

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

**EFEITO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES
DE REVESTIMENTOS HÍBRIDOS E SOBRE A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Estela Knopp Kerstner Baldin

Porto Alegre
2018.

Estela Knopp Kerstner Baldin

**EFEITO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES
DE REVESTIMENTOS HÍBRIDOS E SOBRE A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia, modalidade Acadêmica.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmary Nichele Brandalise

Porto Alegre

2018.

Estela Knopp Kerstner Baldin

**EFEITO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES
DE REVESTIMENTOS HÍBRIDOS E SOBRE A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Esta tese foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de doutor em engenharia, área de concentração ciência e tecnologia dos materiais e avaliada em sua forma final, pela orientadora e pela banca examinadora do curso de pós-graduação.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmary Nichele Brandalise

Coordenador do PPGE3M: Prof. Dr. Carlos Perez Bergmann

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Christiam Viezzer - Universidade Franciscana (UNF)

Prof^a. Dr^a. Melissa Camassola – Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)

Prof^a. Dr^a. Silvia Tamborim – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Leonardo Antonini – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela vida, pelas oportunidades que me concedeu e por me mostrar mais uma vez que tudo tem o seu tempo certo para acontecer.

A minha orientadora Profa. Dra. Célia de Fraga Malfatti pela oportunidade, orientação, ensinamentos, dedicação e por acreditar e confiar no meu trabalho. Muito obrigada por toda a sua exigência, tenho certeza que fez amadurecer muito pessoal e profissionalmente.

A minha ex-coorientadora Profa. Dra. Lisete Scienza que inicialmente me proporcionou a possibilidade de realizar a interação entre a UFRGS e a UCS e também me apoiando na decisão de optar por cursar a pós-graduação.

A minha atual coorientadora Profa. Dra. Rosmary Brandalise pela confiança, compreensão, dedicação e ensinamentos.

Ao meu esposo Oscar que me ajudou incondicionalmente na realização deste trabalho, por inúmeras vezes me mostrar o outro lado das coisas, tornando-as sempre mais fáceis. Obrigada pelo seu companheirismo, cumplicidade e amor.

Aos meus pais Ermindo e Maria Luiza que acreditaram e me incentivaram em toda a minha formação pessoal e acadêmica. Agradeço pelo amor incondicional de vocês, demonstrado principalmente na difícil situação que nossa família passou durante um período deste doutorado.

Ao meu irmão Fabiano pelo apoio e amizade que sempre me proporcionou. À minha irmã Catiane e ao meu cunhado Rafael pela amizade e receptividade em POA e por nunca terem medido esforços para me ajudar.

A todos os meus colegas do LAPEC, especialmente Elen, Gustavo, Alexander e Leonardo, por toda a amizade, pelos momentos de descontração e por toda a ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LPOL Paula, Aline, Damiani e Matheus que compartilharam comigo vários momentos de alegria e que se fizeram presentes também nos momentos difíceis, obrigada pelos conselhos e paciência.

À Empresa Esterilizare e ao Hospital Pompéia de Caxias do Sul, especialmente ao Sr. Roberto, à Caroline e ao Michel por toda ajuda e disponibilidade para a realização dos processos de esterilização.

As Profas. Dras. Mariana Ely e Patrícia Pranke por todo o interesse em meu trabalho e pela disponibilidade de seus laboratórios sendo esses fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. As suas alunas Charlene e Daniela, obrigada por toda a ajuda e apoio na realização dos ensaios biológicos e na discussão dos resultados.

À Prof. Dra. Eliena Birriel primeiramente pela confiança, pela abertura de seu laboratório e por toda a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bruno Meira pelo auxílio na realização de algumas análises.

À Prof. Dra. Iduvirges Lourdes Muller por compartilhar todo o seu conhecimento nos seminários de discussão científica do LAPEC, contribuindo imensamente para o conteúdo deste trabalho.

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

A CAPES pelo apoio financeiro, o qual tornou possível a realização deste trabalho.

O meu reconhecimento a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

**“A menos que modifiquemos à nossa
maneira de pensar, não seremos capazes de
resolver os problemas causados pela forma
como nos acostumamos a ver o mundo”.**

Albert Einstein

RESUMO

Revestimentos híbridos silanos têm sido aplicados sobre a liga de Ti6Al4V como forma de melhorar sua resistência à corrosão e sua propriedade de bioatividade. No contexto de funcionalização de superfícies, a introdução de células-tronco em estruturas objetivando o crescimento de novos tecidos tem sido muito estudada, como por exemplo, no processo de osteointegração. No entanto, ao final do desenvolvimento de biomateriais, a escolha do processo de esterilização deve ser cuidadosamente considerada, uma vez que essa pode comprometer as propriedades requeridas para os mesmos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de 3 diferentes processos de esterilização: autoclave a vapor, plasma de peróxido de hidrogênio e óxido de etileno, sobre as propriedades de um revestimento híbrido silano e sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. Para isso, os revestimentos foram obtidos a partir de um sol constituído pelos precursores silanos Tetraetoxisilano (TEOS) e Metiltrietoxisilano (MTES), aplicados sobre o substrato de Ti6Al4V. Para promover a bioatividade, partículas de hidroxiapatita foram dispersas em um segundo revestimento (TEOS/MTES + hidroxiapatita) aplicado sobre o primeiro (TEOS/MTES). Após a esterilização, os revestimentos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, perfilometria, molhabilidade e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. O comportamento eletroquímico foi avaliado por monitoramento do potencial de circuito aberto e curvas de polarização potenciodinâmicas. A citocompatibilidade para células MG-63 foi avaliada para o revestimento protetivo e a diferenciação osteogênica para o revestimento bioativo aplicado sobre a camada protetiva. Os resultados mostraram que após a esterilização o efeito barreira do revestimento protetivo foi comprometido e isso pode ser associado às modificações superficiais ocasionadas pelos mesmos. Todos os processos de esterilização provocaram modificações morfológicas no revestimento bioativo, aumentando a bioatividade do mesmo. As esterilizações por óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio intensificaram a degradação hidrolítica do revestimento bioativo e a partir disso os mesmos apresentaram maiores índices de liberação de silício. Os revestimentos bioativos esterilizados não apresentaram citotoxicidade às células-tronco mesenquimais. O comportamento de adesão, viabilidade e diferenciação osteogênica foi favorecido sobre o revestimento esterilizado por plasma de peróxido de hidrogênio, comportamento oposto ao observado para o revestimento esterilizado por óxido de etileno.

ABSTRACT

Silane hybrid coatings have been applied on the Ti6Al4V alloy as a way to improve their corrosion resistance and their bioactivity properties. In the context of surface functionalization, the introduction of stem cells into structures, aiming at the growth of new tissues, has been much studied as, for example, in the process of osteointegration. However, at the end of the development of biomaterials, the choice of the sterilization process should be carefully considered, once this may compromise the properties required for it. The aim of the present work was to evaluate the influence of three different sterilization processes: steam autoclave, hydrogen peroxide plasma and ethylene oxide, on the protective and bioactive properties of a hybrid silane coating. For this, the coatings were obtained from a sol consisting of the precursor silanes Tetraethoxysilane (TEOS) and precursor Methyltriethoxysilane (MTES), applied on Ti6Al4V. To promote bioactivity, hydroxyapatite particles were dispersed in a second coating (TEOS/MTES + hydroxyapatite) applied on the first (TEOS/MTES). After sterilization, coatings were evaluated by scanning electron microscopy, atomic force microscopy, profilometry, wettability and fourier transform infrared spectroscopy. The electrochemical behavior was evaluated by monitoring the open circuit potential and the potentialdynamic polarization curves. The cytocompatibility of MG-63 cells was evaluated for the protective coating and osteogenic differentiation for the bioactive coating applied on the protective layer. The results showed that after sterilization the barrier effect of the protective coating was compromised, and this may be associated with the surface modifications caused by the coating. All sterilization methods caused morphological modifications in the bioactive coating, increasing its bioactivity. Sterilization by ethylene oxide and hydrogen peroxide plasma intensified the hydrolytic degradation of the bioactive coating and from this they showed higher rates of silicon release. Sterilized bioactive coatings did not show cytotoxicity to mesenchymal stem cells. The behavior of adhesion, viability and osteogenic differentiation was favored on the sterilized coating of hydrogen peroxide plasma, behavior opposite to the observed coating sterilized by ethylene oxide.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo químico das reações de hidrólise e condensação para obtenção de revestimentos híbridos a partir de alcoxissilanos e organoalcoxissilanos.....	11
Figura 2. Esquema representativo da etapa de adsorção e condensação dos silanos sobre a superfície metálica.	11
Figura 3. Representação da técnica de deposição de filmes por <i>dip coating</i> ; (A) imersão da amostra, (B) retirada da amostra com velocidade controlada e (C) evaporação com a formação de uma camada de sol-gel.....	16
Figura 4. Representação esquemática do processo de osteointegração.....	18
Figura 5. Diferentes escalas da rugosidade superficial de um implante e o tecido/células do corpo humano.	26
Figura 6. Fluxograma das etapas de obtenção do revestimento protetivo e dos processos de esterilização.	37
Figura 7. Fluxograma das etapas de obtenção do revestimento bioativo e dos processos de esterilização.	39
Figura 8. Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo de diferenciação das células-tronco mesenquimais.	42
Figura 9. Ilustração das interações entre a superfície e o líquido para determinação do valor de ângulo de contato.....	49
Figura 10. Microestrutura por microscopia óptica da liga Ti6Al4V revelada pelo ataque com uma solução <i>Kroll</i> (HF/HNO ₃ /H ₂ O) durante 15 segundos.....	60
Figura 11. FTIR (A) dos reagentes alcoxissilano (TEOS) e organoalcoxissilano (MTES) e (B) das soluções após 3 e 24 horas de hidrólise da solução de TEOS/MTES.....	61
Figura 12. FTIR do filme híbrido após as etapas de condensação e cura a 450 °C.	62
Figura 13. Curva TG da solução TEOS/MTES após 24 horas de hidrólise.	63
Figura 14. Curva TG do revestimento híbrido após etapa de cura à 450 °C.	64
Figura 15. Micrografias no MEV/FEG do substrato metálico e do revestimento híbrido protetivo. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).	65
Figura 16. Micrografias no MEV/FEG das áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento da composição química elementar de acordo com a composição do	

revestimento, (B) região de destacamento do filme do substrato de Ti6Al4V com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.	66
Figura 17. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM em água, DMEM e SBF.	67
Figura 18. Imagens obtidas por AFM: (A) Ti6Al4V e (B) Ti6Al4V/TM.	69
Figura 19. Potencial de circuito aberto (OCP) diário em SBF a 37 ± 3 °C durante 672 horas de imersão das amostras Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM.	70
Figura 20. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após 1 hora e 672 horas de imersão.	71
Figura 21. Curvas de polarização em SBF a 37 ± 3 °C após 1 hora e 672 horas de imersão.	72
Figura 22. Micrografias no MEV/FEG após o ensaio de polarização das amostras imersas por 672 horas em SBF a 37 ± 3 °C; (A, B e C) Ti6Al4V e (D, E, F e G) Ti6Al4V/TM. Imagens obtidas em diferentes ampliações (A, B e C) 5.000, 10.000 e 50.000 x original, respectivamente e (D e F) 1.000 x original e (E e G) 5.000 x original.	73
Figura 23. Micrografias no MEV/FEG do substrato de Ti6Al4V após esterilização com os diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes ampliações (500 x original e 20.000 x original).	75
Figura 24. Micrografias no MEV/FEG do revestimento protetivo após esterilização com os diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes ampliações (500 x original e 20.000 x original).	76
Figura 25. Micrografias obtidas por MEV/FEG das áreas analisadas em ensaio de adesão do revestimento protetivo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes ampliações (500 x original e 40.000 x original).	77
Figura 26. FTIR do revestimento híbrido protetivo antes do processo de esterilização e esterilizado pelos diferentes processos.	78
Figura 27. Imagens obtidas por AFM para (A) Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos: (B) Ti6Al4V _{OE} , (C) Ti6Al4V _{AC} e (D) Ti6Al4V _{PH}	80
Figura 28. Imagens obtidas por AFM para (A) Ti6Al4V/TM não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos: (B) Ti6Al4V/TM _{OE} , (C) Ti6Al4V/TM _{AC} e (D) Ti6Al4V/TM _{PH}	83
Figura 29. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.	86

Figura 30. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos.....	88
Figura 31. Potencial de circuito aberto (OCP) diário em SBF a 37 ± 3 °C durante 672 horas de imersão; (A) Ti6Al4V e (B) Ti6Al4V/TM esterilizadas com diferentes processos.....	90
Figura 32. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão de Ti6Al4V esterilizado com diferentes processos.	92
Figura 33. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão de Ti6Al4V/TM esterilizado com diferentes processos.	93
Figura 34. Curvas de polarização de Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão.....	95
Figura 35. Curvas de polarização de Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão.....	97
Figura 36. Micrografias no MEV/FEG após o ensaio de polarização de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados pelos diferentes processos e imersos por 672 horas em SBF a 37 ± 3 °C. Imagens obtidas em diferentes ampliações (5.000 x original e 50.000 x original).	99
Figura 37. Citotoxicidade de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados por diferentes processos sobre a viabilidade de células MG-63 tratadas durante 1, 2 e 7 dias com o extrato obtido pela realização de ensaio indireto de acordo com norma ISO 10993-5-2009-2. *Letras correspondem as diferenças estatisticamente significativas, utilizando-se o teste ANOVA-Tukey ($p \leq 0,05$).	101
Figura 38. Morfologia celular de MG-63 tratadas durante 1, 2 e 7 dias visualizadas em microscopia de luz invertida com aumento de 200 x.	102
Figura 39. Porcentagem de células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio após realização de ensaio de contato direto de acordo com norma ISO 10993-5-2009-2, com modificações. (*Letras correspondem as diferenças estatisticamente significativas, utilizando-se o teste ANOVA-Tukey $p \leq 0,05$).....	103
Figura 40. Células MG-63 coradas com laranja de acridina e brometo de etídio visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 200 x.	105
Figura 41. Morfologia no MEV/FEG das células MG-63 sobre as superfícies de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizadas pelos diferentes processos após 2 e 7 dias de incubação. Imagens obtidas com ampliação de 150 x original.	106

Figura 42. Micrografias no MEV/FEG das partículas de hidroxiapatita na forma como recebida. Imagens obtidas em diferentes magnificações (50.000 x original e 250.000 x original).	109
Figura 43. Tamanho das partículas de hidroxiapatita obtida em Difração de raio laser <i>versus</i> tempo de moagem.	110
Figura 44. FTIR da hidroxiapatita antes e após a etapa de moagem por 60 minutos em moinho planetário.	111
Figura 45. Curvas TG da hidroxiapatita antes e após a etapa de moagem por 60 minutos em moinho planetário.	112
Figura 46. FTIR da solução de TEOS/MTES hidrolisada com a adição das partículas de hidroxiapatita após 1 hora e 24 horas.	113
Figura 47. FTIR do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C... 114	
Figura 48. Curvas TG da solução TEOS/MTES hidrolisada após 1 e 24 horas da adição de partículas de hidroxiapatita.	115
Figura 49. Curvas TG do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.	116
Figura 50. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado nas diferentes temperaturas; (A e B) Ti6Al4V/TM/TM _{HA-60°C} (C e D) Ti6Al4V/TM/TM _{HA-150°C} . Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original). ...	117
Figura 51. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado a 60 °C em diferentes áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento elementar de acordo com a composição do revestimento, (B) região de destacamento com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.	118
Figura 52. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado a 150 °C em diferentes áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento elementar de acordo com a composição do revestimento, (B) região de destacamento com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.	118
Figura 53. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V/TM/TM _{HA} curado nas temperaturas de 60 e 150 °C em água, DMEM e SBF.	120
Figura 54. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo antes e após a esterilização pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).	122
Figura 55. Micrografias no MEV/FEG das áreas analisadas após a realização do ensaio de adesão do revestimento bioativo (TEOS/MTES + HA, curado a 60 °C) aplicado sobre	

o revestimento protetivo e esterilizado pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).....	123
Figura 56. FTIR do revestimento híbrido bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos.....	124
Figura 57. Medida de ângulo de contato médio obtido para Ti6Al4V/TM/TM _{HA} esterilizado com os diferentes processos em água, DMEM e SBF.	126
Figura 58. Coeficiente de atrito (COF) do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos em função do tempo (carga de 0,3 N, frequência de 1 Hz e comprimento da trilha de 0,2 mm, contra corpo = esfera de zircônia estabilizada com ítria).	127
Figura 59. Micrografias no MEV/FEG das trilhas e das esferas após a realização dos ensaios de desgaste; (A) Ti6Al4V/TM/TM _{HA} , (B) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/OE} , (C) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/AC} e (D) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/PH} . Imagens obtidas em diferentes magnificações (250 x original e 5.000 x original).....	129
Figura 60. Difratoogramas de DRX para o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1 e 28 dias em SBF; (A) Ti6Al4V/TM/TM _{HA} , (B) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/OE} , (C) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/AC} e (D) Ti6Al4V/TM/TM _{HA/PH}	130
Figura 61. Variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos imersos por 1, 7, 14 e 28 dias em SBF.	131
Figura 62. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1 e 28 dias em SBF a 37 ± 3 °C. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original). ...	133
Figura 63. Variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1, 7, 14, 28 e 60 em solução DMEM.	135
Figura 64. Imagens de diferenciação celular: (A) diferenciação adipogênica, (B) diferenciação osteogênica, (C) diferenciação condrogênica e (D) controle – células não submetidas aos protocolos de diferenciação.....	139
Figura 65. Citotoxicidade do revestimento bioativo esterilizado por diferentes processos mensurado pela dosagem de LDH no sobrenadante após 1, 4 e 9 dias de exposição das células-tronco mesenquimais sobre os revestimentos. (***) correspondem as diferenças estatisticamente significativas obtidas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,001$).	140
Figura 66. Comportamento de adesão das células-tronco mesenquimais sobre o revestimento bioativo esterilizado com os diferentes processos.	141

Figura 67. Células-tronco mesenquimais coradas com DAPI e visualizadas em microscopia de luz invertida com aumento de 400 x.	142
Figura 68. Viabilidade das células-tronco mesenquimais após 1, 4 e 9 dias de exposição sobre o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos. (* corresponde as diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,05$).	142
Figura 69. Morfologia das células-tronco sobre o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos após 1, 4 e 9 dias.	144
Figura 70. Mineralização óssea quantificada indiretamente pela deposição de cálcio decorrente da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais em contato por 21 dias com o revestimento bioativo esterilizado por diferentes processos. (* corresponde as diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,05$).	146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos precursores à base de silanos.	35
Tabela 2. Programa de temperatura para a determinação de Si por HR-CS GF AAS. ...	52
Tabela 3. Codificação e descrição das amostras deste estudo.	58
Tabela 4. Comparação da composição química elementar mínima exigida pela norma ASTM F136-13 e a descrita no certificado de qualidade do fornecedor.	59
Tabela 5. Ângulos de contato médios para Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM em água, DMEM e SBF.	67
Tabela 6. Valores médios de rugosidade micrométrica determinados por perfilometria de contato.	68
Tabela 7. Valores médios de rugosidade nanométrica determinados por AFM.	68
Tabela 8. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos.	79
Tabela 9. Valores médios de rugosidade em escala nanométrica determinados por AFM para Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos.	79
Tabela 10. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V/TM não esterilizado e esterilizado com os diferentes processos.	82
Tabela 11. Valores médios de rugosidade em escala nanométrica determinados por AFM para Ti6Al4V/TM não esterilizado e esterilizado com os diferentes processos.	82
Tabela 12. Ângulos de contato médios para Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.	86
Tabela 13. Ângulos de contatos médios obtidos para Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.	88
Tabela 14. Ângulos de contato médios obtidos para Ti6Al4V/TM/TMHA curado nas temperaturas de 60 e 150 °C em água, DMEM e SBF.	119
Tabela 15. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V/TM/TM _{HA} não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos.	125

Tabela 16. Ângulos de contato médios obtidos para Ti6Al4V/TM/TM _{HA} esterilizado com os diferentes processos em água, DMEM e SBF.....	126
Tabela 17. Determinação direta de Si (mg.L ⁻¹) por HR-CS GF AAS.....	136
Tabela 18. Média de expressão imunofenotípica (n=3) de marcadores de células mesenquimais e não-mesenquimais.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscópio de força atômica
APTES	Aminopropiltriétoxisilano
APTMS	Aminopropiltrimetóxisilano
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR	Reflexão total atenuada
BTSE	Bistriétoxisilietano
CaP	Fosfato de cálcio
COF	Coefficiente de atrito
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindole
DETA	Dietil triamina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios-X
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
ECM	Matriz extracelular
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FURG	Fundação Universidade do Rio Grande
GPTMS	Glicidoxipropiltrimetóxisilano
HA	Hidroxiapatita
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HR-CS GF AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em forno de grafite
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão
LDH	Lactato desidrogenase
Me	Metal
MEV/FEG	Microscópio de varredura de alta resolução
MO	Microscopia óptica

MPTMS	Metacriloxipropiltrimetoxisilano
MTES	Metiltriétoxisilano
MTMOS	Metiltrimetoxisilano
MTT	Brometo de 3- (4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<i>mi</i>	Massa inicial
<i>mf</i>	Massa final
OCP	Potencial de circuito aberto
PBS	Solução tampão de fosfato salino (PBS)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFDS	Perfluorodeciltriclorosilano
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
P/S	Penicilina/Estreptomicina
Ra	Rugosidade média da superfície
Ry	Distância entre o pico mais alto e o vale mais profundo dentro da linha de medição
Rz	Rugosidade média aritmética dos cinco pontos de maior afastamento, acima e abaixo de uma linha média de medição
Rms	Rugosidade média quadrática
RSD	Desvio padrão
SBF	Solução simulada de fluido corpóreo
SFB	Soro fetal bovino
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TEOS	Tetraétoxisilano
TGA	Análise termogravimétrica
TMOS	Tetrametoxisilano
u.a.	Unidade alternativa
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
°	Graus
#	Gramatura
λ	Lambda
Δ	Delta
θ	Theta
α	Alfa
β	Beta
ppm	Partes por milhão
atm	Atmosfera
μ	Microns
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
cm	Centímetros
g	Gramas
mg	Miligramas
μg	Microgramas
L	Litro
mL	Mililitros
μL	Microlitros
V	Volts
mV	Milivolts
s	Segundos
min	Minutos
h	Horas
v/v	Volume/volume
cm^2	Centímetro quadrado
m^3	Metro cúbico
R^2	Coefficiente de determinação
N	Newton

Hz	Hertz
A	Ampere
E_{ECS}	Potencial em relação ao eletrodo de calomelano saturado
i	Densidade de corrente
M	Molaridade
rpm	Rotação por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
Si	Silício
O	Oxigênio
Ti	Titânio
Zr	Zircônio
Al	Alumínio
Fe	Ferro
Mg	Magnésio
V	Vanádio
Pd	Paládio
TiO_2	Dióxido de titânio
SiO_2	Dióxido de silício
CO_2	Dióxido de carbono
HF	Ácido fluorídrico
HNO_3	Ácido nítrico
H_2O	Água
NaOH	Hidróxido de sódio
$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	Hidroxiapatita
N_2	Gás nitrogênio
Ca^{+2}	Íon cálcio
Mg^{+2}	Íon magnésio
PO_3^{-4}	Íon fosfato
CaO	Óxido de cálcio
CH_3	Metila
OH	Hidroxila
Ti6Al4V	Liga titânio, alumínio e vanádio
Co–Cr–Mo	Liga cobalto, cromo e molibdênio
NiTi	Liga níquel e titânio (Nitinol)

MgCa

Liga magnésio e cálcio

AISI 316 L

Aço cromo, níquel e molibdênio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	Objetivo geral	3
2.2.	Objetivos específicos	3
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1.	Biomateriais	4
3.1.1.	Biomateriais metálicos.....	5
3.2.	Revestimentos à base de precursores silanos pelo método sol-gel.....	8
3.2.1.	Revestimentos híbridos à base de precursores silanos em biomateriais	12
3.1.2.	Revestimentos utilizados como suportes extracelulares	17
3.2.	Efeito das propriedades superficiais sobre o comportamento celular.....	23
3.2.2.	Molhabilidade	24
3.2.3.	Rugosidade.....	25
3.3.	Processos de esterilização e biomateriais	27
3.3.2.	Esterilização térmica.....	29
3.3.3.	Esterilização química.....	30
3.3.4.	Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1.	Materiais	34
4.2.	Métodos	35
4.2.2.	Preparação do substrato metálico.....	35
4.2.3.	ETAPA 1: Obtenção do revestimento híbrido protetivo	36
4.2.4.	ETAPA 2: Obtenção do revestimento híbrido bioativo.....	38
4.2.5.	Processos de esterilização	40
4.2.5.1.	Esterilização em autoclave.....	41
4.2.5.2.	Esterilização por óxido de etileno.....	41
4.2.5.3.	Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio	41
4.2.6.	ETAPA 3: Diferenciação de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento bioativo.....	42
4.2.6.1.	Obtenção das células-tronco mesenquimais	43
4.2.6.2.	Caracterização das células-tronco mesenquimais	43
4.2.6.3.	Diferenciação osteogênica (Mineralização).....	45
4.2.7.	Caracterizações das amostras.....	46

4.2.7.1. Microestrutura do substrato Ti6Al4V	46
4.2.7.2. Espectroscopia no infravermelho.....	46
4.2.7.3. Análise termogravimétrica.....	47
4.2.7.4. Microscopia de varredura de alta resolução.....	47
4.2.7.5. Ensaio de adesão	47
4.2.7.6. Rugosidade.....	48
4.2.7.7. Ângulo de contato	48
4.2.7.8. Caracterização eletroquímica.....	49
4.2.7.9. Difração de raios-X.....	50
4.2.7.10. Resistência ao desgaste por abrasão	50
4.2.7.11. Degradação hidrolítica	50
4.2.7.12. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em forno de grafite	51
4.2.7.13. Estudo da bioatividade.....	53
4.2.7.14. Caracterização biológica.....	53
4.2.7.14.1. Cultura celular sobre revestimento híbrido protetivo	54
4.2.7.14.2. Cultura celular sobre revestimento híbrido bioativo	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Obtenção e esterilização do revestimento híbrido protetivo - ETAPA 1.....	59
5.1.1. Obtenção e caracterização do revestimento híbrido protetivo.....	59
5.1.1.1. Caracterização química do revestimento protetivo.....	60
5.1.1.2. Caracterização térmica.....	63
5.1.1.3. Caracterização morfológica	65
5.1.1.4. Caracterização eletroquímica.....	69
5.1.2. Influência dos processos de esterilização sobre o revestimento protetivo.....	74
5.1.2.1. Caracterização morfológica	74
5.1.2.2. Caracterização eletroquímica.....	89
5.1.2.3. Caracterização biológica.....	100
5.1.2.3.1. Citotoxicidade.....	100
5.1.2.3.2. Viabilidade, adesão e morfologia celular	102
5.1.3. Conclusões parciais.....	107
5.2. Obtenção e esterilização do revestimento híbrido bioativo - ETAPA 2.....	109
5.2.1. Obtenção e caracterização do revestimento híbrido bioativo.....	109
5.2.1.1. Caracterização das partículas de hidroxiapatita.....	109

5.2.1.2. Caracterização química.....	113
5.2.1.3. Caracterização térmica.....	115
5.2.1.4. Caracterização morfológica	116
5.2.2. Influência dos processos de esterilização sobre o revestimento híbrido bioativo.....	121
5.2.2.1. Caracterização morfológica	121
5.2.2.2. Resistência ao desgaste por abrasão	127
5.2.2.3. Estudo da bioatividade.....	130
5.2.2.4. Comportamento de degradação do revestimento híbrido bioativo e liberação de silício.....	134
5.2.3. Conclusões parciais.....	137
5.3. Estudo do comportamento de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento híbrido protetivo e bioativo - ETAPA 3	139
5.3.1. Citotoxicidade.....	140
5.3.2. Adesão, viabilidade e morfologia celular	141
5.3.3. Diferenciação osteogênica	145
5.3.4. Conclusões parciais.....	147
6. CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS	152

1. INTRODUÇÃO

Com aumento da perspectiva de vida da sociedade, a bioengenharia é uma das áreas científicas que tem demonstrado grande desenvolvimento com aplicações inovadoras. Utilizando fundamentos e métodos das áreas das engenharias e das ciências da saúde, visa acelerar e/ou tornar possível o reparo de tecidos ou órgãos humanos defeituosos ou faltantes, de forma transitória ou permanente. Os materiais usados em tais desenvolvimentos e aplicações são denominados de biomateriais (ORÉFICE, 2006).

