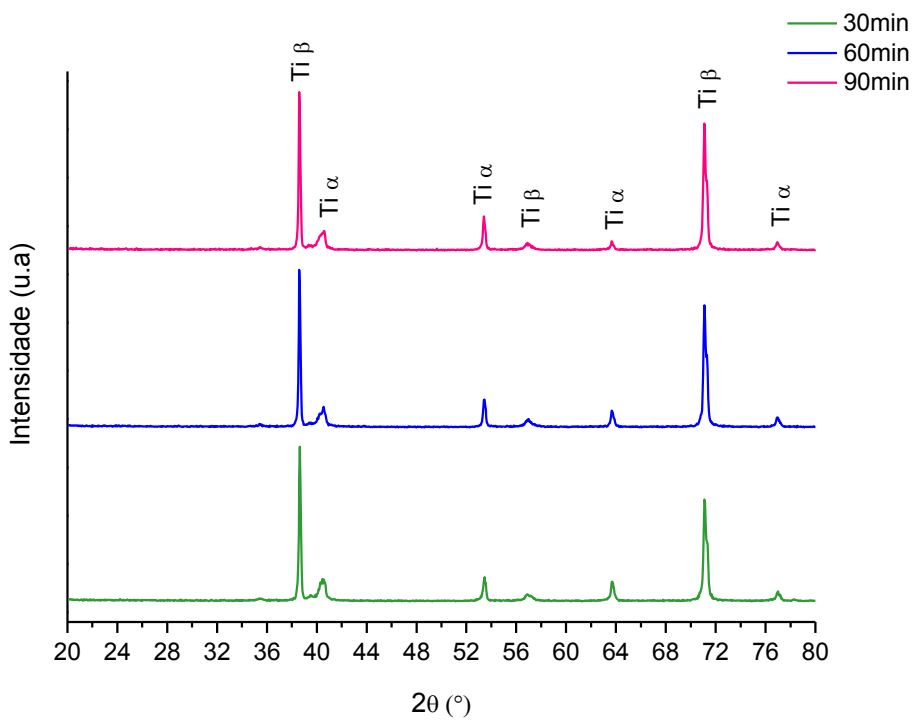


Figura 24: Difratomogramas de DRX para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 30, 60 e 90 minutos.

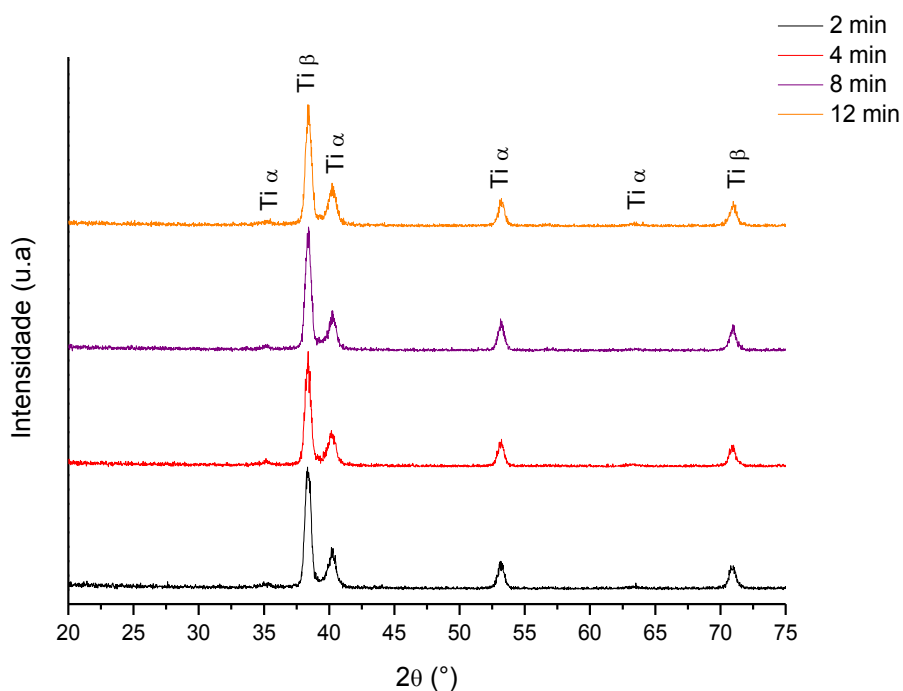


Figura 25: Resultados de DRX ângulo rasante (5°) para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente a 25V nos tempos 2, 4, 8 e 12 minutos.

5.1.1 Conclusões Parciais

As amostras tratadas eletroquimicamente em menor tempo de tratamento eletroquímico apresentaram a formação de nanoestruturas, prevalecendo o processo de dissolução anódica; enquanto que em maiores tempos de tratamento eletroquímico favoreceu o espessamento da camada de óxido sobre as nanoestruturas.

Contudo, por análise de DRX não foi detectada a presença de óxido sobre as amostras tratadas eletroquimicamente, isso pode estar relacionado a baixa espessura da camada de óxido. Nesse caso, empregando análises como por exemplo, a técnica XPS seriam indicadas para obter resultados mais conclusivos.

Independente do tempo de tratamento eletroquímico foi observado que todos os valores de rugosidade micrométrica (R_a e R_z) ficaram semelhantes para as amostras tratadas até 60 minutos (R_a na ordem de 0,1 a 0,2 μm). Enquanto a amostra tratada por 90 minutos apresentou rugosidade (R_a) na ordem de 1 μm .

Já os valores de rugosidade obtidos em escala nanométrica ficaram entre 6 e 13 nm (R_a) e não foi observada uma relação de tendência entre tempo de tratamento eletroquímico e a rugosidade nanométrica (R_a e R_z).

As amostras tratadas eletroquimicamente apresentaram valores de ângulos de contato dentro da faixa de 80° a 93° .

De um modo geral as amostras obtidas nessa etapa do trabalho apresentaram ângulos de contato elevado (de 80° a 93°), independentemente do tempo de tratamento eletroquímico utilizado, ou mesmo da rugosidade micrométrica.

Esse comportamento pode estar associado ao fato de que as amostras foram limpas com etanol antes da determinação do ângulo de contato. Como a molhabilidade é influenciada pela presença de espécies adsorvidas na superfície, nas etapas seguintes desse trabalho uma limpeza da superfície empregando a limpeza com plasma de ar será empregada.

5.2 Obtenção de superfícies nanoestruturas em 4 e 12 minutos de tratamento eletroquímico: limpeza por Plasma de Ar

Durante o estudo da influência do tempo sobre a morfologia obtida verificou-se dificuldade para reprodutibilidade dos resultados. Isso indicou que a superfície das amostras estavam chegando para a etapa de tratamento eletroquímico com problema na limpeza, evidenciando que a limpeza com etanol não estava sendo eficaz. Por esse motivo, houve a necessidade de realizar uma nova metodologia de limpeza das amostras por plasma de ar antes dos tratamentos eletroquímicos.

Para esse novo estudo foram selecionadas as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos e 12 minutos, as quais foram submetidas ao processo de limpeza por plasma de ar antes do tratamento eletroquímico. As amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos foram escolhidas em consequência das mesmas terem apresentado a formação de nanoestruturas (Figura 18c), prevalecendo o processo de dissolução anódica durante o tratamento eletroquímico. As amostras tratadas eletroquimicamente por 12 minutos foram escolhidas por terem apresentado o espessamento da camada de óxido sobre a superfície nanoestruturada (Figura 18e).

Pretende-se dessa forma, avaliar o efeito da morfologia (presença de nanoestruturas) e característica da superfície (presença intensa de óxido ou não) na resposta frente a adesão celular, proliferação celular, diferenciação de células-tronco em células ósseas e deposição de cálcio.

Nessa etapa do presente estudo as amostras foram avaliadas quanto à morfologia e estrutura, rugosidade e molhabilidade. A análise de XPS foi utilizada para identificação de óxido de titânio, e de possíveis elementos (H, N, F, S) ou grupos funcionais (OH, C=O) que poderiam estar presentes na superfície em decorrência do tratamento eletroquímico. As imagens de MEV-FEG e MEV-EDS serão utilizadas para evidenciar a presença de nanoestruturas ou o espessamento da camada de óxido, além de indicar os elementos químicos que se concentram em determinadas regiões das superfícies tratadas eletroquimicamente.

Na Figura 26 estão apresentados os transientes de densidade de corrente das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos obtidos a partir da nova metodologia de limpeza das amostras com plasma de ar anterior ao tratamento eletroquímico. A partir do perfil do transiente de densidade de corrente é possível observar um platô com tendência de estabilidade após 10 minutos de tratamento eletroquímico,

indicando a formação de óxido sobre a superfície da qual contribuiu para a diminuição da densidade de corrente como consequência do aumento da resistência.

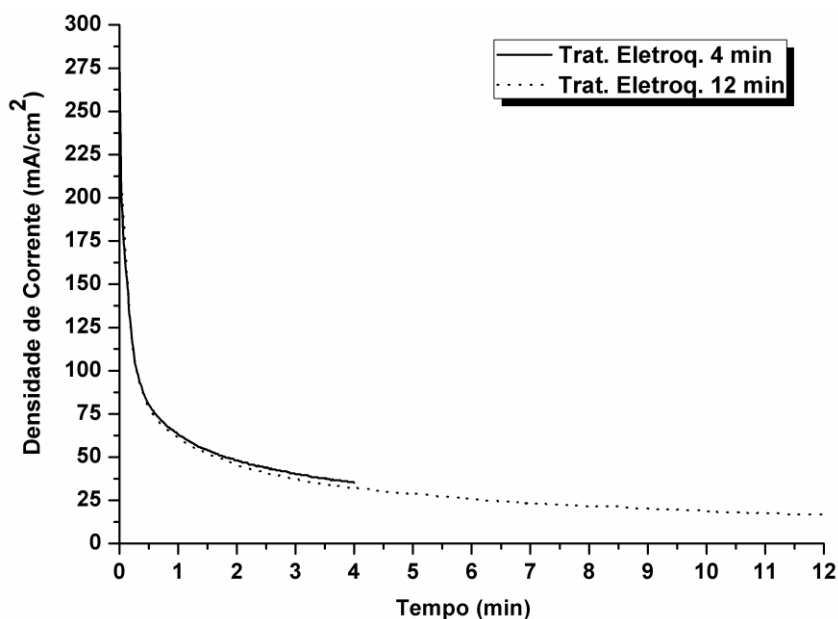


Figura 26: Transiente de densidade de corrente das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos pré-limpas com plasma de ar anterior ao tratamento eletroquímico.

Na Figura 27 estão apresentados os resultados da morfologia nanométrica obtidas por AFM para as amostras tratadas eletroquimicamente após limpeza por plasma de ar.

A partir desses resultados observa-se que as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos apresentaram a formação de nanoestruturas bem definidas (Figura 27b) enquanto que na amostra tratada eletroquimicamente aos 12 minutos prevaleceu o espessamento da camada de óxido (Figura 27c). A formação das nanoestruturas provavelmente ocorreu em consequência do processo de dissolução anódica ter sido mais intensa do que o espessamento da camada de óxido.

A limpeza das amostras com plasma de ar, antes do tratamento eletroquímico, contribuiu para a obtenção de nanoestruturas mais definidas e resultados reproduzíveis.

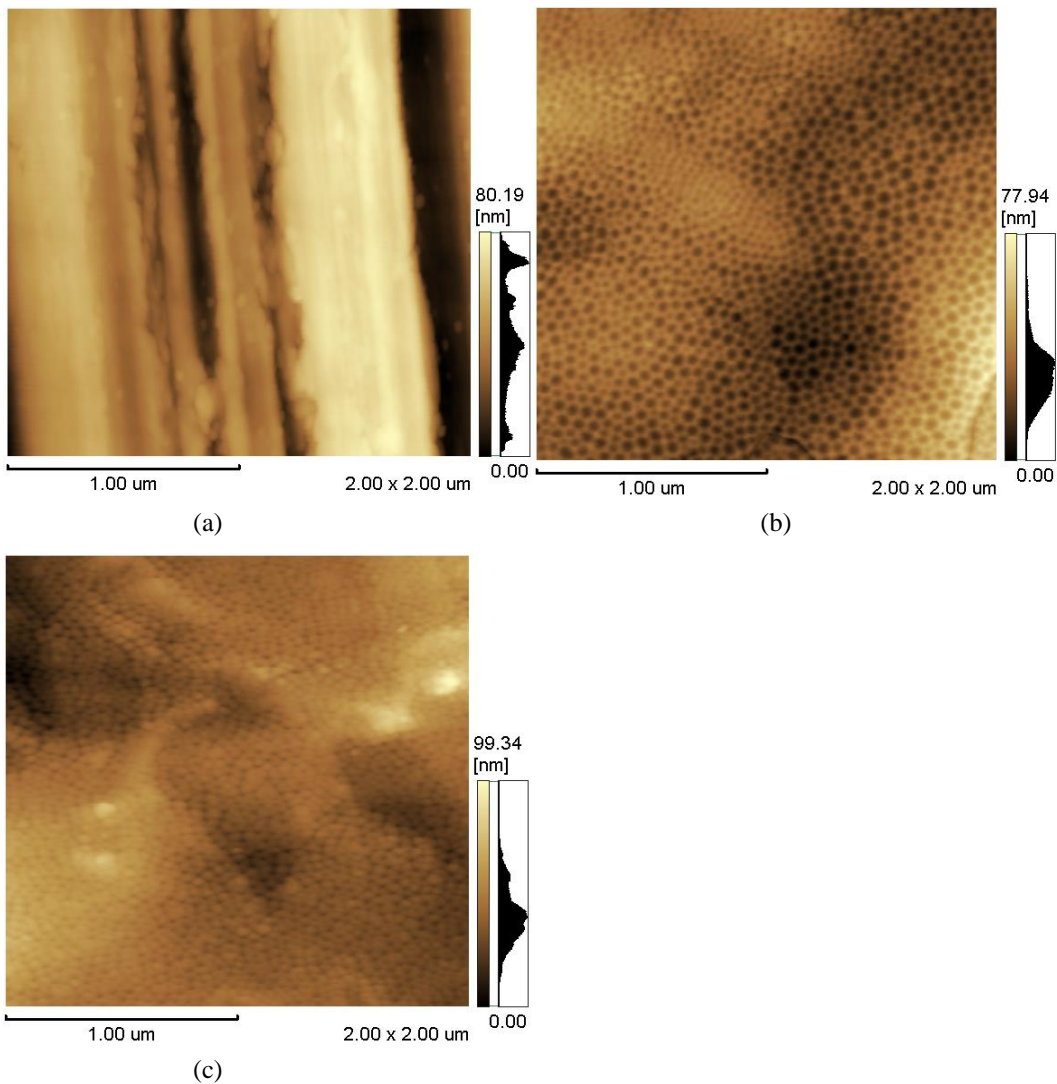


Figura 27: Imagens obtidas por AFM das amostras após limpeza por Plasma de Ar e tratamento eletroquímico. (a) Lixada, (b) Trat. Eletroq. 4 min, (c) Trat. Eletroq. 12 min.

A partir dos resultados de XPS tanto para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos (Figura 28) e 12 minutos (Figura 29), foi possível identificar a presença de oxigênio (O1s), isso indica que durante o tratamento eletroquímico houve a formação de óxido independente do maior ou menor tempo de tratamento eletroquímico.

A partir da Tabela 6 é possível observar que na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos, a % de oxigênio atômico foi maior do que na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos. Isso pode estar relacionado com a % atômica de titânio disponível sobre a superfície, indicando que quanto mais titânio disponível houver, mais óxido foi formado sobre a superfície, aumentando conseqüentemente a quantidade de oxigênio.

A partir da Tabela 6 é possível observar que a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos apresentou uma maior quantidade de C1s do que na amostra tratada

eletroquimicamente por 4 minutos, essa quantidade de carbono está relacionada com a quantidade de flúor que também foi maior para a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos. Acredita-se que essa relação direta da quantidade de carbono e de flúor esteja associada a presença de ligação C-F como pode ser visto na Figura 30 (a) para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos e na Figura 31 (a) para a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos. A identificação de elementos como C1s e F1s no espectro de XPS para ambas as amostras tratadas eletroquimicamente pode ser proveniente da composição do eletrólito utilizado para a obtenção das nanoestruturas, o qual era composto por ácido fluorídrico, ácido sulfúrico e glicerina.

Conforme Figura 30 (a) é possível ver a presença de um pico característico de CF_3 em 292,8 eV para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos, enquanto que para a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos esse pico não aparece, conforme Figura 31 (a). Esse comportamento pode estar relacionado com o fato de que na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos prevaleceu a dissolução anódica (Figura 27 (b)), fazendo com que mais Ti2p esteja disponível na superfície (Tabela 6) para se complexar com o F, formando o complexo $[\text{TiF}_6]$ solúvel em água. Conforme já mostrado por Albu et al. 2008 [72], uma vez que esse complexo é solúvel em água, a parte mais eletropositiva do complexo (Ti) tenderá a formar uma ligação com o oxigênio dos grupos hidroxilas da glicerina, deixando o flúor livre para se ligar ao carbono, promovendo a formação de compostos como o CF_3 .

Para K. Cai et al. [228] a análise por XPS é uma técnica bastante sensível da superfície, a qual é capaz de promover ambas informações qualitativas e quantitativas sobre a presença de diferentes elementos na superfície. Cai et al. 2006 identificaram Ti2p¹ e Ti2p³ com energia de ligação entre 400 e 500 eV, os autores também identificaram óxido de titânio com energia de ligação de 531 eV. Além desses elementos, os autores identificaram a presença de carbono, provavelmente proveniente da contaminação da superfície as quais foram expostas ao ar antes da análise por XPS; além disso foram identificadas espécies de carbono na forma de carbonatos (C=O), cuja energia de ligação foi de 288,9 eV. Segundo M. Winkelmann et al. [229] e H. K. Jang et al. [230] a contaminação da superfície por hidrocarbonetos é um processo inevitável, e a adsorção ocorre espontaneamente a partir do ar ambiente.

J. H. Park et al. [113] realizaram tratamento superficial de titânio com acetona e solução de ácido nítrico, ácido fluorídrico e fluoreto de amônio identificando por análise de XPS a presença de C, O, Ti e N, além de traços de S (0,8% At.). Posteriormente as

amostras foram limpas com acetona, isopropanol e etanol e descobriram por análise de XPS que a porcentagem de C e N foram reduzidas e a porcentagem de Ti e O sobre a superfície aumentou. Além disso, esses mesmos autores realizaram algumas análises da superfície do titânio por XPS após métodos de esterilização por radiação gama, autoclave, luz UV e plasma de oxigênio descobrindo que todos os métodos foram eficientes na remoção de contaminantes orgânicos.

A. Bismarck et al. [231] colocaram em contato HF com fibras de carbono através do processo de fluoração e por análise de XPS identificaram um pico de CF no espectro de C1s em 285,5 eV, indo de acordo com o que está apresentado na Figura 30 (a) e Figura 31 (a). Além disso esses mesmos autores também apresentaram um pico referente a CF₃ em 292,8 eV, o que também foi observado no presente trabalho (Figura 31(a)). G. Nasé et al. [232] salientaram que a ligação C-F e os níveis de F1s e C1s não dependem somente da natureza da ligação, mas também do número de átomos de F disponíveis a se ligarem aos átomos de C, do ambiente químico do grupo CF e da estrutura e conformação do átomo de C no material fluorado.

G. Hopfengärtner et al. [233] realizaram um estudo sobre a técnica de XPS para determinando elementos químicos, dentre eles o vanádio e mostraram que V2p_{3/2} normalmente apresenta um pico característico em 516,2 eV, os autores fizeram referência desse pico como sendo V₆O₁₃, porém os resultados apresentados nesse trabalho não indicam a presença de vanádio (Figura 28 e Figura 29). Isso está provavelmente associado ao fato de que o óxido de titânio que recobre a superfície da liga Ti6Al4V dificulta a detecção de tudo que esteja abaixo dele, uma vez que análise por XPS é uma técnica que atinge normalmente 2 camadas atômicas, e isso não é suficiente para ver outros elementos que estejam abaixo dessa camada. O pico que aparece em 516,2 eV não foi identificado como vanádio pela análise de XPS, isso não quer dizer que não exista óxido de vanádio, ele simplesmente não foi identificado; esse pico pode ser um efeito secundário, um elétron Auger, isso porque nos mesmos espectros apresentados na Figura 28 e Figura 29 o pico do N e do Al aparecem e eles são bem menores do que em 516,2 eV equivalente ao que seria o pico de óxido de vanádio.

L. Z. Zhao et al. [234] atribuem a energia de ligação do V2p_{3/2} em 516,5 eV para vanádio com número de oxidação +5. S. L. T. Anderson [235] em seu estudo mostrou por análise de XPS a energia de ligação para o V2p_{3/2} com seus respectivos óxidos: 516,6 eV V₂O₅, 516,3 eV V₆O₁₃, 515,7 eV VO₂, 515,6 eV V₂O₄ e 515,4 eV V₂O₃. Segundo R. J. D. Tilley et al. [236] o óxido V₆O₁₃ surge a partir do óxido V₂O₅ quando este sofre algum

aquecimento a partir de uma sistema de vácuo. S. L. T. Anderson 1979 [235] destacou que há uma diferença energética pequena de somente 0,3 eV entre os sinais $V2p_{3/2}$ do V_6O_{13} e V_2O_5 .

H. Habazaki et al. [237] mostraram em seu estudo por análise de XPS a presença de fluoreto nas paredes dos nanotubos de TiO_2 após realizar a anodização de Ti puro em fluoreto de amônio. P. C. Jorge et al. [238] identificaram a presença de vanádio, ferro e traços de fluoreto em nanotubos de Ti-6Al-4V após anodização em ácido fluorídrico e sulfúrico.

Tabela 6: % Atômico de cada elementos obtido a partir dos resultados de XPS das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos, 25V e 7°C.

Elementos (% At.)	Trat. Eletroq.4 minutos	Trat. Eletroq.12 minutos
O1s	40,23	35,37
C1s	41,30	49,11
F1s	0,33	0,62
Ti2p	12,48	9,63
Al2p	2,56	2,01

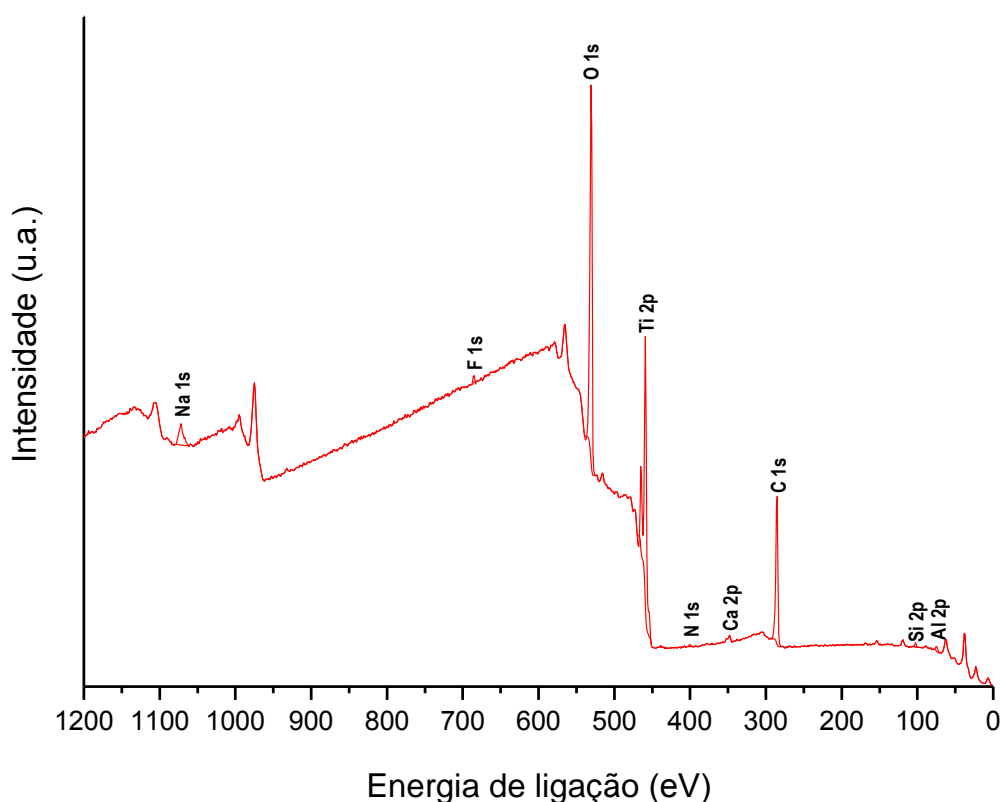


Figura 28: Espectro de XPS da superfície de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 4 minutos, a 25V e 7°C.