Entre os biomateriais metálicos, o titânio e suas ligas têm sido amplamente empregados na fabricação de implantes devido às suas propriedades mecânicas, resistência à corrosão e por serem considerados materiais de excelente biocompatibilidade (CHEN, WANG E YUAN, 2013). Entretanto, problemas *in vivo* relacionados à corrosão de dispositivos de titânio implantados têm sido reconhecidos com a liberação de níveis significativos de titânio para o ambiente corpóreo (YU, ADDISON E DAVENPORT, 2015). No caso de ligas, tais como Ti6Al4V, a dissolução dos íons titânio, alumínio e vanádio também pode afetar a biocompatibilidade do dispositivo (SAJNÓG et al., 2018). Da mesma forma, as superfícies de titânio constituem-se em um ambiente adequado para a adesão e proliferação bacteriana, favorecendo a formação de biofilme, que é geralmente inacessível ao sistema imunológico (RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013). Aliado a isso, a bioatividade destas superfícies não é elevada o suficiente para induzir o crescimento do tecido ósseo e promover uma boa fixação (osteointegração) (CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011).

Assim, com o objetivo de melhorar o índice de sucesso clínico de implantes metálicos, estudos na área de biomateriais buscam modificar as características desses pelo uso de revestimentos biofuncionais (BALLARRE et al., 2010). Na literatura a aplicação de revestimentos protetores sobre implantes metálicos é comumente estudada. Do mesmo modo, ressalta-se também a utilização de revestimentos bioativos à base de fosfato de cálcio, especificamente hidroxiapatita, visando a melhora do processo de osteointegração (GOODMAN et al., 2013). Porém, o uso de revestimentos unicamente cerâmicos se torna restrito, devido à insatisfatória adesão dos mesmos com os substratos metálicos junto as problemáticas geradas pelas propriedades mecânicas oriundas dos materiais cerâmicos (OLIVEIRA et al., 2010; CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011).

Alguns estudos têm utilizado revestimentos híbridos orgânicos-inorgânicos preparados pelo método sol-gel para aplicação em biomateriais (OWENS et al., 2016). Dentre esses, destaca-se o êxito do desenvolvimento de revestimentos híbridos com precursores à base de silício (silanos) (BALLARRE et al., 2011; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013). Estes revestimentos têm sido estudados tanto para promover a melhora do desempenho à corrosão de próteses metálicas, como também para a obtenção de revestimentos biofuncionalizados, devido a possibilidade da incorporação de fármacos e partículas bioativas aos mesmos (ZOMORODIAN et al. 2012; LIU et al., 2013). Ainda assim, em biomateriais a liberação de silício oriundo destes revestimentos tem sido avaliada por alguns autores devido a influência do mesmo na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (CHEN E KO, 2013; MARTÍNEZ-IBÁÑEZ et al., 2016).

Para a posterior implantação do biomaterial, deve-se garantir a condição de esterilização dos mesmos. O processo de esterilização é uma etapa de suma importância para o uso de biomateriais em seres vivos, uma vez que o mesmo proporciona principalmente a eliminação de microrganismos do material e a prevenção da transmissão de doenças (PARK et al., 2012; GALANTE et al. 2017). Para a escolha da técnica de esterilização a ser empregada deve-se considerar o tipo de material submetido ao procedimento. Alguns autores relataram o efeito de diferentes processos de esterilização nas propriedades de substratos de titânio e nanotubos de TiO_2 (PARK et al., 2012; JUNKAR et al., 2016).

Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção de revestimentos híbridos silanos com propriedades protetivas e bioativas (pela incorporação de partículas de hidroxiapatita) pelo método sol-gel, aplicados sobre a liga de $Ti6Al4V$. Além disso, estudou-se também a influência de diferentes processos de esterilização nas propriedades dos revestimentos obtidos, em relação às modificações morfológicas, físico-químicas, eletroquímicas e mecânicas, bem como no comportamento de diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

É objetivo deste trabalho avaliar o efeito de processos de esterilização sobre as propriedades de revestimentos híbridos (camada protetiva: TEOS/MTES e camada bioativa: TEOS/MTES + hidroxiapatita) aplicados em Ti6Al4V e sobre o comportamento de diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

2.2. Objetivos específicos

Buscando atender ao objetivo geral, os objetivos específicos devem ser atendidos.

- a) Definir método e parâmetros processuais que possibilitem a obtenção por sol-gel de um revestimento híbrido (TEOS/MTES) aderente e protetivo ao substrato metálico de Ti6Al4V;
- b) Avaliar o efeito de diferentes processos de esterilização sobre as propriedades do revestimento híbrido protetivo proposto;
- c) Definir método e parâmetros processuais que possibilitem a obtenção de um revestimento híbrido bioativo (TEOS/MTES com adição de partículas de hidroxiapatita) aderente ao revestimento protetivo (TEOS/MTES);
- d) Avaliar o efeito de diferentes processos de esterilização sobre as propriedades do revestimento híbrido bioativo obtido;
- e) Investigar o efeito de diferentes processos de esterilização sobre o revestimento híbrido protetivo e bioativo avaliando o comportamento de adesão, viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Biomateriais

A bioengenharia é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados (OLIVEIRA et al., 2010). Atualmente vivenciam-se experiências anteriormente vistas com o auxílio da medicina e da engenharia por meio do desenvolvimento de novos materiais, os chamados biomateriais. Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética que tem como função substituir, de forma transitória ou permanente, tecidos, órgãos ou funções do corpo humano (CHEN E THOUAS, 2015).

Segundo Oréfice, (2006), biomateriais podem ser classificados em metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais) e compósitos. Dada às especificidades que os biomateriais apresentam, eles são considerados uma classe especial de materiais.

Os biomateriais devem possuir características peculiares, sendo uma das mais importantes, a biocompatibilidade, ou seja, eles devem atender ao requisito de funcionalidade para a qual foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias no corpo humano. A funcionalidade destes materiais está associada à aplicação a qual este se destina, de tal modo que um material biocompatível para uma dada função se torna inadequado se usado em outras aplicações (OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com a resposta biológica induzida no organismo, os materiais biocompatíveis podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos. Um material bioinerte não induz a nenhuma resposta local do sistema imunológico, no entanto um material biotolerável, induz a uma resposta mínima, sendo simplesmente aceito pelo organismo receptor. A resposta típica do tecido ósseo com relação aos materiais biotoleráveis e bioinertes é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso, sendo a espessura dessa camada inversamente proporcional à inércia do material. Dentre esses, os materiais mais empregados atualmente podem ser citados as cerâmicas de alumina, polímeros como polietileno de ultra alto peso molecular, e os materiais metálicos como, cromo, vanádio, titânio e suas ligas. Já o material bioativo permite uma resposta

biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação entre o tecido e o próprio material. Neste caso o tecido é capaz de interagir intimamente com o material depositando-se diretamente sobre a superfície do mesmo sem a intervenção da camada de tecido fibroso. A natureza dessa ligação osso-implante no caso destes materiais é química, sendo o papel fundamental realizado pelos componentes orgânicos e minerais presentes nos fluidos do corpo humano. Os materiais bioativos, por excelência, são os biovidros, as vitrocerâmicas bioativas e as cerâmicas do sistema fosfato de cálcio, entre as quais a mais difundida é a hidroxiapatita (RIGO et al., 2014; BAREIRO E SANTOS, 2014; SURMENEV, SURMENEVA E IVANOVA, 2014).

3.1.1. Biomateriais metálicos

Implantes metálicos, como *stents*, placas ósseas e articulações artificiais, são amplamente utilizados no corpo humano (ZHANG, GUAN E ZHANG, 2011). Os implantes metálicos apresentam como principal característica a elevada resistência mecânica, porém, apresentam algumas desvantagens: além de serem biotoleráveis ou bioinertes, no caso de ligas metálicas, a liberação de partículas devido ao desgaste ou degradação química, pode causar diferentes patologias podendo ser requerida a remoção do implante (ZHAO et al., 2012). Relatos indicam que detritos originados desses processos são nocivos aos tecidos adjacentes e também reduzem significativamente o desempenho do implante (AHMED et al., 2014). Além disso, a falha de implantes também pode ocorrer devido a diferença entre os módulos elásticos de implantes metálicos em relação aos tecidos, tendo efeito no fenômeno denominado de “blindagem de tensões” (MANAM et al., 2017).

Dentre os problemas causados ao corpo humano associados a implantes metálicos permanentes, inclui-se trombose, irritação física, potenciais respostas inflamatórias e a incapacidade para o mesmo se adaptar ao crescimento e ou as mudanças do corpo humano (ZHANG, GUAN E ZHANG, 2011). Atualmente, as indústrias de produtos biomédicos estão atentas à evolução dos materiais e empregam as tecnologias mais modernas na confecção de órteses, próteses e instrumentos que proporcionem uma melhor reabilitação, em um menor tempo de internação hospitalar (TOKER et al., 2014).

O sucesso de um implante metálico no corpo humano se deve a resposta clínica obtida do componente, que depende, entre muitos fatores a serem considerados, dois aqui em destaque: o primeiro à biocompatibilidade do mesmo, e o segundo quanto a rejeição do implante pelo paciente, correlacionada com sua resposta imunológica. A corrosão de implantes metálicos em fluidos corpóreos pode resultar na liberação de íons ou na formação de produtos de corrosão que apresentam toxicidade para biomoléculas e ou células, provocando consequências negativas nos processos de biocompatibilidade, osteointegração e nas propriedades mecânicas do implante utilizado (BUENO-VIEIRA et al., 2015; MARINO E MASCARO, 2004). Deste modo, a liberação de íons em materiais metálicos deve ser considerada uma problemática de suma importância podendo levar ao insucesso de implantes metálicos (MARINO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2013).

Segundo Lyndon et al. (2014), a degradação ou corrosão do implante metálico são suscetíveis a alterações da temperatura e do pH do corpo humano; podendo este último atingir valores entre 3 e 4 no caso de inflamações ocasionadas por cirurgias ou lesões, devido a secreções inflamatórias das células (CHEN E THOUAS, 2015).

Dentre os biomateriais metálicos, pode-se destacar a utilização dos aços inoxidáveis (principalmente os austeníticos como, por exemplo, o AISI 316 L), ligas de cobalto, titânio e suas ligas (Ti6Al4V e NiTi) e demais ligas magnésio e tântalo (CHEN E THOUAS, 2015).

Titânio e suas ligas são considerados os materiais mais promissores em diversas áreas, isso devido a suas propriedades como: baixa densidade, alta resistência mecânica, biocompatibilidade e resistência à corrosão (CHEN, WANG E YUAN, 2013). Na área biomédica, titânio e suas ligas reúnem o maior número de requisitos para uso em cirurgias e também são chamados de “metais especiais” (PFEIFFER et al., 2003) e são muito utilizados como substitutos ósseos nas áreas de medicina ortodontia e ortopédica (LÓPEZ et al., 2015).

A resistência à corrosão do titânio e suas ligas é conferida pela ocorrência de uma reação espontânea de formação de uma camada passiva de óxido de titânio (TiO₂) em sua superfície, que atua como uma barreira de proteção (VOJTĚCH et al., 2010; TOKER et al., 2014). Porém, o uso destes materiais em ambientes agressivos pode desencadear problemas devido a esta película de óxido não ser eficaz para protegê-los devido à sua espessura e estrutura porosa (CHEN, WANG E YUAN, 2013). Em caso de ligas, a

espessura de óxido formada se torna um parâmetro ainda mais crítico, uma vez que age diretamente no controle da liberação dos íons (VOJTĚCH et al., 2010; TOKER et al., 2014). Caso a espessura desta camada seja muito fina, a liberação de íons metálicos é gradualmente facilitada, e assim essa se torna menos protetora. No entanto, quanto mais espessa for a mesma, há um aumento da possibilidade de formação de fissuras, o que eventualmente levará a uma pronunciada liberação de íons metálicos (TOKER et al., 2014). Em casos extremos, a corrosão pode causar a redução do desempenho mecânico, ou até mesmo a fratura do implante, afetando a biocompatibilidade e a aceitação do mesmo (VOJTĚCH et al., 2010).

No caso específico do uso de Ti6Al4V em biomateriais, Yu, Addison e Davenport, (2015) evidenciaram a migração de íons de titânio relacionada à corrosão dessa liga em solução de fluido corpóreo. Neste mesmo sentido, em casos *in vivo* a liberação de íons de titânio pela dissolução de dispositivos implantados tem sido reconhecida (SARMIENTO-GONZÁLEZ et al., 2009; SAJNÓG et al., 2018). Olmedo et al. (2013) observaram a inflamação localizada de tecidos no entorno de implantes dentários e relacionaram à detecção de íons de titânio pela análise elementar de Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) da mucosa oral. Além disso, a dissolução de alumínio (Al) em ambiente corpóreo pode desencadear na ocorrência da doença de Alzheimer, neuropatia periférica e osteomalacia; bem como a presença de vanádio (V) pode alterar a cinética da atividade enzimática associada à resposta inflamatória (VASILESCU et al., 2009; SOMSANITH et al., 2015).

Outro fator importante com relação a implantes de titânio e suas ligas é que suas superfícies constituem um ambiente adequado para a adesão e proliferação bacteriana, favorecendo a formação do chamado biofilme que é em grande parte inacessível para o sistema imunológico e resistente a ação de drogas (RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013). O biofilme é uma camada que naturalmente se desenvolve da aderência de bactérias em uma superfície inerte; são relacionados a certas doenças infecciosas e a uma importante variedade de infecções relacionadas à dispositivos e falha de implantes (DINCA et al., 2006).

O titânio é largamente utilizado como biomaterial devido à sua alta citocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, permitindo o contato direto entre osso-implante (CARVALHO et al., 2010). Porém, os biomateriais metálicos não possibilitam a

formação de uma ligação química com o osso (bioativos) e por isso, métodos alternativos ainda estão sendo investigados visando o processo de osteointegração dos mesmos (GALTAYRIES et al., 2010; CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011; ASRI et., 2016; KE et al., 2017). Por estas razões, na última década, o processo de osteointegração, pela solicitação da resposta de células osteogênicas, como adesão, proliferação e diferenciação celular, tornou-se um aspecto a ser considerado nos estudos de engenharia biomédica (VOJTĚCH et al., 2010).

Sendo assim, a modificação superficial de implantes metálicos de titânio é essencial para a melhora do seu desempenho eletroquímico, biocompatibilidade e do processo de osteointegração, com o propósito de utilizá-lo como biomaterial e buscando aumentar sua estabilidade em longo prazo (BAYAT, SANJABI E BARBER, 2011; FU et al., 2012).

3.2. Revestimentos à base de precursores silanos pelo método sol-gel

Uma das formas de modificação superficial muito estudada e utilizada é a obtenção de revestimentos híbridos pelo método sol-gel.

O método sol-gel apresenta inúmeras vantagens, tais como: o aumento da homogeneidade do revestimento obtido, a capacidade de revestir formas complexas, de preparar revestimentos nanoestruturados e o domínio do controle da composição, microestrutura e espessura do filme formado (CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011; HIEDA et al., 2012).

Segundo Brinker, (1990), o sol é uma suspensão coloidal de pequenas partículas sólidas dispersas em líquido; já o gel é uma rede tridimensional contínua (aglomeração de partículas coloidais) encapsuladas em uma fase líquida.

O método sol-gel pode ser descrito como a formação de uma rede de óxido formada por progressivas reações de condensação de precursores em um meio líquido. Os precursores utilizados podem ser de natureza puramente inorgânica (óxidos metálicos, nitretos, carbetos) ou orgânicos (alcóxidos) que são atualmente os mais utilizados. Dentre esses, destaca-se o uso de alcóxidos metálicos devido a rápida reação com a água, $M(OR)_n$, onde M representa elementos formadores de rede como: Si, Ti, Zr, Al, Fe, etc.; e R representa grupo alquil (CAPIOTTO, 2006; WANG E BIERWAGEN, 2009).

O mecanismo sol-gel ocorre em quatro etapas: hidrólise do precursor, condensação e a polimerização de monômeros formando partículas e cadeias, crescimento das partículas e a aglomeração das estruturas poliméricas com a formação de redes em um líquido (formação do gel). Estas etapas são basicamente afetadas por parâmetros, tais como pH, temperatura, relações molares entre os reagentes, composição do solvente, etc. (WANG E BIERWAGEN, 2009).

Dentre as aplicações deste método de obtenção de revestimentos, destaca-se o êxito do desenvolvimento de revestimentos utilizando precursores a base de silício (silanos), que visa diferentes funcionalidades com aplicações em diferentes áreas científicas. Na literatura, pesquisas têm focado na obtenção dos denominados revestimentos híbridos silanos orgânicos-inorgânicos preparados pela tecnologia sol-gel, a fim de ultrapassar a limitação dos revestimentos silanos inorgânicos puros (WANG E BIERWAGEN, 2009).

De acordo com os autores Rami Al-Oweini e El-Rassy, (2009); Kunst et al. (2014), tal limitação pode ser exemplificada pela obtenção de filmes utilizando somente o precursor Tetraortosilicato ou Tetraetoxisilano (TEOS), uma vez que os mesmos podem se tornar frágeis devido a evaporação ocorrida na etapa de cura do revestimento, tendem a absorver umidade atmosférica que podem causar o aparecimento de defeitos estruturais e se tornam instáveis quando utilizados para aplicações a longo prazo.

A obtenção de revestimentos híbridos silanos orgânicos-inorgânicos tem se tornado de grande interesse uma vez que combinam as características dos diferentes compostos (EL-HADAD et al., 2014). Estes revestimentos são constituídos pela combinação de silanos inorgânicos $\text{Si}(\text{OR})_4$ e orgânicos $\text{R}'(\text{CH}_2)_n\text{Si}(\text{OR})_3$, onde R é um grupo alcóxi hidrolisável e R' é um grupo organofuncional (WANG E BIERWAGEN, 2009).

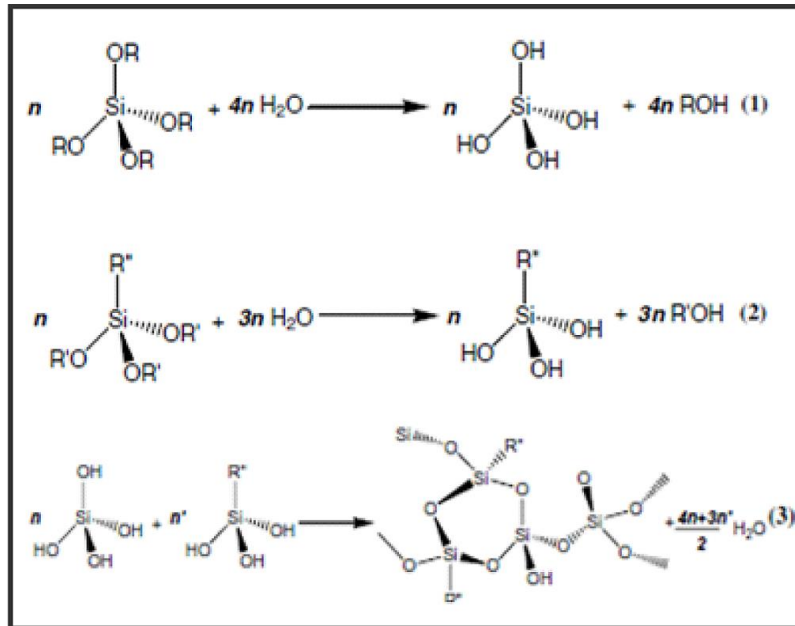
A utilização dos compostos inorgânicos tem como funcionalidade melhorar a estabilidade térmica dos revestimentos, promover a aderência à substratos metálicos e conferir aos mesmos, melhores propriedades mecânicas. Já os compostos orgânicos promovem aos revestimentos alta flexibilidade e baixa porosidade, evitando o aparecimento de defeitos durante a etapa de evaporação do solvente ou por ação mecânica e também quando utilizados como pré-tratamento para superfícies metálicas auxiliam na adesão de revestimentos orgânicos (YU et al., 2015).

Os revestimentos híbridos silanos podem ser classificados de acordo com a natureza da ligação química entre as partes orgânicas e inorgânicas. Quando se tem a mistura de um componente orgânico em um sistema sol-gel inorgânico, há somente interação por forças de Van der Waals entre os mesmos, porém quando se utiliza precursores que possuem espécies oligoméricas (organoalcoxissilanos) para reagir com o hidrolisado de precursores inorgânicos, há a formação de uma ligação covalente entre as partes orgânicas e inorgânicas (WANG E BIERWAGEN, 2009; GABBARDO, 2014). Deste modo, revestimentos híbridos silanos orgânicos-inorgânicos apresentam ligações químicas estáveis que contribuem para a estabilidade da estrutura dos mesmos (YU et al., 2015).

O mecanismo de obtenção de revestimentos híbridos silanos pelo método sol-gel se dá pela ocorrência de reações de hidrólise e condensação quando em contato dos precursores com a água para a formação dos grupos silanol (Si-OH). Após a etapa de cura ou secagem, os grupos silanol presentes na solução permitem a ligação com a superfície do metal (Me-OH) via formação de ligações metalo-siloxanos (Si-O-Me) e sofrem autoreticulação por meio das ligações siloxano (Si-O-Si), resultando numa camada orgânica, compacta, uniforme e quimicamente ligada ao substrato metálico (ZOMORODIAN et al., 2012). Além disso, segundo Omar et al. (2015) a camada de dióxido de silício (SiO₂) formada possui excelentes propriedades anticorrosivas.

A Figura 1 apresenta o mecanismo das reações envolvidas na síntese de revestimentos híbridos silanos orgânicos-inorgânicos.

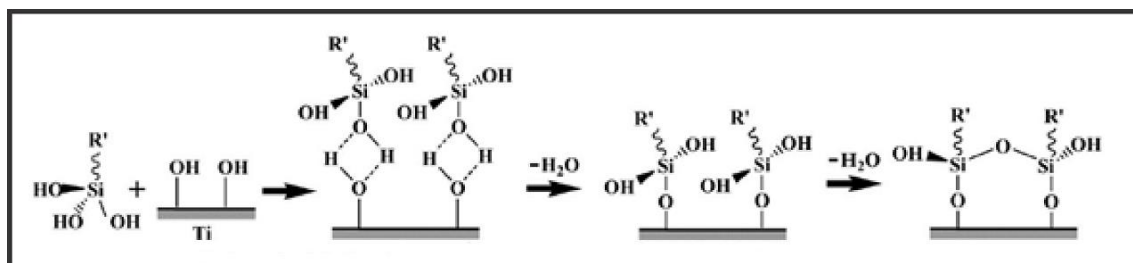
Figura 1. Mecanismo químico das reações de hidrólise e condensação para obtenção de revestimentos híbridos a partir de alcoxissilanos e organoalcoxissilanos (Adaptado de RAMI AL-OWEINI E EL-RASSY, 2009).



Em que as reações 1 e 2 correspondem as etapas de hidrólise dos precursores orgânico e inorgânico, respectivamente; e a reação 3 às etapas de condensação e cura, promovendo a formação da rede siloxano, caracterizada pela ligação (Si–O–Si).

Segundo Zhu e Van Ooij, (2004); Van Ooij et al. (2005), a adsorção da camada de silano na superfície do metal se dá pela formação de ligações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre os grupos silanol (Si–OH) da solução e os grupos hidroxilas do metal (Me–OH) que após etapa de cura ou secagem, formam as ligações covalentes metalo-siloxano (Me–O–Si) e siloxanos (Si–O–Si), exemplificadas na Figura 2.

Figura 2. Esquema representativo da etapa de adsorção e condensação dos silanos sobre a superfície metálica (Adaptado de LIU et al., 2013).



3.2.1. Revestimentos híbridos à base de precursores silanos em biomateriais

Revestimentos híbridos silanos orgânicos-inorgânicos obtidos pelo método sol-gel têm sido estudados com propósito de utilização em biomateriais (CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011; OWENS et al., 2016). Especificamente, muitos destes revestimentos estão sendo estudados para melhorar o desempenho à corrosão de próteses metálicas ou funcionalizar as superfícies das mesmas, através da incorporação de partículas bioativas, biomoléculas, fármacos e/ou componentes orgânicos dispersos em precursores silanos (DUBRUEL et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; RAKMAE et al., 2012; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013).

Amato et al. (2005) analisaram o comportamento eletroquímico em solução simulada de fluido corpóreo (SBF) do revestimento híbrido formado pelo alcoxissilano Tetraetoxissilano (TEOS) e o organoalcoxissilano Metiltrietoxissilano (MTES), aplicado sobre a liga de Co–Cr–Mo para uso em implantes ortopédicos, obtidos em diferentes temperaturas de cura (450 e 550 °C). Os autores observaram a formação de revestimentos uniformes e isentos de defeitos. Contudo, o revestimento curado a temperatura de 450 °C, comparativamente aquele curado a 550 °C, apresentou melhor comportamento protetivo ao substrato metálico. Esse comportamento pode ser associado à maior concentração de grupamentos metila provenientes de MTES, que quando submetido a maior temperatura sofrem decomposição. Segundo os autores a presença deste grupo funcional diminui a molhabilidade do revestimento formando uma barreira hidrofóbica ao eletrólito utilizado.

Rahimi, Mozaffarinia e Hojjati, (2013) avaliaram a influência do comportamento protetivo de revestimentos híbridos formados pelos precursores TEOS e Glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTMS) com a aplicação de mono, bi e tricamadas sobre a liga de alumínio. Os autores observaram que o revestimento formado com aplicação de uma monocamada apresentou melhor adesão ao substrato metálico, bem como, a ausência de defeitos superficiais, comparativamente aos demais. Em consequência disso, verificou-se também esse revestimento isento de fissuras e de menor espessura foi o que apresentou superior comportamento protetivo.

Zomorodian et al. (2012) propuseram a aplicação de filmes híbridos formados pelos silanos GPTMS e MTES dopados com dietil triamina (DETA) sobre a liga de magnésio (AZ31), utilizando-se de diferentes pré-tratamentos aplicados anteriormente a etapa de silanização (amostras somente polidas, atacadas com ácido fluorídrico ou polidas

com tratamento eletroquímico em solução de hidróxido de sódio, (NaOH). Os autores avaliaram o comportamento eletroquímico dos revestimentos imersos em solução salina balanceada de *Hank* (HBSS) durante 144 horas e observaram o superior desempenho a corrosão dos mesmos em relação ao substrato metálico. O efeito dos pré-tratamentos na obtenção dos revestimentos não foi constatado, no entanto, foi possível evidenciar a influência dos mesmos no desempenho eletroquímico do sistema; as amostras polidas apresentaram estabilidade protetiva nas primeiras horas de imersão, porém após 48 horas houve o aparecimento de defeitos superficiais nos revestimentos; comportamento similar foi observado ao final das 144 horas de ensaio de impedância para as amostras pré-tratadas com NaOH. Já as pré-tratadas com ataque ácido apresentaram superior efeito barreira aos demais, relacionado à formação de uma camada de óxidos de magnésio subjacente ao revestimento silano depositado, conferindo maior estabilidade química ao mesmo.

Liu et al. (2013) compararam o caráter protetivo em solução simulada de fluido corpóreo (SBF) de filmes silanos formados por Bistrietoxisililetano (BTSE) ou Aminopropiltrietoxisilano (APTES) sobre substratos da liga AZ31 (liga amplamente utilizada para a fabricação de implantes biodegradáveis). O revestimento de BTSE apresentou superior efeito barreira comparativamente à APTES e este comportamento foi justificado pela maior hidrofobicidade e densidade das ligações (Me–O–Si) apresentadas por este revestimento, em consequência do maior número de grupamentos hidrolisáveis presentes na molécula do silano BTSE.

Além da barreira física a ação do eletrólito, evitando a migração de íons citotóxicos do substrato metálico para o ambiente corpóreo afetando consequentemente a biocompatibilidade do implante (BALLARRE et al., 2011). Há inúmeras pesquisas focadas na obtenção de revestimentos com dupla funcionalidade, ou seja, protetores e bioativos, fazendo uso da adição de cerâmicas bioativas pelo método sol-gel. Além disso, o uso do processo sol-gel permite que materiais cerâmicos sejam adicionados numa variedade de formas (BALLARRE et al., 2007; BALLARRE et al., 2010; BALLARRE et al., 2011; LIU et al., 2013; OMAR et al., 2015).

A adição de partículas bioativas tem sido estudada como uma tentativa de formar filmes bioativos que induzam o processo de osteointegração sobre diferentes substratos metálicos (DUBRUEL et al., 2006; BALLARRE et al., 2011, 2010; LIU et al., 2013;

YAACOUB et al., 2012). Os pós ou aglomerados cerâmicos têm sido utilizados na síntese de revestimentos bioativos visando o favorecimento da regeneração óssea ou também para melhorar a biocompatibilidade de implantes metálicos (CHELLAPPA E VIJAYALAKSHMI, 2017; BALLARRE et al., 2011). Além disso, os revestimentos contendo partículas cerâmicas sobre superfícies metálicas estimulam a maturação de osteoblastos, minimizam a aderência de bactérias e a formação do biofilme, resultando em uma melhor resposta biológica do implante a ser implantado (ZHAO et al., 2012).

Ballarre et al. (2010) investigaram a obtenção de revestimentos híbridos compostos por TEOS e MTES com adições de cerâmicas bioativas ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$) em diferentes concentrações (10 e 30 %), aplicados sobre AISI 316 L pelo método sol-gel. Os filmes obtidos foram caracterizados quanto ao comportamento protetivo *in vitro* e quanto ao comportamento bioativo *in vivo*. Devido à ação barreira do revestimento depositado, os autores não observaram a migração de íons (cromo e níquel) provenientes do substrato metálico após 30 dias de imersão em SBF. Da mesma forma, após 60 dias de análise *in vivo* o implante revestido apresentou propriedade bioativa devido à interação do mesmo com o tecido já existente, sendo essa influenciada pelas diferentes concentrações de cerâmicas bioativas utilizadas. A utilização de 10 % de partículas bioativas promoveu a formação de cristais minerais no novo osso formado de melhor qualidade, porém quando utilizado 30 % foi observado pelos autores somente a formação de uma camada de osteócitos (matriz óssea não mineralizada) densa e uniforme ao entorno de toda a superfície do implante.

Os resultados acima citados confirmaram os obtidos pelos mesmos autores em estudos anteriores, nos quais em ensaios *in vitro* do revestimento TEOS e MTES com a adição de 30 % de sílica não se observou a formação de apatita na superfície das amostras analisadas (BALLARRE et al., 2007). Adicionalmente a isso, em 2011 os mesmos autores obtiveram maior módulo de elasticidade para o novo osso formado comparativamente ao já existente, sendo a formação desse induzida pelo contato do mesmo com substrato de AISI 316 L revestido pelos precursores silanos (TEOS e MTES) contendo partículas de sílica (BALLARRE et al., 2011).

Zheng et al. (2011) observaram que revestimentos sol-gel aplicados sobre a liga de nitinol (NiTi) além de eficazes para a proteção a corrosão, exibiram adequada bioatividade, em consequência da presença de grupos hidroxilas, o que favoreceu a

nucleação de apatita de cálcio e até mesmo a formação de uma matriz mineralizada, promovendo o processo de osteointegração.

Segundo Dubruel et al. (2006), as ligações siloxanos podem suportar grupos reativos, amino ou halogenados, que protegem a superfície metálica contra a adesão microbiana não-específica. De acordo com Kregiel, (2014), outra aplicação de êxito de organoalcoxissilanos foi na prevenção da formação do biofilme, como por exemplo o uso de organoalcoxissilanos à base de aminas quaternárias podendo proporcionar eficiente proteção antimicrobiana contra a formação e adesão de uma vasta variedade de microrganismos.

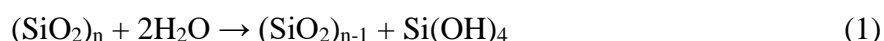
Rodríguez-Cano et al. (2013) propuseram a formação de um revestimento a partir do precursor Aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) aplicado sobre a liga Ti6Al4V para aplicação em implantes ortopédicos, avaliando o desempenho biológico do mesmo pelo comportamento de células osteoblásticas primárias, adesão de bactérias e pela formação do biofilme. Os autores observaram a biocompatibilidade das células osteoblásticas sobre superfície silanizada independente das propriedades físico-químicas da mesma. Além disso, o revestimento proposto reduziu a formação do biofilme comparativamente a superfície pré-tratada pelo processo de oxidação química. Por fim, os autores verificaram o rompimento hidrolítico das ligações Si–O–Ti, quando imerso por 15 dias em SBF, denotando a instabilidade do revestimento silano.

Outra aplicação importante de revestimentos silanos na área biomédica é quanto a liberação de compostos de silício pela degradação hidrolítica da rede sol-gel. A presença do elemento silício auxilia no metabolismo de conectividade de tecidos, principalmente ósseos e cartilagosos, associados à formação e calcificação dos ossos. Junto a isso, a presença do silício atua na síntese do colágeno tipo I e no comportamento de células osteoblásticas (JUAN-DIAZ et al., 2016)

Martínez-Ibáñez et al. (2016) avaliaram o comportamento *in vitro* (células-tronco mesenquimais adiposas) e *in vivo* de revestimentos silanos compostos por Metiltrimetoxisilano (MTMOS) e TEOS, em diferentes proporções, depositados sobre substratos de titânio. Os autores evidenciaram o efeito positivo da liberação de silício pela degradação dos revestimentos na proliferação e diferenciação de células tronco (ambos os comportamentos foram pronunciados para as amostras contendo maior percentual do silano TEOS). Quando avaliado o comportamento *in vivo*, observou-se a bioatividade do

revestimento bem como o auxílio do mesmo na formação de um novo osso, justificada pela liberação de silício que conseqüentemente ativou a produção de colágeno tipo I.

Em 2017, Ibáñez et al. estudaram a degradação de revestimentos silanos com diferentes percentuais de MTMOS, TEOS e GPTMS em solução simulada de fluido corpóreo (SBF). Os autores observaram que o revestimento de maior hidrofilia proporcionou maior liberação de silício para o meio. Enfatiza-se que o mecanismo de degradação hidrolítica destes revestimentos ocorre de acordo com a reação 1 descrita abaixo.

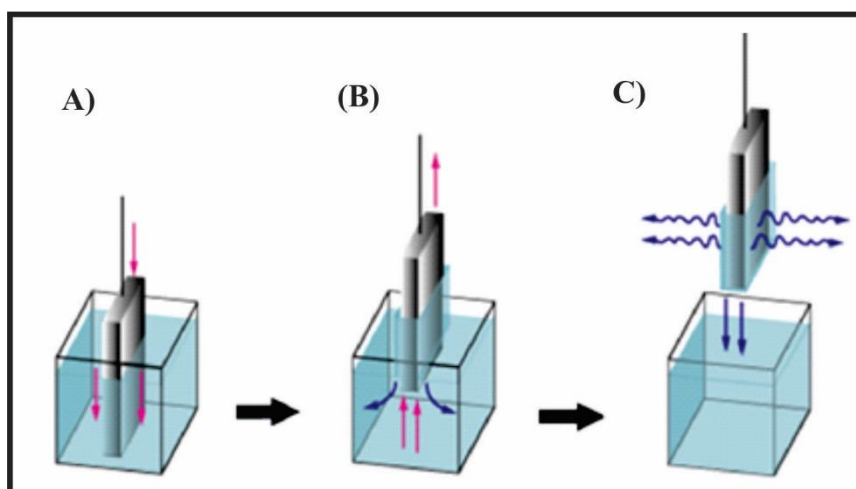


Segundo Latifi et al. (2016), a presença do grupamento silanol (Si–OH) formado pela degradação de revestimentos à base de silanos, favorece à bioatividade dos mesmos em decorrência da nucleação e do crescimento de apatita.

Deste modo, diante da revisão bibliográfica apresentada, neste estudo serão utilizados os precursores silanos MTES e TEOS afim de se obter um revestimento híbrido de propriedades protetivas e bioativas.

Para a deposição dos revestimentos à base de silanos obtidos pelo método sol-gel sobre a superfície de um substrato, tem sido amplamente utilizada a técnica de *dip coating* (Figura 3).

Figura 3. Representação da técnica de deposição de filmes por *dip coating*; (A) imersão da amostra, (B) retirada da amostra com velocidade controlada e (C) evaporação com a formação de uma camada de sol-gel. (Adaptado de KUNST et al., 2015).



A técnica de *dip coating* consiste na imersão e retirada do substrato metálico a uma velocidade controlada do sol hidrolisado. Durante o movimento de retirada a suspensão é arrastada com o substrato, causando um aumento na área de evaporação e na taxa de secagem, o que leva primeiramente, à formação de uma camada de gel. Com o prosseguimento da secagem, uma camada sólida é formada sobre o substrato metálico.

3.1.2. Revestimentos utilizados como suportes extracelulares

Dentro do contexto de funcionalização de superfícies, com a evolução da medicina regenerativa visando o desenvolvimento de novos biomateriais que objetivam o crescimento de tecidos, alguns pesquisadores têm focado suas pesquisas na introdução de células em estruturas chamadas “*scaffolds*”. Estas estruturas servem de apoio para a proliferação celular e sua arquitetura define a forma dos novos tecidos formados (WILLIAMS E SEBASTINE, 2005).

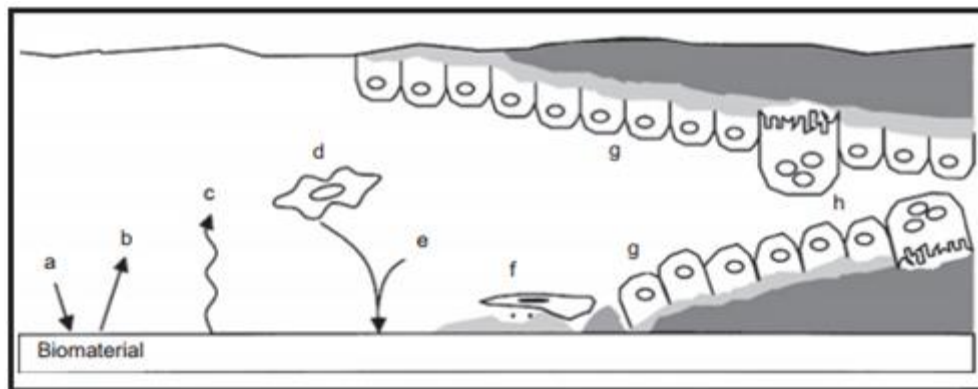
Os “*scaffolds*” podem ser considerados como uma matriz extracelular (ECM) para o crescimento de células, tecidos e órgãos e, por isso, devem reproduzir idealmente a ECM natural de, tanto quanto possível do local onde servirá de suporte (LIAO, CHAN E RAMAKRISHNA, 2008). Deste modo, necessitam fornecer tanto o suporte físico quanto biológico para a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (PARK et al., 2009).

Dentre as aplicações da medicina regenerativa, ressalta-se as aplicações para o favorecimento do processo de osteointegração de implantes (LIN et al., 2014).

De acordo com Lin et al. (2014), o processo de osteointegração refere-se a ancoragem direta do implante pela formação de novos tecidos ósseos adjacentes ao mesmo, sem a formação de tecidos fibrosos ao redor de ambos. Muitos são os fatores que influenciam este processo, tais como: procedimento cirúrgico, contato com fluidos biológicos, características do indivíduo, e do implante a ser utilizado, especificamente anatomia, dimensões e propriedades superficiais.

Para Subramani e Mathew, (2012) o processo de osteointegração ocorre conforme o esquema apresentado na Figura 4 e elencando nos itens que seguem:

Figura 4. Representação esquemática do processo de osteointegração (Adaptado de SUBRAMANI E MATHEW, 2012).



- (a) contato do sangue e fluidos corpóreos podendo haver a adsorção de moléculas, proteínas, provenientes do mesmo na superfície do biomaterial;
- (b) desorção de proteínas;
- (c) mudanças de superfície e liberação de material;
- (d) migração de células para o implante;
- (e) adsorção de proteínas específicas;
- (f) adesão de células osteogênicas,
- (g) formação da matriz óssea sobre o tecido já existente;
- (h) remodelação do osso recém-formado pelos osteoclastos.

Segundo Wang et al. (2015), especificamente para o processo de osteointegração quando da utilização de células-tronco mesenquimais, a partir da etapa (f), ocorre pela adesão das mesmas com posterior diferenciação dessas em células osteoblásticas, que produziram o colágeno reticulado e as proteínas especializadas na formação da matriz orgânica do osso (osteocalcina e osteopontina). A matriz orgânica é posteriormente calcificada para formar a matriz óssea mineralizada, que sofre remodelação por ação dos osteoclastos.

Segundo Boudriot et al. (2005) existem duas maneiras de maximizar o crescimento celular na engenharia de tecidos: mistura direta de componentes no suporte utilizado como matriz extracelular ou revestimento do mesmo, como por exemplo, a adição de fármacos na estrutura de “*scaffolds*”; e a adição de culturas celulares durante

o desenvolvimento dos “*scaffolds*”. Ou seja, de acordo Chen e Thouas, (2015), especificamente para o aprimoramento do processo de osteointegração, existem dois mecanismos de modificação a se seguir: químico e biológico.

Na primeira abordagem, com relação à mistura de componentes no suporte extracelular visando o processo de osteointegração, ressalta-se a utilização de revestimentos contendo cerâmicas bioativas que visam o aumento das taxas de cicatrização do tecido ósseo, a fim de garantir a fixação e a estabilidade do implante. Segundo Hukovic, Tkalcec e Piljac, (2003), em nível molecular, cerâmicas bioativas facilitam a diferenciação celular e deposição de colágeno, bem como auxiliam na precipitação de fosfato de cálcio.

De acordo com Goodman et al. (2013), a estrutura óssea é composta por células, proteínas (principalmente colágeno) e uma porção mineral. A fase mineral inorgânica do osso corresponde a 50 % do peso do mesmo e é formada principalmente por fosfatos de cálcio, predominantemente cristais de hidroxiapatita.

A hidroxiapatita [HA - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] é considerada uma das formas mais populares de cerâmicas a base de fosfato de cálcio. Por apresentar composição química muito similar a matriz inorgânica do tecido ósseo. A hidroxiapatita é bastante utilizada em aplicações biomédicas, em consequência de sua osteocondutividade, biocompatibilidade, não carcinogenicidade e por apresentar estabilidade durante o processo de esterilização (KLIMEK et al., 2016). Também tem apresentado influência positiva na resposta de células osteoblásticas (GIL-ALBAROVA et al., 2012; RAPHEL et al., 2016).

Deste modo, revestimentos contendo partículas de hidroxiapatita sobre substratos metálicos têm sido amplamente estudados visando auxiliar a formação de um novo osso (GOODMAN et al., 2013), enfatizando-se a aplicação clínica destes revestimentos em implantes ortopédicos e dentários (CHEN et al., 2017).

Especificamente, os revestimentos contendo partículas de hidroxiapatita promovem a liberação de íons (cálcio e fosfato), aumentando conseqüentemente a saturação de fluidos corporais e, portanto, promovendo a precipitação de uma camada de apatita sobre o implante, que auxilia na estabilização e fixação do mesmo. Além disso, a

camada de apatita formada pode induzir a mineralização da matriz extracelular por células osteoblásticas (GOYENVALLE et al., 2006; MCENTIRE et al., 2015).

Kuwabara et al. (2012) avaliaram a resposta de células osteoblásticas sobre revestimentos de TiO₂ aplicados em substratos de titânio pela técnica de *sputtering* com a adição de partículas bioativas de hidroxiapatita. De acordo com esses resultados, a adsorção de proteínas e a interação celular (adesão e proliferação) de osteoblastos foram melhoradas pela presença de HA atuante como revestimento bioativo. Os autores também encontraram pelos resultados *in vivo*, melhor resistência biomecânica para a integração osso-titânio, apresentada pelo revestimento híbrido formado por TiO₂-HA em relação às demais amostras.

A fosfatase alcalina óssea (FAO) é um marcador bioquímico utilizado na avaliação do comportamento de células osteoblásticas. FAO é uma glicoproteína específica encontrada na superfície destas células e através dela é possível realizar a determinação do fenótipo dos osteoblastos e diferenciação na mineralização óssea (SURMENEV, SURMENEVA E IVANOVA, 2014, 2014).

Surmenev, Surmaneva e Ivanova, (2014) produziram filmes sintetizados com fosfato de cálcio (CaP) e constataram o aumento da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO), dos níveis de osteocalcina e de proteínas, junto a isso, os autores também enfatizaram que além da interação entre revestimentos CaP e células osteoblásticas os mesmos promoveram um melhor comportamento de adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTM), favorecendo a regeneração óssea.

Recentemente, Chen et al. (2017) avaliaram a influência da presença de hidroxiapatita sobre atividade de células osteoblásticas MC3T3-E1 em substratos de titânio contendo TiO₂. Os autores verificaram que a presença de hidroxiapatita sobre as estruturas estudadas promoveram o aumento da atividade de osteoblastos em consequência da detecção de maiores índices de FAO, apresentando maior bioatividade em relação aos formados unicamente por TiO₂.

Bellucci et al. (2017) avaliaram a influência de diferentes concentrações de hidroxiapatita (20 e 70 %) em ensaios *in vivo* de enxertos a serem utilizados na regeneração do tecido ósseo de ratos. Foi observado que ambas as concentrações apresentaram comportamento de osteoindução, porém, após 2 meses de implantação,

houve a desintegração da amostra com maior concentração de hidroxiapatita e o novo osso formado próximo a mesma apresentou depósitos localizados preferencialmente no entorno das partículas de HA não reabsorvidas, ou seja, menor regeneração óssea. Além disso, verificou-se a ligação direta entre o material enxertado e o osso já existente, não havendo sinais de inflamação pela dissolução dos implantes (entre a interface osso/material), denotando a bioatividade dos sistemas. Também, não se observou a formação de um tecido fibroso, indicando a biocompatibilidade e consequente osteointegração dos implantes nas composições propostas.

No contexto da introdução de culturas celulares, a aplicação de células-tronco é de extrema importância para engenharia de tecidos. Segundo Wang, Thissen e Kingshott, (2016), a utilização de células-tronco tem sido proposta uma vez que se pode modular o sistema imunológico e evitar a rejeição alogênica, proporcionando grande sucesso em aplicações clínicas.