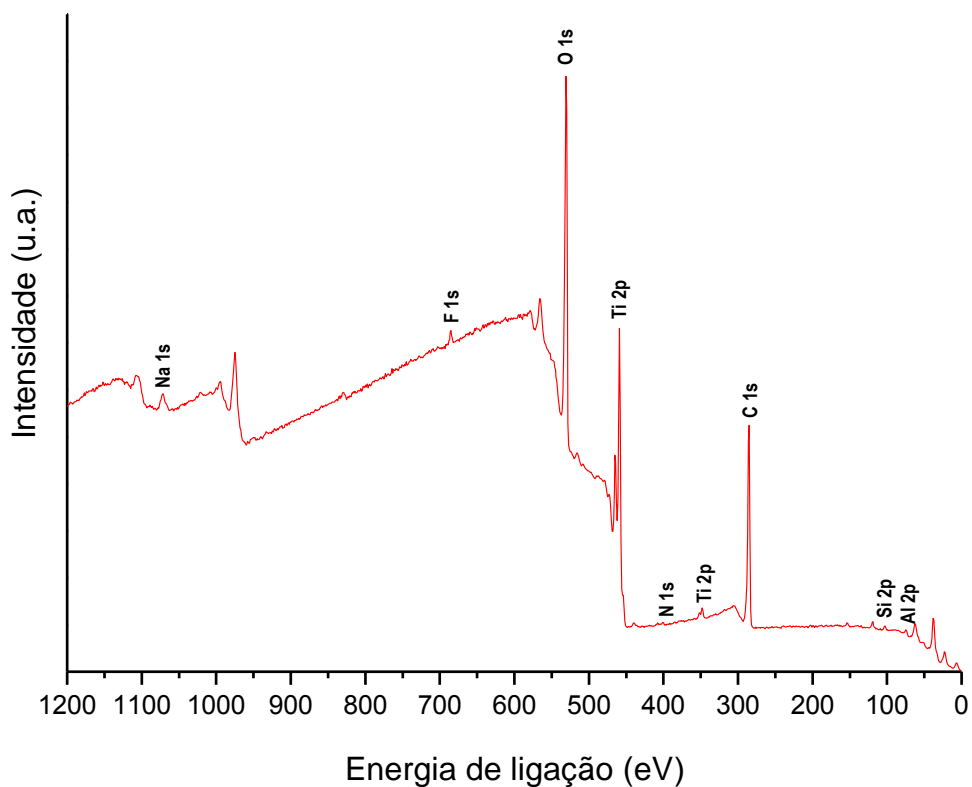


Figura 29: Espectro de XPS da superfície de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 12 minutos, a 25V e 7°C.

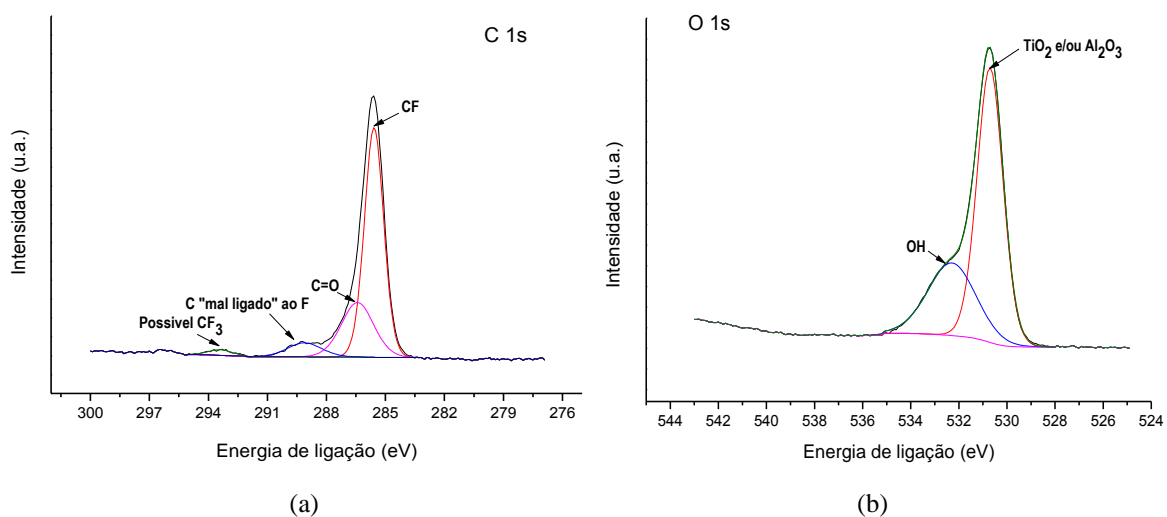
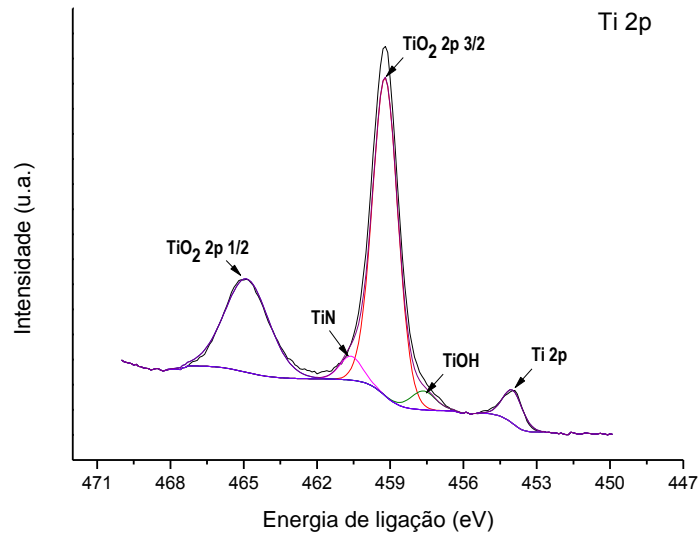
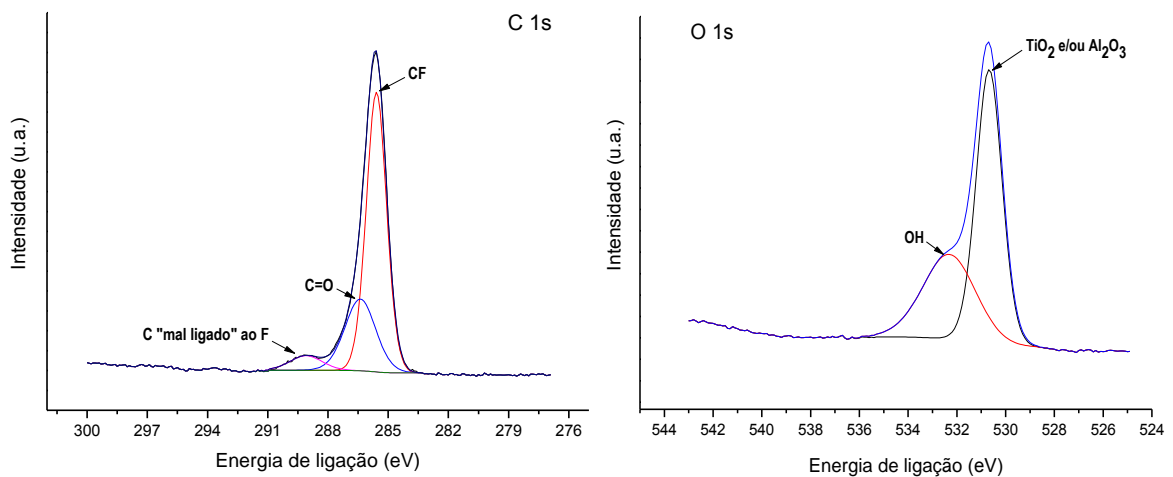


Figura 30: Picos do espectro de XPS após tratamento eletroquímico por 4 minutos, a 25V e 7°C. (a) C1s, (b) O1s.



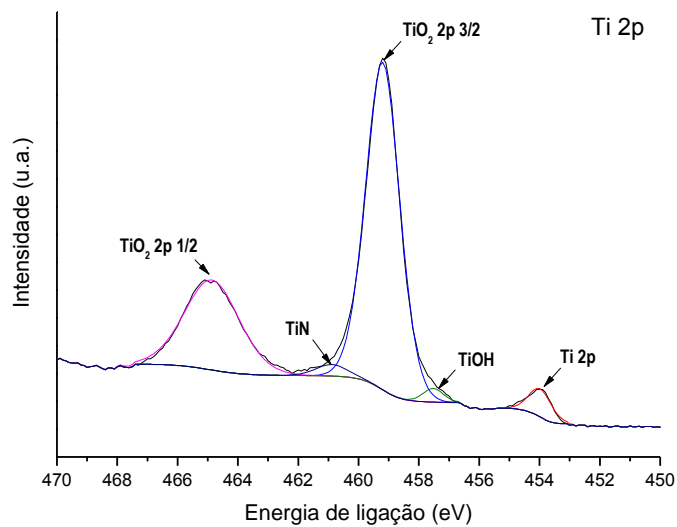
(c)

Figura 30 (continuação): Picos do espectro de XPS após tratamento eletroquímico por 4 minutos, a 25V e 7°C. (c) Ti 2p.



(a)

(b)



(c)

Figura 31: Picos do espectro de XPS após tratamento eletroquímico por 12 minutos, a 25V e 7°C. (a) C1s, (b) O1s, (c) Ti 2p.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados de rugosidade nanométrica, sendo observado que para as amostras somente lixadas os valores de rugosidade nanométrica foram maiores ($R_a = 16 \text{ nm}$) do que aqueles observados para as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos ($R_a \approx 5 \text{ nm}$).

Em relação aos valores de rugosidade micrométrica (Tabela 8) não foi observado diferença significativa entre os valores de rugosidade média (R_a) para todos os sistemas estudados, ficando os valores na ordem de 0,1 a 0,2 μm . As amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos apresentaram um pequeno aumento da rugosidade micrométrica comparado as amostras somente lixadas. Esse aumento da rugosidade pode ter sido devido pelo tratamento eletroquímico realizado, o qual realizou modificações superficiais devido à dissolução anódica ou espessamento da camada de óxido.

L. Chou et al. [239] e M. Jayaraman et al. [240] avaliaram a topografia da superfície de discos de titânio em relação a morfologia celular e descobriram que naquelas superfícies mais rugosas, as células adquiriram uma morfologia mais alongada e polarizada. Este tipo de morfologia tende a favorecer a síntese de proteínas, e consequentemente favorecer a adesão, proliferação e diferenciação celular. Segundo A. L. Mescher [241], uma célula com morfologia polarizada é aquela que tem seu núcleo e suas estruturas celulares localizadas na sua base.

Conforme mostrado por T. S. N. Silva et al. [242] o aumento da rugosidade média R_a (em torno de 0,5 μm) acelerou a diferenciação de células mesenquimais em meio osteogênico, mas não apresentou nenhum efeito positivo sobre a proliferação celular. K. T. Bowers et al. [243], J. C. Keller et al. [244] e S. Ozawa et al. [245] têm comentado de que o aumento da rugosidade do implante proveniente de processos de texturização podem melhorar a adesão e proliferação celular. M. Diniz et al. [246] descobriram que osteoblastos apresentam uma boa afinidade por superfícies com rugosidade média (R_a) próximo de 0,5 μm .

D. Buser et al. [247] realizaram estudos com animais e mostraram que implantes de Ti com maior rugosidade aumentam o contato osso-implante. X. Zhu et al. [248] observaram a partir do crescimento de osteoblastos em superfícies de Ti que superfícies com menor rugosidade micrométrica tiveram poucas extensões citoplasmáticas, comparativamente às superfícies com uma rugosidade micro e submicrométrica. Isso mostra que células não somente sentem a direção da topografia do substrato, como também respondem as irregularidades presentes na morfologia. C. M. Di et al. [249] estudaram o

efeito da topografia de superfície de titânio em células epiteliais após serem limpas 3 vezes em banho ultrassônico em água pura por 10 minutos cada limpeza, posteriormente os autores realizaram a limpeza em ultrassom com solução 2% livre de fosfato por 20 minutos (2x) e então banho ultrassônico em acetona por 20 minutos (2x). Os autores sugeriram que esse comportamento está relacionado com uma propriedade geral de interação das células com a microarquitetura das superfícies. Os estudos indicaram que a rugosidade nanométrica muda a maneira como as células interagem com a superfície, alterando também a morfologia da célula, a força de adesão e proliferação.

D. D. Deligianni et al. [250] reportaram que células de medula óssea humana detectaram mudanças a partir da rugosidade de Ti6Al4V após limpeza em álcool em ultrassom por 10 minutos e lavagem com água deionizada, os resultados indicaram valores de rugosidade na faixa de 0,49 a 0,87 μm o que resultou num aumento da adesão celular com o aumento da rugosidade micrométrica.

K. Cai et al. [228] têm mostrado que superfícies texturizadas em nanoescala parecem ter pouco efeito ou quase nenhum efeito sobre a adsorção de proteínas e proliferação celular. Enquanto P. Raz et al. [251] mostraram que superfícies com microrugosidade adsorvem mais fibronectinas do que superfícies mecanicamente polidas e de menor rugosidade micrométrica; esse mesmo autor acredita que o ambiente celular não é determinado somente por uma característica da superfície, mas é uma resposta pela combinação de diferentes propriedades superficiais.

I. Abrahamsson et al. [252] mostraram que superfícies rugosas permitiram um aumento da osseointegração, enquanto que T. Berglundh et al. [253] destacaram que superfícies rugosas ($R_a \approx 2,29 \mu\text{m}$) facilitaram a estabilidade do trombo de sangue durante a fase inicial de cicatrização, promovendo uma reosseointegração. Esse mesmo autor destacou que superfícies rugosas tendem a diminuir o risco de peri-implantite. Segundo J. A. M. Damé [254] explicou que a peri-implantite é o acúmulo de biofilme bacteriano ao redor do implante, induzindo alterações superficiais que dificultam a osseointegração.

Tabela 7: Valores da rugosidade obtidas em escala nanométrica.

Sistemas	R_a (nm)	R_z (nm)
Lixada	$16 \pm 0,4$	$48 \pm 0,2$
Trat. Eletroq. 4 min	$5 \pm 0,2$	21 ± 1
Trat. Eletroq. 12 min	6 ± 1	16 ± 2

Tabela 8: Valores da rugosidade obtidas em escala micrométrica.

Sistemas	Ra (μm)	Rz (μm)
Lixada	$0,1 \pm 0,002$	$0,5 \pm 0,02$
Trat. Eletroq. 4 min	$0,2 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$
Trat. Eletroq. 12 min	$0,2 \pm 0,03$	$1,7 \pm 0,1$

Os valores de ângulo de contato em DMEM e H₂O estão apresentadas na Tabela 9 para todos os sistemas avaliados. A partir desses resultados é possível observar baixos valores de ângulo de contato para as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos comparado as amostras tratadas eletroquimicamente por 12 minutos e amostras lixadas tanto em DMEM como em H₂O. A diminuição do ângulo de contato para as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos pode ter sido influenciada pela dissolução anódica predominantemente em relação à formação e espessamento da camada de óxido observada para a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos.

É possível também observar que os valores dos ângulos de contato para essas amostras que foram limpas com plasma de ar (Tabela 9) são menores do que aqueles obtidos para as mesmas amostras que foram limpas com etanol (Tabela 12). Isso indica que a limpeza com etanol deixa espécies adsorvidas na superfície, as quais tornam as superfícies mais hidrofóbicas mascarando o efeito da composição da superfície sobre a molhabilidade superficial (Tabela 6).

Tabela 9: Medidas do ângulo de contato em DMEM e H₂O (amostras limpas com plasma de ar antes da medida).

Sistemas	DMEM (°)	H ₂ O (°)
Lixada	$83 \pm 0,3$	70 ± 3
Trat. Eletroq. 4 min	58 ± 1	40 ± 2
Trat. Eletroq. 12 min	75 ± 4	$47 \pm 0,4$

R. A. Gittens et al. [255] mostraram que modificações na superfície do titânio podem melhorar suas propriedades hidrofílicas pela mudança da química da superfície. M. P. Coutinho [256] estudou a influência de tratamentos superficiais sobre a molhabilidade, e observaram que o titânio tratado com anodização apresentou baixa rugosidade e mais baixos valores de ângulo de contato do que a superfície de titânio polida.

R. Narayanan et al. 2009 [257] estudaram superfícies de titânio após imersão em HNO₃, HF e H₂O, com posterior anodização obteve-se nanotubos de TiO₂ observando

valores de ângulo de contato entre 70–80°, os quais contribuíram para uma melhora nos resultados de viabilidade celular.

C. C. Rex et al. [258] estudaram o efeito da rugosidade nanométrica de Ti6Al4V sobre o crescimento de fibroblastos. As amostras antes dos testes com células foram limpas em banho ultrassônico com 95% de etanol e limpeza em água deionizada por 3 vezes, posteriormente as amostras foram esterilizadas em autoclave a 121°C e 30 minutos. Os resultados indicaram que a rugosidade nanométrica muda a molhabilidade e a adesão celular, dos quais apareceram mais fortemente influenciados por uma superfície mais rugosa. Os resultados deles confirmaram que células cultivadas por 3 dias sobre uma superfície mais rugosa tiveram um bom resultado de espraiamento do que naquelas superfícies de menor rugosidade.

Nas Figura 32 (a,b), Figura 33 (c,d,e) estão apresentados os resultados de MEV-FEG referentes às amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos respectivamente. Como já havia sido observado a partir das imagens obtidas por AFM (Figura 27 (b)), nas amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos (Figura 32 (a,b)) a presença de nanoestruturas na superfície é mais nítida do que na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos (Figura 33 (c,d,e)) devido ao espessamento da camada de óxido que ocorre na última.

Nas imagens obtidas de mapeamento da composição química (Figura 34 (c) e Figura 35(c)), observa-se o sinal intenso do vanádio (estabilizador da fase β) em alguns dos grãos para ambos os tratamentos eletroquímicos. Segundo F. Habashi [259] ligas de titânio, tais como Ti6Al4V possuem uma fase β , a qual é estabilizada predominantemente por elementos de liga como molibdênio, silício, vanádio, ferro, cromo, cobre e paládio, enquanto o Al estabiliza a fase α [260],

Conforme mostrado anteriormente (Figura 12 e Figura 13) a microestrutura das amostras de Ti6Al4V estudadas nesse trabalho apresentam grãos da fase β e grãos da fase α . Observa-se para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos (Figura 32 (a)) que a dissolução para a formação das nanoestruturas ocorre de forma mais intensa na fase α do que na fase β . Enquanto, na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos não foi observada, aparentemente uma diferença de intensidade de dissolução para fase α em relação à fase β (Figura 33(d)).

Além disso, na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos é possível visualizar a formação de nanoestruturas no contorno da fase β , conforme indicado na Figura 32 (a). Isso pode ser um indicativo de que o processo de dissolução anódica e

formação das nanoestruturas além de prevalecer por toda a superfície em menores tempos de tratamento eletroquímico, também ocorreu no contorno de grão (região mais ativa).

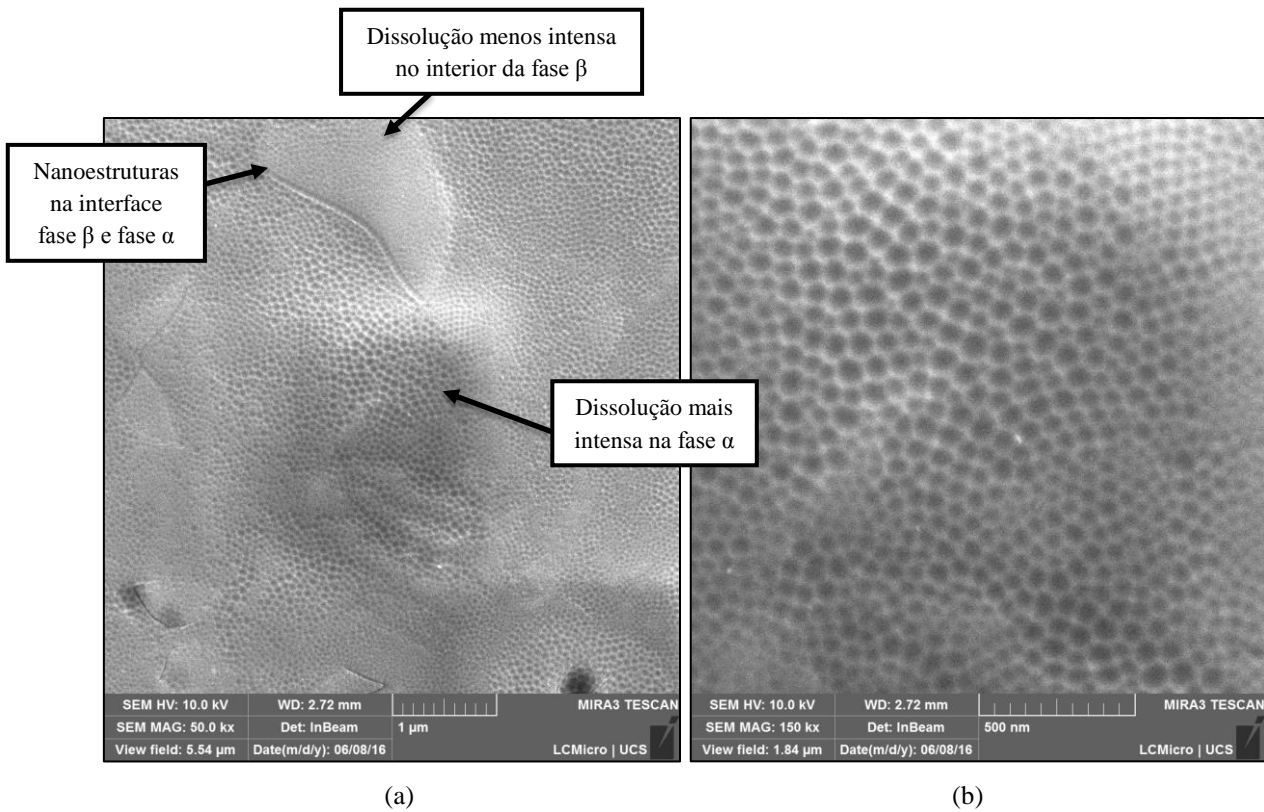


Figura 32: Imagens obtidas por MEV-FEG das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 4 minutos a 7°C.

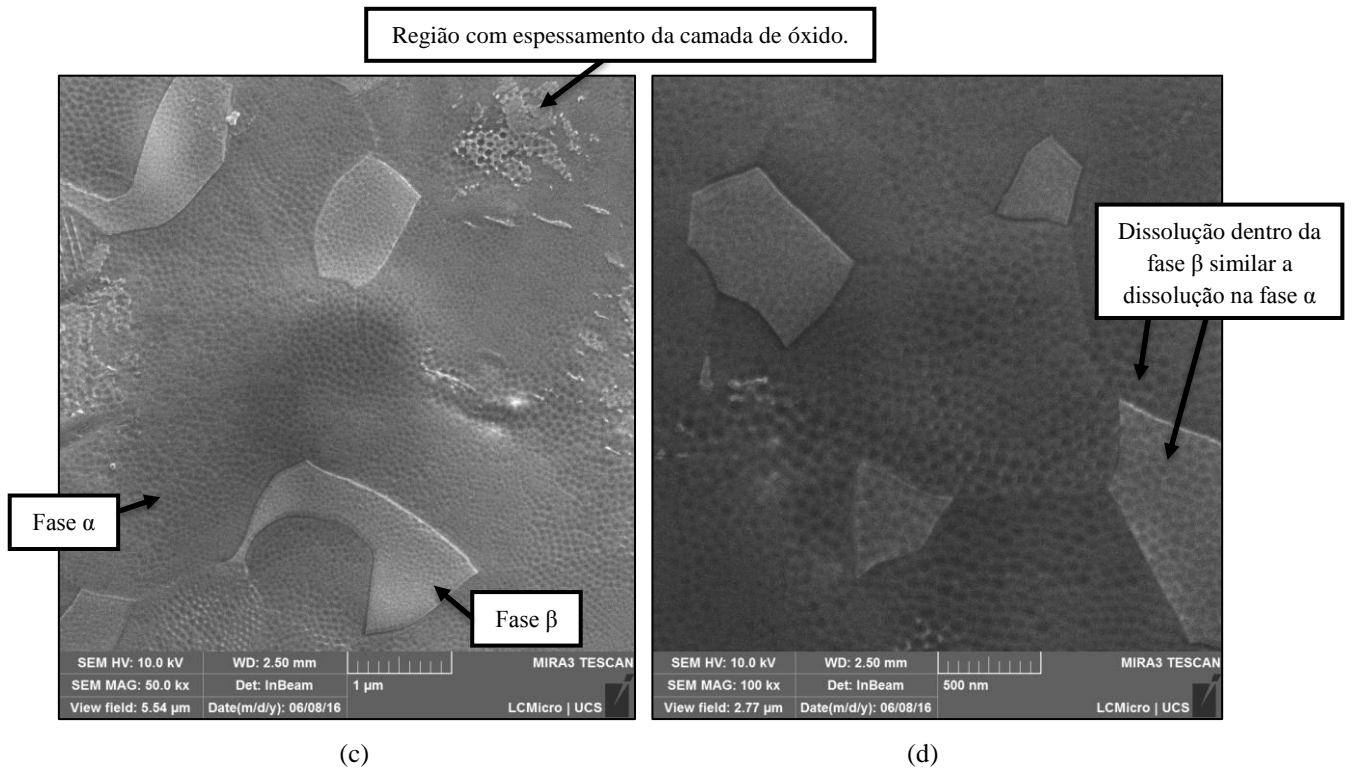
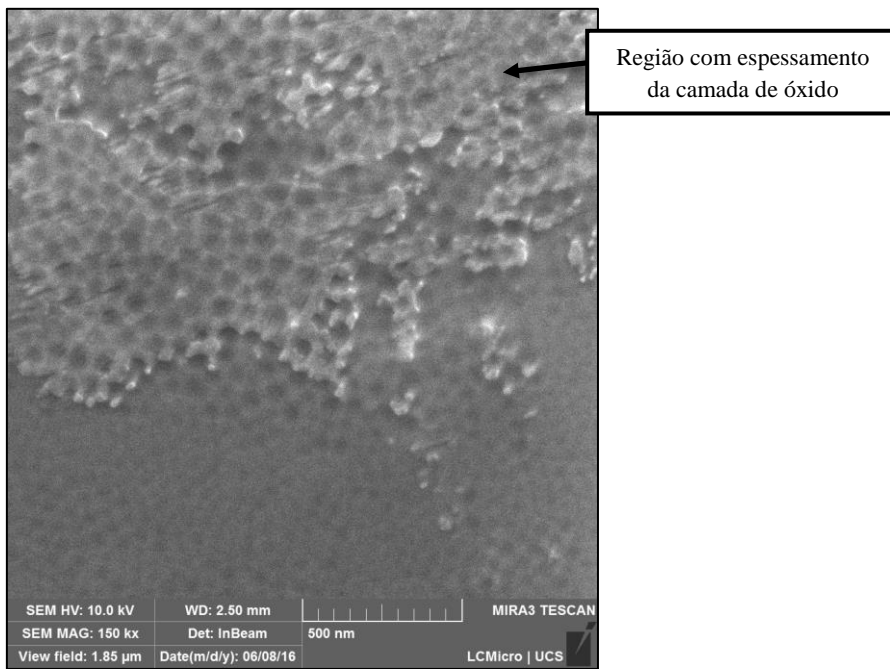


Figura 33: Imagen MEV-FEG das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C.