Por definição, células-tronco são células imaturas com capacidade de autorregeneração por longos períodos que, quando devidamente estimuladas, são capazes de migrar para outras regiões onde darão origem a outros tipos celulares especializados, como morfologia e função definidas, capazes de substituir ou regenerar tecidos em um organismo vivo (PRESTON et al., 2015).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com a sua origem como embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas oriundas da massa interna do blastocisto, e por isto são tidas como células imaturas presentes em um tecido imaturo em desenvolvimento. Já as células-tronco adultas indiferenciadas são encontradas em vários locais de órgãos e tecidos já formados e consistem em células imaturas presentes em um tecido especializado (CAPLAN, 1991). As células-tronco ainda podem ser classificadas, de acordo com a sua capacidade de gerarem novos tipos celulares em: totipotentes (capacidade de formar todos os tipos celulares incluindo anexos embrionários, tais como placenta e cordão umbilical); pluripotentes (capacidade de se diferenciar em quase todas as células que surgem a partir das três camadas germinais de um embrião exceto anexos embrionários); multipotentes (capacidade de produzir vários tipos celulares, porém em número limitado) e unipotentes (somente capazes de gerar um único tipo de células) (PRESTON et al., 2015).

Células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas progenitores multipotentes, capazes de apoiar a hematopoese e se diferenciar em três (osteogênica, adipogênica e condrogênica) ou mais linhagens celulares (miogênica, cardiomiogênica, etc.). As CTM têm sido vistas como células-tronco adultas com grande plasticidade, ou seja, capazes de originar diversos tipos de tecidos (ROMANOV, SVINTSITSKAYA E SMIRNOV, 2003). Dessa forma, o uso de células-tronco mesenquimais tem sido encontrado em uma diversidade de tecidos fetais e adultos, incluindo a medula óssea, o sangue e o fígado fetal, o cordão umbilical e, em algumas circunstâncias, o sangue periférico do adulto e polpa de dente decíduo (MIAO et al., 2006; BERNARDI et al., 2011). Devido a esta capacidade, as CTM são utilizadas em estudos *in vitro* ou *in vivo* (ROMANOV, SVINTSITSKAYA E SMIRNOV, 2003). Sob determinadas condições, essas células podem ser estimuladas a replicar e/ou deixar o nicho em direção a tecidos lesados aonde irão se diferenciar para promover a regeneração da área afetada (CAPLAN, 1991).

Dimitrievska et al. (2011) avaliaram a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais em revestimentos de TiO₂ com a adição de 10 % de nanopartículas de hidroxiapatita aplicados sobre liga de Ti6Al4V. Os autores observaram uma maior adesão e atividade metabólica promovida pelo revestimento proposto comparativamente aos demais, formados unicamente por TiO₂ ou hidroxiapatita (HA). Foi observada também a presença de uma maior quantidade de FAO e osteocalcina, marcadores da atividade de osteoblastos para tal revestimento. Outra informação relevante para o desenvolvimento de revestimentos de regeneração óssea foi a observação da capacidade de mineralização das CTM destes revestimentos nanocompósitos de TiO₂-HA em meio isento de dexametasona, uma vez que para algumas linhagens celulares, quando em ensaios *in vitro* se faz a necessária a adição deste composto para auxiliar durante a mineralização óssea.

Recentemente, encontram-se na literatura algumas publicações quanto a diferenciação osteogênica de células-tronco sobre revestimentos compósitos contendo partículas de hidroxiapatita, o que torna este material ainda mais promissor na área de engenharia de tecidos. Enfatiza-se os estudos realizados por Sanaei-Rad et al. (2016) que observaram índices superiores para diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas do tecido adiposo sobre *scaffolds* do polímero Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) PLGA recobertos com hidroxiapatita. Tae Young et al. (2016) obtiveram percentuais similares

do marcador alcalina fosfatase e das proteínas (osteocalcina e osteopontina), quando da diferenciação osteogênica de células-tronco do tecido adiposo sobre hidroxiapatita e hidroxiapatita com o polímero fucoidan.

No âmbito geral, raras são as publicações focadas no estudo do comportamento biológico de células-tronco mesenquimais sobre substratos metálicos revestidos por filmes a base de alcoxissilanos ou organoalcoxissilanos, visando o favorecimento do processo de osteointegração. Ressalta-se o estudo realizado por Chen e Ko (2013), que avaliaram o comportamento de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea sobre um revestimento derivado de silano utilizando o precursor Metacriloxypropiltrimetoxisilano (MPTMS) com a adição de peptídeos (arginina, glicina, aspartato e serina) sobre substratos de titânio. Os autores concluíram o revestimento proposto mostrou-se um método promissor para a modificação de superfícies de titânio a serem utilizados como implantes dentários.

3.2. Efeito das propriedades superficiais sobre o comportamento celular

Conforme exposto anteriormente, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares, eles devem ser osteocondutivos, proporcionando a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado, possuir características superficiais que promovam esse recrutamento e devem primordialmente ser biocompatíveis (OLIVEIRA et al., 2010).

Os fenômenos de interação entre células e a superfície dos suportes extracelulares podem ser definidos de forma bastante abrangente como mecanismos pelos quais as células são capazes de responder a estímulos do meio ambiente externo e como estes influenciam sua adesão, proliferação e diferenciação (ANDREWS, HUNT E BLACK, 2007).

Na literatura é reportado que o comportamento celular é fortemente afetado pelas propriedades superficiais, tais como: composição, morfologia, molhabilidade e rugosidade do implante a ser utilizado (ZHU et al., 2004; LIN et al., 2014; KULKARNI et al., 2015; HUANG et al., 2016).

Para o favorecimento do processo de osteointegração é fundamental o conhecimento das características superficiais do implante a ser utilizado, principalmente

devido à etapa de adaptação do tecido ósseo após a implantação. Propriedades superficiais controlam a quantidade e a qualidade da adesão celular sobre o implante e consequentemente, o crescimento do tecido (BOTTICELLI et al., 2003).

3.2.2. Molhabilidade

A molhabilidade superficial é quantificada pela determinação do ângulo de contato entre a interface da superfície sólida e o líquido (BELAUD et al., 2015).

Para Liu et al. (2013) a molhabilidade é um dos parâmetros mais importantes que influencia sobre a resposta celular de um material para implante. Segundo Kulkarni et al. (2015), a primeira resposta quando da inserção do biomaterial em ambiente corpóreo é a adsorção de moléculas de água à superfície, seguida pela adsorção de moléculas, como por exemplo proteínas presentes na mesma.

Segundo Pegueroles et al. (2008) algumas células têm preferência por superfícies hidrofílicas. Entretanto, a adesão celular é normalmente mediada pelas proteínas contidas na matriz extracelular e a adsorção dessas é um dos principais fatores que influenciam na aderência e no crescimento celular em materiais sintéticos (WANG THISEN E KINGSHOTT, 2016). De acordo com Lee, Loo e Rohanizadeh, (2014), as proteínas se adsorvem preferencialmente em superfícies hidrofóbicas, devido ao desdobramento de seus núcleos hidrofóbicos sobre as superfícies destes materiais. Entretanto, segundo Kulkarni et al. (2015) a adsorção das proteínas por contato hidrofóbico pode causar mudanças conformacionais ou, até mesmo desnaturação das mesmas, causando a redução da proliferação celular em tais superfícies.

Wang et al. (2013) avaliaram a influência da molhabilidade de revestimentos derivados de silanos compostos por TEOS e MTES (em diferentes proporções) sobre o substrato de AISI 316 L no comportamento *in vitro* de células endoteliais, visando a aplicação para *stentes* vasculares. Após 96 horas, para ambas as culturas avaliadas (células endoteliais da veia umbilical humana – CE e células musculares lisas da parede aórtica de rato - SMC) foram observados superiores percentuais de adesão e proliferação celular sobre a superfície de maior hidrofília (somente TEOS, 26,2°) em relação as demais (proporção 70/30, 45°) e (proporção 40/60, 85°). Entretanto, segundo os autores a capacidade de endotelização (compatibilidade do *stent* vascular e reduzir a possibilidade

de reestenose) se dá pela razão entre os resultados obtidos pelas distintas culturas celulares, tornando o revestimento de caráter moderadamente hidrofílico (proporção 70/30) o mais promissor para esta aplicação.

Segundo Belaud et al. (2015) a molhabilidade além de ser influenciada pela composição química superficial é também dependente da rugosidade da mesma. Deste modo, ressalta-se que na área de biomateriais muitos trabalhos têm avaliado as alterações provocadas na molhabilidade em relação as modificações na rugosidade superficial e consequentemente no comportamento celular (GITTENS et al., 2011; KULKARNI et al., 2015; MOON et al., 2017).

3.2.3. Rugosidade

As respostas biológicas são alteradas a partir das modificações superficiais em diferentes dimensões. Na área biomédica, as superfícies nanoestruturadas são consideradas as de rugosidade superficial com dimensões entre 1-100 nm, as micro entre 1-10 μm e as superfícies macro entre 10 μm - 1mm (KULKARNI et al., 2015).

A rugosidade micrométrica promove *in vivo* o aumento da área de contato osso-implante influenciando nas taxas clínicas de cicatrização, osteointegração e fixação biomecânica (GITTENS et al., 2011; CHEN E KO, 2013).

Entretanto, a rugosidade superficial nanométrica tem relação direta aos tamanhos de proteínas e da matriz extracelular e por isso, desempenham um papel importante na diferenciação dos osteoblastos e na regeneração tecidual (MOM et al., 2017). Para Wang, Thissen e Kingshott, (2016) nanotopografias influenciam diretamente na adesão dos filapódios celulares devido a semelhança na escala de tamanho, proporcionando a ocorrência dos processos de detecção, proliferação e diferenciação celular.

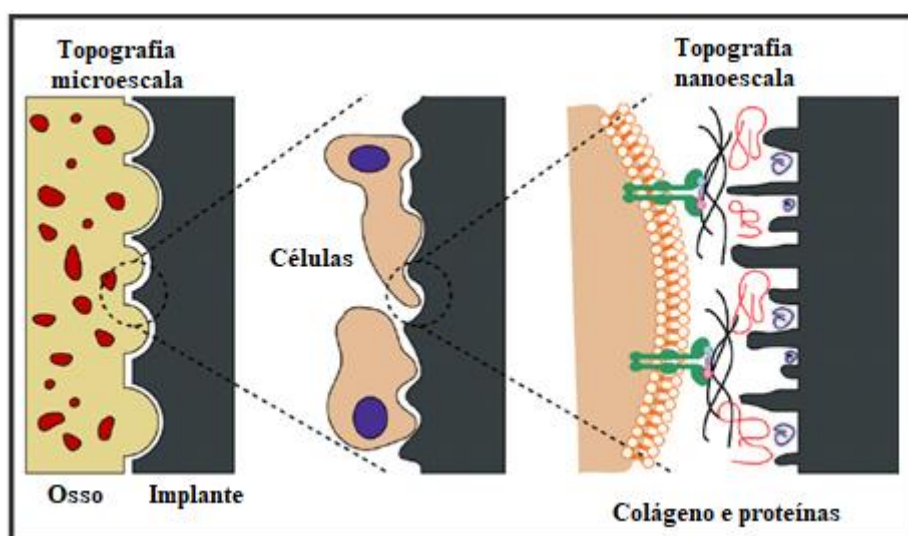
Segundo Lee, Loo e Rohanizadeh, (2014), independente da área superficial, o aumento da rugosidade em nano escala de revestimentos de fosfato de cálcio pode promover uma maior adsorção de proteínas; enquanto que para a escala micrométrica, isso pode não ocorrer, uma vez que em comparação a dimensão celular a topografia pode parecer nivelada.

Em artigo foi citado que superfícies de menor rugosidade dificultam a adsorção

das proteínas, enquanto que superfícies muito rugosas (com sulcos muito profundos) dificultam o comportamento de migração das células (MUZZARELLI et al., 2011).

A Figura 5 apresenta um esquema ilustrativo das possíveis interações entre as diferentes escalas da rugosidade superficial de um implante e os tecidos/células do corpo humano.

Figura 5. Diferentes escalas da rugosidade superficial de um implante e o tecido/células do corpo humano (Adaptado de GITTENS et al., 2011).



Ressalta-se que em literatura não há um consenso de qual a topografia superficial proporciona uma melhor proliferação e diferenciação de células ósseas.

Chuah et al. (2015) observaram maior nível de adesão, proliferação e espraiamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo (BMSC) sobre superfícies silanizadas (Polidimetilsiloxano - PDMS) esterilizadas em UV, mais hidrofóbicas, irregulares e rugosas (130° e $Ra = 3,5$ nm), em relação a outras analisadas (120° e $Ra = 0,7$ nm). Os autores verificaram índices superiores de diferenciação osteogênica e condrogênica para essas superfícies, quando da análise dos marcadores específicos para as respectivas alterações. Complementarmente, também foi observado a predominância da influência do parâmetro rugosidade sobre o comportamento celular comparativamente aos demais analisados (molhabilidade, morfologia e diferentes percentuais de adição da proteína fibronectina).

Qiu et al. (2017) avaliaram a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais oriundas de ratos sobre superfícies de titânio, recobertas com o silano APS,

contendo partículas de grafeno e, verificaram a influência dos parâmetros de superfície neste comportamento (especificamente da topografia). O revestimento silano contendo partículas de grafeno e imerso em uma solução de NaOH a 180 °C (redução de oxigênio) e de maior rugosidade (122 nm) apresentou superior comportamento de diferenciação em relação ao revestimento de silano e grafeno (35 nm) e somente silano (41,9 nm); ressalta-se que todos os revestimentos apresentaram ângulo de contato próximo a 40°.

Lee, Lee e Kim, (2009) avaliaram o comportamento de células osteoblásticas sobre filmes nanoestruturados a base de fosfato de cálcio. Os resultados demonstraram que a superfície menos rugosa ($R_a = 0,18$ nm) promoveu maior adesão, proliferação e diferenciação celular em relação à mais rugosa ($R_a = 87$ nm), porém, com percentuais inferiores a superfície de topografia intermediária ($R_a = 20$ nm). Diante destes resultados, os autores concluíram que a resposta celular também é também fortemente induzida pela composição química da superfície. Isso porque no estudo citado, a topografia de rugosidade intermediária foi a que apresentou maior relação entre Ca/P comparativamente as demais, influenciando na resposta celular.

Chen e Ko, (2013) avaliaram a influência dos parâmetros superfícies na diferenciação de células tronco derivadas da medula óssea em diferentes condições: substrato de titânio ($R_a = 0,16$ μm e 70°), substrato de titânio silanizado com Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS) ($R_a = 0,21$ μm e 78°) e substrato de titânio silanizado com a adição de peptídeos ($R_a = 1,23$ μm e 43°). Os resultados *in vitro* indicaram que a superfície mais rugosa, de maior caráter hidrofílico apresentou melhor capacidade biológica para acelerar a adesão celular e os maiores índices de mineralização extracelular (fosfatase alcalina), indicando ser a mais promissora visando o processo de osteointegração.

3.3. Processos de esterilização e biomateriais

A esterilização de dispositivos médicos tem por objetivo a eliminação de todas as formas de microrganismos, incluindo bactérias, esporos e fungos (PARK et al., 2012).

De acordo com Galante et al. (2017), a esterilização de biomateriais que tem contato ou que serão implantados no corpo humano podem minimizar a incidência de infecções em pacientes. Por isso, após o processo de esterilização se faz necessário

garantir que os materiais esterilizados estejam de acordo com os requisitos de qualidade e as especificações descritas nos regulamentos que limitam a contaminação de microrganismos (VETTEN et al., 2014).

Alguns fatores devem ser considerados a fim de garantir a esterilidade de biomateriais, tais como: carga microbiana contida no material, carga inorgânica, existência de biofilme, acessibilidade, tipo de biomaterial utilizado para a construção do dispositivo médico e a utilização pretendida para o mesmo (RUTALA E WEBER, 2008).

Uma vez que o biomaterial tem de ser estéril para a sua implantação no corpo humano, o processo de esterilização é considerado como a última etapa da modificação de sua superfície. Assim, dependendo do dispositivo biomédico a ser utilizado e de suas propriedades, o processo de esterilização deve ser cuidadosamente selecionado. Existem diversos processos de esterilização disponíveis, porém cada um com diferentes modos de ação (PARK et al., 2012). Cada processo de esterilização tem as suas próprias vantagens e limitações e podem ter efeitos adversos sobre certos tipos de dispositivos médicos e biomateriais a serem esterilizados. Além disso, deve-se garantir que a escolha do processo de esterilização não comprometa ou altere as propriedades e a estabilidade dos biomateriais ou do dispositivo médico a ser utilizado (QIU, SUN E CONNOR, 2011).

De acordo com Park et al. (2012), as propriedades biológicas, químicas e mecânicas dos biomateriais são suscetíveis a alterações de acordo com o processo de esterilização utilizado. Além disso, essas propriedades podem afetar diretamente nas interações com o tecido hospedeiro circundante ao implante, influenciando o processo de osteointegração (SHI et al., 2016).

Para Costa et al. (2017), anteriormente a etapa de esterilização é imprescindível a realização de um processo de higienização/limpeza da superfície do biomaterial. Esta etapa visa a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos. Para Rutala e Weber, (2008) esta etapa consiste na limpeza mecânica (fricção) ou com auxílio de instrumentos (ultrassom) em água com detergentes neutros ou produtos enzimáticos.

3.3.2. Esterilização térmica

A autoclavagem é um processo térmico de esterilização que expõe os organismos vivos a condições de temperatura mínima de 121 °C, pressão de 1,2 atm em períodos de exibição de 15-20 minutos, dependendo do tamanho e da massa dos dispositivos a serem esterilizados (PARK et al., 2012; VETTEN et al., 2014). Em virtude do vapor aplicado durante o processo de esterilização por autoclave, este procedimento não é recomendado para biomateriais termossensíveis (PARK et al., 2012) ou biodegradáveis (SAVARIS, SANTOS, BRANDALISE, 2016). Para Qiu, Sun e Connor, (2011), a esterilização por autoclave ocorre devido à destruição de microrganismos pela oxidação dos componentes celulares, como desnaturação de enzimas e proteínas.

Uma alternativa à esterilização à vapor é a calor seco, em que os dispositivos são expostos a calor seco em um forno durante um longo período de tempo (por exemplo, 160 °C durante 2 horas), porém não é recomendado na área da saúde, pois é difícil controlar a confiabilidade do processo (WILSON E NAYAK, 2013).

De acordo com Serro (2003), dependendo do processo de esterilização utilizado ocorrem modificações nas propriedades superficiais materiais, normalmente são observadas alterações na hidrofiliabilidade, rugosidade e composição química. Neste trabalho, o autor avaliou a influência de diferentes processos de esterilização (autoclave, plasma e radiação gama) na mineralização óssea de substratos de titânio imersos em distintos fluidos corpóreos (SBF e HBSS). Os resultados indicaram que amostras tratadas em autoclave e irradiadas apresentaram uma diminuição da hidrofiliabilidade, atribuída ao aumento de contaminantes orgânicos, principalmente espécies carbonáceas. No entanto, nas superfícies esterilizadas por plasma foi observada a remoção de componentes adsorvidos e óxidos nativos da superfície, aumentando a hidrofiliabilidade e a rugosidade da mesma. Porém, quanto a etapa de mineralização, todas as amostras apresentam comportamento similar, independente do processo de esterilização utilizado.

Oh et al. (2011) analisaram o comportamento de osteoblastos sobre superfícies formadas por nanotubos de TiO₂, esterilizadas por autoclave via úmida e a seco. Os autores demonstraram que a adesão celular foi fortemente influenciada pelos parâmetros de superfície quando utilizada a esterilização a seco. Quando comparados os dois processos utilizados, as amostras esterilizadas por autoclave por calor a seco foram as apresentaram maior adesão celular, porém tal diferença foi percebida somente após 24

horas de ensaio. Tal comportamento foi explicado pelos autores em consequência da aglomeração das proteínas e pelo aprisionamento de ar nos nanotubos formados.

Wu et al. (2007) avaliaram a estabilidade térmica do revestimento híbrido composto pelos silanos TEOS e GPTMS e, encontraram a temperatura de 315 °C como a temperatura inicial de degradação mássica do mesmo. Da mesma forma, Chandekar, Sengupta e Whitten, (2010) realizaram um estudo comparativo entre diferentes revestimentos silanos e obtiveram as temperaturas 250 e 350 °C para a decomposição térmica dos revestimentos APTES e Perfluorodeciltriclorosilano (PFDS), respectivamente.

Park et al. (2012) avaliaram a esterilização em autoclave de implantes de titânio pelas modificações nas propriedades superficiais e de cultura celular (osteoblastos MG-63). A esterilização por autoclave provocou a redução da molhabilidade e da rugosidade média superficial em relação a não esterilizada e, ambas foram justificadas pela deposição de contaminantes oriundos do vapor utilizado durante o processo. Verificaram também que tais alterações afetaram negativamente a diferenciação osteogênica das células analisadas.

Junkar et al. (2016) estudaram a influência de diferentes processos de esterilização (autoclave, esterilização por plasma de oxigênio e luz UV) nas propriedades superficiais e no comportamento celular (osteoblastos humanos/HOB) em nanotubos de titânio. Neste estudo foi observado que a esterilização por autoclave provocou modificações mais significativas na morfologia dos nanotubos em relação aos demais processos. Os processos de esterilização analisados promoveram o aumento da molhabilidade e da rugosidade média nanométrica (sendo ambas alterações mais pronunciadas para a amostra esterilizada por plasma de oxigênio). Os autores também evidenciaram alterações químicas superficiais que junto as modificações anteriormente citadas influenciaram no comportamento de adesão, viabilidade e morfologia celular.

3.3.3. Esterilização química

Dentre os processos de esterilização química enfatiza-se a grande utilização do tratamento com óxido de etileno. Este processo é amplamente utilizado para a esterilização de dispositivos médicos, atuando como um agente de alquilação, que

desnatura as proteínas e os ácidos nucleicos funcionais de microrganismos, provocando a interrupção da multiplicação celular, isso porque o óxido de etileno reage com a parte sulfídrica da proteína presente no núcleo do microrganismo (QIU, SUN E CONNOR, 2011).

Essa ação está relacionada com os parâmetros de concentração, temperatura, umidade relativa e tempo de exposição ao gás (FRANÇA et al., 2013).

Em termos de suas desvantagens, óxido de etileno é inflamável e explosivo, além disso, seus resíduos são considerados tóxicos e cancerígenos (VETTEN et al., 2014). O óxido de etileno deve ser evitado na esterilização de biomateriais de pequenas dimensões, devido à dificuldade da eliminação dos resíduos tóxicos adsorvidos na superfície do biomaterial (ISO 10993-7-2008; RUTALA E WEBER, 2008).

Liu et al. (2013) avaliaram o efeito da esterilização por autoclave e óxido de etileno sobre as propriedades superficiais e o comportamento de biocompatibilidade de células osteoblásticas MC3T3-E1 em superfícies de Mg e MgCa. Os autores observaram a redução da hidrofília e da rugosidade superficial de ambas as amostras e relacionaram estas alterações à presença de contaminantes inorgânicos provenientes dos processos utilizados. Quanto à biocompatibilidade, o processo de óxido de etileno apresentou baixo índice de adesão celular comparativamente as demais amostras; tal comportamento foi justificado pela toxicidade dos resíduos provenientes deste processo.

Basiaga et al. (2016) avaliaram o efeito dos processos de esterilização por autoclave e óxido de etileno no comportamento eletroquímico do revestimento a base de silano formado por TEOS e Tetrametoxisilano (TMOS) depositado sobre o substrato de titânio. Os autores observaram que ambos os processos de esterilização promoveram o aumento do efeito barreira do revestimento de SiO₂, e justificaram isso pela penetração da solução de fluido corpóreo através no mesmo resultando na formação de uma camada de óxido subjacente ao substrato metálico.

Walke et al. (2016) relataram o efeito da esterilização pelos processos de autoclave e óxido de etileno sobre propriedade superficiais, eletroquímicas e adesão celular do revestimento a base de silano obtido a partir dos precursores TEOS e TMOS aplicado em aço AISI 316 L. Os autores evidenciaram a redução da rugosidade superficial nanométrica de Rms = 76,6 nm para 58,1 nm para autoclave e 65,5 nm para óxido de

etileno, aliado ao aumento da resistência a corrosão do revestimento. Entretanto, quanto à adesão e morfologia celular (fibroblastos L-29) não foram observadas alterações comparativamente a amostra não esterilizada.

3.3.4. Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio

Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio é um processo que está sendo utilizado em diversos hospitais por quase uma década. Ao contrário dos demais processos de esterilização, este processo não é tóxico, não deixa resíduos sobre os dispositivos esterilizados e faz uso de baixas temperaturas (QIU, SUN E CONNOR, 2011).

Neste processo de esterilização, o peróxido de hidrogênio é injetado dentro de uma câmara sob vácuo, na qual atua como um agente de oxidação dos componentes celulares, como por exemplo, lipídios estruturais das membranas e ácido desoxirribonucleico (DNA), interrompendo o metabolismo desses microrganismos. Esta interação química é responsável pela inativação de microrganismos (LEE et al., 2008); e, segundo Rutala e Weber, (2008) pode ocorrer também pela reação com os radicais livres gerados durante o processo este processo de esterilização.