(e)

Figura 33 (continuação): Imagem MEV-FEG das amostras tratadas eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C.

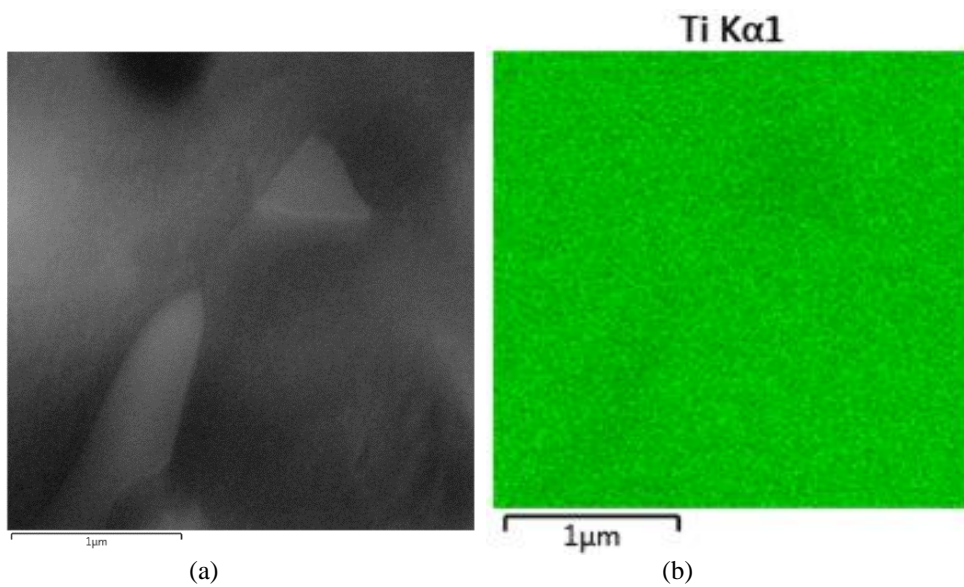


Figura 34: Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 4 minutos a 7°C: a) imagem obtida por eletrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti.

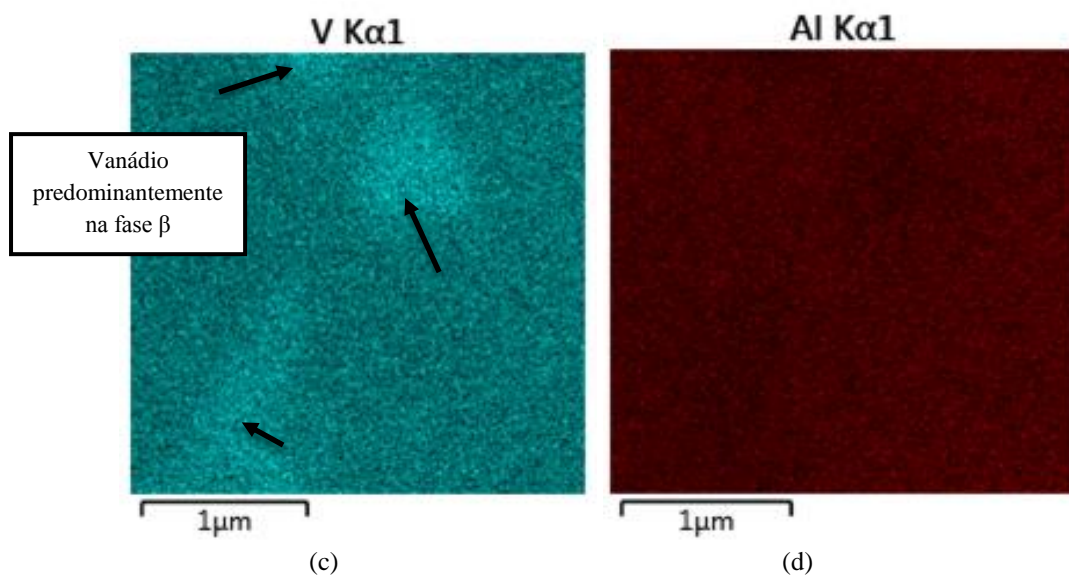


Figura 34 (continuação): Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 4 minutos a 7°C: c) mapeamento do elemento V e d) mapeamento do elemento Al.

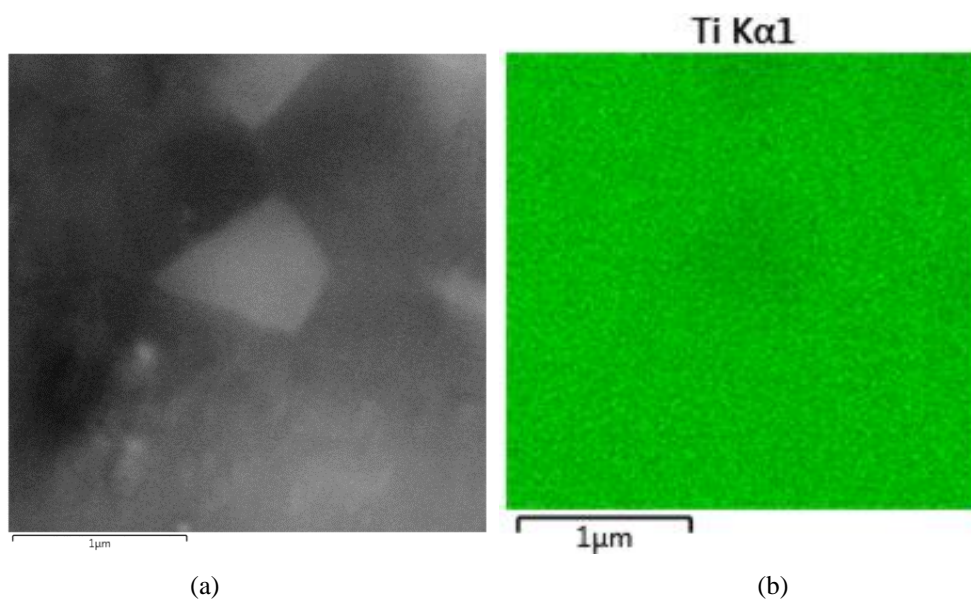


Figura 35: Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C: a) imagem obtida por elétrons secundários; b) mapeamento do elemento Ti.

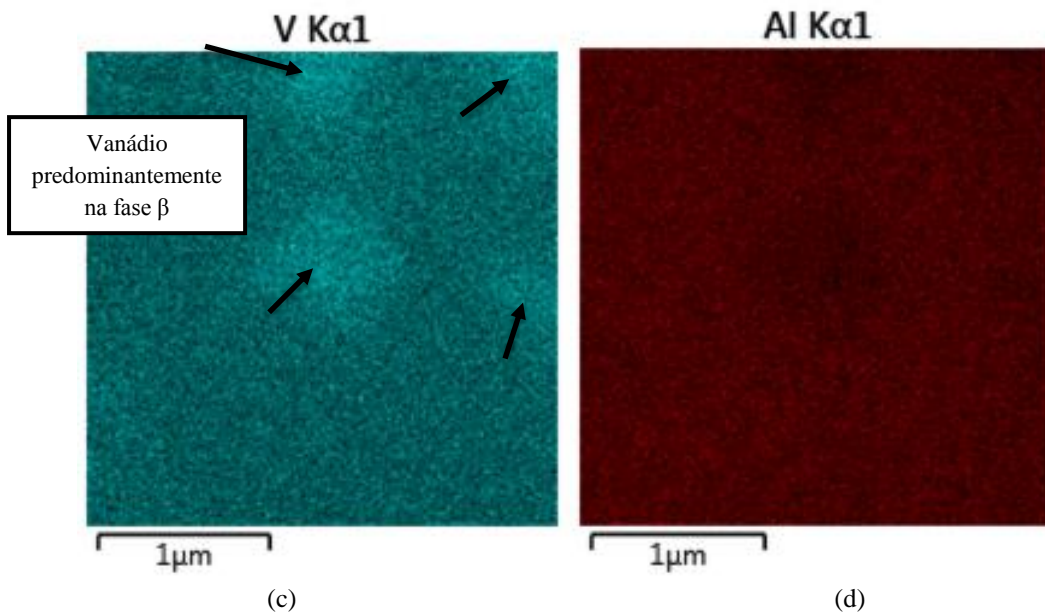


Figura 35 (continuação): Imagens obtidas por MEV-EDS da amostra tratada eletroquimicamente a 25V, tempo de 12 minutos a 7°C: c) mapeamento do elemento V e d) mapeamento do elemento Al

5.2.1 Conclusões Parciais

A limpeza das amostras, antes do tratamento eletroquímico, por plasma de ar contribuiu para a formação de nanoestruturas mais definidas.

Entre as amostras tratadas eletroquimicamente não foi identificada diferença entre os valores rugosidade em escala nanométrica ou micrométrica. Ainda que, a amostra tratada por 4 minutos apresentasse uma estrutura evidenciando o favorecimento da dissolução anódica e a amostra tratada por 12 minutos evidenciasse o espessamento de uma camada de óxido.

Contudo, as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos apresentaram menores valores de ângulo de contato, que nesse caso, deve estar associado à composição química superficial. A partir dos resultados obtidos por análise de XPS, observou-se que tanto as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos como aquelas tratadas por 12 minutos apresentaram a formação de óxido de titânio. Contudo a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos apresentou uma maior quantidade de carbono e flúor na superfície.

A amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos apresentou dissolução de forma mais intensa na fase α , do que na fase β . Isso não foi observado para a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos a qual apresentou, aparentemente, dissolução com mesma intensidade nas duas fases.

A limpeza por plasma de ar permitiu observar a diferença quanto à molhabilidade das superfícies das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos em relação aquelas tratadas por 12 minutos. Essa diferença que não havia sido observado para amostras limpas com etanol. Isso evidencia que a limpeza por plasma de ar promoveu a remoção de espécies que poderiam estar adsorvidas na superfície mascarando o efeito da composição superficial sobre a molhabilidade.

5.3 Efeito dos métodos de esterilização sobre a morfologia de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V.

Nesse item serão apresentados os resultados da avaliação dos métodos de esterilização: Etanol+PBS, Autoclave e Plasma de Ar, sobre a superfície nanoestruturada proveniente do tratamento eletroquímico por 4 minutos. Esses métodos de esterilização, principalmente os dois primeiros, têm sido amplamente utilizados em estudos mencionados na literatura. Contudo, evidências de alterações das superfícies submetidas a esses tratamentos tem sido relatadas.

A amostra 4 foi utilizada para essa avaliação por apresentar uma nanoestrutura bem definida.

No presente trabalho, as superfícies após esterilização, foram caracterizadas por microscopia de força atômica. Avaliou-se a rugosidade em escala nanométrica e micrométrica, e foram realizadas medidas do ângulo de contato para avaliar a molhabilidade antes e após métodos de esterilização.

Na Figura 36(a) está apresentada a imagem obtida por AFM da amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos, 25 V a 7°C antes da esterilização. É possível observar, antes do processo de esterilização que a amostra apresenta a formação de nanoestrutura bem definidas em toda a área analisada.

Após a realização dos métodos de esterilização é possível observar uma alteração importante da morfologia da superfície para as amostras esterilizadas com Etanol+PBS (Figura 36c) e por Autoclave (Figura 36d). No entanto, a amostra esterilizada por Plasma de Ar (Figura 36b) não apresentou mudança em relação à morfologia inicial da amostra Figura 36(a).

I. Junkar et al. [96] já haviam observado a destruição de nanotubos de TiO₂ e alterações morfológicas após esterilização por autoclave. Esses mesmos autores perceberam após esterilização por luz UV (comprimento de onda de 253,7 nm, distância da fonte de luz de 40 cm, lâmpada Philip de 36W) um leve rompimento dos nanotubos de titânio, ocasionando uma desordenação da estrutura nanotubular. Enquanto que um intacta estrutura nanotubular foi observada depois da esterilização por plasma de oxigênio (Fonte geradora RF, frequência de 13,56 MHz, potência de saída de 200 W, pressão de 75 Pascal e tempo de 60 segundos).

A. Lamberti et al. [261] sugerem que a destruição de nanotubos de TiO₂ em autoclave a úmido pode estar relacionado ao efeito combinado da umidade e da elevada temperatura (127°C-134°C) provenientes do vapor da esterilização, o qual induz a

cristalização dos nanotubos de TiO_2 resultando numa alteração morfológica. D. Wang et al. [262] têm discutido os mecanismos propostos para o vapor de água e cristalização de água causando modificações na morfologia de nanotubos. Para A. Lamberti et al. as mudanças observadas na morfologia superficial de nanotubo pode estar associado a combinação de efeitos do vapor d'água e da temperatura utilizada durante o processo de esterilização.

Segundo A. Lamberti et al. [261] e J. Yu et al. [263] moléculas do vapor d'água proveniente do processo de esterilização interagem com as paredes dos nanotubos de TiO_2 amorfo e condensam como água quente agindo com um catalisador que irá favorecer o rearranjo de TiO_2 em TiO_6^{2-} octaedro. Para R. Wang et al. [264] a destruição de nanotubos de TiO_2 pode também estar relacionada a presença de íons F^- que evaporam da superfície dos nanotubos devido a alta temperatura utilizada no processo de esterilização. Segundo M. Kulkarni et al. [265] e M. Kulkarni et al. [266] esses íons F^- provém dos eletrólitos utilizados para produção de nanotubos por anodização e normalmente se encontram em baixa concentração na superfície dos nanotubos.

E. Gossila et al. [267] avaliaram a citocompatibilidade de amostras de quitosana obtidas por aglomeração eletrostática após esterilização por autoclave (121°C , 20 min), etanol 70%, radiação γ (maior do que 25 KGy, ^{60}Co) e dióxido de carbono supercrítico (0,25% água, 0,15% peróxido de hidrogênio e 0,5 % anidrido acético, 38°C , 8,5 Mpa, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos). Para todos os métodos de esterilização foi observada uma diminuição da viabilidade celular com o passar do tempo, além disso, os autores mostram que o método de esterilização por etanol 70% e CO_2 supercrítico foram os métodos em que a viabilidade celular apresentou maior variação, em consequência provavelmente das alterações morfológicas ocasionadas por esses métodos. Esses mesmos autores salientam que métodos de esterilização podem afetar nas propriedades biológicas, mecânicas, químicas e físicas dos materiais e que escolher o método adequado para realizar a esterilização deve ser baseado no tipo de material que se pretende trabalhar. Além disso, os autores observaram que todos os métodos de esterilização diminuíram a módulo de Young das amostras de quitosana e que a esterilização por autoclave ocasionou uma mudança na coloração das amostras.

Para C. Wen [268] o método de esterilização por plasma de oxigênio não apresenta mudanças na morfologia dos nanotubos, já que durante a esterilização a temperatura é baixa na superfície e não há moléculas de água (vapor) envolvido, isso faz com que ocorra uma diminuição das chances do fluoreto evaporar e induzir os nanotubos a cristalização/modificação.

C. Giai et al. [269] realizaram um estudo envolvendo a eficiência dos métodos de esterilização por calor à seco (170°C por 3 horas), etanol (solução de etanol a 75 vol.% por 15 ou 18 horas) e glutaraldeído 2% vol. por 15 horas em amostras de aço carbono. Os autores salientaram que a esterilização em metais não deve alterar a superfície, e nem afetar na susceptibilidade do metal na corrosão, mas ao mesmo tempo deve continuar atuando na desativação da atividade biológica.

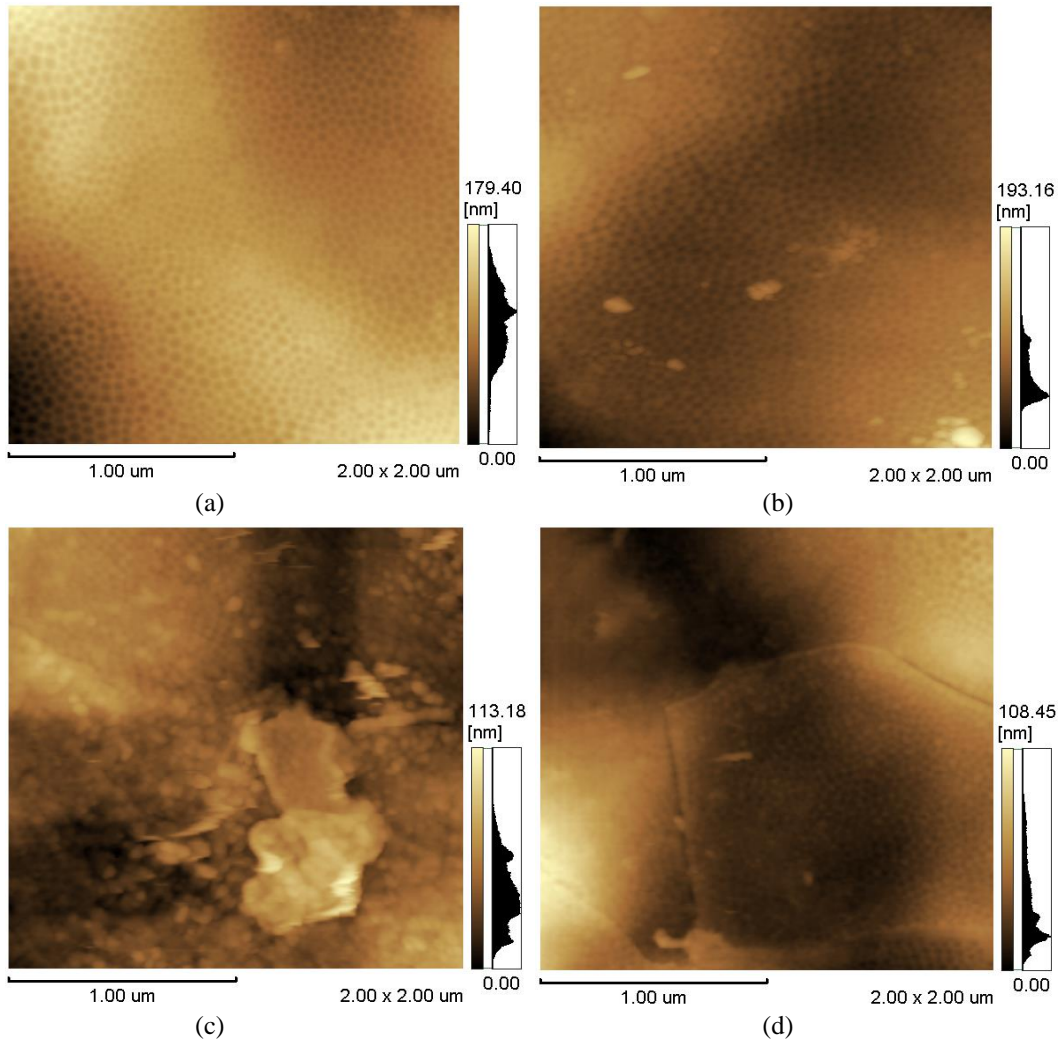


Figura 36: Imagens bidimensionais obtidas por AFM das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos: (a) Antes dos processo de esterilização, (b) Esterilizada por Plasma de Ar, (c) Esterilizada em Etanol+PBS, (d) Esterilizada por Autoclave.

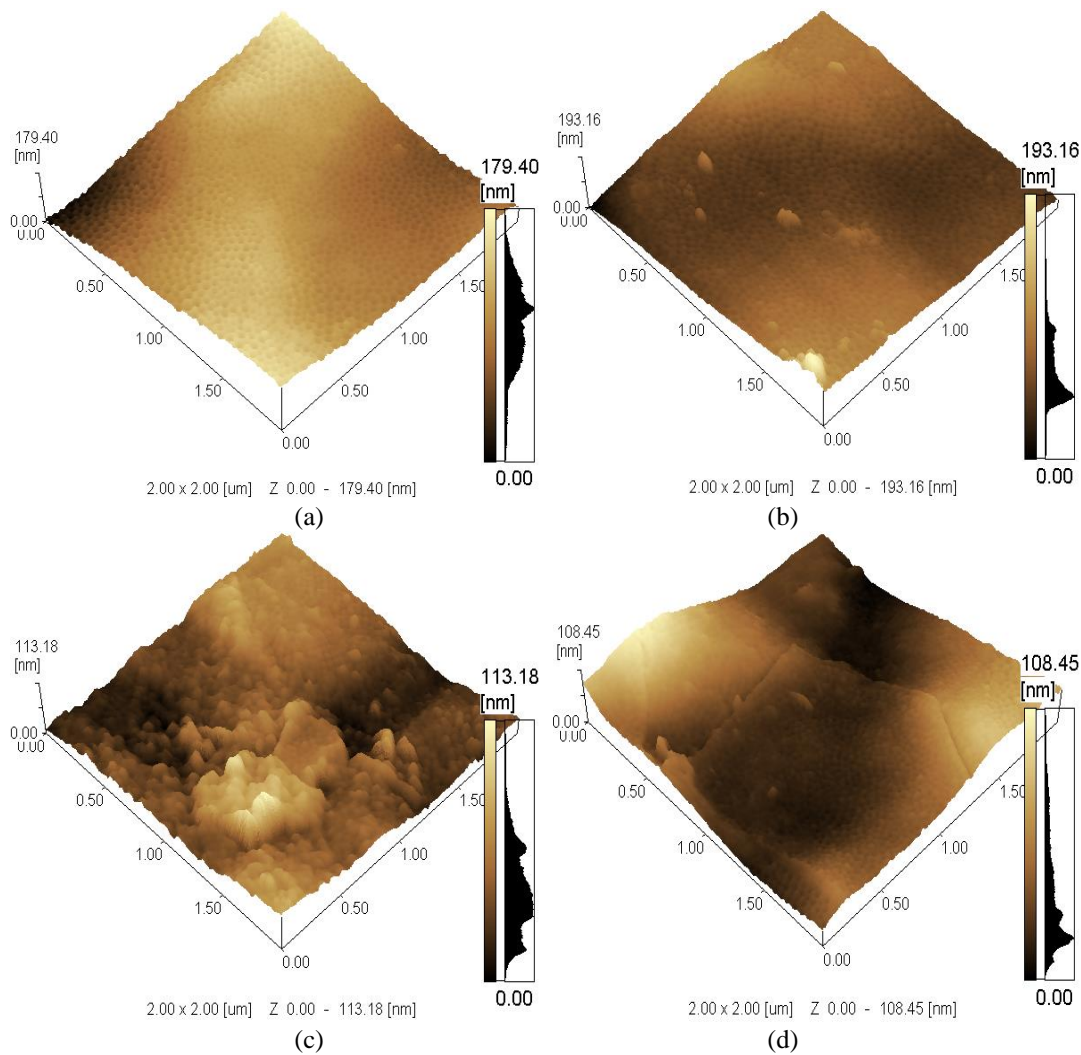


Figura 37: Imagens tridimensionais obtidas por AFM das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos após os métodos de esterilização. (a) Antes dos métodos de esterilização, (b) Esterilização por Plasma de Ar, (c) Esterilização por Etanol+PBS, (d) Esterilização por Autoclave.

Partindo de que o método de esterilização por Etanol+PBS e Autoclave foram os métodos de esterilização que alteraram a morfologia nanométrica das amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos, nota-se que o efeito sobre os valores de rugosidade nanométrica (R_a) (Tabela 10) foi maior para as amostras esterilizadas por Etanol+PBS. Enquanto a amostra esterilizada por autoclave apresentou uma pequena alteração na rugosidade nanométrica. Para as amostras esterilizadas por Plasma de Ar não foi identificada diferença ou alteração nos valores de rugosidade em escala nanométrica após esterilização.

No entanto, segundo J. H. Park et al. [113] o processo de esterilização por plasma (PDC-32G, Harrick Plasma, 2 minutos) pode eventualmente causar um leve aumento da rugosidade micrométrica e modificar a atividade da superfície devido a ação do oxigênio proveniente do plasma. Contudo, no presente trabalho, com relação a rugosidade

micrométrica (Tabela 11), não foi observada uma diferença importante para as amostras analisadas antes e após o processo de esterilização, independentemente do processo de esterilização empregado. Isso mostra que as alterações ocasionadas pelo processo de esterilização estudados são evidenciadas apenas em escala nanométrica.

Tabela 10: Medidas de rugosidade em escala nanométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente por 4 min, 25V, 7°C.

		Ra (nm)	Rz (nm)
Antes da esterilização		$5 \pm 0,2$	21 ± 1
Após esterilização	Plasma de Ar	6 ± 1	23 ± 4
	Etanol+PBS	11 ± 1	29 ± 4
	Autoclave	10 ± 4	34 ± 19

Tabela 11: Medidas de rugosidade em escala micrométrica para as amostras de Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente por 4 min, 25V, 7°C.

		Ra (μm)	Rz (μm)
Antes da esterilização		$0,2 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$
Após esterilização	Plasma de Ar	$0,2 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$
	Etanol+PBS	$0,1 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,1$
	Autoclave	$0,2 \pm 0,02$	$1,4 \pm 0,1$

Na Tabela 12 e Figura 38 estão apresentados os valores de ângulo de contato empregando como solução DMEM.

É possível verificar que os métodos de esterilização por Etanol+PBS e por Autoclave (Tabela 12 e Figura 38) apresentaram maiores valores de ângulo de contato do que a superfície esterilizada por Plasma de Ar. Esse comportamento mais hidrofóbico, está provavelmente associado às alterações morfológicas ocorridas nas superfícies (Figura 36(c,d)) em consequência da adsorção e/ou deposição de material.

Além disso, evidencia-se que o método de esterilização por Plasma de Ar tende a tornar a superfície mais hidrofílica, como pode-se observar inclusive para a amostra que não sofreu processo de esterilização, a qual apresentou um ângulo de contato maior do que a amostra esterilizada por Plasma de Ar.

Esse efeito do método de esterilização por Plasma de ar está provavelmente associado à remoção de moléculas apolares presentes no ar do ambiente que são

inevitavelmente adsorvidas na superfície metálica da liga Ti6Al4V. Além disso, esse método não ocasiona alterações morfológicas sobre as superfícies após esterilização, conforme pode ser visto na Figura 36(b).

Tabela 12: Medidas de ângulo de contato para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos em DMEM e H₂O antes e após os métodos de esterilização.

Esterilização		DMEM (°)	H ₂ O (°)
Antes da esterilização		70 ± 0,1	71 ± 0,1
Após esterilização	Plasma de Ar	29 ± 2	31 ± 2
	Etanol+PBS	41 ± 1	56 ± 1
	Autoclave	57 ± 3	77 ± 2

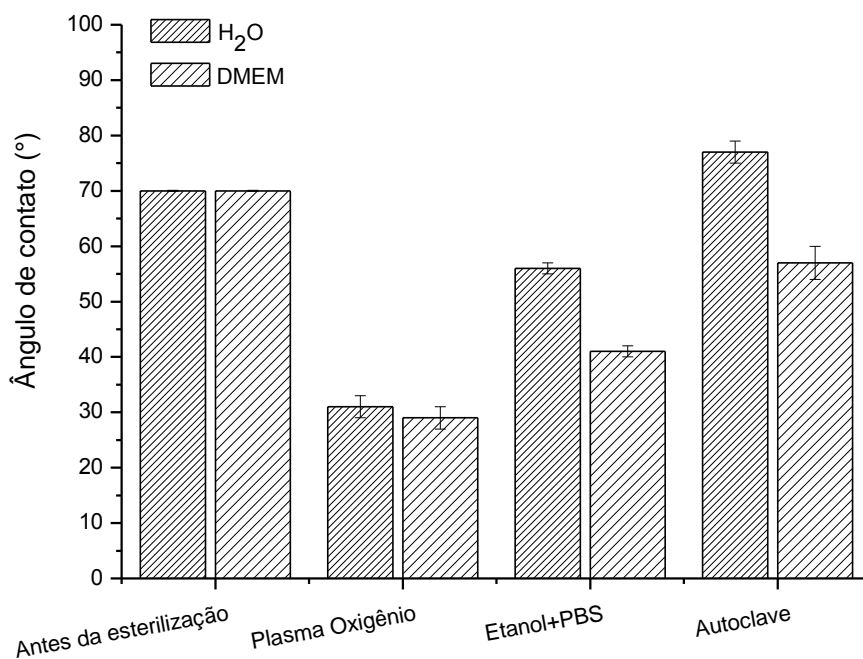


Figura 38: Medidas de ângulo de contato em DMEM antes e após os métodos de esterilização.

D. E. MacDonald et al. [270] realizaram processos de limpeza com álcool (butanol e água na relação volume de 9:1 em banho ultrassônico, a temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente limpas em etanol absoluto e lavadas duas vezes em água destilada) em superfícies de titânio e encontraram um aumento da hidrofobicidade da superfície; esse mesmo comportamento mais hidrofóbico foi encontrado por P. J. Vezeau et al. [271] e A. P. Serro et al. [272] após esterilização por Autoclave (121°C, 15 minutos, 60 W) em implantes de titânio. Y. Wang et al. [273] observaram que durante o crescimento celular, as células apresentaram poucas e não alongadas extensões citoplasmáticas

(filopodia) sobre aquelas superfícies de titânio que foram esterilizadas em autoclave, indicando uma baixa força de interação das células com a superfície.

Segundo M. E. Schrader [274] o aumento da molhabilidade favorece o aumento da interação entre a superfície do implante e o ambiente biológico. R. E. Baier et al. [275] mostraram que uma camada de células aparece mais facilmente sobre uma superfície de titânio com caráter hidrofílico, apresentando ao mesmo tempo uma forte adesão celular.

Para T. A. Hurbett et al. [276] a hidrofiliabilidade da superfície é um fator determinante na biocompatibilidade de biomateriais. C. Eriksson et al. [277] salientaram que quando implantes com elevada hidrofiliabilidade são implantados no osso, a taxa de formação de osso é aumentada, contribuindo ao mesmo tempo para a maturação e diferenciação de células ósseas. D. Buser et al. [278] destacaram que uma superfície hidrofílica promove a mineralização do osso, contribuindo potencialmente para uma rápida osteointegração e carregamento precoce do osso.

I. Junkar et al. [96] avaliaram quatro métodos de esterilização (autoclave, luz UV, plasma por peróxido de hidrogênio e plasma por oxigênio) em nanotubos de TiO_2 e não observaram influência sobre a molhabilidade de nanotubos de TiO_2 . Para A. Lamberti et al. [261] a diminuição do ângulo de contato de nanotubos de TiO_2 após esterilização em autoclave (90°C , 240 minutos) pode estar relacionado a formação de defeitos superficiais que agem como sítios de adsorção de OH^- .

Para I. Junkar et al. [96] a esterilização por plasma de oxigênio em nanotubos de TiO_2 ocasiona uma exposição da superfície por espécies reativas de oxigênio, as quais interagem com a superfície diminuindo a contaminação por hidrocarbonetos e formando uma densa camada de óxido TiO_2 . Porém é sabido que titânio exibe uma camada natural de TiO_2 sobre a superfície, a qual é alterada após exposição do plasma por oxigênio. Para esses autores muitas das mudanças nas propriedades superficiais da camada de TiO_2 pode ser atribuída as mudanças na química da superfície e na molhabilidade, propriedades das quais influenciam fortemente nos resultados de biocompatibilidade. Esses mesmos autores ainda salientam que tratamentos superficiais influenciam na camada de óxido, tornando-a mais densa, menos contaminada com hidrocarbonetos e mais hidrofílica.

5.3.1 Conclusões Parciais

O método de esterilização por Autoclave e Etanol+PBS alteraram a morfologia nanométrica das amostras; enquanto que para a amostra esterilizada por Plasma de Ar não foi verificada mudança na morfologia após esterilização. O método de esterilização por Etanol+PBS e Autoclave aumentaram os valores de rugosidade média nanométrica,

enquanto que nas amostras esterilizadas por Plasma de Ar não houve alteração nos valores de rugosidade.

As alterações morfológicas ocasionadas pelos métodos de esterilização por Etanol+PBS e Autoclave contribuíram para o aumento nos valores de ângulo de contato.

As amostras esterilizadas por Plasma de Ar promoveram um aumento da hidrofobicidade (diminuição do ângulo de contato) comparativamente à amostra não esterilizada, pois o método de esterilização por Plasma de Ar ocorre a remoção de moléculas apolares provenientes do ar do ambiente, as quais são inevitavelmente adsorvidas na superfície.

5.4 Ensaio bacteriológico e micológico, determinação do potencial citotóxico, adesão e diferenciação celular para amostras esterilizadas por plasma de ar

Aqui serão apresentados os resultados dos testes de associação de biomateriais com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSCs) a partir do contato com os biomateriais esterilizados por plasma de ar (Ti puro, Ti6Al4V, Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 e 12 minutos). Tais resultados são provenientes do ensaio bacteriológico e micológico, potencial citotóxico, adesão celular, diferenciação celular a partir do crescimento celular em meio osteogênico e medida de deposição de cálcio (deposição de matriz óssea).

5.4.1 Ensaio Microbiológico

Como foi mostrado no item 5.3 dentre os métodos de esterilização empregados (Plasma de Ar, Etanol+PBS e Autoclave), o método de esterilização por Plasma de Ar foi o método que não alterou a morfologia das superfícies tratadas eletroquimicamente por 4 minutos, conforme imagens por AFM 2D conforme Figura 36(b); além de não alterar os valores de rugosidade nanométrica (Tabela 10) e rugosidade micrométrica (Tabela 11), tornando a superfície mais hidrofílica depois da esterilização; este método foi escolhido para os ensaios com bactérias (bacteriológico) e fungos ou leveduras (micológico).

Conforme já comentado anteriormente, os resultados dos testes bacteriológico e micológico mostraram que o método de esterilização por Plasma de Ar é eficiente, ou seja, esteriliza a superfície uma vez que não foi detectado a presença de bactérias ou fungos/leveduras na superfície após esterilização.

5.4.2 Potencial citotóxico

A partir da Figura 39 os resultados de citotoxicidade para todos os sistemas mostraram que nenhum dos sistemas foi citotóxico aos 3 dias de ensaio (72 h), conforme norma ISO 10993-5:2009. Além das 72 h avaliadas conforme indicado pela norma, foi realizado um estudo de até 7 e 14 dias cuja proposta foi conhecer o comportamento dos sistemas frente a um tempo maior de contato das células com os biomateriais. Aos 14 dias de contato dos biomateriais, o titânio puro foi o único biomaterial que mostrou tendência a apresentar comportamento citotóxico. Esse comportamento pode estar relacionado à presença de partículas presentes na superfície provenientes do lixamento mecânico, diminuindo a viabilidade celular e favorecendo o processo de apoptose, conforme já indicado por M. L. Wang et al. [279].

E. V. Ortega et al. [280] estudaram a citotoxicidade de Ti6Al4V a partir de um processo de jateamento de areia por óxido de alumínio e por um processo de passivação em ácido nítrico em fibroblastos 929 de ratos e em fibroblastos humanos MRC-5, e não encontraram comportamento citotóxico frente às superfícies avaliadas. Os autores também mostraram que o Ti6Al4V não induziu efeitos mutagênicos quando em contato com *E. coli*. T. Rae [281] realizou a incubação de fibroblastos sinoviais humanos por 8 dias sobre Ti6Al4V mas não evidenciou citotoxicidade, além disso, não foi detectada a presença de quantidades de vanádio, titânio e alumínio dissolvidos a partir da liga.

A. C. L. Faria et al. [282] avaliaram o efeito citotóxico de Ti puro, Ti6Al4V e Ni-Cr-Be por tratamento a plasma sob atmosfera em argônio e vácuo e tratamento por chama de oxigênio, e descobriram que somente o Ni-Cr-Be apresentou comportamento citotóxico sobre as células humanas de carcinoma epidermóide da cavidade bucal (SCC 9).

Segundo M. Esposito et al. [283] ligas como Ti6Al4V contém alumínio em sua composição, e segundo os autores isso faz com que uma camada de óxido de alumínio venha se formar sobre a superfície a qual pode exercer algum efeito citotóxico. Y. Okazaki et al. [284] estudaram o efeito citotóxico de vários íons metálicos em fibroblastos L929 e osteoblastos MC3T3-E1 não sendo encontrado efeito citotóxico em Ti, Zr, Sn, Nb e Ta; porém os íons de Al e V exibiram citotoxicidade a partir de concentrações acima ou igual 0,2 ppm, o efeito citotóxico do Al foi mais pronunciado sobre as células em meios contendo quantidade de íons V abaixo de 0,03 ppm.

M. L. Wang et al. [279] mostraram que a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de estroma de medula humana foi prejudicada por partículas de titânio expostas sobre a superfície; reduzindo a viabilidade celular e proliferação. Os autores mostraram que a exposição de partículas de titânio provenientes de desgaste superficial comprometeram a viabilidade celular induzindo conseqüentemente à apoptose. Para M. L. Wang et al. [285] a exposição dessas partículas de titânio provenientes de algum tipo de desgaste superficial contribui para a diminuição da formação do osso e compromete a osseointegração na interface implante/osso. Após 24 h e 72 h as células expostas a partículas de titânio exibiram elevados níveis de citotoxicidade; enquanto que em menores tempos de exposição (6h) as partículas não apresentaram efeito citotóxico.

Para M. L. Wang et al. [279] a composição do material, o tamanho da partícula, e o tempo de exposição são importantes parâmetros que influenciam na bioreatividade das células sobre a superfície. O aumento da citotoxicidade se relaciona com as partículas

expostas na superfície, causando inicialmente necrose devido ao trauma celular secundário como também causando aumento da taxa de apoptose, e consequente morte celular.

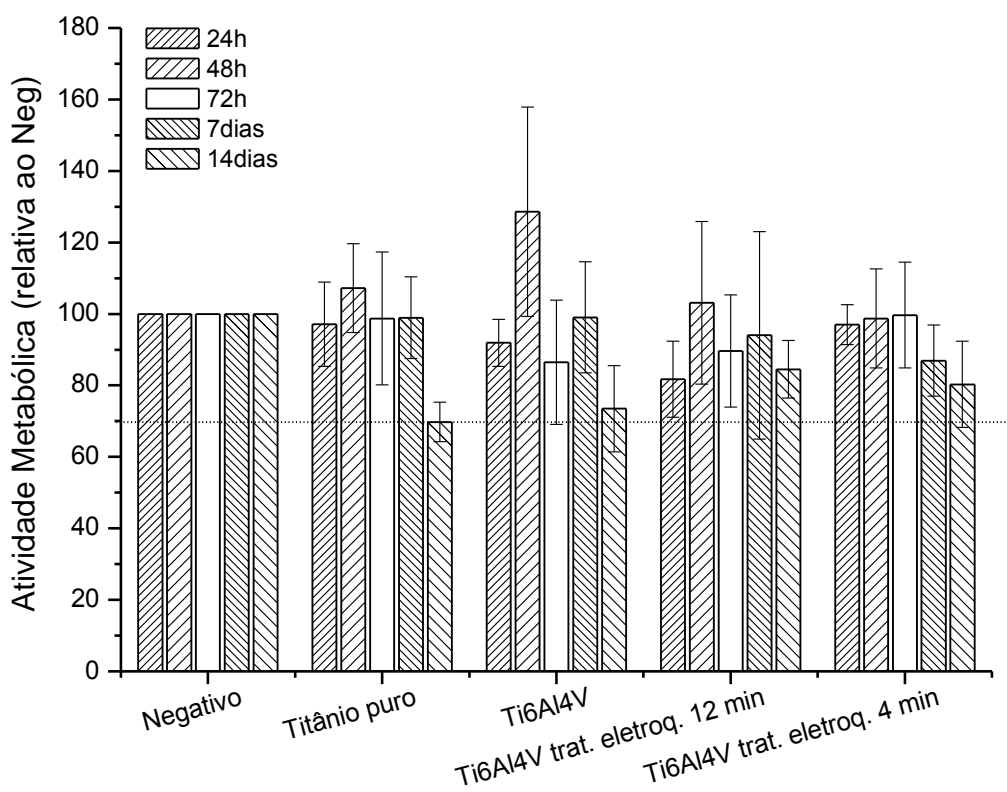


Figura 39: Citotoxicidade após 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias de exposição dos biomateriais.

5.4.3 Adesão Celular e Osteogênese

Na Figura 40 estão apresentados os resultados de adesão celular expressos em % de células aderidas sobre os biomateriais avaliados, observando-se que todos os biomateriais apresentaram adesão celular. As amostras somente lixadas de Ti6Al4V apresentaram maior adesão celular do que os outros biomateriais, mas que foram encontrados resultados semelhantes de adesão entre as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos.

Na Figura 41 estão apresentados os resultados de viabilidade celular das BMMSCs em contato com os sistemas Ti puro lixado, Ti6Al4V lixado, Ti6Al4V tratado eletroquimicamente 4 minutos e Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos após 4 dias de cultivo.

Esses resultados indicam que no sistema de amostras de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 4 minutos as células apresentaram maior viabilidade celular do que nos outros biomateriais, esse aumento pode ter sido favorecido pela superfície nanoestruturada sem a presença de regiões com espessamento da camada de óxido, conforme pode ser visto na Figura 32 (a,b) e pelo fato dessa superfície ter sido esterilizada

por plasma de ar, o que contribuiu para o aumento da hidrofiliçidade, conforme indicado na Tabela 9.

S. Sista et al. [286] avaliaram a adesão de osteoblastos MC3T3-E1 proveniente de roedores sobre a liga de Ti-Zr e observaram que a adesão celular foi maior sobre aquelas superfícies com nanotubos e com maior rugosidade nanométrica do que naquelas superfícies somente polidas mecanicamente.

E. B. Partida et al. [287] mostraram que a adesão e a viabilidade celular de osteoblastos foram aumentadas sobre as superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V, apresentando maior número de interconexões celulares e um aumento do número de filopodia celular ancorada sobre as nanoestruturas. M. S. Stan et al. [288] observaram um maior crescimento de osteoblastos G292 sobre nanotubos de TiO₂ em Ti6Al4V quando comparado a liga Ti6Al7Nb anodizada.

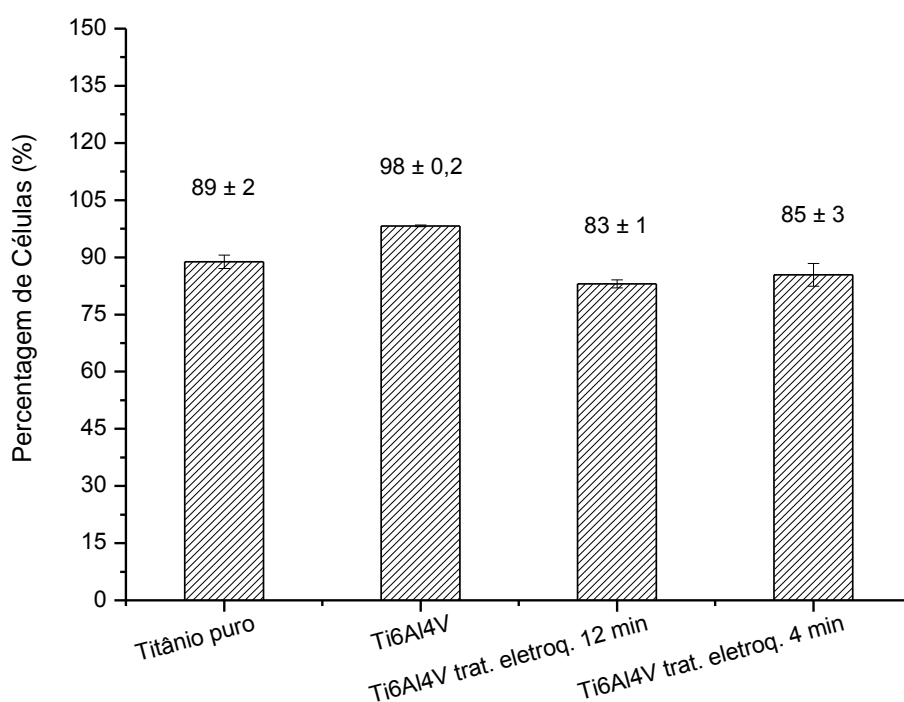


Figura 40: Resultados de Adesão celular para todos os biomateriais avaliados.

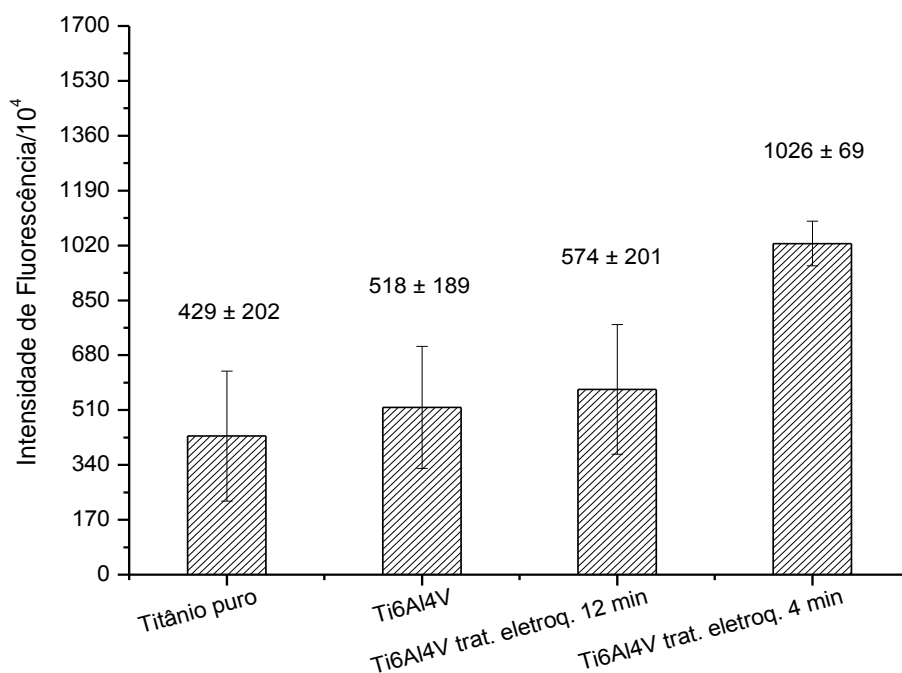


Figura 41: Viabilidade celular de BMMSCs após 4 dias de contato com os biomateriais.

Nas Figura 42 até Figura 45 estão apresentadas as imagens de MEV dos biomateriais após adesão celular e cultivo por 4 dias. As imagens de MEV dos biomateriais Ti puro (Figura 42), Ti6Al4V lixado (Figura 43) e Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos (Figura 44) que estão sendo apresentadas corroboram com os resultados apresentados de viabilidade celular (Figura 41), sendo possível visualizar pelas imagens de MEV a proliferação de células de geometria poligonal e a formação de uma matriz extracelular fragmentada.

Conforme pode ser visualizado na amostra de Ti6Al4V somente lixada (Figura 43 (f) as células apresentaram uma forma mais triangular; enquanto que para a amostra Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos a forma das células foi mais arredondada Figura 44 (k). Esse comportamento vai de acordo com o que foi mostrado por D-Z. Cui et al. [289] os quais indicaram uma melhora na resposta de células osteoblásticas sobre a liga Ti-8Ta-3Nb, sendo que as células apresentaram uma geometria poligonal, com formas entre triangular e arredondada.

Na amostra de Ti6Al4V tratada eletroquimicamente por 4 minutos Figura 45 (m,n) visualiza-se a formação de uma matriz extracelular íntegra sem regiões de fragmentação e rompimento das extensões citoplasmáticas. A formação dessa matriz extracelular é um dos indicativos de que as nanoestruturas obtidas aos 4 minutos de tratamento eletroquímico Figura 32 (a,b) contribuíram significativamente para a aderência das células na superfície, promovendo a proliferação celular e posterior formação da matriz extracelular.

Além disso, na Figura 42 (d) está indicado por uma seta o comportamento de aderência das células através da filopodia (extensões citoplasmáticas) nas ranhuras obtidas pelo lixamento mecânico do titânio. Isso mostra que a rugosidade contribuiu significativamente para a adesão e posterior proliferação celular.

Apesar de ser possível visualizar uma matriz extracelular na amostra de Ti6Al4V somente lixada, visualiza-se facilmente regiões indicando apoptose das células, conforme destacado na Figura 43 (h).

H. Wang et al. [290] observaram que células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea se estenderam completamente sobre superfícies de Ti6Al4V com tratamento superficiais por fusão de feixe de elétrons (EBM) e fusão por laser seletivo (SLM); além disso as células apresentaram alta densidade celular e exibiram filopodia (extensões citoplasmáticas) após 24 h de cultivo celular. Esses resultados mostraram que todas as amostras de Ti6Al4V tratadas por EBM e SLM apresentaram uma boa adesão celular e que as amostras avaliadas apresentaram uma boa citocompatibilidade.