A eficácia da esterilização por plasma representa a redução de bactérias, esporos bacterianos, leveduras e vírus, tornando o processo tão eficiente quanto o de esterilização por óxido de etileno e raios gama (HOLY et al., 2000). Ao final do ciclo de operação, os produtos da esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio são oxigênio e água, não gerando nenhum tipo de resíduos tóxicos (QIU, SUN E CONNOR, 2011).

As vantagens da esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio incluem baixa temperatura de operação, menor tempo de esterilização, o não uso de gases tóxicos, alta penetrabilidade, além de ser um processo eficaz na eliminação de bactérias e vírus (VETTEN et al., 2014).

Segundo Vezeu et al. (1996) a esterilização por plasma é eficaz na remoção de contaminantes provocando o aumento da energia de superfície do biomaterial. No entanto, este processo pode ativar a superfície esterilizada, fazendo com que a mesma reaja com os resíduos provenientes deste processo, podendo causar novamente a modificação desta superfície.

Muller et al. (2014) avaliaram o comportamento de células osteoblásticas (MG-63) sobre superfícies de titânio tratadas com plasma de peróxido de hidrogênio e, verificaram que o aumento da molhabilidade provocado pelo mesmo impactou positivamente no comportamento de adesão celular.

Embora não haja muitas publicações nesta área de pesquisa é importante salientar a importância do estudo dos efeitos causados pelos processos de esterilização nas propriedades superficiais de biomateriais. Segundo Rai et al. (2013), a etapa de esterilização é de fundamental importância na área biomédica e a escolha inadequada do processo pode prejudicar o desempenho do biomaterial por afetar suas propriedades físicas, químicas e/ou biológicas comprometendo os resultados almejados.

Por fim, diante do conteúdo apresentado neste capítulo, este estudo teve como proposta caracterizar revestimentos a base de precursores silanos, com propriedades protetivas e bioativas, aplicados sobre o substrato de Ti6Al4V. Buscou-se também avaliar o efeito de diferentes processos de esterilização sobre as propriedades dos revestimentos obtidos, bem como no comportamento de biocompatibilidade de células de osteossarcoma (MG-63) e de diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta etapa do trabalho apresenta os métodos e as técnicas utilizadas para a obtenção de revestimentos híbridos protetivo e bioativo bem como a caracterização dos mesmos, antes e após a realização dos processos de esterilização por óxido de etileno, autoclave a vapor e plasma de peróxido de hidrogênio.

4.1. Materiais

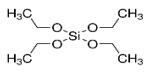
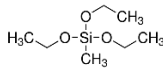
Os corpos de prova utilizados neste estudo foram de uma liga comercial de Ti6Al4V (Realum) com dimensões de 15 x 15 x 0,85 mm de espessura (recebida sob a forma de chapa), cortada com o processo de jato de água (empresa Jettek Ltda).

Os reagentes utilizados para a limpeza das amostras foram acetona (Dinâmica, 99,5 %) e álcool etílico (Anidrol, 99,5 %).

Para a obtenção do revestimento híbrido foi utilizado o precursor alcoxissilano Tetraetoxissilano, TEOS (Sigma-Aldrich, 98 %), aliado ao precursor organoalcoxissilano, Metiltriétoxissilano, MTES (Sigma-Aldrich, 98 %). Além desses, para a preparação da solução sol-gel foram utilizados álcool etílico (Anidrol, 99,5 %), ácido nítrico (Neon, 66,2 %) e ácido acético (Neon, 98 %). Como partículas bioativas utilizou-se hidroxipatita granulada comercial (Sigma-Aldrich, 90 %), de massa molar igual a 502,31 g/mol.

As propriedades físico-químicas do alcoxissilano TEOS e do organoalcoxissilano MTES são apresentadas na Tabela 1 de acordo com as informações contidas nos boletins técnicos do fornecedor.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos precursores à base de silanos.

	TEOS	MTES
Nomenclatura	Tetraetoxisilano	Metiltrietoxisilano
Fórmula molecular	$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$	$\text{CH}_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
Fórmula estrutural		
Massa molar (g.mol⁻¹)	208,30	178,30
Massa específica (g.mL⁻¹)	0,933	0,895

A solução simulada de fluido corpóreo foi elaborada de acordo com a metodologia proposta por Kokubo e Takadama, (2006). Para a formulação de 1 litro de solução foram utilizados os seguintes reagentes: 8,035 g de cloreto de sódio (Dinâmica, 99 %), 0,355 g de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, 100 %), 0,225 g de cloreto de potássio (Dinâmica, 99 %), 0,231 g de difosfato de potássio trihidratado (Sigma-Aldrich, 98 %), 0,993 g de cloreto de magnésio hexahidratado (Synth, 99 %), 39 mL de ácido clorídrico (Synth, 37 %), 0,292 g de cloreto de cálcio (Synth, 99 %), 0,072 g de sulfato de sódio (Nuclear, 99 %) e 6,118 g de hidroximetil(aminometano) (Sigma-Aldrich, 100 %).

4.2. Métodos

Para melhor organização do presente trabalho, a metodologia experimental adotada foi dividida nos seguintes tópicos:

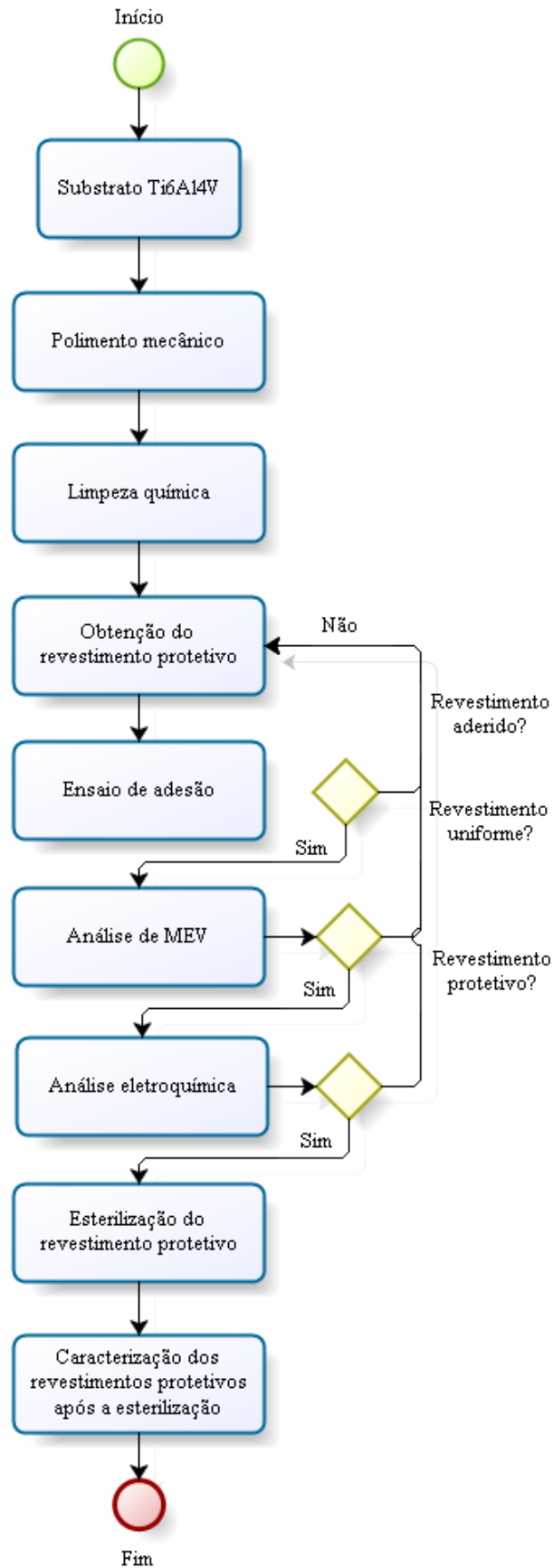
4.2.2. Preparação do substrato metálico

Para a preparação das superfícies do substrato de Ti6Al4V, as amostras foram lixadas com lixa de carbetto de silício (SiC) até a gramatura de #1200, limpas em detergente alcalino, imersas em banho ultrassônico em acetona e álcool etílico pelo tempo de 10 minutos, respectivamente, e secas com auxílio de jato de ar frio (RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013).

4.2.3. ETAPA 1: Obtenção do revestimento híbrido protetivo

A Figura 6 apresenta o fluxograma das etapas desenvolvidas para a obtenção do revestimento híbrido protetivo (TEOS/MTES) e do estudo da influência dos processos de esterilização sobre o mesmo. Junto a isso, segue a descrição da metodologia realizada.

Figura 6. Fluxograma das etapas de obtenção do revestimento protetivo e dos processos de esterilização.



O revestimento híbrido protetivo foi formulado utilizando a metodologia de sol-gel e aplicado ao substrato de Ti6Al4V pela técnica de *dip coating* (MA 765, Marconi). Para a obtenção do revestimento híbrido protetivo foi realizada a combinação dos precursores alcoxissilano TEOS e organoalcoxissilano MTES em proporção de 40:60 molar, mantendo-se constante as relações de: silanos:água (1:2) e (1:3); água:álcool etílico (1:1) e (9:1); água:ácido acético (7:1) e (9:1), respectivamente, de acordo com Wang et al. (2013); García, Ceré e Durán (2004); Ballarre et al. (2007, 2010 e 2011).

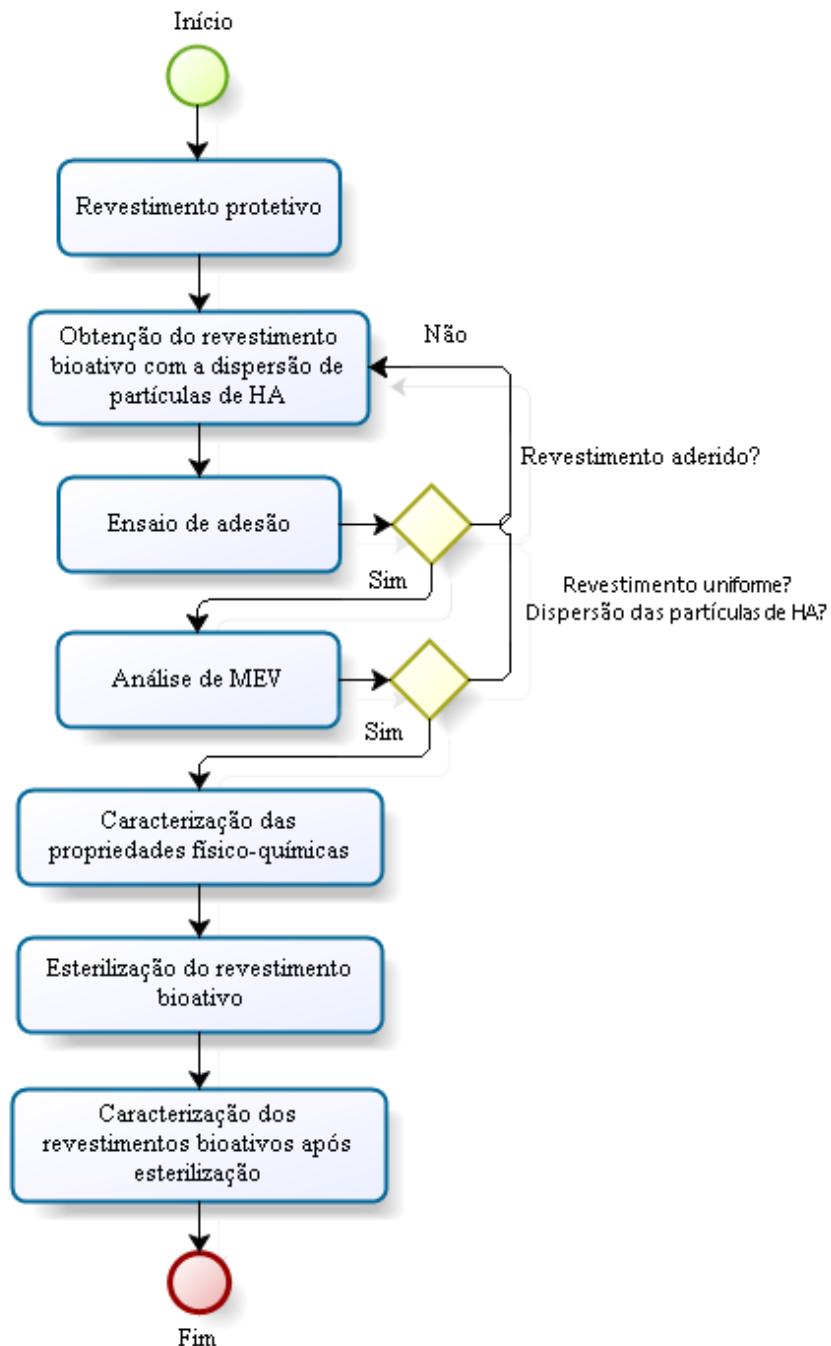
A etapa de hidrólise dos precursores orgânicos-inorgânicos foi conduzida em meio ácido ($\text{pH}_{\text{TEOS/MTES}}$ entre 1 e 2) a temperatura de 40 °C e com agitação constante nas primeiras 3 horas, seguida a agitação a temperatura ambiente até o término de 24 horas. A acidificação do meio foi feita pela adição de ácido nítrico e como solvente foi utilizado etanol.

A obtenção do revestimento protetivo no substrato Ti6Al4V foi realizada utilizando a aplicação de uma única camada de sol, com velocidades de entrada e retirada de 25 $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ e tempo de imersão de 5 minutos (BALLARRE et al., 2007; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013). Após a aplicação do sol, as amostras permaneceram expostas ao ar por 30 minutos a temperatura ambiente, para promover a secagem e a condensação do filme sobre o substrato e, em seguida, foram levadas ao forno (marca Sanchis - Fornos Industriais) para o processo de cura a 450 °C por 30 minutos, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2.4. ETAPA 2: Obtenção do revestimento híbrido bioativo

A Figura 7 apresenta o fluxograma das etapas desenvolvidas para a obtenção e caracterização do revestimento híbrido bioativo (TEOS/MTES com adição de hidroxiapatita), bem como, do estudo da influência dos processos de esterilização sobre o mesmo. Junto a isso, abaixo segue a descrição da metodologia realizada.

Figura 7. Fluxograma das etapas de obtenção do revestimento bioativo e dos processos de esterilização.



Para a homogeneização e estabilidade das partículas de hidroxiapatita na solução de TEOS/MTES foi realizada a moagem das mesmas visando a redução do tamanho dos aglomerados. Para isso, utilizou-se um moinho planetário, modelo Pulverisette 6, marca Fritsch, com jarro de moagem de aço temperado revestido com politetrafluoretileno (PTFE), volume de 225 mL. Como corpos moedores foram utilizadas esferas de zircônia de 10 mm de diâmetro. A moagem foi realizada com as razões de partículas: esferas de

20:1 e álcool etílico:pó 70:30 com velocidade de 500 rpm pelos tempos de 30, 45 e 60 minutos (LANDAL et al., 2014)

A dispersão das partículas bioativas de hidroxiapatita foi realizada no sol já hidrolisado à temperatura ambiente, com a proporção de adição de 10 % em massa (BALLARRE et al., 2011; DIMITRIEVSKA et al., 2011, OMAR et al., 2015). A homogeneização da suspensão foi realizada em um misturador de alto cisalhamento (marca Sonics), com amplitude de 40 % por 6 minutos (GARCIA, CERÉ E DURAN, 2004).

O revestimento híbrido bioativo foi também obtido a partir dos precursores silanos TEOS/MTES em proporção molar (40:60) em condições similares as anteriormente utilizadas, porém com a adição de partículas bioativas de hidroxiapatita. As partículas foram adicionadas após 24 horas de hidrólise do sol de TEOS/MTES e posteriormente esta suspensão permaneceu em agitação por mais 24 horas até a obtenção do revestimento bioativo sobre o substrato metálico de Ti6Al4V já revestido com o revestimento protetivo.

A deposição do filme bioativo foi realizada utilizando a aplicação de uma única camada de sol, com velocidades de entrada e retirada da suspensão de $18 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ e tempo de imersão de 5 minutos (BALLARRE et al., 2010). Posteriormente, as amostras permaneceram expostas ao ar por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram levadas ao forno para o processo de cura nas temperaturas de 60 ou 150 °C por 1 hora (BALLARRE et al., 2008), utilizando-se uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2.5. Processos de esterilização

O estudo da influência dos processos de esterilização foi realizado em ambos os revestimentos, protetivo e bioativo, (Etapas 1 e 2).

Anteriormente ao processo de esterilização, foi realizada a higienização das amostras, essa foi realizada na empresa Esterilizare, de Caxias do Sul, credenciada junto Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A higienização foi realizada pela imersão pelo tempo de 10 minutos das amostras em um detergente enzimático ENZI-TEC 5 e, posteriormente, foi realizado o enxague das mesmas com água de osmose reversa e seguida pela secagem com ar comprimido filtrado.

Após a higienização, as amostras esterilizadas pelos processos de óxido de etileno e autoclave foram acondicionadas em embalagens de grau cirúrgico 100 x 150 cm e as por plasma de peróxido de hidrogênio em embalagens do material Tyvek®.

4.2.5.1. Esterilização em autoclave

A esterilização em vapor saturado foi realizada na empresa Esterilizare, conforme procedimento padrão, em autoclave da marca Baumer (série 050500001, modelo HI-VAC Plus Autoclave Horizontal) com capacidade de 0,56 m³. A mesma operou nas condições de temperatura de 134 °C, pressão de 0,68 atm por 7 minutos de exposição.

4.2.5.2. Esterilização por óxido de etileno

A esterilização por óxido de etileno também foi realizada na empresa Esterilizare, de acordo com o procedimento padrão da mesma. As condições utilizadas foram: pressão de 0,65 atm, temperatura de 55 °C e tempo de 180 minutos. O gás utilizado no processo de esterilização foi de 90 % óxido de etileno e 10 % de dióxido de carbono (CO₂), marca Chemogas (Lote 280715).

Nos ciclos de esterilização dos processos de óxido de etileno e vapor saturado foram dispostos integradores químico e biológico, os quais após o término do ciclo foram colocados em incubação (tempo de resposta em 4 e 3 horas, respectivamente).

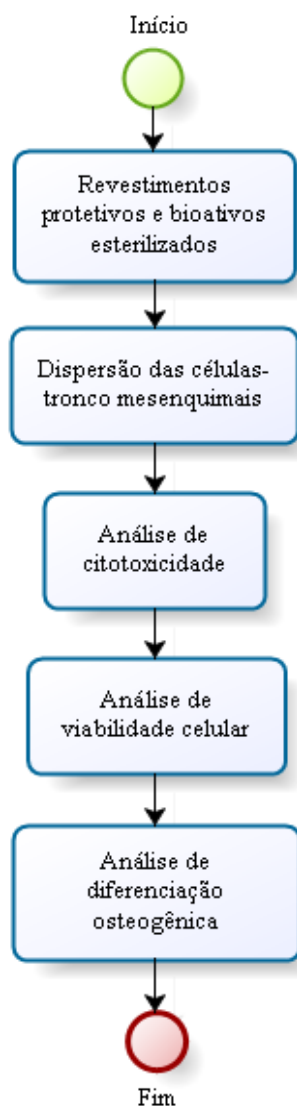
4.2.5.3. Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio

A esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio foi realizada na Central de Materiais Esterilizados (CME) do hospital Pompéia, localizado em Caxias do Sul. O processo de esterilização foi realizado pelo uso do esterilizador Sterrad NX da marca Johnson e Johnson Company. O tempo de esterilização foi de 28 minutos, com temperatura durante o ciclo de esterilização entre 45 – 55 °C.

4.2.6. ETAPA 3: Diferenciação de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento bioativo

A Figura 8 apresenta as etapas desenvolvidas no estudo de diferenciação das células-tronco mesenquimais em células osteogênicas, na forma de fluxograma.

Figura 8. Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo de diferenciação das células-tronco mesenquimais.



Os procedimentos referentes à obtenção, caracterização e diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTMs) foram realizados no Laboratório de Células-Tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

4.2.6.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais

A obtenção das células-tronco mesenquimais foi feita através de células de polpa de dente decíduo. Esses foram obtidos na Faculdade de Odontologia da UFRGS, após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou responsável e com a aprovação no Comitê de Ética (CAAE nº 36403514.6.0000.5347). Em seguida, os dentes foram levados para o Laboratório de Células-Tronco da Faculdade de Farmácia para a continuidade dos experimentos.

Para o isolamento das células, a polpa foi separada cuidadosamente do tecido dentário com o auxílio de uma colher de dentina no fluxo laminar. Na sequência, a manipulação do tecido pulpar removido foi realizada de acordo ao processamento descrito por Bernardi et al. (2011). Resumidamente, a polpa dos dentes foi mantida em contato com a solução de colagenase a 0,2 % (Gibco®) por 60 minutos e, em seguida, após a centrifugação a 800 g por 10 minutos, a suspensão de células resultante foi semeada em 1 poço de uma placa de cultivo de 12 poços, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich®), contendo 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco).

A cultura foi mantida em incubadora umidificada a 5 % CO₂ e 37 °C por 72 horas, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas subsequentes foram realizadas a cada 3-4 dias.

Após a subconfluência, a cultura primária foi lavada uma vez com solução salina de Hank (HBSS) livre de Ca⁺² e Mg⁺². Uma solução de 0,25 % de tripsina em HBSS foi utilizada e as células foram incubadas por 10 minutos a 37 °C. As células foram ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas para novas garrafas de cultivo celular. Passagens subsequentes foram realizadas de forma semelhante. As passagens (subculturas) foram realizadas quando a cultura atingir uma confluência de, pelo menos, 90 %.

4.2.6.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais

A caracterização das células-tronco mesenquimais foi realizada pela análise morfológica das culturas celulares, a presença das células aderentes e a sua confluência

foram rotineiramente observadas em Microscópio Invertido de Contraste de Fase, marca Olympus, durante a cultura das células-tronco.

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente pela presença de marcadores de células, através de citometria de fluxo, usando-se o equipamento FACSARIA III (Becton Dickinson). As CTMs foram analisadas na quinta passagem da cultura celular, conforme segue:

Os anticorpos utilizados foram os específicos para identificar os marcadores de CTMs, tais como CD90, CD73, CD105 bem como confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, como CD34, CD45 e HLA-DR. A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 2 µL de anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para cada uma das moléculas. O 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) foi utilizado para permitir a avaliação apenas de células vivas.

Após incubação com os anticorpos durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. O 7AAD foi utilizado a uma concentração final de 1 µg.mL⁻¹ em solução tampão de fosfato salino (PBS) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSARIA III (BD), equipado com laser de argônio para 488 nm. O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular, e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos PE (*phycoerythrin* - ficoeritrina) e FITC (*fluorescein isothiocyanate* - isotiocianato de fluoresceína). A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se em torno de 10.000 eventos de cada amostra, e a análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva versão 6.0 (BD Biosciences).

A etapa de diferenciação celular foi realizada seguindo protocolos já descritos por Meirelles, (2006). A diferenciação celular *in vitro* em tipos celulares mesenquimais, necessária para confirmação da identidade da população obtida, foi testada a partir da quinta passagem.

A diferenciação osteogênica foi feita pelo cultivo durante 21 dias em meio contendo soro fetal bovino (10 %), dexametasona (10⁻⁸ M), ácido ascórbico 2-fosfato (5

$\mu\text{g/mL}$) e β -glicerofosfato (10 mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com Alizarin Red S em pH 4,2.

Para a diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais, realizou-se o cultivo celular por 3 a 4 semanas em meio IMDM contendo 20 % de plasma humano, dexametasona (10^{-7} M), insulina (2,5 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (5 μM), rosiglitazona (5 μM) e heparina sódica (10 unidades/mL). Os adipócitos foram discernidos por observação ao microscópio com contraste de fase e/ou por coloração com o corante Oil Red O.

Para a diferenciação condrogênica, as células aderentes foram cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias. O meio foi constituído de DMEM e suplementado com 15 mM Hepes, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de insulina, 10 ng/mL TGF- β 1 e 50 nM da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). A condrogênese foi demonstrada pela coloração com *Alcian Blue*.

Todos os meios de cultivo foram trocados a cada 3-4 dias e as células foram fixadas com 4% paraformaldeído, sendo realizada posteriormente a coloração específica.

Com relação aos pré-requisitos para classificação das células como CTMs, as mesmas foram rotineiramente acompanhadas em microscópio ótico para avaliação de sua morfologia fibroblastóide e capacidade de aderência ao plástico da placa de cultivo.

4.2.6.3. Diferenciação osteogênica (Mineralização)

Após a obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais, essas foram dispersas sobre o revestimento híbrido protetivo e bioativo proposto e então foi avaliada a diferenciação osteogênica das mesmas.

Para a realização do ensaio, as amostras revestidas e esterilizadas pelos diferentes processos foram distribuídas em poços de placas de cultivos celulares de 24 poços, e em seguida foram colocados o-rings de silicone em torno das mesmas, isso para assegurar que as células semeadas permanecessem sobre os biomateriais e que a área de análise fosse igual para todos os grupos.