T. Han et al. [291] cultivaram células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea sobre nanotubos de Ti6Al4V e perceberam que as células apresentaram forma arredondada, com longas extensões e abundante lamellipodia; além disso, os autores perceberam a formação de uma matriz extracelular (ECM) depositada sobre os nanotubos de Ti6Al4V.

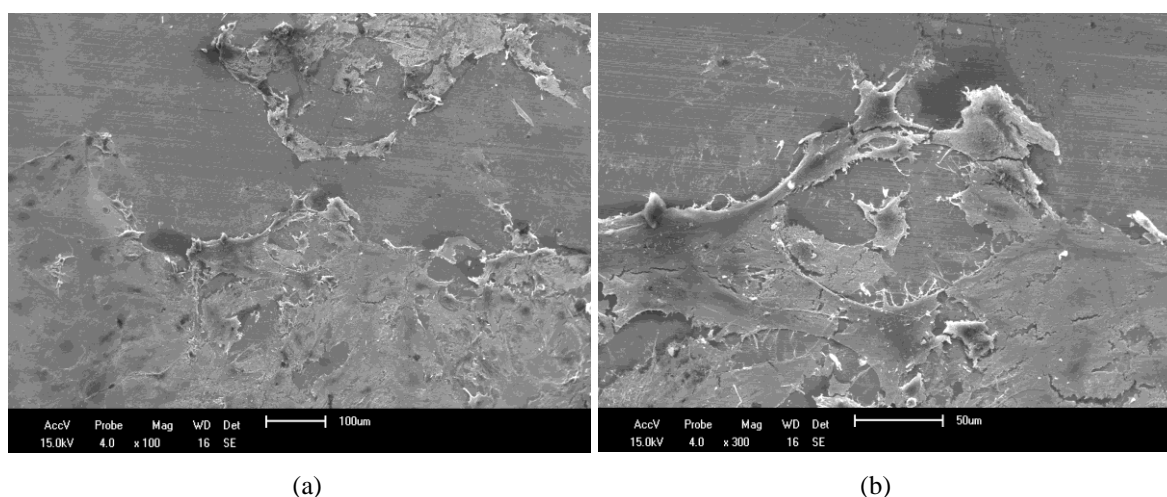
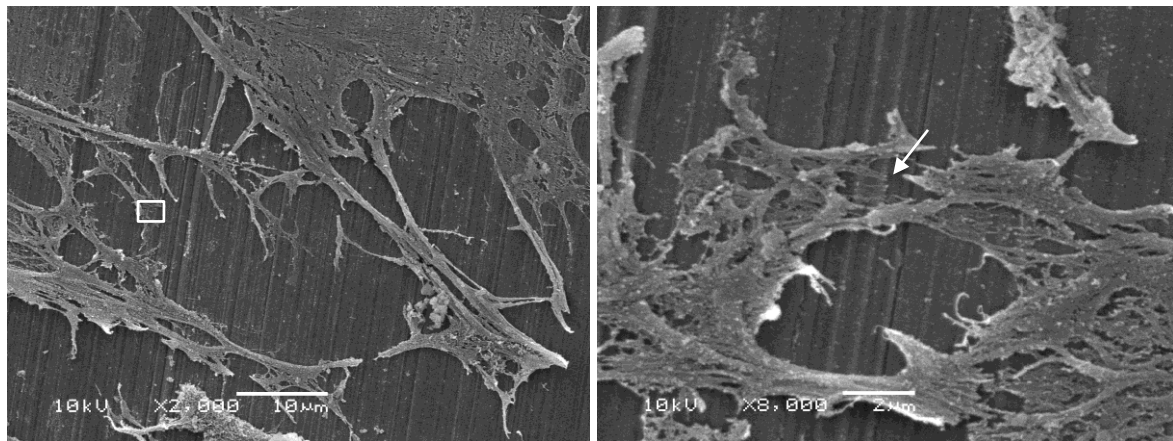


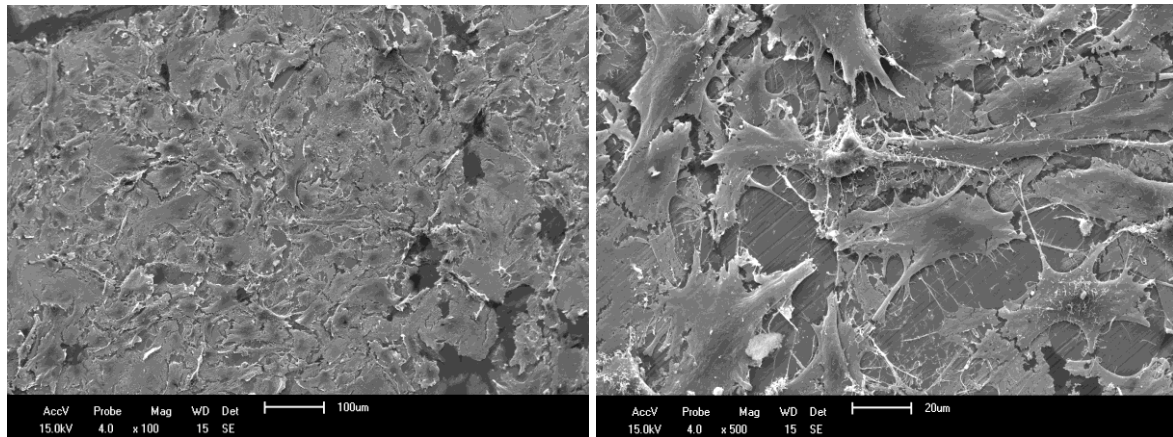
Figura 42: Imagens de MEV do Titânio puro lixado após ensaio de cultivo de BMMSCs por 4 dias. (d) Ampliação da região indicada na imagem (c).



(c)

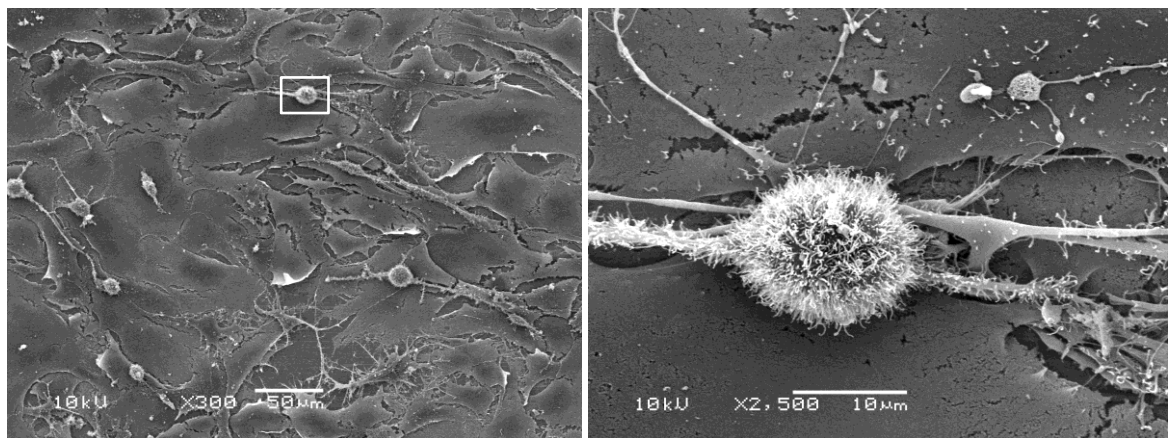
(d)

Figura 42 (continuação): Imagens de MEV do Titânio puro lixado após ensaio de cultivo de BMMSCs por 4 dias. (d) Ampliação da região indicada na imagem (c).



(e)

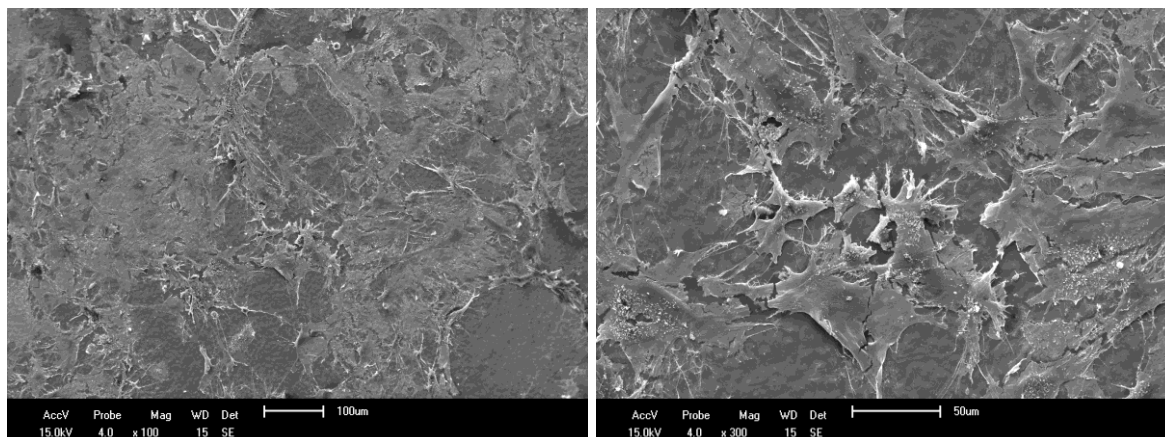
(f)



(g)

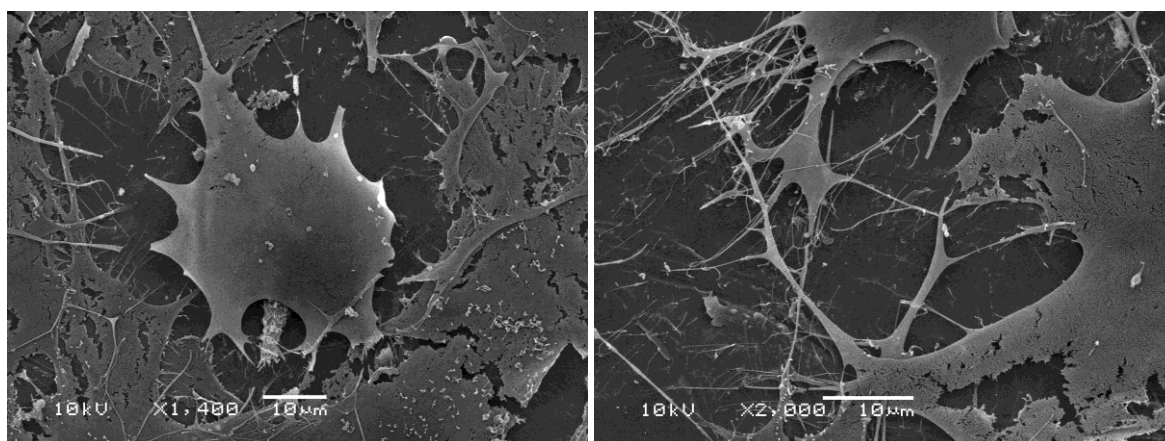
(h)

Figura 43: Imagens de MEV do Ti6Al4V lixado após ensaio de cultivo de BMMSCs por 4 dias. (h) Ampliação da região indicada na imagem (g).



(i)

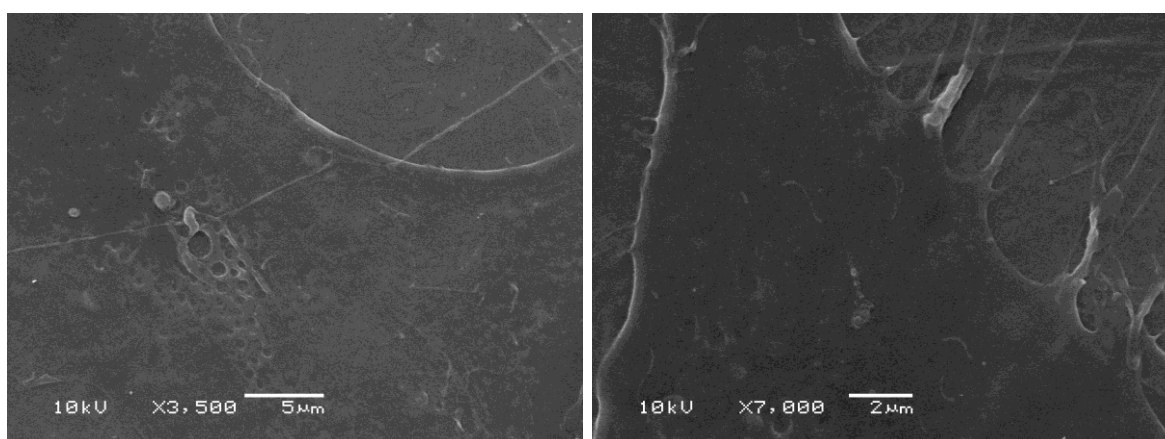
(j)



(k)

(l)

Figura 44: Imagens de MEV do Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos após cultivo de BMMSCs por 4 dias.



(m)

(n)

Figura 45: Imagens de MEV do Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 minutos após ensaio de Adesão Celular.

5.4.4 Diferenciação celular e Mineralização

Na Figura 46 estão apresentados os resultados de atividade de fosfatase alcalina em meio osteogênico para todos os biomateriais avaliados. A partir dos valores de ALP em

μM de produto/ μg de proteína (Tabela 13) é possível verificar que enquanto as células sobre o Titânio puro apresentaram diferenciação celular mais lenta, na liga Ti6Al4V houve uma aceleração da diferenciação celular. Esse comportamento está inversamente relacionado com o que está sendo apresentado nos resultados de deposição de cálcio (mineralização) (Tabela 14 e Figura 47), sendo possível ver que sobre o Ti6Al4V a deposição de cálcio foi menor do que sobre o Ti puro.

Segundo G. S. Stein et al. [194] células podem apresentar diferenciação celular mais lenta em função do processo de mineralização estar ocorrendo, uma vez que normalmente o processo de mineralização inicia quando a etapa de diferenciação está sendo concluída.

Com relação as amostras Ti6Al4V tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos se verifica que a etapa de diferenciação celular (Tabela 13 e Figura 46) foi mais rápida e a deposição de cálcio (Tabela 14 e Figura 47) foi maior para a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos, isso mostra que tais processos já estão ocorrendo bem antes sobre a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos do que sobre a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos. A presença de nanoestruturas (Figura 27(b) e Figura 32 (a,b) além do comportamento mais hidrofílico (Tabela 9) da amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos podem ter contribuído significativamente para acelerar a diferenciação celular, aumentando a etapa de mineralização (deposição de cálcio).

Na Figura 48 estão apresentadas as imagens da superfície das amostras após ensaio de Alizarina, o que torna visível a deposição de matriz óssea (indicada pela coloração avermelhada) permitindo afirmar que as células diferenciaram bem para todos os biomateriais.

Y. Hu et al. [292] observaram um aumento da atividade ALP de células-tronco mesenquimais sobre nanotubos de TiO_2 em presença do marcador BMP2. K. S. Brammer et al. [293] estudaram a presença de osteoblastos sobre nanotubos de TiO_2 em substrato de titânio e mostraram um aumento nos níveis de atividade ALP após o contato das células sobre os nanotubos de TiO_2 , além disso os autores indicaram que houve um aumento de alongadas filopodias.

A amostra Ti6Al4V lixada apresentou uma diferenciação celular mais rápida comparada as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos (Tabela 13 e Figura 46), esse comportamento pode estar relacionado a maior rugosidade média nanométrica (R_a); uma vez que na amostra lixada o R_a foi $\sim 9,0$ nm enquanto que para as amostras tratadas eletroquimicamente o R_a ficou em torno de 3,0 nm.

B. D. Boyan et al. [294] têm mostrado que células osteoblásticas em superfícies de titânio mais rugosas tendem a aumentar a atividade ALP (diferenciação celular). S. Fujimori [295] mostrou que células humanas MC3T3-E1 apresentaram um aumento na diferenciação osteoblástica sobre superfícies rugosas. B. D. Boyan et al. [296] também mostraram que o crescimento de osteoblastos sobre uma superfície com microrugosidade produz um ambiente osteogênico capaz de promover a diferenciação osteoblástica por comunicação parácrina e autócrina entre as células.

Tabela 13: Atividade de fosfatase alcalina expressa em μM de produto/ μg de proteína.

Biomaterial	μM de produto/ μg de proteína
Controle	$4 \pm 0,2$
Meio osteogênico	27 ± 1
Titânio puro	6 ± 2
Ti6Al4V	22 ± 2
Ti6Al4V trat. eletroq. 12 min	13 ± 1
Ti6Al4V trat. eletroq. 4 min	18 ± 2

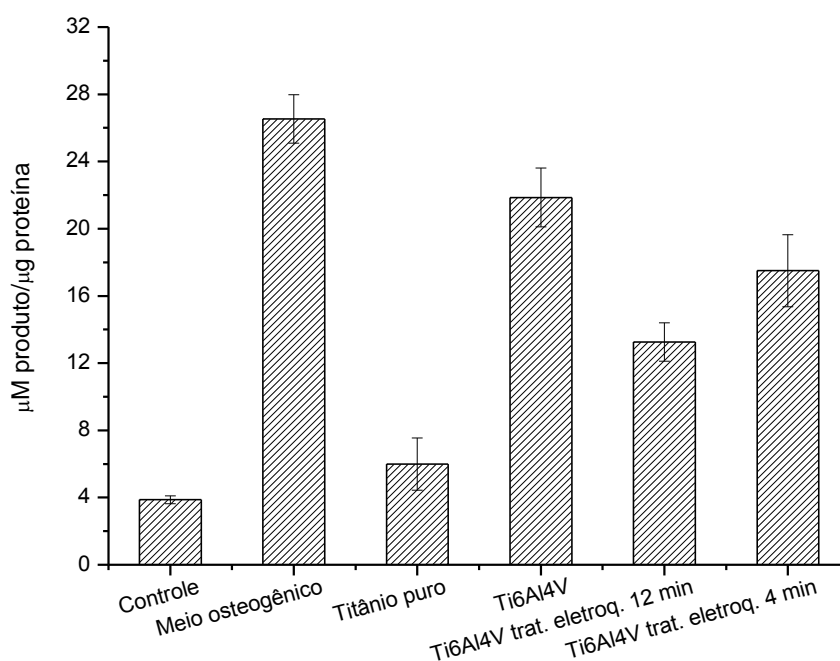


Figura 46: Atividade de fosfatase alcalina expressa em μM de produto/ μg de proteína ($n = 3$).

Tabela 14: Quantificação indireta da mineralização expressa em mM de cálcio/10⁴ células. (n=3).

Biomaterial	mM de cálcio/10 ⁴ células
Controle	0,5 ± 0,01
Meio osteogênico	1 ± 0,03
Titânio puro	4 ± 1
Ti6Al4V	2 ± 0,4
Ti6Al4V trat. eletroq. 12 min	4,5 ± 0,01
Ti6Al4V trat. eletroq. 4 min	5,4 ± 0,4

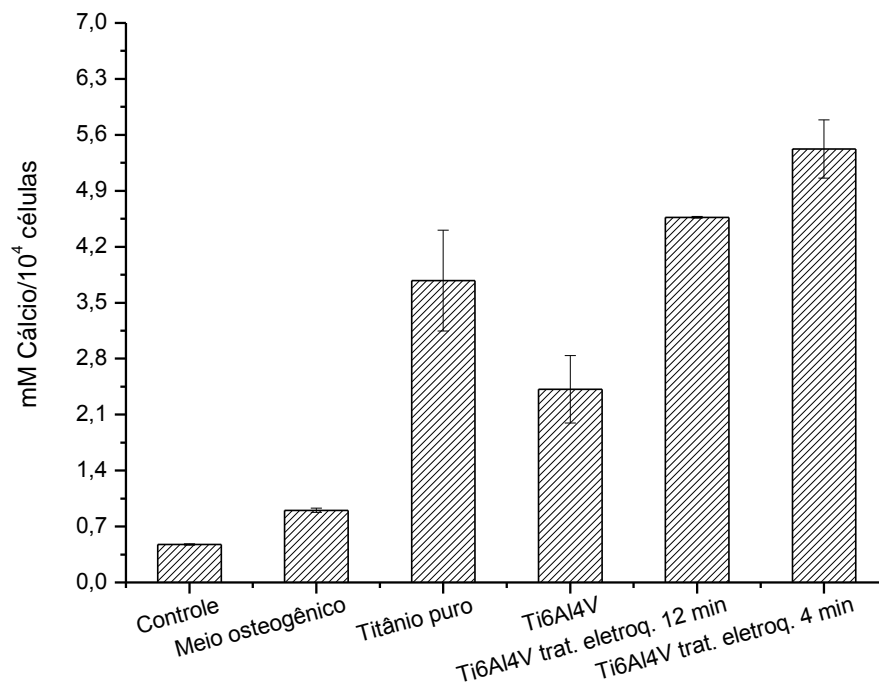
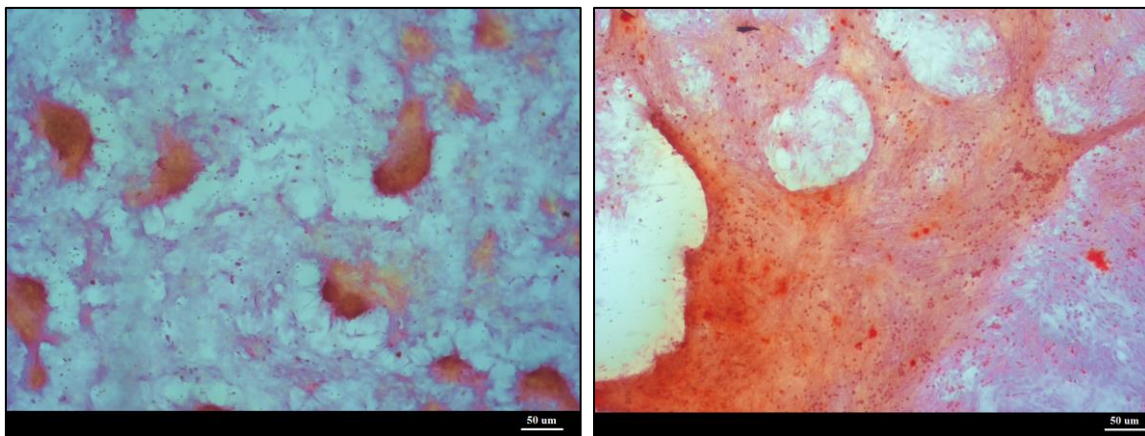


Figura 47: Quantificação indireta da mineralização expressa em mM de cálcio/10⁴ células.



(a)

(b)

Figura 48: Imagens mostrando a superfície das amostras após ensaio de Alizarina (Deposição de matriz óssea). (a) BMMSCs mantidas em meio CCM, (b) BMMSCs mantidas em meio osteogênico.

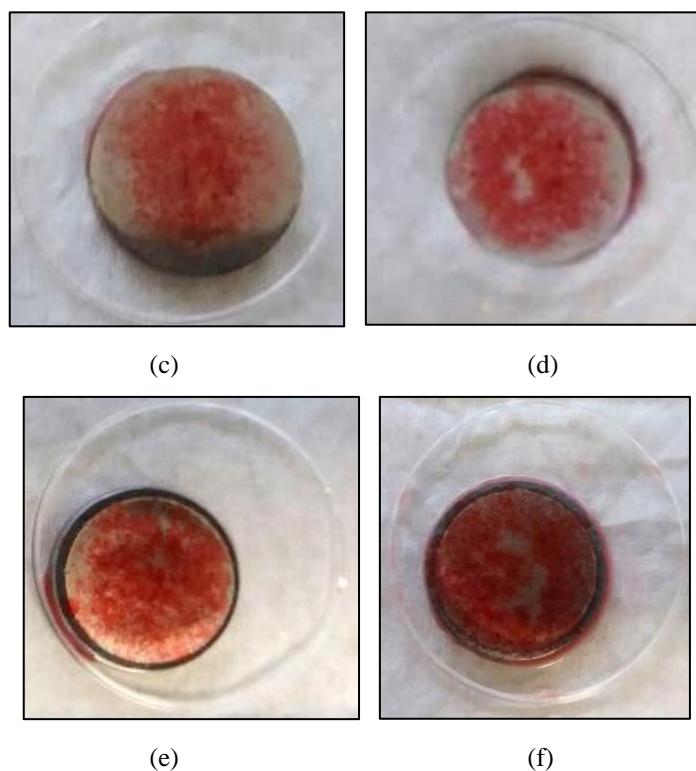


Figura 48 (continuação): Imagens mostrando a superfície das amostras após ensaio de Alizarina (Deposição de matriz óssea). (c) BMMSCs associadas a Titânio puro em meio osteogênico, (d) BMMSCs associadas a Ti6Al4V em meio osteogênico. Barra de escala 50 μm , aumento 10x. (e) BMMSCs associadas a Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 12 minutos em meio osteogênico e (f) BMMSCs associadas a Ti6Al4V tratado eletroquimicamente por 4 minutos em meio osteogênico.

5.4.5 Conclusões Parciais

Os resultados dos testes bacteriológico e micológico mostraram que o método de esterilização por Plasma de Ar foi eficiente, uma vez que não foi identificado a presença de bactérias ou fungos na superfície após esterilização.