Em seguida, 3×10^4 células sobre os biomateriais e a capacidade de diferenciação foi verificada após 21 dias de experimento. Para a análise, as triplicatas foram fixadas

com paraformaldeído 4 % por 30 minutos. Em seguida, todos os grupos passaram por coloração com Alizarin Red por 20 minutos. Depois de realizada a lavagem com água Milli-Q, 500 microlitros de ácido acético 10 % foi adicionado aos poços contendo as células e/ou biomateriais até dissolução completa de todos os cristais de cálcio corados. Desses, 50 microlitros foram transferidos para uma placa de 96 poços e 100 microlitros de uma solução de hidróxido de amônio foi adicionado. A leitura em leitor de placas foi realizada imediatamente, em 405 nm.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das triplicatas realizadas.

4.2.7. Caracterizações das amostras

4.2.7.1. Microestrutura do substrato Ti6Al4V

A microestrutura do substrato metálico de Ti6Al4V foi avaliada por análise metalográfica no Laboratório de Metalografia/UCS. Para isso, foi realizado o lixamento das amostras (lixas de carbetto de silício até a gramatura de #4000) com posterior ataque, utilizando-se uma solução *Kroll* (HF/HNO₃/H₂O) durante 15 segundos (COLLINGS, 1994). Após o ataque metalográfico, a amostra foi lavada em água e álcool etílico e posteriormente a microestrutura foi analisada por microscopia óptica (MO) em um microscópio da marca Nikon, modelo Epiphot 200.

4.2.7.2. Espectroscopia no infravermelho

Os precursores a base de silanos, as soluções hidrolisadas, os revestimentos e as partículas de hidroxiapatita foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em reflexão total atenuada (ATR). Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos na região compreendida entre 4000 e 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ utilizando um espectrômetro Nicolet IS10 Thermo Scientific, (Laboratório de Polímeros/UCS).

4.2.7.3. Análise termogravimétrica

As propriedades térmicas dos precursores à base de silanos, dos revestimentos e das partículas de hidroxiapatita foram analisadas pelo ensaio termogravimétrico em um equipamento TGA da marca Shimadzu, modelo TG-50 do Laboratório de Polímeros/UCS, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera inerte de nitrogênio ($\text{N}_2 - 50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) com temperatura 23 ± 2 até $800\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.7.4. Microscopia de varredura de alta resolução

A morfologia do substrato metálico, dos revestimentos e das partículas de hidroxiapatita foi observada em vista de topo em Microscópio de varredura de alta resolução (MEV/FEG), marca Tescan-Modelo Mira3, no Laboratório de Caracterização de Materiais/UCS.

Acoplado ao Microscópio de varredura de alta resolução (MEV/FEG) foi realizado o mapeamento elementar por Espectroscopia por energia dispersiva (EDS), em equipamento de marca Oxford Instruments modelo X-Maxd. Tal técnica foi utilizada para atestar a formação dos revestimentos à base de silanos sobre o substrato metálico e sobre o revestimento protetivo.

4.2.7.5. Ensaio de adesão

Para a análise de adesão dos revestimentos sobre o substrato metálico foi realizada uma adaptação do teste *Crosshatch and Tape Pull Test*, de acordo com a norma ASTM D-3359. Na referida norma é indicada a realização manual de ranhuras verticais e horizontais no revestimento depositado, com auxílio de um dispositivo de corte. Em sequência, uma fita adesiva (marca 3M) foi aplicada e pressionada sobre o mesmo. Por fim, a fita adesiva é removida com uma inclinação próxima a 180° e as áreas de destacamento do revestimento são analisadas e de acordo com a quantidade de material que ficou aderido ao substrato o grau de aderência é atribuído. Para isso, a região destacada foi avaliada com vista de topo e com inclinação da amostra de 35° no MEV/FEG. Essa inclinação foi utilizada visando avaliar a forma de destacamento do

revestimento protetivo do substrato metálico e do revestimento bioativo sobre o protetivo, respectivamente.

4.2.7.6. Rugosidade

O substrato metálico e os revestimentos foram caracterizados pela determinação dos parâmetros e perfis de rugosidade nanométricos e micrométricos.

A análise de rugosidade nanométrica foi realizada por microscopia de força atômica (AFM) em um microscópio da marca SHIMADZU, modelo SPM-9500J3, operando em modo de contato, com sondas de nitreto de silício (nanossensores) e *scanner* com variação vertical de 8 μm e área de varredura de 10 x 10 μm , (Laboratório de Pesquisa em Corrosão/UFRGS).

A rugosidade micrométrica foi analisada em rugosímetro de contato, da marca Mitutoyo, modelo SurfTest SJ-301 (Laboratório de Novas Tecnologias de Produção/UCS) com cut-off de 0,8 mm.

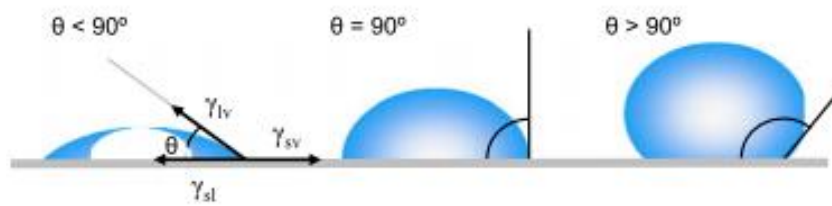
Nestas análises foram mensurados os parâmetros de Ra (rugosidade média da superfície), Ry (distância entre o pico mais alto e o vale mais profundo) e Rz (rugosidade média aritmética de cinco valores parciais dentro de uma linha de medição, considerando os pontos de maior afastamento, acima e abaixo da mesma) (SMITH, 2002).

4.2.7.7. Ângulo de contato

O ângulo de contato (θ), foi mensurado para quantificar a molhabilidade do substrato metálico e dos revestimentos.

O ângulo de contato expressa o valor, em graus, da interface formada entre um líquido e a superfície de um sólido quando em equilíbrio com as fases presentes. Quando utilizado água como líquido, valores de θ menores que 90° representam molhamento da superfície, ou seja, a superfície é caracterizada como hidrofílica, e em contrapartida, para valores maiores que 90° , essa é caracterizada como hidrofóbica (YUAN E LEE, 2013). A Figura 9 exemplifica as interações entre a superfície e o líquido que determinam os valores de ângulo de contato.

Figura 9. Ilustração das interações entre a superfície e o líquido para determinação do valor de ângulo de contato (Adaptado de YUAN E LEE, 2013).



Esta análise foi realizada pelo método da gota séssil a partir de um aparato desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa em Corrosão da UFRGS, na qual gotas de água deionizada, de solução simulada de fluido corpóreo (SBF) e do meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) foram depositadas sobre as superfícies por meio de uma microseringa. Posteriormente os valores de ângulo de contato foram mensurados por meio de um programa de análise de imagens (para todas as amostras foram realizadas medidas em triplicata).

4.2.7.8. Caracterização eletroquímica

A caracterização quanto ao desempenho eletroquímico do substrato metálico e do revestimento protetivo foi realizada pelo monitoramento do potencial de circuito aberto (OCP) e curvas de polarização potenciodinâmicas. Uma célula convencional de três eletrodos foi utilizada para realizar as análises, sendo o eletrodo de referência o de calomelano saturado (ECS) e contra eletrodo de platina, interligada a um Potenciostato/Galvanostato, da marca IviumStat da Ivium Technologies, auxiliado pelo software IviumSoft, (Laboratório de Corrosão e Proteção Superficial/UCS).

A parte inferior das amostras foi lixada para a remoção dos revestimentos, na qual foi realizada o contato elétrico através de um fio de cobre, que posteriormente foi recoberto com uma fita de carbono condutora. A área exposta para análise foi de 1 cm² e a restante foi isolado pela aplicação de uma resina epóxi (marca Loctite), com tempo de cura de 24 horas.

As medidas foram realizadas em meio não agitado, naturalmente aerado, à temperatura de aproximadamente 37 °C e o eletrólito utilizado foi uma solução simulada de fluido corpóreo (SBF). O OCP foi monitorado durante a primeira meia hora de imersão

no eletrólito antes do ensaio de polarização. O intervalo de varredura foi de -200 mV abaixo do potencial de circuito aberto e 400 mV acima desse potencial com velocidade de varredura de $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. O período de monitoramento de cada amostra foi de 28 dias de imersão (AMATO et al., 2005; BALLARRE et al., 2008; ZOMORODIAN et al., 2012).

4.2.7.9. Difração de raios-X

As análises de difração de raios-X (DRX) foram realizadas em um difratômetro de Raios-X, marca Philips, modelo X'Pert MPD, equipado com monocromador curvado de grafite e ânodo fixo de cobre, operando a 40 kV e 40 mA. O intervalo de ângulos analisados foi de 5 a 75°, com passo de $5^\circ\cdot\text{s}^{-1}$, no Laboratório de Materiais Cerâmicos/UFRGS. Tal análise foi realizada a fim de verificar a bioatividade do revestimento proposto após imersão em SBF.

4.2.7.10. Resistência ao desgaste por abrasão

Os ensaios tribológicos de desgaste foram realizados com um tribômetro – CETR, controlado computacionalmente com uma configuração do tipo “*ball on plate*” do Laboratório de Pesquisa em Corrosão (UFRGS). O desgaste foi realizado por uma esfera de zircônia estabilizada com ítria em movimento linear e recíproco com um diâmetro de 0,5 mm. Os ensaios foram realizados com carga de 0,3 N por 60 minutos em uma frequência de 1 Hz e comprimento da trilha de 2 mm. A trilha foi obtida perpendicularmente ao lixamento das amostras.

4.2.7.11. Degradação hidrolítica

A degradação hidrolítica do revestimento bioativo foi avaliada por medição indireta da variação da massa. Para a realização deste ensaio se fez uma adaptação das diretrizes descritas na norma ISO 10993-13:2010.

O estudo de degradação foi realizado pela imersão das amostras contendo o revestimento bioativo em uma solução de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de

penicilina/estreptomicina (P/S) a temperatura de aproximadamente 37 °C em diferentes tempos de avaliação (1, 7, 14, 28 e 60 dias) (MARTÍNEZ-IBÁÑEZ et al., 2017).

Após a conclusão de cada um dos tempos selecionados, as amostras foram removidas da solução, lavadas com água deionizada e secas em estufa a 37 °C por 48 horas. Posteriormente as amostras tiveram suas massas registradas e o percentual da variação de massa foi calculado pela Equação 1 abaixo:

$$massa (\%) = \frac{mf - mi}{mi} \times 100 \quad (1)$$

Sendo mi e mf as massas das amostras antes e após a imersão.

4.2.7.12. Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em forno de grafite

Para quantificar o silício liberado do revestimento bioativo, as soluções DMEM na qual as amostras permaneceram imersas para o estudo de degradação hidrolítica foram analisadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS, do inglês, *high resolution-continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*).

Em um espectrômetro de absorção atômica modelo contrAA 700 (Analytik Jena, Alemanha), da Fundação Universidade do Rio Grande (FURG). O espectrômetro foi operado com tubos de grafite revestidos com grafite pirolítico e com plataforma integrada. Como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de arco de xenônio (Analytik Jena), a qual permite a emissão de radiação dentro da faixa espectral entre 185 e 900 nm. No que diz respeito ao sistema óptico do espectrômetro, foi utilizado um duplo monocromador (Analytik Jena) de alta resolução composto por um prisma para pré-separação de ordens espectrais e uma grade de difração do tipo *Echelle*. O sistema óptico permite obter uma resolução espectral de $\lambda/\Delta\lambda = 145000$, o que corresponde a uma banda espectral inferior a 2 pm por pixel em 200 nm.

A água ultrapura utilizada na preparação das soluções de referência foi purificada em um sistema Milli-Q Direct-Q UV3® (Millipore), com resistividade de 18,2 MΩ.cm. As soluções de referência monoelementares de Si utilizadas para calibração e ensaio de recuperação, foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg.L⁻¹ (Assurance)

em ácido nítrico HNO₃, 5 % (v/v) e ácido fluorídrico, HF 1 % (v/v). Como modificador químico, foi utilizada uma solução de Pd 1000 mg.L⁻¹ em HNO₃ 10 % (v/v). Argônio com pureza de 99,998 % (marca White Martins) foi utilizado como gás de purga durante o programa de aquecimento do forno de grafite nas determinações por HR-CS GF AAS.

Inicialmente, os tubos de grafite com recobrimento pirolítico foram condicionados termicamente, utilizando o programa de formatação recomendado pelo fabricante do equipamento de HR-CS AAS, sempre que os tubos foram utilizados pela primeira vez. Da mesma forma, as plataformas de grafite foram submetidas a um programa de aquecimento recomendado pelo fabricante para descontaminação, quando necessário, até que os valores de branco fossem considerados desprezíveis (absorbância integrada inferior a 0,002 segundos).

Tanto as amostras, como as soluções de referência de silício foram introduzidas (5 µL) sobre a plataforma de grafite com auxílio de um amostrador automático. Da mesma forma, 5 µL de Pd 1000 mg.L⁻¹ como modificador químico foram introduzidos sobre a plataforma, tanto nas medições feitas nas amostras como nas soluções de referência. As determinações foram feitas de forma direta (sem uma etapa de decomposição prévia das amostras) utilizando a linha de ressonância principal do Si em 251,6110 nm, centradas no pixel central (101 ± 1). Para a quantificação de Si, foi feita uma curva de calibração externa de 100 a 750 µg.L⁻¹. O programa de temperatura do forno de grafite foi adaptado das condições recomendadas pelo fabricante e este segue apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de temperatura para a determinação de Si por HR-CS GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C.s⁻¹)	Tempo (s)	Ar (L.min⁻¹)
Secagem 1	80	6	20	2,0
Secagem 2	90	3	20	2,0
Secagem 3	110	5	20	2,0
Pirólise	1700	300	10	2,0
Auto-zero	1700	0	5	0
Atomização	2600	1500	5	0
Limpeza	2650	50	4	2,0

A curva de calibração (entre 0,10 e 0,75 mg.L⁻¹) utilizada na quantificação de Si, apresentou um coeficiente de determinação (R²) de 0,9977. Os desvios padrões (RSDs) foram inferiores a 12 %. Para as amostras de maior concentração de Si (60 dias) foram feitas as diluições necessárias para a adequação das leituras com a faixa de concentração utilizada para a curva de calibração. Para avaliar a qualidade dos resultados obtidos foi feito um ensaio de adição e recuperação pela adição de 0,500 mg.L⁻¹ de Si. A recuperação obtida foi de 105 %, com desvio padrão de 11 %. Este resultado pode ser considerado adequado na avaliação da exatidão e precisão do método.

4.2.7.13. Estudo da bioatividade

O estudo da bioatividade do revestimento proposto foi realizado pela imersão das amostras em uma solução simulada de fluido corpóreo (SBF) a temperatura de aproximadamente 37 °C por diferentes tempos de avaliação (1, 7, 14 e 28 dias) (KOKUBO E TAKADAMA, 2006; OMAR et al., 2015).

Após o término dos tempos selecionados, as amostras foram removidas das soluções, lavadas com água deionizada e secas em estufa a 37 °C por 48 horas, seguido pela pesagem. O percentual da variação de massa foi calculado pela Equação 1 anteriormente citada.

4.2.7.14. Caracterização biológica

O comportamento biológico dos revestimentos híbridos propostos foi avaliado em distintas etapas deste estudo.

O substrato metálico e o revestimento protetivo esterilizados pelos diferentes processos foram avaliados quanto à citotoxicidade, viabilidade, adesão e morfologia celular. Para isso foram utilizadas células de osteossarcoma humano (MG-63) seguindo a metodologia de análises por contato indireto e contato, conforme descrito na norma ISO 10993-5-2009-2; essas análises foram realizadas no Laboratório de Genoma, Proteômica e Reparos de DNA/UCS.

Para o revestimento bioativo a caracterização biológica foi avaliada quanto à citotoxicidade, adesão, viabilidade e morfologia celular das células-tronco mesenquimais,

no Laboratório de Hematologia e Células-Tronco/UFRGS. Ressalta-se que para a realização deste estudo biológico foram utilizadas cinco diferentes culturas primárias e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.7.14.1. Cultura celular sobre revestimento híbrido protetivo

A citotoxicidade foi avaliada pelo método indireto com ensaio de MTT. Este método é baseado na redução do MTT (brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) pela enzima desidrogenase mitocondrial, na formação de cristais de formazan (MOSMANN et al., 1983; ALLEY et al., 1988). Primeiramente, para a obtenção de uma solução de extração, o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S) foi colocado em contato com amostras Ti6Al4V e Ti6Al4V revestidas com o filme protetivo ($3 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$) durante 24 horas a 37°C em 5 % de CO_2 . Em seguida, as células MG-63 foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células. mL^{-1} em 100 μL de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1 % P/S. Após 24 horas, as células foram tratadas com a solução de extração obtida pela imersão das amostras durante 1, 2 e 7 dias. O meio foi removido e 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 2 horas em atmosfera umidificada com 5 % de CO_2 . Subsequentemente, retirou-se a solução de MTT e dissolveu-se os cristais de formazan em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Realizou-se a leitura espectrofotométrica a 570 nm em um leitor de microplacas (Spectra Max190, Molecular Devices, EUA) e os resultados foram expressos em porcentagem da viabilidade. A absorbância do controle negativo representou 100 % de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle. As alterações na viabilidade celular analisadas pelo método indireto foram observadas e documentadas, após 1, 2 e 7 dias de exposição ao tratamento da amostra.

Para verificar as alterações morfológicas nas células MG-63, procedeu-se o protocolo de coloração de Giemsa, Nerseyan et al. (2006), para isso as mesmas foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células. mL^{-1} com 100 μL de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % SFB e 1 % P/S. Após 24 horas, as células foram tratadas com a solução de extração, citada anteriormente, e incubadas por

1, 2 e 7 dias. Para o controle negativo, utilizou-se meio DMEM (10 % de SFB e 1 % P/S) e para o controle positivo utilizou-se DMSO 5 %, incubou-se a 37 °C em 5 % de CO₂, no mesmo tempo citado acima. O meio foi removido e fixou-se as células com metanol durante cinco minutos e adicionou-se solução de *Giemsa* durante 10 minutos na mesma placa. Após, visualizou-se a placa em microscopia com ampliação de 200 x.

A viabilidade celular foi analisada pela realização do método direto com a técnica de coloração utilizando laranja de acridina e brometo de etídio em placas de 24 poços. As amostras (1 cm²) com e sem revestimento foram dispostas nos diferentes poços. Após, semeou-se as células MG-63 com densidade de 3 x 10⁴ células/poço sobre as amostras em 1000 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10 % de SBF e 1 % de P/S, seguido de incubação a 37 °C em 5 % de CO₂, durante o período de 2 e 7 dias. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, lavado com PBS e sobre as amostras se utilizou a técnica de coloração com corante laranja de acridina (100 µg.mL⁻¹) e brometo de etídio (100 µg.mL⁻¹). Realizou-se a contagem de células em apoptose através de microscópio de fluorescência com 100 x de ampliação.

Para comparativo nos ensaios citados acima, como controle negativo, utilizou-se meio DMEM (10 % de SFB e 1 % P/S) e para o controle positivo utilizou-se DMSO 5 % a 37 °C em 5 % de CO₂.

A morfologia celular e a distribuição topográfica das células MG-63 sobre as amostras de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM foram avaliadas no MEV/FEG. As células foram inicialmente semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5 x 10⁴ células.mL⁻¹ para as análises de 2 e 7 dias. Em ambas as linhagens, utilizou-se 1000 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB e 1 % de P/S sobre as amostras durante 2 e 7 dias. Posteriormente fixou-se as células com solução de glutaraldeído 3 % em PBS (v/v) durante 15 minutos e com etanol 30, 50, 70, 90 e 100 % (v/v) durante 10 minutos para cada concentração. Após, manteve-se as amostras em dessecador até a realização da análise de MEV/FEG.

4.2.7.14.2. Cultura celular sobre revestimento híbrido bioativo

A citotoxicidade dos revestimentos bioativos em relação às CTMs foi avaliada pelo método colorimétrico (Labtest) por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH).

Esta enzima faz parte do metabolismo dos glicídios e pode ser encontrada nas células dos principais tecidos. Pelo rompimento da membrana celular há a liberação da enzima Lactato desidrogenase (LDH), localizada no citoplasma das células, para o meio de cultura e a partir da sua presença é realizada a quantificação. O aumento da dosagem no meio de cultura desta enzima aumenta com a morte celular. A partir disso, as amostras contendo os revestimentos bioativos foram dispostas em placas de cultura de 24 poços, imersas em meio de DMEM suplementado com 10 % de SFB e 0,1 % de P/S, das quais alíquotas do sobrenadante foram retiradas para análise após 1, 4 e 9 dias de cultivo. Foram utilizados os controles, negativo, células cultivadas diretamente na superfície plástica das placas de cultura, como controle de não toxicidade; e positivo, no qual as células foram cultivadas diretamente no poço e, no dia da dosagem, foi adicionado Triton X-100, (Sigma-Aldrich), na concentração de 1 % (v/v), a fim de se verificar a liberação máxima de LDH, este reagente é responsável pelo processo de destruição da célula causada pela ruptura da membrana plasmática. A leitura da absorbância foi realizada em Multiskan FC Thermo Scientific.

A adesão das CTMs foi analisada pela disposição das amostras revestidas em placas de 24 poços, imersas em meio de cultura de DMEM suplementado com 10 % de SBF e 0,1 % de P/S, e sobre essas foram semeadas aproximadamente 30×10^4 células. Para comparativo, o controle negativo foi realizado em células cultivadas diretamente sobre as superfícies plásticas das placas de cultura. Após 6 horas de semeadura, as células foram coradas com 4, 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), um marcador de núcleo celular. Após inúmeras lavagens para remoção do corante em excesso, fotografias com ampliação de $400 \times (97,2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2)$ das superfícies das amostras foram tomadas em 9 pontos aleatórios, com auxílio de um microscópio invertido da marca Olympus. O resultado de adesão foi calculado pela média das células obtidas em cada ponto.

A viabilidade celular foi analisada pelo uso do reagente WST-8 (Sigma-Aldrich). Em placas de 24 poços, foram semeadas 3×10^4 células/poço, em meio de cultura de DMEM suplementado com 10 % de SFB e 0,1 % de P/S e após 1, 4 e 7 dias de cultivo, o reagente WST-8 foi adicionado, permanecendo em contato com as células por 1 hora (de acordo com as instruções do fabricante). Seguindo isso, a solução foi lida a 450 nm no mesmo leitor de placas citado acima. Como controle negativo, as células foram cultivadas diretamente no poço da placa de cultura.

A morfologia das CTMs foi analisada por microscopia confocal, microscópio Olympus FV1000. Para esta análise, as células foram semeadas sobre as amostras contendo os revestimentos, em meio DMEM suplementado com 10 % de SFB e 0,1 % de P/S e, após decorridos 1, 4 e 9 dias desta semeadura, utilizou-se paraformaldeído por 1 hora, à temperatura ambiente para fixar as mesmas. Em seguida, uma solução de PBS/Triton (0,1 %) (Invitrogen®) foi deixada em contato com as células por 30 minutos, seguida, pela adição de uma solução de faloidina/rodamina ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em PBS/triton por 40 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Depois de retirada essa última solução, foi adicionado o corante DAPI para a marcação dos núcleos celulares, por 1 minuto, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Lavagens sucessivas foram realizadas e as amostras com células marcadas foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz, até a realização da análise de microscopia. Como controle negativo, novamente foram semeadas células diretamente sobre os poços de cultivo.

Para ambas as caracterizações biológicas (revestimento protetivo e bioativo) a significância estatística dos resultados foi avaliada utilizando t-teste e análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição normal. Significância foi aceita para p inferior a 0,05 utilizando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 19.0) para Windows.

A Tabela 3 apresenta a codificação e a descrição das amostras utilizadas durante as próximas etapas deste estudo.

Tabela 3. Codificação e descrição das amostras deste estudo.

Nomenclatura	Descrição
Ti6Al4V	Ti6Al4V lixado.
Ti6Al4V/TM	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo composto TEOS e MTES curado a 450 °C.
Ti6Al4V _{OE}	Ti6Al4V lixado e esterilizado pelo processo de óxido de etileno.
Ti6Al4V _{AC}	Ti6Al4V lixado e esterilizado pelo processo de autoclave.
Ti6Al4V _{PH}	Ti6Al4V lixado e esterilizado pelo processo de plasma de peróxido de hidrogênio.
Ti6Al4V/TM _{OE}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e esterilizado pelo processo de óxido de etileno.
Ti6Al4V/TM _{AC}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e esterilizado pelo processo de autoclave.
Ti6Al4V/TM _{PH}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e esterilizado pelo processo de plasma de peróxido de hidrogênio.
Ti6Al4V/TM/TM _{HA-60°C}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e revestimento bioativo composto por TEOS e MTES contendo 10 % de hidroxiapatita curado a 60 °C.
Ti6Al4V/TM/TM _{HA-150°C}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e revestimento bioativo composto por TEOS e MTES contendo 10 % de hidroxiapatita curado a 150 °C.
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/OE}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e revestimento bioativo contendo 10 % de hidroxiapatita curado a 60 °C e esterilizado pelo processo de óxido de etileno.
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/AC}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo curado a 450 °C e revestimento bioativo contendo 10 % de hidroxiapatita curado a 60 °C e esterilizado pelo processo de autoclave.
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/PH}	Ti6Al4V lixado com aplicação de revestimento protetivo e revestimento bioativo contendo 10 % de hidroxiapatita curado a 60 °C e esterilizado pelo processo de plasma de peróxido de hidrogênio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos objetivos propostos no estudo, neste capítulo estão discutidos os seguintes resultados: preparação e caracterização do substrato metálico, obtenção e caracterização dos revestimentos protetivo e bioativo aplicados sobre o substrato metálico de Ti6Al4V, a influência de diferentes processos de esterilização sobre ambos revestimentos e por fim o estudo do comportamento de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento final proposto.

5.1. Obtenção e esterilização do revestimento híbrido protetivo - ETAPA 1

5.1.1. Obtenção e caracterização do revestimento híbrido protetivo

O revestimento protetivo foi obtido sobre a liga de Ti6Al4V, e por isso foi realizada a análise da composição química bem como da microestrutura da mesma afim de caracterizá-la.

A Tabela 4 apresenta a composição química elementar da liga Ti6Al4V determinada pela técnica de fluorescência de raios-X, descrita no certificado de qualidade fornecido pela empresa Realum. Comparando os valores obtidos com os estabelecidos pela norma ASTM F136-13, que se refere a utilização da liga Ti6Al4V em implantes cirúrgicos, constata-se que os elementos químicos apresentam percentuais dentro dos limites determinados pela norma.

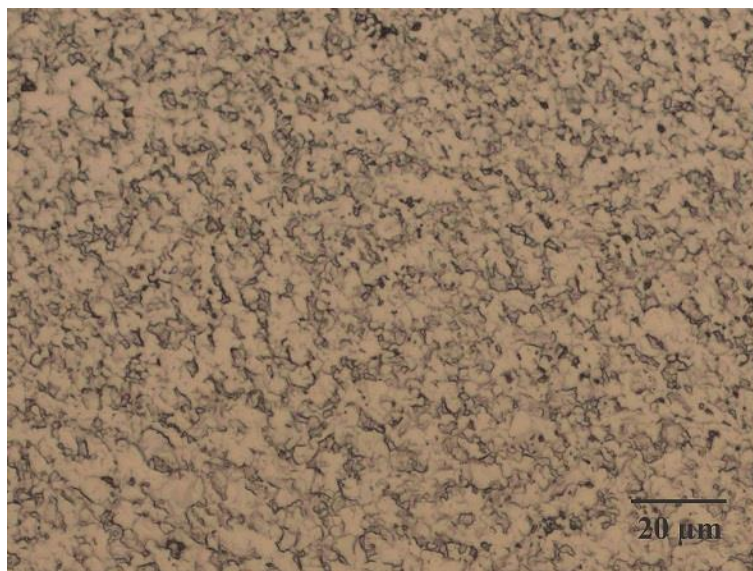
Tabela 4. Comparação da composição química elementar mínima exigida pela norma ASTM F136-13 e a descrita no certificado de qualidade do fornecedor.

Elemento	Ti	Al (min.)	V (min.)	Fe (máx.)
Composição pela norma ASTM F136-13 (%)	Balanço	5,5 – 6,0	3,5 – 4,5	0,25
Composição (%)	Balanço	5,72	4,10	0,17

A Figura 10 apresenta a microestrutura da liga Ti6Al4V revelada pela utilização do reagente *Kroll*. As imagens mostram a presença de duas fases que de acordo com Marino e Mascaro, (2011) e Dimah et al. (2012), se referem a presença da fase α ,

distribuída uniformemente pela amostra (área clara), e a fase β apresentada predominante no contorno de grão (área escura). Nesta liga, o alumínio estabiliza a fase α e o vanádio estabiliza a fase β e esses elementos de liga são conhecidos por aumentar as propriedades mecânicas do titânio, bem como, refinar o tamanho de grão (MARINO et al., 2006).

Figura 10. Microestrutura por microscopia óptica da liga Ti6Al4V revelada pelo ataque com uma solução *Kroll* (HF/HNO₃/H₂O) durante 15 segundos.

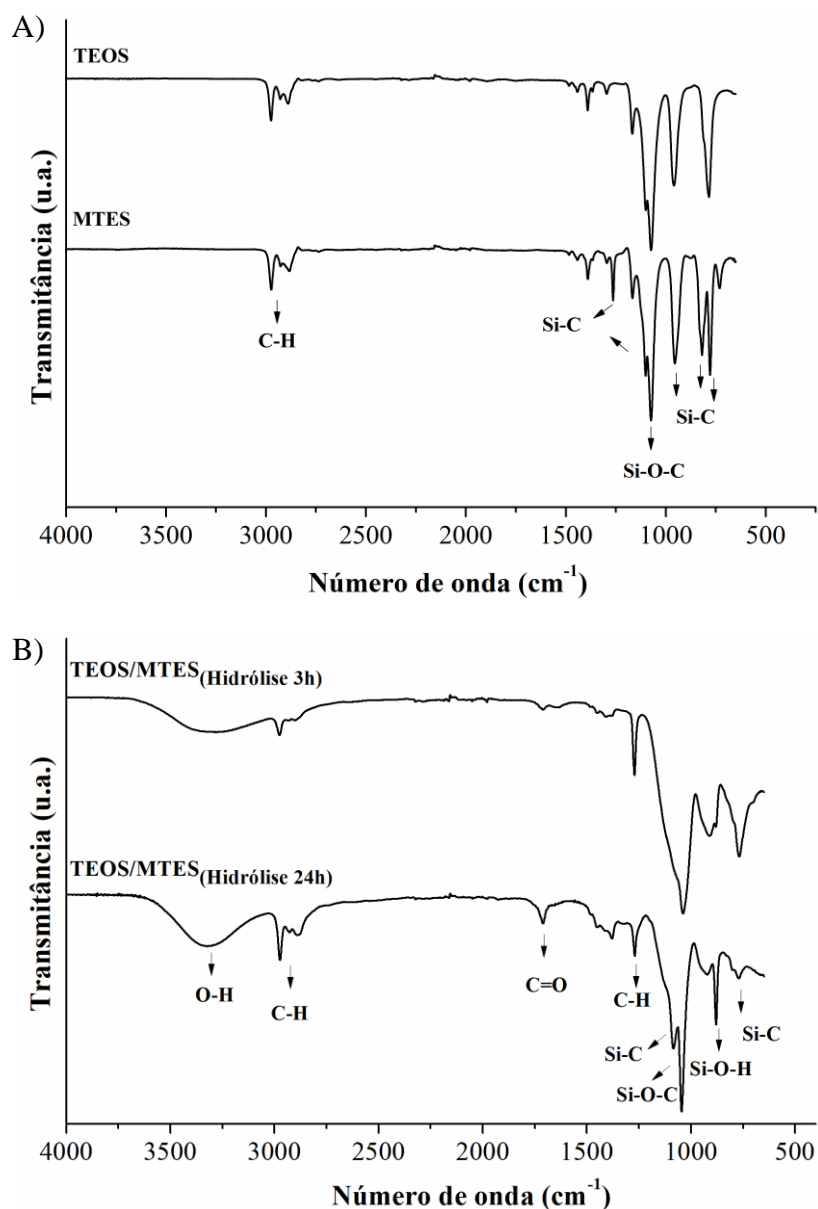


5.1.1.1. Caracterização química do revestimento protetivo

A Figura 11 apresenta os espectros no FTIR dos precursores silanos utilizados para o desenvolvimento do trabalho bem como da solução TEOS/MTES após 3 e 24 horas de hidrólise.

Pela análise dos espectros apresentados na Figura 11(A) e comparando-os aos espectros encontrados em literatura, foram identificadas as ligações presentes nas estruturas químicas dos mesmos (RAMI AL-OWEINI E EL-RASSY, 2009; CRIADO, SOBRADOS E SANZ, 2014). Para ambos os precursores se observou a presença da ligação C–H, existente nos grupamentos CH₂ e CH₃ (2970 e 2890 cm⁻¹) e as vibrações de estiramento simétrico de Si–O–C (1167, 1100, 1074, 958 e 785 cm⁻¹). As bandas características de Si–C também foram observadas para MTES (780 e 1265 cm⁻¹) devido às ligações Si–CH₃, respectivamente, presentes no grupamento lateral.

Figura 11. FTIR (A) dos reagentes alcoxissilano (TEOS) e organoalcoxissilano (MTES) e (B) das soluções após 3 e 24 horas de hidrólise da solução de TEOS/MTES.



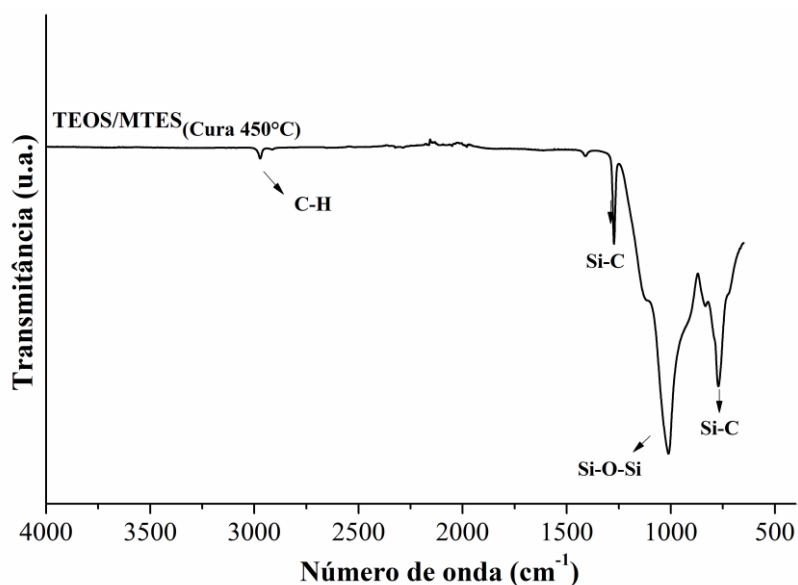
Para o revestimento TEOS/MTES após 24 horas de hidrólise, Figura 11(B), a ampla absorção entre 3200 e 3700 cm⁻¹ foi atribuída a deformação axial de -OH, surgindo a partir de grupos silanol (Si-OH) e a presença dos solventes água e álcool (-OH). Além disso, a presença do catalisador ácido acético foi percebida devido ao aparecimento da banda em aproximadamente 1716 cm⁻¹, referente a ligação C=O. As absorções a cerca de 2900 cm⁻¹ estão associadas às ligações C-H, estiramento simétrico e assimétrico (CH₂ e CH₃), nas cadeias alifáticas dos alcoxissilano (TEOS) e organoalcoxissilano (MTES).

O tempo de 3 horas de hidrólise para esse sol tem sido empregado na literatura (ALMEIDA et al., 2015; GARCIA, CERÉ E DURAN, 2004; BALLARE et al., 2007).

No entanto, pela análise de FTIR deste estudo foi possível observar após 24 horas de hidrólise uma maior intensidade da banda Si–OH comparativamente a 3 horas, evidenciando maior ocorrência desta reação. Por este motivo, no presente trabalho o tempo de 24 horas de hidrólise foi empregado. Contudo, é importante salientar que a permanência das bandas referente à Si–O–C, 1044 cm^{-1} no espectro de TEOS/MTES após 24 horas de hidrólise, Figura 11(B), atribuídas ao estiramento simétrico, decorrente do movimento dos átomos de oxigênio pertencentes ao grupo (Si–O–C), ainda indicou à hidrólise incompleta dos precursores TEOS e/ou MTES.

A Figura 12 apresenta os espectros no FTIR do filme híbrido após a realização das etapas de condensação e cura a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analisando-se as bandas obtidas e relacionando-as com o mecanismo químico das reações envolvidas na síntese de revestimentos híbridos orgânicos-inorgânicos, ressalta-se principalmente a ocorrência da reação de condensação entre os grupamentos silanol, devido a formação das ligações de siloxanos (Si–O–Si), associada ao aparecimento da banda em aproximadamente 1020 cm^{-1} no revestimento formado por TEOS e MTES. Tais resultados estão de acordo com as considerações publicadas por Rami Al-Oweini e El-Rassy, (2009); Rahimi, Mozaffarinia e Hojjati, (2013); Criado, Sobrados e Sanz, (2014).

Figura 12. FTIR do filme híbrido após as etapas de condensação e cura a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$.



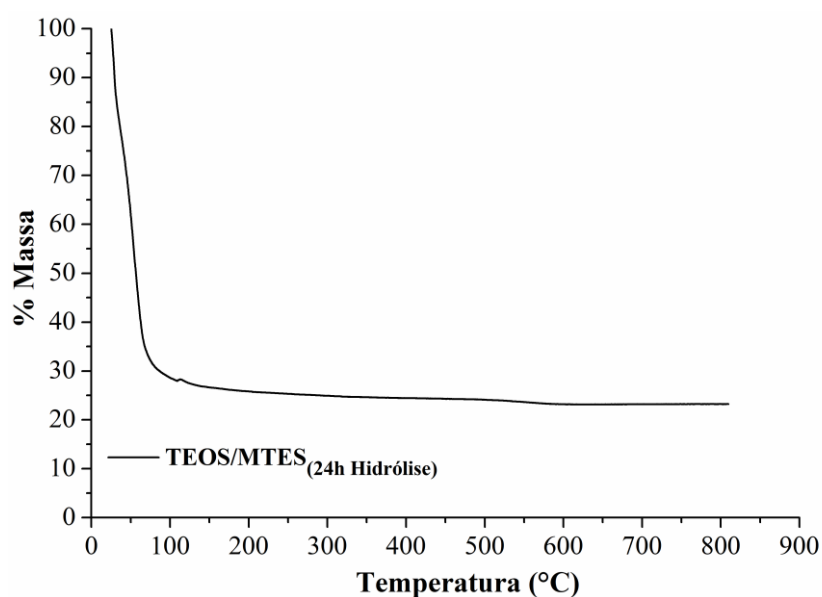
Observou-se também na Figura 12 o aparecimento da banda característica da ligação C–H do espectro do filme TEOS/MTES, relacionada aos grupos CH_2 e CH_3

presentes em ambos precursores, juntamente a presença das bandas relacionadas a ligação Si-C, correspondentes à Si-CH₃ (1276 cm⁻¹) (JUAN-DÍAZ et al., 2016).

5.1.1.2. Caracterização térmica

A Figura 13 apresenta a curva TG da solução hidrolisada após 24 horas. Tal análise foi realizada afim de possibilitar a identificação dos possíveis efeitos causados pela temperatura na formação do revestimento híbrido.

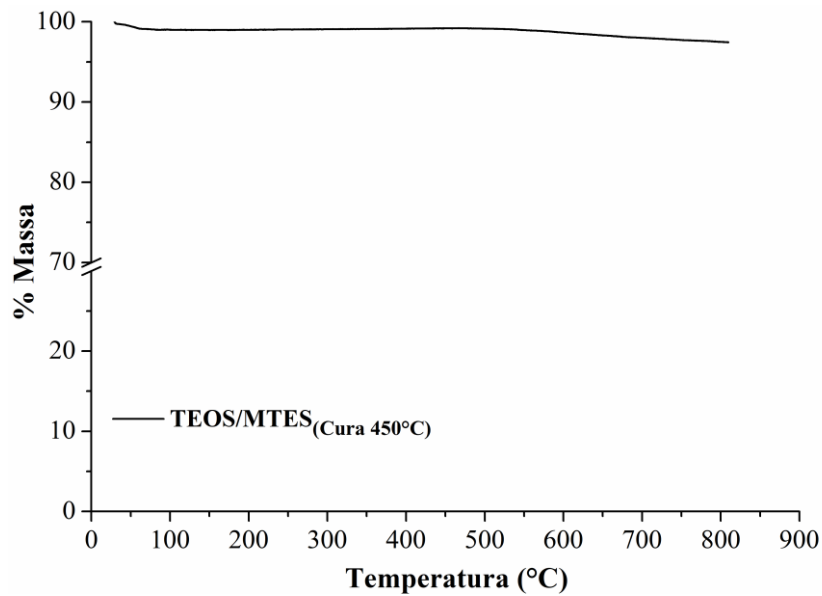
Figura 13. Curva TG da solução TEOS/MTES após 24 horas de hidrólise.



Para a solução hidrolisada durante 24 horas, observou-se um evento de perda de massa de 70 % na faixa de temperatura entre 25 à 120 °C, o qual pode ser atribuído à evaporação de solventes como etanol, água e ácido acético, presentes na composição do revestimento. No intervalo de temperatura de 120 a 800 °C, nenhum evento significativo de perda ou ganho de massa foi observado.

A Figura 14 apresenta a curva TG do revestimento após as etapas de condensação e cura, e essa teve por objetivo determinar a estabilidade térmica do revestimento híbrido obtido após cura à 450 °C.

Figura 14. Curva TG do revestimento híbrido após etapa de cura à 450 °C.



Pela análise da curva TG, observou-se uma pequena variação da massa até a temperatura de aproximadamente 50 °C, que pode estar associada a remoção de espécies adsorvidas na superfície do revestimento. Junto a isso, foi evidenciado outro evento de perda de massa próximo a 550 °C, atribuído a oxidação dos grupos metila presentes no revestimento, mesmo esses apresentando baixo percentual mássico (2 %) comparativamente a totalidade da composição analisada.

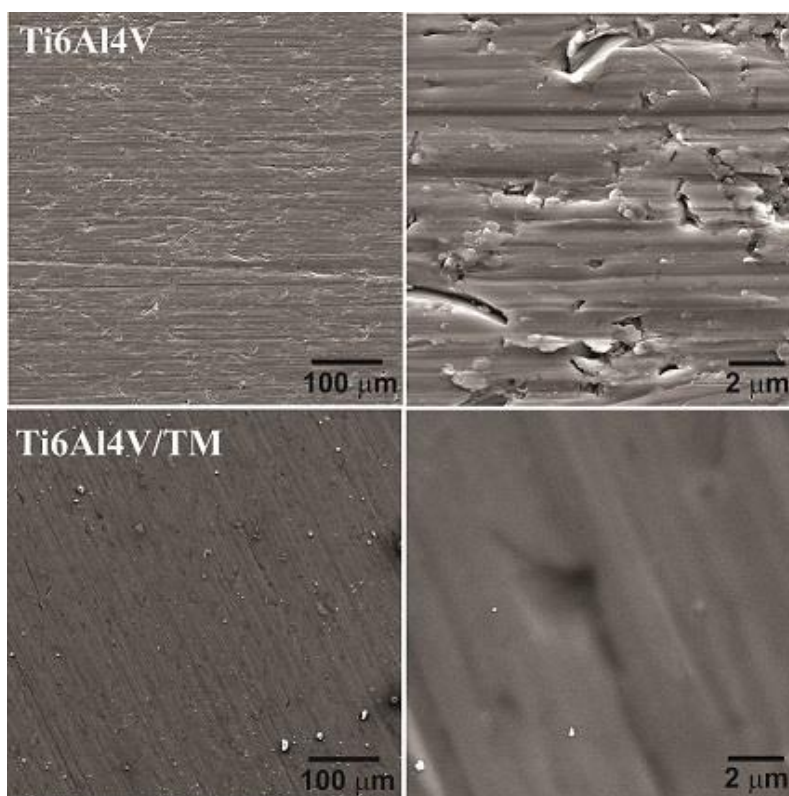
Wang et al. (2013) relataram que a presença do grupamento metila em revestimentos TEOS/MTES contribui para a maior hidrofobicidade do filme formado e consequentemente melhora o comportamento protetivo do mesmo. Innocenzi, Abdirashid e Guglielmi, (1994) utilizaram em seu estudo a temperatura de cura de 450 °C e justificaram o uso dessa, devido a degradação e oxidação dos grupamentos metila presente no organosilano MTES ocorrer no intervalo entre 450 à 560 °C; sendo então temperatura escolhida, a limite para se obter um revestimento com o mais alto grau de sinterização da rede inorgânica, apresentando uma rede compacta, não comprometendo as propriedades termomecânicas, estruturais e mantendo a funcionalidade do grupamento metila (CH₃).

Contudo, apesar dos eventos citados, pode-se evidenciar a estabilidade térmica do revestimento híbrido após cura, realizada por 30 minutos à 450 °C, uma vez evidenciada a constância da massa em função do aumento de temperatura durante a análise de TGA.

5.1.1.3. Caracterização morfológica

A Figura 15 apresenta as micrografias obtidas no MEV/FEG com vista de topo do substrato metálico lixado e do revestimento híbrido protetivo depositado sobre o mesmo.

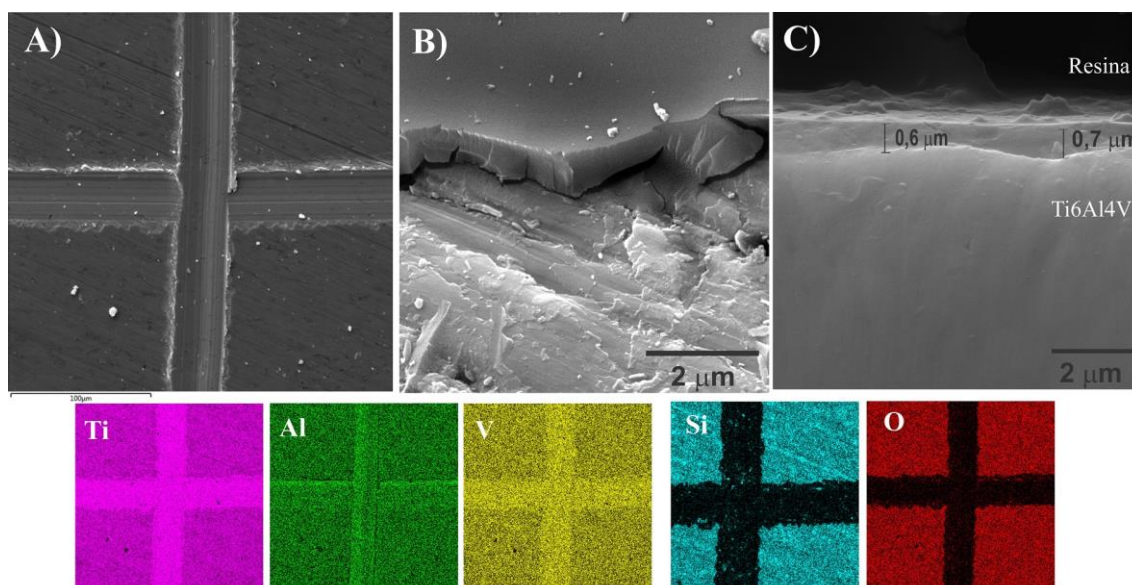
Figura 15. Micrografias no MEV/FEG do substrato metálico e do revestimento híbrido protetivo. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



Foi observado para a amostra Ti6Al4V, uma superfície irregular relacionada ao processo de lixamento ao qual foi submetida. Para o revestimento protetivo (Ti6Al4V/TM), observou-se a presença de um revestimento com cobertura uniforme, homogêneo e isento de falhas e depósitos ao longo da superfície de análise.

Na Figura 16 estão apresentadas as micrografias obtidas pela vista de topo, em perspectiva e vista do corte transversal das amostras no MEV/FEG do revestimento híbrido composto por TEOS/MTES. Além disso, estão apresentadas as imagens do mapeamento elementar de cores obtido por EDS após ensaio de adesão.

Figura 16. Micrografias no MEV/FEG das áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento da composição química elementar de acordo com a composição do revestimento, (B) região de destacamento do filme do substrato de Ti6Al4V com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.



A partir das imagens obtidas, notou-se alto grau de adesão do revestimento protetivo sobre o substrato metálico, uma vez que as áreas de destacamento e remoção do mesmo ocorreram em pequenas regiões além das demarcadas de acordo a norma ASTM D-3359, Figura 16(A). A espessura do revestimento híbrido depositado sobre o substrato metálico ficou na ordem de 0,6 μm, Figura 16(C). Este resultado está coerente com os obtidos por Omar et al. (2015) e Ballarre et al. (2011), os quais fizeram uso dos mesmos precursores de silício, porém para revestimentos aplicados sobre substratos metálicos de AISI 316 L.