Nenhum dos sistemas avaliados foi citotóxico aos 3 dias de ensaio (72 h), período este recomendado pela norma ISO 10993-5:2009.

Os resultados de crescimento celular em meio osteogênico e de adesão celular mostraram que a viabilidade e a adesão celular foram maiores para as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos. Esse comportamento pode ter sido motivado pela presença de nanoestruturas e pela esterilização por plasma de ar, tornando a superfície mais hidrofílica.

Com relação aos resultados de diferenciação celular em meio osteogênico, as células sobre titânio puro apresentaram uma diferenciação celular mais lenta, enquanto que sobre a liga Ti6Al4V lixada a diferenciação foi mais acelerada. Comportamento inverso foi observado na deposição de cálcio, onde sobre o Ti6Al4V a deposição foi menor do que

sobre Titânio puro. Isso indica que naquela superfície em que a diferenciação celular foi mais acelerada, acabou retardando o processo de mineralização (deposição de cálcio).

Nas amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos a diferenciação celular e a mineralização ocorreram de maneira mais acelerada do que na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos, isso pode ter ocorrido em consequência da presença de nanoestruturas e de uma superfície mais hidrofílica na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos.

6. CONCLUSÕES

As características físico-químicas da superfície de Ti6Al4V são fortemente influenciadas pelos parâmetros operacionais de tratamento eletroquímico.

Com relação ao *estudo da influência do tempo de tratamento eletroquímico sobre a morfologia, estrutura e composição química superficial* conclui-se que a formação de nanoestruturas prevaleceu em menor tempo de tratamento eletroquímico e o espessamento da camada de óxido em maiores tempo de tratamento eletroquímico. Os valores de rugosidade micrométrica foram semelhantes entre as amostras até 60 minutos de tratamento eletroquímico, enquanto que aos 90 minutos houve um aumento da rugosidade na ordem de 1 μm . A rugosidade nanométrica não apresentou uma relação de tendência com o tempo de tratamento eletroquímico. As amostras apresentaram ângulo de contato elevado (de 80° a 93°) independentemente do tempo de tratamento eletroquímico e da rugosidade micrométrica; tal comportamento pode estar associado ao fato de que as amostras foram limpas com etanol anterior as medidas de ângulo de contato.

Partindo do estudo *obtenção de superfícies nanoestruturadas em 4 e 12 minutos de tratamento eletroquímico: limpeza por Plasma de Ar* conclui-se que a limpeza por plasma de ar contribuiu para a formação de nanoestruturas mais definidas. Apesar de ter ocorrido a dissolução anódica na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos e o espessamento da camada de óxido na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos não foi evidenciada diferença na rugosidade nanométrica. Contudo, a diminuição dos valores de ângulo de contato para as amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos estaria associado à composição química superficial.

As amostras tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos apresentaram a formação de óxido de titânio, conforme indicado pelas análises de XPS, porém a amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos apresentou uma maior quantidade de carbono e fluor na superfície.

Na amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos a dissolução foi mais intensa na fase α , do que na fase β ; enquanto que na amostra tratada eletroquimicamente por 12 minutos a dissolução apresentou mesma intensidade nas duas fases.

A limpeza por plasma de ar permitiu observar a diferença quanto à molhabilidade entre as superfícies tratadas eletroquimicamente por 4 e 12 minutos. Essa diferença não

havia sido observada para as amostras limpas com etanol, o que evidencia que a limpeza por plasma de ar promove a remoção de espécies que poderiam estar adsorvidas na superfície, mascarando o efeito da composição superficial sobre a molhabilidade.

Quanto ao estudo *efeito dos métodos de esterilização sobre a morfologia de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V* concluiu-se que os métodos de esterilização por Autoclave e Etanol+PBS alteraram a morfologia nanométrica das amostras, aumentando os valores de rugosidade nanométrica e os valores de ângulo de contato. Enquanto que para a amostra esterilizada por Plasma de Ar não foi verificada mudança na morfologia após esterilização, não houve alteração nos valores de rugosidade, além de apresentar uma diminuição do ângulo de contato (aumento da hidrofiliabilidade); esse aumento da hidrofiliabilidade pode estar relacionado a remoção pelo método de esterilização por Plasma de Ar de moléculas apolares presentes no ar, as quais são inevitavelmente adsorvidas na superfície.

Quanto ao estudo *ensaio bacteriológico e micológico, determinação do potencial citotóxico, adesão e diferenciação celular para amostras esterilizadas por plasma de ar* concluiu-se que o método de esterilização por Plasma de Ar foi eficiente, uma vez que não foi identificada a presença de bactérias ou fungos após esterilização. Além disso, nenhum dos biomateriais avaliados foi citotóxico após 72 h de ensaio citotóxico, o que mostra que nenhum dos tratamento eletroquímicos foi prejudicial para as células.

O aumento do crescimento celular em meio osteogênico e o maior número de células aderidas, além da aceleração na diferenciação celular e mineralização ocorreram nas amostras tratadas eletroquimicamente por 4 minutos. Esses resultados podem ter sido influenciados pela presença de nanoestruturadas e pelo comportamento mais hidrofílico da superfície.

Uma melhor adesão celular foi observada nas amostras somente lixadas de Ti6Al4V, influenciada pela maior rugosidade nanométrica. Esse aumento da adesão celular pode ter sido influenciado pela maior quantidade de regiões para o ancoramento celular, favorecendo mais a proliferação celular na liga do que no titânio puro. Porém mesmo que a rugosidade tenha favorecido a proliferação, o comportamento frente a mineralização foi menor do que todos os outros biomateriais avaliados.

Dessa forma, conclui-se que a amostra tratada eletroquimicamente por 4 minutos foi o biomaterial que apresentou melhor comportamento frente ao contato com as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSCs), uma vez que apresentaram

maior crescimento celular em meio osteogênico, acelerando a diferenciação celular e o processo de mineralização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RUPP, F.; SCHEIDELER, L.; REHBEIN, D.; AXMAN, D.; GEIS-GERSTORFER. **Roughness induced dynamics changes of wettability of acid etched titanium implant modifications.** *Biomaterials*, v. 25, pp. 1429-1438, 2004.
- [2] HUANG, C. A.; HSU, F.; YU, C. H. **Electropolishing behaviour of pure titanium in sulphuric acid-ethanol electrolytes with an addition of water.** *Corrosion Science*, n. 2, v. 53, pp. 589-596, 2011.
- [3] ARRINGTON, E. D.; SMITH, W. J.; CHAMBERS, H. G.; BUCKELL, A. L.; DAVINO, N. A. **Complications of iliac crest bone graft harvesting.** *Clin Orthop.*, 329, pp. 300-309, 1996.
- [4] AKINTOYE S. O., LAM T., SHI S., BRAHIM J., COLLINS M. T., ROBEY P. G. **Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals.** *Bone* 38:758-768, 2006.
- [5] PETITE H., VIATEAU V., BENSALD W., MEUNIER A., DE POLLAK C., BOURGUIGNON M. **Tissue engineered bone regeneration.** *Nat. Biotechnol.* 18:959-962, 2000.
- [6] ROSE F. R., OREFFO R. O. **Bone tissue engineering: hope vs hype.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:1-7, 2002.
- [7] MARINI, F.; LUZI, E.; FABBRI, S.; CIUFFI, S.; SORACE, S.; TOGNARINI, I.; GALLI, G.; ZONEFRATI, G.; SBAIZ, F.; BRANDI, M. L. **Oteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on nanostructured Ti6Al4V and Ti13Nb13Zr.** *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 12, pp. 224-237, 2015.
- [8] TOGNARINI, I.; SORACE, S.; ZONEFRATI, R.; GALLI, G.; GOZZINI, A.; CARBONELL, S. S.; THYRION, G. D.; CAROSSINO, A. M.; TANINI, A.; MAVILIA, C.; AZZARI, C.; SBAIZ, F.; FACCHINI, F.; CAPANNA, R.; BRANDI, M. L. **In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces.** *Biomaterials*, v. 29, pp. 809-824, 2008.
- [9] CARVALHO, D. R.; CARVALHO, P. S. P.; MAGRO FILHO, O.; DE MELLO, J. D. B.; BE-LOTI, M. M.; ROSA, A. L. **Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched-titanium surface.** *Braz. Dent. J.*, v. 21, n. 1, pp. 3-11, 2010.
- [10] NISHIGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, M.; KIM, H. -M.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T. **The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium.** *Biomaterials*, n. 5, v. 20, pp. 491-500, 1999.

-
- [11] ISSAC, J.; GALTAYRIES, A.; KIZUKI, T.; KOKUBO, T.; BERDAL, A.; SAUTIER, J. M. **Bioengineered titanium surfaces affect the gene-expression and phenotypic response of osteoprogenitor cells derived from mouse calvarial bones.** *European Cells and Materials*, v. 20, pp. 178-196, 2010.
- [12] LÜTHEN, F.; LANGE, R.; BECKER, P.; RYCHLY, J.; BECK, U.; NEBE, J. G. B. **The influence of surface roughness of titanium on β 1- and β 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells.** *Biomaterials*, v. 26, pp. 2423-2440, 2005.
- [13] BAGNO, A.; BELLO, C. D. **Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, pp. 935-949, 2004.
- [14] KLYMOV, A.; BRONKHORST, E. M.; RIET, J.; JANSEN, J. A.; WALBOOMERS, X. F. **Bone marrow-derived mesenchymal cells feature selective migration behavior on submicro- and nano-dimensional multi-patterned substrates.** *Acta Biomaterialia*, v. 16, pp. 117-25, 2015.
- [15] YANG, K.; KYUHWAN, J.; EUNKYUNG, K.; KIM, J.; PARKLL, K. I.; KIM, J.; CHO, S. W. **Nanotopographical manipulation of focal adhesion formation for enhanced differentiation of human neural stem cells.** *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 5, n. 21, pp.10529–40, 2013.
- [16] WILLIAMS, D. F. **Consensus and definitions in biomaterials.** In: de Potter C, de Lange K, de Groot K, Lee AJC, editors. *Advances in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; p. 11-16, 1987.
- [17] WILLIAMS, D. F. **Biocompatibility Principles Encyclopedia of Materials: Science and Technology.** 2^a Edition, pp. 542-548, 2001.
- [18] BROWN, L.; BURSTEN, M. **Química: A ciência central.** 9^a Ed, cap. 12, 2005.
- [19] ENDERLE, J.; SUSAN, M.; BLANCHARD, J. B. **Introduction to biomedical engineering.** Academic Press-New York, 2^a Ed. Cap 6, 2005.
- [20] DIENER, A.; NEBE, B.; LÜTHEN, F.; BECKER, P.; BECK, U.; NEUMANN, H. G.; RYCHLY, J. **Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics.** *Biomaterials*, n. 4, v. 26, pp. 383-392, 2005.
- [21] SANTOS. A. R. **Efeito da oxidação anódica de titânio comercialmente puro revestido ou não com fibronectina na interface osteoblastos humanos-superfície de titânio.** (Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

-
- [22] PFEIFFER, F.; HERZOG, B.; KERN, D.; SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER, J.; WOLBURG, H. **Cell reactions to microstructured implant surfaces.** *Microelectronic Engineering*, n. 1, v. 67-68, pp. 913-922, 2003.
- [23] POHLER, O. E. **Unalloyed titanium for implants in bone surgery.** *Injury*, v. 31, n. 4, pp. 7-13, 2000.
- [24] TENGVALL, P.; LUNDSTRÖM, I. **Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial.** *Clinical Materials*, n. 2, v. 9, pp. 115-134, 1992.
- [25] SUL, Y. –T. **The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant.** *Biomaterials*, n. 22, v. 24, pp. 3893-3907, 2003.
- [26] ARCOS, D.; BOCCACCINI, A. R.; BOHNER, M.; DÍEZ-PÉREZ, A.; EPPLE, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; HERRERA, A.; PLANELL, J. A.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L.; VALLET-REGÍ, M. **The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis.** Opinion Paper. *Acta Biomaterialia*, 2014.
- [27] SCHENK R. K. **Bone response to grafts and implants. Perspectives on biomaterials: proceedings of the 1985 international symposium on biomaterials.** Taipei, Taiwan, February 25–27, 1985. Amsterdam; New York New York, NY, USA: Elsevier; Distributors for the US and Canada, Elsevier Science; 1986. p. 121–36.
- [28] BUDDY, D. R. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.** New York - Academic Press, Cap. 2, 1996.
- [29] PRADO, S. M. H. **Apostila de Biomateriais.** 2006.
- [30] WANHILL, R.; BARTER, S. **Fatigue of Beta Processed and Beta Heat-treated Titanium Alloys,** Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, 2012.
- [31] TERLINDE, T. WITULSKI, G. **Forging of titanium, in Titanium and Titanium Alloys, Fundamentals and Applications,** ed. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, pp. 289–304, 2003.
- [32] PETERS, M.; HEMPTENMAKER, J.; KUMPFET, J.; LEYENS, C. **Structure and properties of titanium and titanium alloys, in Titanium and Titanium Alloys, Fundamentals and Applications,** ed. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, pp. 1–36, 2003.
- [33] Prepared under the direction of the ASM International Handbook Committee. **Properties and Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials.** ASTM HANDBOOK, 2, 3470, 2001.

-
- [34] ZIMMER, C. G. **Influência da oxidação térmica sobre as propriedades de fadiga da liga Ti-6Al-4V.** (Dissertação de mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.
- [35] HANDBOOK. **Fatigue and Fracture Properties of Titanium Alloys.** ASM INTERNATIONAL, v. 19, 1996.
- [36] RMI Titanium Company. **Titanium Alloy Guide.** 2000.
- [37] ELIAS, C. N. LIMA, J. H. C.; VALIEV, R.; MEYERS, M. A. **Biomedical Applications of Titanium and its Alloys.** *Biological Materials Science*, v. 60, n. 3, pp. 46-49, 2008.
- [38] WILLIAMS, D.F. **Titanium: Epitome of biocompatibility or cause of concern.** *J. Bone Joint Surg. Br.*, v. 76, n. 3, p. 348-349, 1994.
- [39] ACERO, J.; CALDERÓN, J.; SALMERON, J.; VERDAGUER, J.; CONSEJO, C. **The behaviour of titanium as a biomaterial: microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis.** *Journal of Cranio-maxillofacial Surgery*, v. 27, n. 2, pp. 117-123, 1999.
- [40] WANG, Y. B.; ZHENG, Y. F. **Corrosion behaviour and biocompatibility evaluation of low modulus Ti-16Nb shape memory alloy as potential biomaterial.** *Materials Letters*, v. 63, n. 15, p. 1293–1295, 2009.
- [41] ASTM F138-13a. **Standard Specification for Wrought 18Chromium-14Nickel-2.5Molybdenum Stainless Steel Bar and Wire for Surgical Implants (UNS S31673),** ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
- [42] TONG, Y. X.; GUO, B.; ZHENG, Y. F.; CHUNG, C. Y.; MA, L. W. **Effects of Sn and Zr on the Microstructure and Mechanical Properties of Ti-Ta-Based Shape Memory Alloys.** *Journal of Materials Engineering and Performance*, v. 20, n. 4-5, p. 762–766, 2011.
- [43] OSHIDA, Y. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials.** Elsevier, pp. 448, 2010.
- [44] NUNOME, S.; KANETAKA, H.; KUDO, T. A.; ENDOH, K.; HOSODA, H.; IGARASHI, K. **In vitro evaluation of biocompatibility of Ti-Mo-Sn-Zr superelastic alloy.** *Journal of Biomaterials Applications*, v. 30, n. 1, p. 119–130, 2015.
- [45] FU, J.; YAMAMOTO, A.; KIM, H. Y.; HOSODA, H.; MIYAZAKI, S. **Novel Ti-base superelastic alloys with large recovery strain and excellent biocompatibility.** *Acta Biomaterialia*, v. 17, p. 56–67, 2015.

-
- [46] PROKOSHKIN, S.; BRAILOVSKI, V.; KOROTITSKIY, A.; INAEKYAN, K.; DUBINSKIY, S.; FILONOV, M.; PETRZHIK, M. **Formation of nanostructures in thermomechanically-treated Ti–Ni and Ti–Nb-(Zr, Ta) SMAs and their roles in martensite crystal lattice changes and mechanical behavior.** *Journal of Alloys and Compounds*, v. 577, p. S418–S422, 2013.
- [47] BRAILOVSKI, V.; PROKOSHKIN, S.; GAUTHIER, M.; INAEKYAN, K.; DUBINSKIY, S.; PETRZHIK, M.; FILONOV, M. **Bulk and porous metastable beta Ti–Nb–Zr(Ta) alloys for biomedical applications.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 3, p. 643–657, 2011.
- [48] LEVASHOV, E.A.; PETRZHIK, M.I.; KIRYUKHANTSEV-KORNEEV, F. V.; SHTANSKY, D. V.; PROKOSHKIN, S. D.; GUNDEROV, D. V.; SHEVEIKO, A. N.; KOROTITSKY, A. V.; ZALIEV, R. Z. **Structure and mechanical behavior during indentation of biocompatible nanostructured titanium alloys and coatings.** *Metallurgist*, v. 56, n. 5, p. 1–13, 2012.
- [49] DROB, S.I.; VASILESCU, C.; DROB, P.; VASILESCU, E.; GORDIN, D. M.; GLORANT, T. **Corrosion Behaviour of Nitrogen-Implantation Ti-Ta-Nb Alloy in Physiological Solutions Simulating Real Conditions from Human Body.** *Jom*, v. 67, n. 4, p. 818–829, 2015.
- [50] BERTRAND, E.; GLORANT, T.; GORDIN, D. M.; VASILESCU, E.; DROB, P.; VASILESCU, C.; DROB, S. I. **Synthesis and characterisation of a new superelastic Ti-25Ta-25Nb biomedical alloy.** *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 3, n. 8, p. 559–564, 2010.
- [51] SEIXAS, M.R.; KONATU, R.T.; RANGEL, A. L. R.; HILSDORF, G. O. R.; PEREIRAJR, A.; ALVES CLARO, A. P. R. **Study of a new titanium alloy for orthodontic applications.** *Dental Materials*, v. 29, Supple, n. 0, p. e64, 2013.
- [52] TONG, Y. X.; GUO, B.; ZHENG, Y.F.; CHUNG, C. Y.; MA, L. W. **Effects of Sn and Zr on the Microstructure and Mechanical Properties of Ti-Ta-Based Shape Memory Alloys.** *Journal of Materials Engineering and Performance*, v. 20, n. 4, pp. 762–766, 2011.
- [53] COUTINHO, M. P. **Influência da morfologia e da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro.** (*Dissertação de Mestrado em Ciência dos Materiais*). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2007.
- [54] WILLIAMS, D. F. **Dictionary of biomaterials.** Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

-
- [55] FENG, B.; WENG, J.; YANG, B. C.; QU, S. X.; ZHANG, X. D. **Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast.** *Biomaterials*, n. 25, v. 24, pp. 4663-4670, 2003.
- [56] NISHIGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, M.; KIM, H. -M.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T. **The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium.** *Biomaterials*, n. 5, v. 20, pp. 491-500, 1999.
- [57] LIANG, B.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; TAMURA, J.; KIM, H. -M.; UCHIDA, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. **Histological and mechanical investigations of the bone-bonding ability of anodically oxidized titanium in rabbits.** *Biomaterials*, n. 27, v. 24, pp. 4959-4966, 2003.
- [58] LAMOLLE, S. F.; MONJO, M.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAUGEN, H. J. **The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells.** *Biomaterials*, n. 5, v. 30, pp. 736-742, 2009.
- [59] ISAAC, J.; GALTAYRIES, KIZUKI, T.; KOKUBO, T.; BERDAL, A.; SAUTIER, JEAN-MICHEL. **Bioengineered titanium surfaces affect the gene-expression and phenotypic response of osteoprogenitor cells derived from mouse calvarial bones.** *European Cells and Materials*, v. 20, pp. 178-196, 2010.
- [60] YANG, G.; WANG, B.; TAWFIQ, K.; WEI, H.; ZHOU, S.; CHEN, G. **Electropolishing of surfaces: theory and application.** *Surface Engineering*, pp. 1-19, 2016.
- [61] DATTA, M.; LANDOLT, D. **Fundamentals aspects and applications of electrochemical microfabrication.** *Electrochimica Acta*, n. 15, v. 45, pp. 2535-2558, 2000.
- [62] LARSSON, C., THOMSEN, P., ARONSSON, B. O., RODAHL, M., LAUSMAA, J., KASEMO, B., ERICSON, L. E. **Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses.** *Biomaterials*, v. 17, 605-616, 1996.
- [63] M. DATTA, M., ROMANKIW, L. T. **Electrochemical tool for uniform metal removal during electropolishing.** U.S. Patent No. 5, 217, 586, 1993.
- [64] MANHABOSCO, T. M. **Tribocorrosão da Liga Ti6Al4V, Liga Nitretada, Ti6Al4V revestida por filmes Diamond-Like Carbon (DLC) e obtenção eletroquímica de filmes DLC.** (*Tese de Doutorado em Engenharia de Materiais*). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

-
- [65] ZINGER, O.; ANSELME, K.; DENZER, A.; HABERSETZER, P.; WIELAND, M.; JEANFILS, J.; HARDOUIN, P.; LANDOLT, D. **Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography.** *Biomaterials*, n. 14, v. 25, pp. 2695-2711, 2004.
- [66] HUANG, C. A.; HSU, F.; YU, C. H. **Electropolishing behaviour of pure titanium in sulphuric acid-ethanol electrolytes with na addition of water.** *Corrosion Science*, n. 2, v. 53, pp. 589-596, 2011.
- [67] PIOTROWSKI, O.; MADORE, C.; LANDOLT, D. **Electropolishing of tantalum in sulfuric acid-methanol electrolytes.** *Electrochimica Acta*, n. 19, v. 44, pp. 3389-3399, 1999.
- [68] PUIPPE, J. C. **Surface treatments of titanium implants.** *European Cells and Materials*, v. 5, n. 1, pp. 32-33, 2003.
- [69] VELTEN, D.; BIEHL, V.; AUBERTIN, F.; VALESKE, B.; POSSART, W.; BREME, J. **Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti₆Al₄V by termal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization.** *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, n. 1, pp. 18-28, 2002.
- [70] KOKUBO, T.; KIM, H. -M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. **Bioactive metals: preparation and properties.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, n. 2, v. 15, pp. 99-107, 2004.
- [71] SULKA, D. G.; KOLODZIEJ-KAPUSTA, J.; BRZÓZKA, A.; JASKULA, M. **Anodic growth of TiO₂ nanopore arrays at various temperature.** *Electrochimica Acta*, v. 104, pp. 526-535, 2013.
- [72] ALBU, P. S.; GHICOV, A.; ALDABERGENOVA, S.; DRECHSEL, P.; LeCLERE, D.; THOMPSON, G. E.; MACAK, J. M.; SCHMUKI, P. **Formation of Double-Walled TiO₂ Nanotubes and Robust Anatase Membranes.** *Advanced Materials*, v. 20, pp. 4135-4139, 2008.
- [73] SULKA, G. D.; KOLODZIEJ-KAPUSTA, J.; BRZÓZKA, A.; JASKULA, M. **Fabrication of nanoporous TiO₂ by electrochemical anodization.** *Electrochimica Acta*, v. 55, pp. 4359-4367, 2010.
- [74] TSUCHIYA, H.; MACAK, J. M.; GHICOV, A.; TAVEIRA, L.; SCHMUKI, P. **Self-organized Porous TiO₂ and ZrO₂ Produced by Anodization.** *Corr. Science*, v. 47, pp. 3324, 2005.

-
- [75] ZHOU, X.; NGUYEN, N. T.; OZKAN, S.; SCHMUKI, P. **Anodic TiO₂ nanotubes layers: Why does self-organized growth occur – A mini review.** *Electrochemistry Communications*, v. 46, pp. 157-162, 2014.
- [76] MIRABOLGHASEMI, H.; LIU, N.; LEE, K.; SCHMUKI, P. **Formation of ‘single walled’ TiO₂ nanotubes with significantly enhanced electronic properties for higher efficiency dye-sensitized solar cells.** *Chem. Commun.*, n. 49, pp. 2067-2069, 2013.
- [77] ROSALES-LEAL, J. I.; RODRÍGUEZ-VALVERDE, M. A.; MAZZAGLIA, G.; RAMÓN-TORREGROSA, P. J.; DÍAZ-RODRÍGUEZ, L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O.; VALLECILLO-CAPILLA, M.; RUIZ, C.; CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. A. **Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 365, n. 1-3, pp. 222-229, 2010.
- [78] FRIDMAN, A.; KENNEDY, L. A. **Plasma Physics and Engineering.** New York: Taylor & Franics, 2004.
- [79] STURROCK, P. A. **Plasma Physics: An Introduction to the Theory of Astrophysical.** Geophysical & Laboratory Plasmas. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [80] HAZELTINE, R. D.; WAELBROECK, L. **The framework of plasma physics.** First Edition, pp. 342, 2004.
- [81] HIPPLER, R., KERSTEN, H., SCHMIDT, M., SCHOENBACH, K. M. **Plasma Sources. Low Temperature Plasmas: Fundamentals, Technologies, and Techniques.** 2 ed., 2008.
- [82] LEAL-QUIRÓS, E. **Plasma processing of municipal solid waste.** *Brazilian Journal of Physics*, v. 34, n. 4, 2004.
- [83] HSU S. H.; CHANG Y. L.; TU Y. C.; TSAI C. M.; SU W. F. **Omniphobic low moisture permeation transparent polyacrylate/silica nanocomposite.** *ACS Appl. Mater. Interfaces*, v. 5, n. 8, pp. 2991-2998, 2013.
- [84] DUSKE K., KOBAN I., KINDEL E., SCHRÖDER K., NEBE B., HOLTFRETER, B.; JABLONOWSKI, L.; WELTMANN, K. D.; KOCHER, T. **Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals.** *J. Clin. Periodontol.*, v. 39, n. 4, pp. 400-407, 2012.
- [85] NAKAMURA T.; BUTTAPENG C.; FURUYA S.; HARADA N. **Surface cleaning of metal wire by atmospheric pressure plasma.** *Appl. Surf. Sci.*, v. 256, n. 4, pp. 1096-1100, 2009.

-
- [86] RUPF S.; IDLIBI A. N.; MARRAWI F.; HANNIG M.; SCHUBERT A.; VON MUELLER, L.; SPITZER, W.; HOLTSMANN, H.; LEHMANN, A.; RUEPPELL, A.; SCHINDLER, A. **Removing biofilms from microstructured titanium ex vivo: a novel approach using atmospheric plasma technology.** *Plos One*, v. 6, n. 10, e25893, 2011.
- [87] BRANDT, E. S.; GRACE, J. M. **Initiation of atomic layer deposition of metal oxides on polymer substrates by water plasma pretreatment.** *J. Vac. Sci. Technol. A*, v. 30, 01A137, 2012.
- [88] JANSEN, J. A.; VAN DER, W.; JPCM, G. K. **Fibroblast and epithelial cell interactions with surface-treated implant materials.** *Biomaterials*, v. 12, pp. 25-31, 1991.
- [89] SWART, K. M.; KELLER, J. C.; WIGHTMAN, J. P.; DRAUGHN, R. A.; STANFORD, C. M.; MICHAELS, C. M. **Short term plasma cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium.** *Oral Implantol.*, v. 18, pp. 130-137, 1992.
- [90] SCHAKENBRAAD, J. M.; BUSSCHER, V. J.; WILDEVUUR, C. R. H.; ARENDS J. **The influence of substratum free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 20, pp. 773-784, 1986.
- [91] BAIER, R. E.; MEYER, A. E.; NATIELLA, J. R. **Implant surface physics and chemistry: improvements and impediments to bioadhesion.** *In: Tissue integration in oral, orthopaedic, and maxillofacial reconstruction.* Laney WR, Tolman DE, editors. Chicago, IL: Quintessence Pub. Co., pp. 240-249, 1992.
- [92] CVELBAR, U.; VUJOSEVIC, D.; VRATNICA, Z.; MOZETIC, M. **The influence of substrate material on bacteria sterilization in na oxygen plasma glow discharge.** *J. Phys. D: Appl. Phys.*, v. 39, pp. 3487–3493, 2006.
- [93] MOISAN, M.; BARBEAU, J.; MOREAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L. H. **Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and na analysis of the inactivation mechanisms.** *Int. J. Pharm.*, v. 226, n. 1-2, pp. 1-21, 2001.
- [94] THIERRY, B.; TABRIZIAN, M.; SAVADOGO, O.; YAHIA, L'H. **Effects of sterilization processes on NiTi alloy: Surface characterization.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 49, n. 1, pp. 88-98, 2000.

-
- [95] KILPADI D. V., WEIMER J. J., LEMONS J. E. **Effect of passivation and dry heatsterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants.** *Colloid Surf. A*, v. 135, n. 1–3, pp. 89–101, 1998.
- [96] JUNKAR, I.; KULKARNI, M.; DRASLER, B.; RUGELJ, N.; MAZARE, A.; FLASKER, A.; DROBNE, D.; HUMPOLÍČEK, P.; RESNIK, M.; SCHMUKI, P.; MOZETIC, M.; IGLIC, A. **Influence of various sterilization procedures on TiO₂ nanotubes used for biomedical devices.** *Bioelectrochemistry*, v. 109, pp. 79-86, 2016.
- [97] LAUSMAA J. **Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials.** *J. Electron Spectrosc.*, v. 81, n. 3, pp. 343–61, 1996.
- [98] SUZUKI T, HORI N, ATT W, KUBO K, IWASA F, UENO T. **Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium.** *Tissue Eng.*, v. 15, n. 12, pp. 3679–88, 2009.
- [99] KELLER JC, DRAUGHN RA, WIGHTMAN JP, DOUGHERTY WJ, MELETIOU SD. **Characterization of sterilized cp titanium implant surfaces.** *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 5, n. 4, pp.360–368, 1990.
- [100] OH, S.;DARAIO, C.;CHEN, L. H.; PISANIC, T. R.; FINONES, R. R.; JIN, S. **Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 78, n. 1, pp. 97–103, 2006.
- [101] HUESCA-ESPITIA, L. C.; SUVIRA, M.; ROSENBECK, K.; KORZA, G.; SETLOW, B.; LI, W.; WANG, S.; LI, Y. Q.; SETLOW, P. **Effects of steam autoclave treatment on Geobacillus stearothermophilus spores.** *J. Appl. Microbiol.*, v. 121, n. 5, pp. 1300-1311, 2016.
- [102] SPICHER, G.; PETERS, J. **Suitability of Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus spores as test organism biodincators for detecting superheating of steam.** *Zentralbl Hyg Umweltmed*, n. 5, pp. 462-474, 1997.
- [103] FOX, K.; PFLUG, I. J. **Effect of temperature and gas velocity on the dry-heat destruction rate of bacterial spores.** *Applied Microbiology*, v. 16, n. 2, pp. 343-348, 1968.
- [104] NICHOLSON, W. L. **Ubiquity, Longevity and Ecological Roles of Bacillus Spores. Bacterial Spore Formers – Probiotics and Emerging Applications.** Norfolk, UK, Horizon Bioscience, 2004.
- [105] YU, J.; DAI, G.; CHENG, B. **Effect of crystallization methods on morphology and photocatalytic activity of anodized TiO₂ nanotube array films.** *J. Phys. Chem. C*, v. 114, n. 45, pp. 19378–19385, 2010.

-
- [106] ATT, W.; HORI, N.; IWASA, F.; YAMADA, M.; UENO, T.; OGAWA, T. **The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys.** *Biomaterials*, v. 30, n. 26, pp. 4268-4276, 2009.
- [107] TIBURSKI, J. H. Comprehensive study of the heat resistance of dried *Bacillus subtilis* spores. (Tese de Doutorado em Ciência de Alimentação). Université de Bourgogne, Bourgogne, 2013.
- [108] MOREIRA, A. J.; MANSANO, R. D.; PINTO, T. J. A.; RUAS, R.; ZAMBON, L. S.; SILVA, M. V.; VERDONCK, P. B. **Sterilization by oxygen plasma.** *Applied Surface Science*, v. 235, pp. 151-155, 2004.
- [109] SHINTANI, H. **The relative safety of gamma-ray, autoclave, and ethylene oxide gas sterilization of thermosetting polyurethane.** *Biomed. Instrum. Technol.*, v. 29, n. 6, pp. 513-519, 1995.
- [110] LEROUGE, S., WERTHEIMER, M. R., MARCHAND, R., TABRIZIANI, M., YAHIA, L. H. **Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 51, pp. 129–135, 2000.
- [111] MOYSAN, M.; BARBEAU, J.; MOREAU, S.; PELLETIER, J.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L. H. **Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms.** *Int. J. Pharmaceut.*, v. 226, pp. 1–21, 2001.
- [112] KUMMER, K. M.; TAYLOR, E. N.; DURMAS, N. G.; TARQUINIO, K. M.; ERCAN, B.; WEBSTER, T. J. **Effects of different sterilization techniques and varying anodized TiO₂ nanotube dimensions on bacteria growth.** *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 101, n. 5, pp. 677–6882, 2013.
- [113] PARK, J. H.; NAVARRETE, R. O.; BAIER, R. E.; MEYER, A. E.; TANNENBAUM, R.; BOYAN, B. D.; SCHWARTS, Z. **Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response.** *Acta Biomaterialia*, v. 8, pp. 1966-1975, 2012.
- [114] LIU, H.; CHEN, J.; YANG, L.; ZHOU, Y. **Long-distance oxygen plasma sterilization: Effects and mechanisms.** *Applied Surface Science*, v. 254, pp. 1815-1821, 2008.
- [115] TRIANDAFILLU, K.; BALAZS, D. J.; ARONSSON, B. -O.; DESCOUTS, P.; TU QUOC, P.; VAN DELDEN, C.; MATHIEU, H. J.; HARMS, H. **Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl**

chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials*, v. 24, pp. 1507-1518, 2003.

[116] UENO, M.; URRUCHI, W. M. I.; JORGE, A. O. C.; OTANI, C.; MACIEL, H. S. **Esterilização de limas endodônticas com plasma de oxigênio.** *Pesqui. Odontol. Bras.*, v. 14, n. 3, pp. 205-208, 2000.

[117] RUTALA, W. A., WEBER, D. J. **Low-temperature sterilization technologies: do we need to redefine ‘sterilization’?**, *J. Infect. Control*, v.17, pp. 87–91, 1996.

[118] RUTALA W. A. Desinfection and sterilization of patient-care items. *J. Infect. Control*, v. 17, pp. 377–384, 1996.

[119] DADD, A. H.; DALEY, G. M. **Role of coat in resistance of bacterial spores to inactivation by ethylene oxide.** *J. Appl. Bacteriol.*, v. 53, pp. 109-116, 1982.

[120] SCHEER, B. W.; STOVER, J. C. **Development of a smooth-surface microroughness standard.** *SPIE*, v. 3141, pp. 78-87, 2006.

[121] GITTENS, R. A.; NAVARRETE, R. O.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. **Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants.** *Acta Biomater.*, v. 10, n. 8, pp. 3363-3371, 2014.

[122] ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. **Oral implant surfaces: Part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them.** *Int. J. Prosthodont.*, v. 17, n. 5, pp. 536-543, 2004.

[123] ROSA, M. B.; ALBREKTSSON, FRANCISCHONE, C. E.; SCHWARTZ FILHO, H. O.; WENNERBERG, A. **The influence of surface treatment on the implant roughness pattern.** *Journal of Applied Oral Science*, v. 20, n. 5, pp. 550-555, 2012.

[124] KUBIAK, K. J.; WILSON, M. C. T.; MATHIA, T. G.; CARVAL, P. **Wettability versus roughness of engineering surfaces.** *Wear*, v. 271, pp. 523-528, 2011.

[125] WENZEL, R. N. **Resistance of solid surfaces to wetting by water.** *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 28, n. 8, pp. 988-994, 1936.

[126] CASSIE, A. B. D.; BAXTER, S. **Wettability of porous surfaces.** *Transactions of the Faraday Society*, v. 40, pp. 546-551, 1944.

[127] CHOW, T. S. **Wetting of rough surfaces.** *Journal of Physics: Condensed Matter.*, v. 10, n. 27, 1998.

[128] WHYMAN, G.; BORMASHENKO, E.; STEIN, T. **The rigorous derivation of Young, Cassie-Baxter and Wenzel equations and the analysis of the contact angle hysteresis phenomenon.** *Chemical Physics Letters*, v. 450, n. 4-6, pp. 355-359, 2008.

-
- [129] EXTRAND, C. W.; KUMAGAI, Y. **An experimental study of contact angle hysteresis.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 191, n. 2, pp. 378-383, 1997.
- [130] ANSELME, K.; BIGERELLE, M. **Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion.** *Acta Biomaterialia*, n. 2, v. 1, pp. 211-222, 2005.
- [131] DI PALMA, F.; GUIGNANDON, A.; CHAMSON, A.; LAFAGE-PROUST, M. – H.; LAROCHE, N.; PEYROCHE, S.; VICO, L.; RATTNER, A. **Modulation of the responses of human osteoblast-like cells to physiologic mechanical strains by biomaterial surfaces.** *Biomaterials*, n. 20, v. 26, pp. 4249-4257, 2005.
- [132] SVENSSON, S.; SUSKA, F.; EMANUELSSON, L.; PALMQUIST, A.; NORLINDH, B.; TROBOS, M.; BÄCKROS, H.; PERSSON, L.; RYDJA, G.; OHLANDER, M.; LYVÉN, B.; LAUSMAA, J.; THOMSEN, P. **Osseointegration of titanium with an antimicrobial nanostructured noble metal coating.** *Nanomedicine*, v. 9, n. 7, pp. 1048-1056, 2013.
- [133] WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. **Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review.** *Clin. Oral Implants Res.*, v. 20, pp. 172-184, 2009.
- [134] OLIVEIRA, P. T.; NANJI, A. **Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells.** *Biomaterials*, v. 25, pp. 403-413, 2004.
- [135] MENDES, V. C.; MOINEDDIN, R.; DAVIES, J. E. **Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 90, pp. 577-85, 2009.
- [136] BUSER D., NYDEGGER T., OXLAND T., COCHRAN D. L., SCHENK R. K., HIRT H. P., SNETIVY D., NOLTE L. P. **Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs.** *J. Biomed Mater Res*, v. 45, n. 2, 75-83, 1999.
- [137] OLIVEIRA P. T., NANJI A. **Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells.** *Biomaterials*, v. 25, 403–413, 2004.
- [138] ELIAS K. E., PRICE R. L., WEBSTER T. J. **Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers.** *Biomaterials*, v. 23, n. 15, pp. 3279-3287, 2000.

-
- [139] KAY S., THAPA A., HABERSTROH K. M., WEBSTER T. J. **Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion.** *Tissue Eng.*, v. 8, n. 5, pp. 753-761, 2002.
- [140] PRICE R. L., WAID M. C., HABERSTROH K. M., WEBSTER T. J. **Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers.** *Biomaterials*, v. 24, n. 11, pp. 1877-1887, 2003.
- [141] WEBSTER T. J., SIEGEL R. W., BIZIOS R. **Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics.** *Biomaterials*, v. 21, n. 17, pp. 1803-1810, 2000.
- [142] SUPRONOWICZ P. R., AJAYAN P. M., ULLMANN K. R., ARULANANDAM B. P., METZGER D. W., BIZIOS R. **Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 59, n. 3, pp. 499-506, 2002.
- [143] ZHU, X.; CHEN, J.; SCHEIDELER, L.; REICHL, R.; GEIS-GERSTORFER, J. **Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses.** *Biomaterials*, n. 18, v. 25, pp. 4087-4103, 2004.
- [144] BOTTICELLI, D.; BERGLUNDH, T.; BUSER, D.; LINDHE, J. **The jumping distance revisited. An experimental study in the dog.** *Clin. Oral Impl. Res.*, n. 1, v. 14, pp. 35-42, 2003.
- [145] BIGERELLE, M.; ANSELME, K.; NOEL, B.; RUDERMAN, I.; HARDOUIN, P.; IOST, A. **Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response.** *Biomaterials*, n. 7, v. 23, pp. 1563-1577, 2002.
- [146] ANSELME, K. **Osteoblast adhesion on biomaterials.** *Biomaterials*, n. 7, v. 21, pp. 667-681, 2000.
- [147] PERIZZOLO, D.; LACEFIELD, W. R.; BRUNETTE, D. M. **Interaction between topography and coating in the formation of bone nodules in culture for hydroxyapatite- and titanium-coated micro-machined surfaces.** *Journal of Biomedical Materials Research*, n. 4, v. 56, pp. 494-503, 2001.
- [148] WIELAND, M.; CHEHROUDI, B.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D. M. **Use of Ti-coated to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition.** *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 60, n. 3, pp. 434-444, 2002.
- [149] ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. **The impact of oral implants – past and future, 1966-2042.** *Journal Can. Dent. Assoc.*, v. 71, n. 5, pp. 327-327b, 2005.

-
- [150] KHASHU, H.; BAIJU, C. S.; GUPTA, G.; BALI, P. **Periimplantitis**. *International Journal of Oral Implantology and Clinical Research*, v. 3, n. 2, pp. 71-76, 2012.
- [151] CONNER, K.; SABATINI, R.; MEALEY, B.; TAKACKS, V.; MILLS, M.; COCHRAN, D. **Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched and hydroxyapatite-coated implants in the canine model**. *Journal Periodontol*, v. 74, pp. 658-668, 2003.
- [152] PAPALEXIOU, V.; NOVAES, A. B.; GRISI, M. F.; SOUZA, S. S.; TABA, M.; KAJIWARA, J. K. **Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study**. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 15, pp. 44-53, 2004.
- [153] BRETT, P. M.; HARLE, J.; SALIH, V.; MIHOC, R.; OLSEN, I.; JONES, F. H. **Roughness response genes in osteoblasts**. *Bone*, v. 35, pp. 124-133, 2004.
- [154] BAGNO, A.; DI BELLO, C. **Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, n. 9, v. 15, pp. 935-949, 2004.
- [155] HA, S. -W.; GISEP, A.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; GRUNER, H.; WIELAND, M. **Topographical characterization and microstructural interface analysis of vacuum-plasma-sprayed titanium and hydroxyapatite coatings on carbon fibre-reinforced poly (etheretherketone)**. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, n. 12, v. 8, pp. 891-896, 1997.
- [156] RUPP, F.; SCHEIDELER, L.; REHBEIN, D.; AXMANN, D.; GEISGERSTORFER, J. **Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications**. *Biomaterials*, v. 25, n. 7, pp. 1429-1438, 2004.
- [157] KIESWETTER, K.; SCHWARTZ, Z.; HUMMERT, T. W.; COCHRAN, D. L.; SIMPSON, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. **Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells**. *Journal of Biomedical Materials Research*, n. 1, v. 32, pp. 55-63, 1996.
- [158] COOPER, L. F. **A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants**. *Journal Prosthet. Dent.*, v. 84, pp. 522-534, 2000.
- [159] LAMOLLE, S. F.; MONJO, M.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAUGEN, H. J. **Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance**. *Journal of Biomedical Materials Research A*, n. 3, v. 88 A, pp. 581-588, 2008.

-
- [160] PERRIN, D.; SZMUKLER-MONCLER S.; ECHIKOU, C.; POINTAIRE, P.; BERNARD, J. P. **Bone response to alteration of surface topography and surface composition of sandblasted and acid etched (SLA) implants.** *Clin. Oral Impl. Res.*, v. 13, pp. 465-469, 2002.
- [161] LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. **Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.** *Dental Materials*, v. 23, pp. 844-854, 2007.
- [162] BUSER, D.; BROGGINI, N.; WIELAND, M.; SCHENK, R. K.; DENZER, A. J.; COCHRAN, D. L. **Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface.** *J. Dent. Res.*, v. 83, pp. 529-533, 2004.
- [163] BRUNETTE, D. M. **The effects of implant surface topography on the behavior of cells.** *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 3, n. 4, pp. 231-246, 1988.
- [164] MEYLE, J.; GÜLTIG, K.; WOLBURG, H.; VON RECUM, A. F. **Fibroblast anchorage to microtextured surfaces.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 27, n. 12, pp. 1553-1557, 1993.
- [165] MEYLE, J.; GÜLTIG, K.; NISCH, W. **Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface.** *J. Biomed. Res.*, v. 29, n. 1, pp. 81-88, 1995.
- [166] PFEIFFER, F.; HERZOG, B.; KERN, D.; SCHEIDELER, L.; GEISGERSTORFER, J.; WOLBURG, H. **Cell reactions to microstructured implant surfaces.** *Microelectronic Engineering*, v. 67-68, pp. 913-922, 2003.
- [167] NINOMI M. **Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods.** *Sci Technol Adv Mater.*, v. 4, pp. 445-54, 2003.
- [168] GIL, L. M.; LADEIRA, T. C.; MENEZES, G. C.; COSTA, F.; SILVA F. **The cell-extracellular matrix-biomaterial interface and the biocompatibility of titanium implants.** *Innov. Implant. J. Biomater. Esthet.*, v. 4, n. 3, p. 58-64, 2009.
- [169] KANCZLER, J. M., OREFFO, R. O. **Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone.** *Eur Cell Mater.*, v. 15, pp. 100-114, 2008.
- [170] **Mecanismo Osseointegração** [adaptação do Bone Interface Group, 2013]. <http://www.ecf.utoronto.ca/~bonehead/> acessado em 2015.
- [171] BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. **Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function.** *Acta Biomater.*, v. 5, n. 1, pp. 1-13, 2008.

-
- [172] MIAO, Z. **Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells.** *Cell Biol Int.*, v. 30, n. 9, 681-687, 2006.
- [173] BERNARDI, L. **The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption.** *J. Endod.*, v. 37, n. 7, pp. 973-979, 2011.
- [174] ROMANOV, Y. A., VERONIKA A. SVINTSITSKAYA, VLADIMIR N. SMIRNOV. **Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-like Cells from Umbilical Cord.** *Stem Cells*, v. 21, n. 1, pp. 105–10, 2003.
- [175] LARA, P. A. S.; ZHAO, H.; BAJPAI, R.; ABDELHAMID, A. I.; WARBURTON, D. **Impact of stem cells in craniofacial regenerative medicine.** *Frontiers in Physiology*, n. 188, v. 3, pp. 1-9, 2012.
- [176] SANCHEZ, L. P. A.; ZHAO, H.; BAJPAL, R.; ABDELHAMID, A. I.; WARBURTON, D. **Impact of stem cells in craniofacial regenerative medicine.** *Frontiers in Physiology*, v. 3, n. 188, 2012.
- [177] SUCHANEKA, J.; SOUKUPB, T.; VISEKB, B.; IVANCAKOVAA, R.; KUCEROVAC, L.; MOKRYB, J. **Dental pulp stem cells and their characterization.** *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 153, 31–36, 2009.
- [178] WANG, D. W.; CAO, Y.; QIU, H.; BI, Z. G. **Improved blood compatibility of Mg-1.0Zn-1.0Ca alloy by micro-arc oxidation.** *J. Biomed. Mater. Res. Part. A*, v. 99A, p. 166-172, 2011.
- [179] HEMATTI P. **Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview.** *Methods Mol. Biol.*, v. 690, pp. 163-174, 2011.
- [180] BOYD N. L.; ROBBINS K. R.; DHARA, S. K.; WEST, F. D.; STICE S. L. **Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells.** *Tissue Eng. Part. A.*, v. 15, n.8, pp. 1897-1907, 2009.
- [181] MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; GO, T.; ASNAGHI, M.A.; REES, L.E.; COGAN, T.A.; DODSON A.; MARTORELL, J.; BELLINI, S.; PARNIGOTTO, P.P.; et al. **Clinical transplantation of a tissue-engineered airway.** *Lancet*, v. 372, pp. 2023–2030, 2008.
- [182] KULANGARA, K.; YANG, Y.; YANG, J.; LEONG, K.W. **Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function.** *Biomaterials*, v. 33, pp. 4998–5003, 2012.

-
- [183] CAPLAN, A. I. **Why are MSCs therapeutic? new data: new insight.** *J. Pathol.*, v. 217, n. 2, pp. 318–24, 2009.
- [184] LE GUILLOU-BUFFELLO, D.; BAREILLE, R.; GINDRE, M.; SEWING, A.; LAUGIER, P.; AMEDEE, J. **Additive effect of RGD coating to functionalized titanium surfaces on human osteoprogenitor cell adhesion and spreading.** *Tissue Eng. Part A*, v. 14, n. 8, pp. 1445–55, 2008.
- [185] YANG, Y.; TIAN, J.; DENG, L.; ONG, J. L. **Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro.** *Biomaterials*, v. 23, n. 5, pp. 1383–9, 2002.
- [186] MC MURRAY R. J. **Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency.** *Nat. Mater.*, v. 10, n. 8, pp. 637–44. 519, 2011.
- [187] MEIRELLES, L. D. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J. Cell Sci.*, v. 119, n. 11, pp. 204–13, 2006.
- [188] NAVARRETE-OLIVARES, R.; HYZY, S. L.; HUTTON, D. L.; ERDMAN, C.; WIELAND, M.; BOYAN, D. B.; SCHWARTZ, Z. **Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage.** *Biomaterials*, n. 31, pp. 2728–2735, 2010.
- [189] LAI, H. C.; ZHUANG, L. F.; LIU, X.; WIELAND, M.; ZHANG, Z. Y. **The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2009.
- [190] WOOD, M.A.; BAGNANINCHI, P.; DALBY, M.J. **The beta integrins and cytoskeletal nanoimprinting.** *Exp. Cell. Res.*, v. 314, pp. 927–935, 2008.
- [191] ENGLER, A. J.; SEN, S.; SWEENEY, H. L.; DISCHER, D. E. **Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.** *Cell*, v. 126, n. 4, pp. 677–89, 2006.
- [192] LEE, M.H.; KIM, Y.J.; KIM, H.J.; PARK, H.D.; KANG, A.R.; KYUNG, H.M.; SUNG, J.H.; WOZNEY, J.M.; KIM, H.J.; RYOO, H.M. **BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF- β 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression.** *J. Biol. Chem.* v. 278, pp. 34387–34394, 2003.
- [193] PAVLIN, D.; ZADRO, R.; GLUHAK-HEINRICH, J. **Temporal pattern of stimulation of osteoblast-associated genes during mechanically-induced osteogenesis**

in vivo: Early responses of osteocalcin and type I collagen. *Connect. Tissue Res.*, v. 42, pp. 135–148, 2001.

[194] STEIN G. S.; LIAN, J. B.; VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L. MONTECINO, M.; JAVED, A.; ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; CHOI, J.; POCKWINSE, S. M. **Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression.** *Oncogene*, v. 23, pp. 4315-4329, 2004.

[195] TENG-AMNUAY, N.; TANGPATJAROEN, C.; NISARATANAPORN, E.; LOHWONGWATANA, B. **Replication of trabecular bone structure and reaction layer analysis of titanium alloys using investment casting technique.** *Procedia Technology*, v. 12, pp. 316-322, 2014.

[196] WILLEMS, N. M. B. K.; LANGENBACH, G. E. J.; EVERTS, V.; ZENTNER, A. **The microstructural and biomechanical development of the condylar bone: a review.** *The European Journal of Orthodontics*, v. 36, n. 4, pp. 479-485, 2013.

[197] ASTM B348-13: **Standard specification for titanium and titanium alloy bars and billets.**

[198] KRAWIEC, H.; VIGNAL, V.; SCHWARZENBOECK, E.; BANAS, J. **Role of plastic deformation and microstructure in the micro-electrochemical behaviour of Ti–6Al–4V in sodium chloride solution.** *Electrochimica Acta*, v. 104, pp. 400-406, 2013.

[199] ARMENDIA, M.; GARAY, A.; IRIARTE, L. M. ARRAZOLA, P. J. **Comparison of the machinabilities of Ti6Al4V and TIMETAL® 54M using uncoated WC-Co tools.** *Journal of Materials Processing Technology*, v. 210, pp. 197-203, 2010.

[200] PIDWIRNY, M. **Atmospheric Composition. Fundamentals of Physical Geography**, 2nd Edition, 2006.

[201] PARK, H. H.; PARK, I. S.; KIM, K. S.; JEON, W. Y.; PARK, B. K.; HYUNG, S. K.; BAE, T. S.; LEE, M. H. **Bioactive and electrochemical characterization of TiO₂ nanotubes on titanium via anodic oxidation.** *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 20, pp. 6109-6114, 2010.

[202] BURKARTER, E. **Construção de imagens por padrões hidrofóbico/hidrofílico.** (*Dissertação de Mestrado em Ciências*). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

[203] COWAN, S. T. **Cowan and Steel's Manual for Identification of medical Bacteria.** 2.ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1977.

[204] OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária.** Guia Bacteriológico Prático. 2.ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2000

-
- [205] ALBU, P. S.; GHICOV, A.; ALDABERGENOVA, S.; DRECHSEL, P.; LeCLERE, D.; THOMPSON, G. E.; MACAK, J. M.; SCHMUKI, P. **Formation of Double-Walled TiO₂ Nanotubes and Robust Anatase Membranes.** *Advanced Materials*, v. 20, pp. 4135-4139, 2008.
- [206] KYEREMATENG, N. A.; VACANDIO, F.; SOUGRATI, M. T.; MARTINEZ, H.; JUMAS, J. C.; KNAUTH, P.; DJENIZIAN, T. **Effect of Sn-doping on the electrochemical behavior of TiO₂ nanotubes as potential negative electrode materials for 3D Li-ion micro batteries.** *Journal of Power Sources*, v. 224, pp. 269-277, 2013.
- [207] DELIGIANNI DD, KATSALA N, LADAS S, SOTIROPOULOU D, AMEDEE J, MISSIRLIS YF. **Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption.** *Biomaterials* 2001; 22(11): 1241-1251.
- [208] LINEZ-BATAILLON, P.; MONCHAU, F.; BIGERELLE, M.; HILDEBRAND, H. F. **In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates.** *Biomol. Eng.*, v. 19, n. 2-6, pp. 133-141, 2002.
- [209] H.J. KIM, S.H. KIM, M.S. KIM, E.J. LEE, H.G. OH, W.M. OH, S.W. PARK, W.J. KIM, G.J. LEE, N.G. CHOI, J.T. KOH, D.B. DINH, R.R. HARDIN, K. JOHNSON, V.L. SYLVIA, J.P. SCHMITZ, D.D. DEAN. **Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells.** *J. Biomed. Mater.*, v. 74, n. 3, pp. 366-73, 2005.
- [210] FAUCHEUX, N.; SCHWEISS, R.; LUTZOW, K.; WERNER, C.; GROTH, T. **Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies.** *Biomaterials*, v. 25, n. 14, pp. 2721-2730, 2004.
- [211] IKADA, Y. **Surface modification of polymers for medical applications.** *Biomaterials*, v. 15, n. 10, pp. 725-736, 1994.
- [212] NARAYANAN, R.; KWON, T.; KIM, K. **TiO₂ nanotubes from stirred glycerol/NH₄F electrolyte: Roughness, wetting, behavior and adhesion for implant applications.** *Materials Chemistry and Physics*, v. 117, pp. 460-464, 2009.
- [213] ALTANKOV, G.; GRINNELL, F.; GROTH, T. **Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 30, n. 3, pp. 385-391, 1996.
- [214] GROTH, T; ALTANKOV, G. **Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 17, n. 12, pp. 1227-1234, 1996.

-
- [215] NAKAJIMA, A.; HASHIMOTO, K.; WATANABE, T.; TAKAI, K.; YAMAUCHI, G.; FUJISHIMA, A. **Transparent superhydrophobic thin films with self-cleaning properties.** *Langmuir*, v. 16, pp. 7044-7047, 2000.
- [216] MORCELLI, A. E. **Estudo dos micromecanismos de deformação e fratura da liga de titânio Ti-6Al-4V utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica e difração de raios-X.** *Tese de Doutorado em Ciências.* USP, São Paulo, 2009.
- [217] LU, S. W.; IU, M. Z.; GOGOTSI, Y. **Ceramic nanomaterials and nanotechnology III: Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Ceramic Society.** Indianápolis, USA, 2004.
- [218] AJAMI, E.; ZINSOU, K. F. A. **Calcium phosphate growth at electropolished titanium surfaces.** *Journal of Functional Biomaterials*, n. 3, pp. 327-348, 2012.
- [219] WEN, H. B.; WIJIN, J. R.; CUI, F. Z.; GROOT, K. **Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method.** *Biomaterials*, n. 19, pp. 215-221, 1998.
- [220] LUO, L.; SU, Y.; GUO, J.; FU, H. **Formation of titanium hydride in Ti-6Al-4V alloy.** *Journal of alloys and Compounds*, v. 425, pp. 140-144, 2006.
- [221] BISWAS, A.; SRIKANT, P. V. S.; MANNA, I.; CHATTERJEE, U. K. MAJUMDAR, D. **Chemical oxidation of Ti-6Al-4V for improved wear and corrosion resistance.** *Surface Engineering*, v. 24, n. 6, pp. 442-446, 2008.
- [222] DIKOVA, T. D.; HAHM, M. G.; HASHIM, D. P.; NARAYANAN, T. N.; VAJTAL, R.; AJAYAN, P. M. **Growth mechanism of TiO₂ nanotubes on the Ti-6Al-4V surface.** *MEMS*, Department of Rice University, Houston, USA, 2012.
- [223] SINGH, R.; MARTIN, M.; DAHOTRE, N. B. **Influence of laser surface modification on corrosion behavior of stainless steel 316L and Ti-6Al-4V in simulated biofluid.** *Surface Engineering*, v. 21, n. 4, pp. 297-306, 2005.
- [224] DENOIRJEAN, A.; LEFORT, P.; FAUCHAIS, P. **Nitridation process and mechanism of Ti-6Al-4V particles by dc plasma spraying.** *Phys. Chem. Phys.*, v. 5, pp. 5133-5138, 2003.
- [225] LARSSON C, THOMSEN P, ARONSSON BO, RODAHL M, LAUSMAA, J, KASEMO B, ERICSON, LE. **Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses.** *Biomaterials*, v. 6, n. 17, pp. 605-616, 1996.
- [226] LARSSON C, THOMSEN P, LAUSMAA J, RODAHL M, KASEMO B, ERICSON LE. **Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished**

implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials*, v. 13, n. 15, pp. 1062-1074, 1994.

[227] LAUSMAA J, KASEMO B, MATTSON H, ODELIUS H. **Multi-technique surface characterization of oxide films on electropolished and anodically oxidized titanium.** *Applied Surface Science*, v. 45, pp. 189-200, 1990.

[228] CAI K.; BOSSERT J.; JANDT K. D. **Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?.** *Colloids Surf. B Biointerfaces*, v. 49, pp. 136–144, 2006.

[229] WINKELMANN, M.; GOLD, J.; HAUERT, R.; KASEMO, B.; SPENCER, D. M.; BRUNETTE, D. M., TEXTOR, M. **Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein-and cell-surfaces interactions I: microfabrication and surface characterization.** *Biomaterials*, v. 24, n. 7, pp. 1133–1145, 2003.

[230] H. K. Jang, S. W. Whangbo, H. B. Kim, K. Y. Im, Y. S. Lee, I. W. Lyo, C. N. Whang, G. Kim, H.-S. Lee and J. M. Lee. **Titanium oxide films on Si(100) deposited by electron-beam evaporation at 250°C.** *J. Vac. Sci. Technol. A*, v. 18, n. 3, pp. 917–921, 2000.

[231] BISMARCK, A.; TAHHAN, R.; SPRINGER, J.; SCHULZ, A.; KLAPÖTKE, T. M.; ZELL, H.; MICHAELI, W. **Influence of fluorination on the properties of carbon fibres.** *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 84, pp. 127-134, 1997.

[232] NASÉ, G.; PAPIRER, E.; FIOUX, P.; MOGUET, F.; TRESSAUD, A. **Fluorination of carbon blacks: an x-ray photoelectron spectroscopy study: I. a literature review of XPS studies of fluorinated carbons. XPS investigation of some reference compounds.** *Carbon*, v. 35, n. 2, pp. 175-194, 1997.

[233] HOPFENGÄRTNER, G.; BORGMANN, D.; RADEMACHER, I.; WEDLER, G.; HUMS, E.; SPITZNAGEL, G. W. **XPS studies of oxidic model catalysts: internal standards and oxidation numbers.** *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v. 63, pp. 91-116, 1993.

[234] Zhao, L. Z.; LIU, S. H.; WANG, D. H.; PAN, C. H. **XPS studies of oxide films on transition metals.** *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, v. 52, pp. 571-580, 1990.

[235] ANDERSON, S. L. T. **ESCA investigation of V₂O₅+TiO₂ catalysts for the vapour phase oxidation of alkylpyridines.** *Journal Chem. Soc., Faraday Trans. 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, v. 75, n. 6, pp.1356-1370, 1979.

-
- [236] TILLEY, R. J. D.; HYDE, B. G. **An electron microscopic investigation of the decomposition of V₂O₅.** *J. Phys. Chem. Solids*, v. 31, 1613-1619, 1970.
- [237] HABAZAKI, H., FUSHIMI, K., SHIMIZU, K., SKELDON, P., THOMPSON, G. E. **Fast migration of fluoride ions in growing anodic titanium oxide.** *Electrochem. Commun.*, v. 9, n. 5, pp. 1222–1227, 2007.
- [238] JORGE, P. C.; CONDE, A.; ARENAS, M. A.; RAMON, P. T.; MATYKINA, E.; DAMBORENEA, J. J.; BARRENA, E. G.; ESTEBAN, J. **In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy.** *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 100, n. 7, pp. 1696-1705, 2012.
- [239] CHOU L., FIRTH J. D., UITTO V. J. BRUNETTE D. M. **Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts.** *Journal Cell. Sci.*, v. 108, pp. 1563-73, 1995.
- [240] JAYARAMAN M., MEYER U., BÜHNER M., JOOS U., WIESMANN H. P. **Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro.** *Biomaterials*, v.25, pp. 625-631, 2004.
- [241] MESCHER, A. L. **Digestive Tract.** Ed. Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas. New York: McGraw-Hill, 2010.
- [242] SILVA, T. S. N.; MACHADO, D. C.; VIEZZER, C.; JÚNIOR, A. N.S.; OLIVEIRA, M. G. **Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation. An experimental study.** *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 24, n. 3, 2009.
- [243] BOWERS K. T., KELLER J. C., RANDOLPH B. A., WICK D. G., MICHAELS C. M. **Optimization of surface icromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro.** *Int. J. Oral Maxillofac Implants*, v. 7, pp. 302-10, 1992.
- [244] KELLER J. C., SCHNEIDER G. B., STANFORD C. M., KELLOGG B. **Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment.** *Implant. Dent.*, v. 12, pp. 175-9, 2003.
- [245] OZAWA S, KASUGAI S. **Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture.** *Biomaterials*, v. 17, pp. 23-9, 1996.
- [246] DINIZ M., SADER M., SOARES G. **Superfície de titânio modificada por jateamento mecânico e/ou tratamento ácido.** *Rev. Bras. Odontol.*, v. 58, pp. 135-8, 2001.

-
- [247] BUSER D.; SCHENK R. K.; STEINEMANN S.; FIORELLINI J. P.; FOX C. H.; STICH H. **Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs.** *Journal Biomed. Mater. Res.*, v. 25, pp. 889–902, 1991.
- [248] ZHU X.; CHEN J.; SCHEIDELER L.; ALTEBAEUMER T.; GEIS-GERSTORFER J.; KERN D. **Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces.** *Cells Tissues Organs*, v. 178, pp. 13–22, 2004.
- [249] DI C. M., TOTO P., FELICIANI C., SCARANO A., TULLI A., STROCCHI R., PIATTELLI A. **Spreading of epithelial cells on machined and sandblasted titanium surfaces: an in vitro study.** *Journal Periodontol*, v. 74, pp. 289–295, 2003.
- [250] DELIGIANNI, D. D.; KATSALA, N.; LADAS, S.; SOTIROPOULOU, D.; AMEDEE, J.; MISSIRLIS, Y. F. **Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption.** *Biomaterials*, v. 22, n. 11, pp. 1241-1251, 2001.
- [251] RAZ P.; LOHMANN C. H.; TURNER J.; WANG L.; POYTHRESS N.; BLANCHARD C.; BOYAN B. D.; SCHWARTZ Z. **1alpha, 25(OH)2D3 regulation of integrin expression is substrate dependent.** *J. Biomed Mater. Res. A*, v. 71A, pp. 217–225, 2004.
- [252] ABRAHAMSSON I.; BERGLUNDH T.; LINDER E.; LANG N. P.; LINDHE J. **Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog.** *Clin Oral Implants Re*, v. 15, pp. 381-92, 2004.
- [253] BERGLUNDH T.; GOTFREDSEN K.; ZITZMANN N. U.; LANG N. P.; LINDHE J. **Spontaneous progression of ligature induced periimplantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs.** *Clin. Oral. Implants. Res.*, v. 18, pp. 655-61, 2007.
- [254] DAMÉ, J. A. M. **Reação do tecido subcutâneo de ratos a implantes de Ti cp submetidos a tratamentos superficiais para peri-implantite.** *Tese de Doutorado.* Universidade de São Paulo, 2002.
- [255] GITTENS, R. A.; SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; HYZY, S. L.; GERSTORFER, J. G.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. **A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects.** *Acta Biomaterialia*, v. 10, pp. 2907-2918, 2014.

-
- [256] COUTINHO, M. P. Influência da morfologia e da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro. (**Dissertação de Mestrado em Ciência dos Materiais**). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2007.
- [257] NARAYANAN, R.; KWON, T.; KIM, K. **TiO₂ nanotubes from stirred glycerol/NH₄F electrolyte: Roughness, wetting, behavior and adhesion for implant applications**. *Materials Chemistry and Physics*, v. 117, pp. 460-464, 2009.
- [258] REX, C. C.; MING, C. H.; LEE, T. M. **Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V**. *Biointerphases*, v. 6, n. 3, pp. 87-98, 2011.
- [259] HABASHI, F. **Alloys: Preparation, Properties, Applications**. 1 ed. New York, Wiley-VCH, 1998.
- [260] COLLINGS, E. W.; WELSCH, G.; BOYER, R. **Materials Properties Handbook: Titanium Alloys**. ASM International, 1 ed., 1994.
- [261] LAMBERTI, A.; CHIODONI, A.; SHAHZAD, N.; BIANCO, S.; QUAGLIO, M.; PIRRI, C. F. **Ultrafast room-temperature crystallization of TiO₂ nanotubes exploiting water-vapor treatment**. *Sci. Rep.*, v.5, 2015.
- [262] WANG, D.; LIU, L.; ZHANG, F.; TAO, K.; PIPPEL, E.; DOMEN, K. **Spontaneous phase and morphology transformations of anodized titania nanotubes induced by water at room temperature**. *Nano Lett.*, v. 11, n. 9, pp. 3649-3655, 2011.
- [263] YU, J.; DAI, G.; CHENG, B. **Effect of crystallization methods on morphology and photocatalytic activity of anodized TiO₂ nanotube array films**. *J. Phys. Chem. C*, v. 114, n. 45, pp. 19378-19385, 2010.
- [264] WANG, R.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A.; CHIKUNI, M.; KOJIMA, E.; KITAMURA, A.; SHIMOHIGOSHI, M.; WATANABLE, T. **Photogeneration of highly amphiphilic TiO₂ surfaces**. *Adv. Mater.*, v. 10, n. 2, pp. 135-138, 1998.
- [265] KULKARNI, M.; PATIL-SEN, Y.; JUNKAR, I.; KULKARNI, V. C.; LORENZETTI, M.; IGLIC, A. **Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces**. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v. 129, pp. 47-53, 2015.
- [266] KULKARNI, M.; FLASKER, A.; LOKAR, M.; MRAK-POLJSK, K.; MAZARE, A.; ARTENJAK, A.; CUCNUK, S.; KRALJ, S.; VELIKONJA, A.; SCHMUKI, P.; KRALJ-IGLIC, V.; SODIN-SEMRL, S.; IGLIC, A. **Binding of plasma proteins to titanium dioxide nanotubes with different diameters**. *Int. J. Nanomedicine*, v. 10, pp. 1359-1373, 2015.

-
- [267] GOSSLA, E.; TONNDORF, R.; BERNHARDT, A.; KIRSTEN, M.; HUND, R.-D.; AIBIBU, D.; CHERIF, C.; GELINSKY, M. **Electrostatic flocking of chitosan fibres leads to highly porous, elastic and fully biodegradable anisotropic scaffolds.** *Acta Biomaterialia, In Press*, 2016.
- [268] WEN, C. **Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials**, Woodhead, 2015.
- [269] GIAI, C.; ORTIZ, M. R.; KAPPES, M. A.; SENKO, J.; IANNIZZI, M. **Efficacy of Sterilization Methods and Their Influence on the Electrochemical Behavior of Plain Carbon Steel.** *Journal of The Electrochemical Society*, n. 163, n. 10, C633-C642, 2016.
- [270] MACDONALD D. E; DEO N.; MARKOVIC B.; STRANICK M.; SOMASUNDARAN P. **Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles.** *Biomaterials*, v. 23, pp. 1269–1279, 2002.
- [271] VEZEAU, P.J.; KELLER, J. C.; WIGHTMAN, J. P. **Reuse of healing abutments: an in vitro model of plasma cleaning and common sterilization techniques.** *Implant Dent.*, v. 9, pp. 236–246, 2000.
- [272] SERRO AP, SARAMAGO B. **Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids.** *Biomaterials*, v. 24, pp. 4749–4760, 2003.
- [273] WANG, Y.; WEN, C.; HODGSON, P.; LI, Y. **Biocompatibility of TiO₂ nanotubes with different topographies.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 102, n. 3, pp. 743–751, 2014.
- [274] SCHRADER M. E. **On adhesion of biological substances to low-energy solid-surfaces.** *J. Colloid Interface Sci.*, v. 88, pp. 296–297, 1982.
- [275] BAIER R. E., MEYER A. E., NATIELLA J. R., NATIELLA R. R., CARTER J. M. **Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results.** *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 18, pp. 327–355, 1984.
- [276] Hurbett TA, Ratner BD, Schakenraad JM, Schoen FJ. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.** New York: Academic Press; pp. 133–164, 1996.
- [277] ERIKSSON C, NYGREN H, OHLSON K. **Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone.** *Biomaterials*, v. 25, pp. 4759–4766, 2004.
- [278] BUSER D, BROGGINI N, WIELAND M, SCHENK RK, DENZER AJ, COCHRAN DL, HOFFMANN B, LUSSI A, STEINEMANN SG. **Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface.** *J. Dent. Res.*, v. 83, pp. 529–533, 2004.

-
- [279] WANG, M. L.; TULI, R.; MANNER, P. A.; SHARKEY, P. F.; HALL, D. J.; TUAN, R. S. **Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles.** *Journal of Orthopaedic Research*, v. 21, pp. 697-707, 2003.
- [280] ORTEGA, E. V.; JOS, A.; CAMEÁN, A. M.; MOURELO, J. P.; EGEA, J. J. S. **In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 702, pp. 17-23, 2010.
- [281] RAE, T. **The toxicity of metals used in orthopaedic prostheses. An experimental study using cultured human synovial fibroblasts.** *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 63-B, n. 3, pp. 435-440, 1981
- [282] FARIA, A. C. L.; ROSA, A. L. **In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting.** *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 85B, pp. 504-508, 2008.
- [283] ESPOSITO, M.; HIRSCH, J. M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. **Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II) Etiopathogenesis.** *Eur. J. Oral Sci.*, v. 106, pp. 721-764, 1998.
- [284] OKAZAKI, Y.; RAO, S.; YOSHUMASA, I.; TATEISHI, T. **Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V.** *Biomaterials*, v. 19, pp. 1197-1215, 1998.
- [285] WANG, M. L.; NESTI, L. J.; TULI, R.; LAZATIN, J.; DANIELSON, K. G.; SHARKEY, P. F. **Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells.** *Journal Orthopaedic Research*, v. 20, pp. 1175-1184, 2002.
- [286] SISTA, S.; NOURI, A.; LI, Y.; WEN, C.; HODGSON, P. D.; PANDE, G. **Cell biological responses of osteoblasts on anodized nanotubular surface of a titanium-zirconium alloy.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 101, n. 12, pp. 3416-3430, 2013.
- [287] PARTIDA, E. B.; ULLOA, A. M.; SALAS, B. V.; VELASQUILLO, C.; CARRILLO, M.; ESCAMILLA, A.; VALDEZ, E.; VILLARREAL, F. **Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution.** *Materials*, v. 8, pp. 867-883, 2015.

-
- [288] STAN, M.S.; MEMET, I.; FRATILA, C.; KRASICKA-CYDZIK, E.; ROMAN, I.; DINISCHIOTU, A. **Effects of titanium-based nanotube films on osteoblast behavior in vitro.** *J. Biomed. Mater. Res. A*, v. 103, pp. 48–56, 2014.
- [289] CUI, D-Z; PARK, K-D; LEE, K-K; JUNG, Y-S; LEE, BO-AH; LEE, Y-J.; KIM, O-S; CHUNG, H.-J.; KIM, Y-J. **Surface characteristics and osteoblastic cell response to titanium-8tantalum-3neobium alloy.** *Applied Surface Science*, v. 262, pp. 107-109, 2012.
- [290] WANG, H.; ZHAO, B.; LIU, C.; WANG, C.; TAN, X.; HU, M. **A comparasion of biocompatibility of a titanium alloy fabricated by electron beam melting and selective laser melting.** *PLOS ONE*, v. 11, v. 7, pp. 1-19, 2016.
- [291] HAN, T.; CHANG, B.; DING, X.; YUE, G.; SONG, W.; TANG, H.; JIA, L.; ZHAO, L.; ZHANG, Y. **Improved bone formation and ingrowth for the additively manufactured porous Ti6Al4V bone implants with strontium laden nanotube array coating.** *RSC Advances*, pp. 1-45, 2016.
- [292] HU, Y.; CAI, K.; LUO, Z.; XU, D.; XIE, D.; HUANG, Y.; YANG, W.; LIU, P. **TiO₂ nanotubes as drug nanoreservoirs for the regulation of mobility and differentiation of mesenchymal stem cells.** *Acta Biomater.*, v. 8, n. 1, pp. 439-448, 2012.
- [293] BRAMMER, K.S.; OH, S.; COBB, C.J.; BJURSTEN, L.M.; VAN DE HEYDE, H.; JIN, S. **Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface.** *Acta Biomater.*, v. 5, pp. 3215–3223, 2009.
- [294] BOYAN, B. D.; BATZER, R.; KIESWETTER, K.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; SZMUCKLER-MONCLERS, S.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. **Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblastic-like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃.** *Journal Biomed. Mater. Res.*, v. 39, pp. 77-85, 1998.
- [295] FUJIMORI S. **Surface characterization of titanium plates with different surface treatments and cellular proliferation and expression of osteoblast-like cells in vitro on their surface.** *Journal Dent. Mater.*, v. 14, pp. 155-168, 1995.
- [296] BOYAN, B. D; LOSSDORFER, S.; WANG, L.; ZHAO, G.; LOHMANN, C. H.; COCHRAN, D. L.; SCHWARTZ Z. **Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies.** *Eur. Cell Mater.*, v. 6, pp. 22–27, 2003.