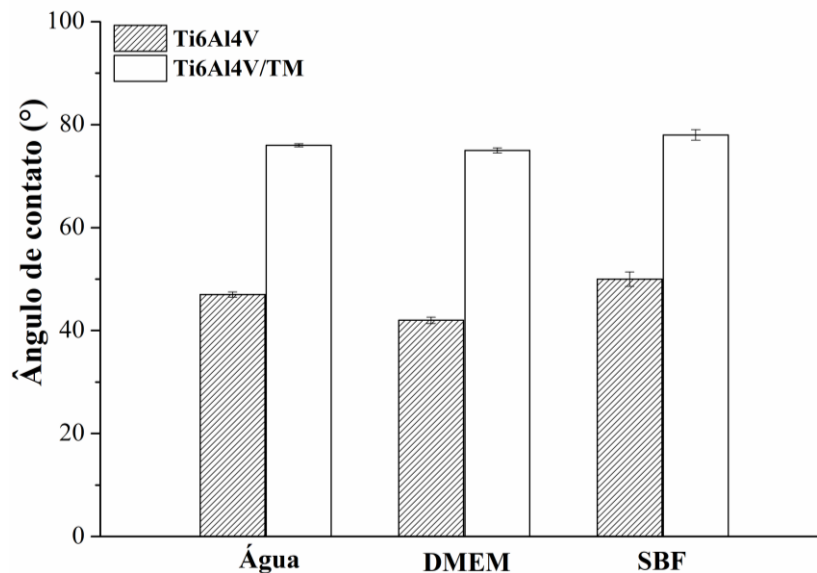
Pelo mapeamento de composição química elementar, por EDS, realizado após ensaio de adesão (Figura 16(A)), observou-se o sinal intenso dos elementos silício e oxigênio (Si e O, principais constituintes da ligação siloxano) na região em que o filme permaneceu aderido sobre o substrato de Ti6Al4V, confirmando a presença do revestimento sobre o substrato de Ti6Al4V nessas regiões.

A Tabela 5 e a Figura 17 apresentam os valores médios dos ângulos de contato obtidos com os 3 diferentes líquidos testados.

Tabela 5. Ângulos de contato médios para Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM em água, DMEM e SBF.

Amostra	Ângulo (°)		
	Água	DMEM	SBF
Ti6Al4V	47 ± 0,5	42 ± 0,6	50 ± 1,4
Ti6Al4V/TM	76 ± 0,3	75 ± 0,6	78 ± 1,0

Figura 17. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM em água, DMEM e SBF.



Observou-se que a amostra Ti6Al4V/TM apresentou maior valor de ângulo de contato quando comparado ao substrato de Ti6Al4V, independentemente do líquido utilizado. Pode-se correlacionar estes resultados aos obtidos anteriormente em análise de FTIR, uma vez que segundo Wang et al. (2013) a presença de grupamentos metila (provenientes do organoalcoxissilano MTES) promoveu a redução da molhabilidade da superfície. Da mesma forma, o aumento dos valores dos ângulos de contato obtidos para o revestimento em relação ao substrato apresentou coerência para a aplicação proposta para o mesmo; isso porque superfícies de menor molhabilidade tendem a inibir a interação com fluidos, aumentando a proteção a corrosão da mesma (AMATO et al., 2005; VAN OOIJ et al., 2005).

Agarwal et al. (2016) obtiveram o valor de ângulo de contato de $77,9^\circ \pm 1,3$ para o revestimento híbrido composto por TEOS/MTES depositado sobre a liga de magnésio

(AZ-31). Os autores observaram após 14 dias de imersão em solução SBF e DMEM que o revestimento obtido atuou como uma barreira física a ação do eletrólito, apresentando comportamento superior em corrosão, quando comparado à liga.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os parâmetros de rugosidade em escala micrométrica e nanométrica obtidos pelas técnicas de perfilometria de contato e AFM do substrato de Ti6Al4V e do revestimento híbrido depositado. A Figura 18 apresenta os perfis de topografia obtidos para ambas as amostras em AFM.

Tabela 6. Valores médios de rugosidade micrométrica determinados por perfilometria de contato.

Amostra	Ra (μm)	Ry (μm)	Rz (μm)
Ti6Al4V	$0,12 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,23$	$1,08 \pm 0,12$
Ti6Al4V/TM	$0,08 \pm 0,01$	$1,23 \pm 0,27$	$0,84 \pm 0,15$

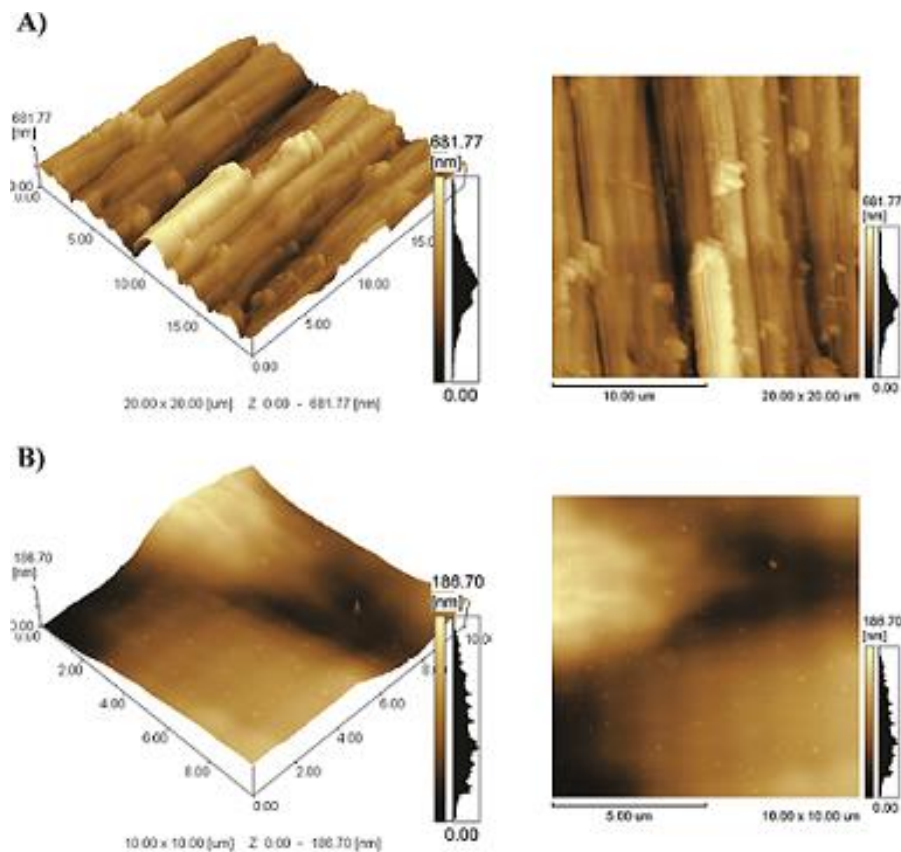
Tabela 7. Valores médios de rugosidade nanométrica determinados por AFM.

Amostra	Ra (nm)	Ry (nm)	Rz (nm)
Ti6Al4V	81 ± 12	700 ± 31	342 ± 16
Ti6Al4V/TM	34 ± 2	213 ± 98	106 ± 49

A deposição do revestimento híbrido (Ti6Al4V/TM) promoveu a redução de todos os parâmetros de rugosidade micrométrica e manométrica, comparativamente ao substrato Ti6Al4V (Tabelas 6 e 7).

No entanto, como pode-se observar nas imagens obtidas por AFM (Figura 18), mesmo após aplicação do revestimento, observou-se para a amostra Ti6Al4V/TM a permanência de uma superfície de perfil irregular (Figura 18(B)), o que foi evidenciado também pelo parâmetro de rugosidade Ry (Tabelas 6 e 7). Isso pode ser justificado pelo fato de que a rugosidade inicial do substrato metálico aliada à baixa espessura de camada apresentada pelo revestimento híbrido, promoveu apenas o recobrimento dos vales (já que o revestimento é nivelador) não conseguindo a cobertura total dos picos do substrato metálico.

Figura 18. Imagens obtidas por AFM: (A) Ti6Al4V e (B) Ti6Al4V/TM.



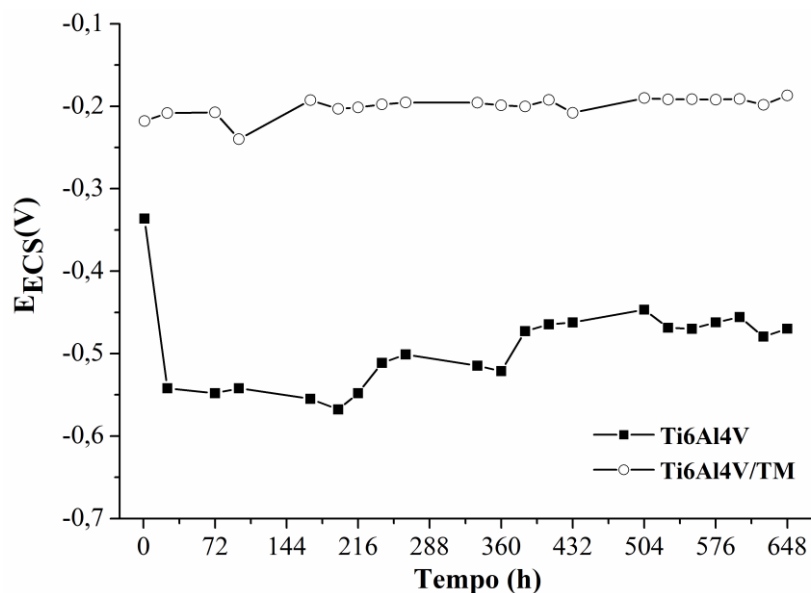
Os resultados de molhabilidade e rugosidade superficial após a deposição do revestimento híbrido protetivo sobre o substrato metálico estão de acordo com a abordagem de Wenzel citada por Pegueroles et al. (2008). Esses autores mostraram que o aumento da rugosidade de uma superfície pode provocar à diminuição dos valores de ângulos de contato devido ao aumento da área superficial. Esta relação também foi observada por Wang, Hsieh e Lee, (2011), para alterações nas rugosidades nanométrica e micrométrica em substratos de titânio. No presente trabalho é preciso considerar que além da rugosidade, a composição química da superfície também variou e a presença o revestimento híbrido também contribui para a diminuição da molhabilidade superficial, como foi mencionado anteriormente.

5.1.1.4. Caracterização eletroquímica

O efeito barreira do revestimento híbrido composto por TEOS/MTES foi avaliado pelos resultados obtidos em ensaios de monitoramento do potencial de circuito aberto (OCP) e curvas de polarização potenciodinâmicas.

Na Figura 19 estão apresentados os valores dos potenciais de circuito aberto monitorados diariamente durante 672 horas de imersão das amostras Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM em solução simulada de fluido corpóreo (SBF).

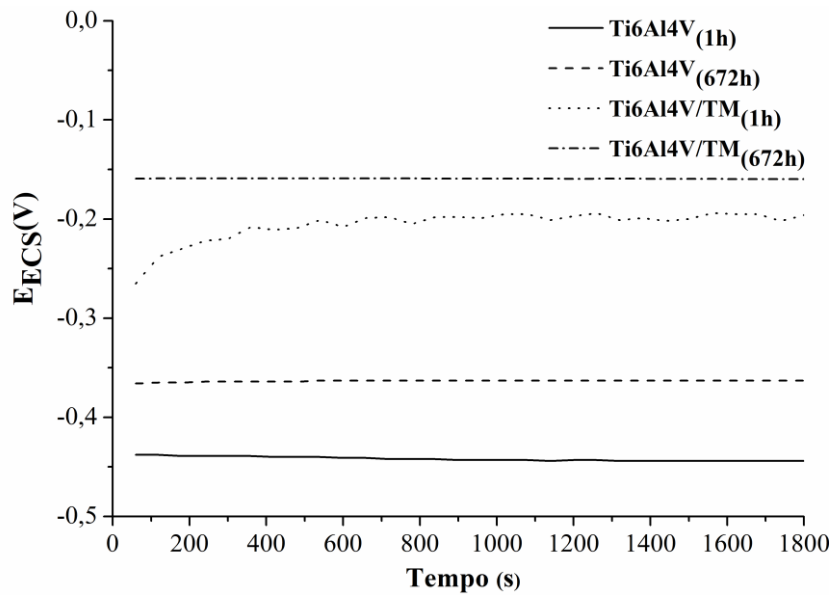
Figura 19. Potencial de circuito aberto (OCP) diário em SBF a 37 ± 3 °C durante 672 horas de imersão das amostras Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM.



Observou-se ao longo do acompanhamento, que a amostra revestida com o filme híbrido apresentou valores de potenciais deslocados em sentido mais positivo em relação à amostra Ti6Al4V, somente lixada. Tal observação pode ser relacionada a presença do revestimento protetivo que pode ter atuado como uma barreira entre o substrato Ti6Al4V e o eletrólito.

Na Figura 20 são apresentados os valores dos potenciais de circuito aberto (OCP) em solução simulada de fluido corpóreo (SBF) a 37 ± 3 °C após 1 e 672 horas de imersão, monitorados durante 1800 segundos.

Figura 20. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após 1 hora e 672 horas de imersão.



A partir da análise das curvas obtidas (Figura 20) foi possível identificar a similaridade dos resultados com os valores de potenciais obtidos pelo monitoramento diário (Figura 19), ou seja, as amostras revestidas apresentaram potenciais deslocados para valores mais positivos em relação às amostras $Ti6Al4V$, independentemente do tempo de imersão (1 hora ou 672 horas), o que confirma efeito protetivo do revestimento híbrido.

No entanto, a amostra $Ti6Al4V$ apresenta valores de potenciais de circuito aberto mais positivos após 672 h de imersão, o que pode estar associado a um espessamento da camada de óxido, a qual constitui uma barreira entre a liga e o eletrólito. Ribeiro et al. (2013), também atribuíram o aumento do potencial de circuito aberto observado para $Ti6Al4V$, à diminuição da reatividade da liga com o tempo de imersão, devido ao aumento da espessura da camada de óxido resultante da reação da liga com a solução.

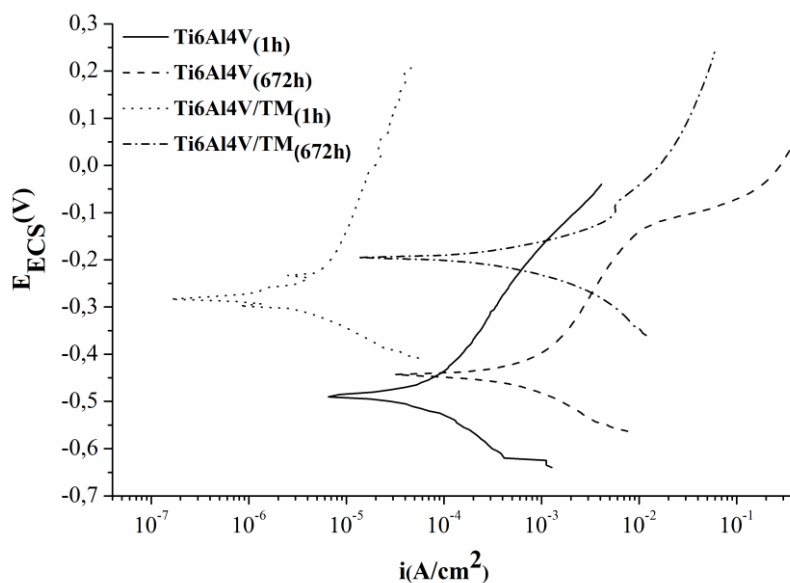
A liga revestida ($Ti6Al4V/TM$) apresentou comportamento semelhante aquele observado para a liga sem revestimento (Figura 20), ou seja, valores de potenciais de circuito aberto mais positivos após 672 horas de imersão, o que pode ser atribuído ao mesmo efeito mencionado anteriormente. Contudo, nesse caso, isso também evidencia a permeabilidade do eletrólito através do revestimento com o tempo de imersão, que pode ter desencadeado a formação de produtos de corrosão, de caráter protetor (GARCIA, CERÉ E DURAN, 2006), envolvendo reação com a liga metálica.

Na Figura 21 estão apresentadas as curvas de polarização potenciodinâmicas em solução simulada de fluido corpóreo (SBF) a 37 ± 3 °C após 1 e 672 horas

Pela análise dos perfis das curvas de polarização potenciodinâmicas foi possível observar o desenvolvimento de menores densidades de correntes para as amostras revestidas com o filme híbrido quando comparadas com as amostras da liga Ti6Al4V, para ambos os tempos de imersão prévia (1 hora e 672 horas). A presença da barreira física formada pelo revestimento híbrido protetor têm sido reportada na literatura sendo associada à diminuição da ocorrência de reações eletroquímicas entre o substrato metálico e o meio (LÓPEZ et al., 2016).

Os resultados obtidos nas curvas de polarização estão de acordo com estudo realizado por Ballarre et al. (2008), no qual sugerem que a propriedade protetiva do revestimento híbrido formado por TEOS/MTES se deve ao alto grau de densificação da fina camada inorgânica formada. Por outro lado, associando os prévios resultados eletroquímicos às demais propriedades superficiais, pode-se relacionar também o superior desempenho protetivo apresentado pela amostra Ti6Al4V/TM ao mais acentuado comportamento hidrofóbico quando comparada a amostra Ti6Al4V, confirmando assim, que revestimentos silanos hidrofóbicos atuam como uma barreira física, inibindo a permeação do eletrólito, e retardando o processo corrosivo do sistema, de acordo com Liu et al. (2013).

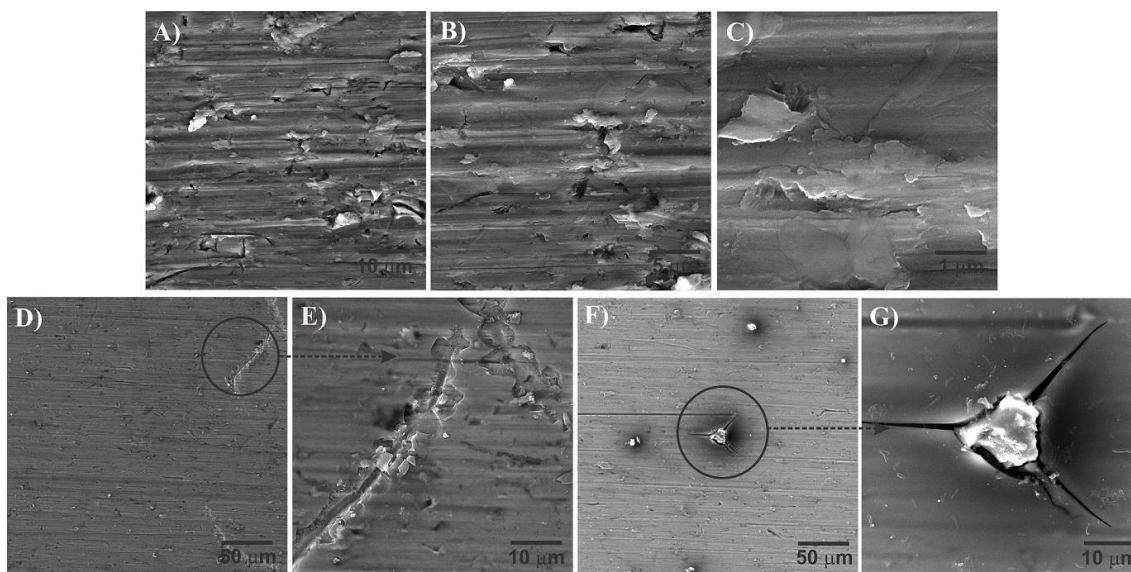
Figura 21. Curvas de polarização em SBF a 37 ± 3 °C após 1 hora e 672 horas de imersão.



Os aumentos dos valores de densidade de corrente observados para a liga revestida e não revestida após 672 horas de imersão prévia, indica que houve a redução da resistência a corrosão com o tempo de imersão, uma vez que, essa é inversamente proporcional à densidade de corrente (LÓPEZ et al., 2016). O aumento da densidade de corrente observado para a amostra Ti6Al4V/TM com 672 horas de imersão prévia, comparativamente a 1 hora de imersão prévia, possivelmente ocorreu devido a permeabilidade do eletrólito através do revestimento. Contudo ainda se pode evidenciar o desempenho superior para essa amostra em relação à Ti6Al4V (amostra sem revestimento).

A Figura 22 apresenta as micrografias obtidas no MEV das amostras após o ensaio de polarização realizado nas amostras imersas por 672 horas.

Figura 22. Micrografias no MEV/FEG após o ensaio de polarização das amostras imersas por 672 horas em SBF a 37 ± 3 °C; (A, B e C) Ti6Al4V e (D, E, F e G) Ti6Al4V/TM. Imagens obtidas em diferentes magnificações (A, B e C) 5.000, 10.000 e 50.000 x original, respectivamente e (D e F) 1.000 x original e (E e G) 5.000 x original.



Observou-se que a amostra Ti6Al4V manteve um aspecto muito semelhante ao substrato não submetido ao ensaio de polarização (Figura 15). Isso indica que o produto de corrosão formado na superfície praticamente não alterou o aspecto do substrato metálico, provavelmente devido a formação de uma camada de óxido de espessura relativamente baixa e de cobertura regular.

A amostra Ti6Al4V/TM manteve a integridade do revestimento durante o ensaio eletroquímico quando comparada ao revestimento não ensaiado (Figura 15),

apresentando, no entanto, algumas fissuras e pequenos pontos localizados de corrosão em sua superfície. Isso pode ser devido à formação de uma camada de óxido pelo contato da liga com o eletrólito que permeou através do revestimento, ou ainda, a própria degradação do revestimento pela permeação do eletrólito, após longo tempo de imersão prévia.

5.1.2. Influência dos processos de esterilização sobre o revestimento protetivo

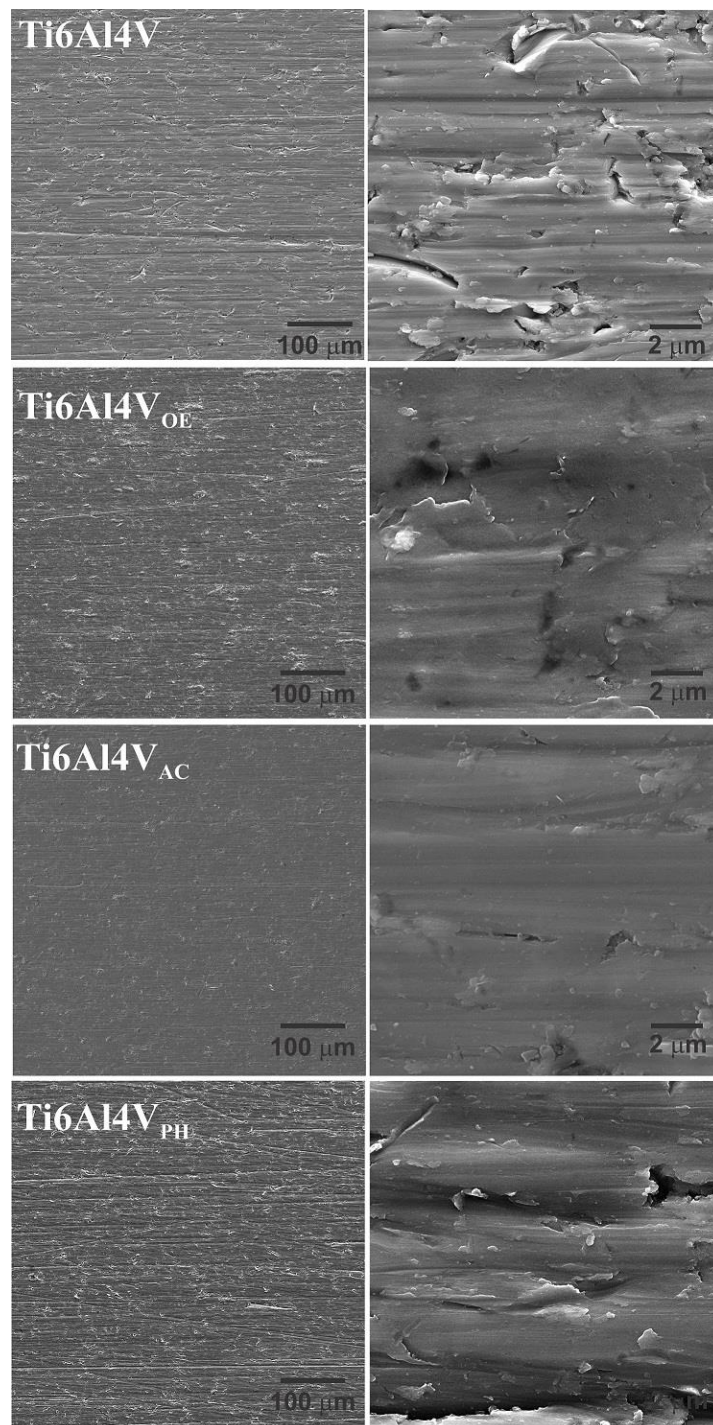
Nesta etapa do estudo foi avaliada a influência dos diferentes processos de esterilização, óxido de etileno, autoclave e plasma de peróxido de hidrogênio, nas propriedades superficiais, protetivas e biológicas do revestimento híbrido protetivo.

5.1.2.1. Caracterização morfológica

As Figuras 23 e 24 apresentam as micrografias com vista de topo do substrato de Ti6Al4V e do revestimento protetivo esterilizado com os três diferentes processos.

Avaliando a morfologia das amostras, os processos de esterilização por óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio não alteraram as características superficiais da liga Ti6Al4V, uma vez que ambas as amostras apresentaram características oriundas do processo de lixamento, similares a amostra Ti6Al4V. Entretanto, para a amostra Ti6Al4V_{AC}, notou-se uma superfície com morfologia mais regular, indicando uma diminuição de saliências e depressões quando comparada à Ti6Al4V.

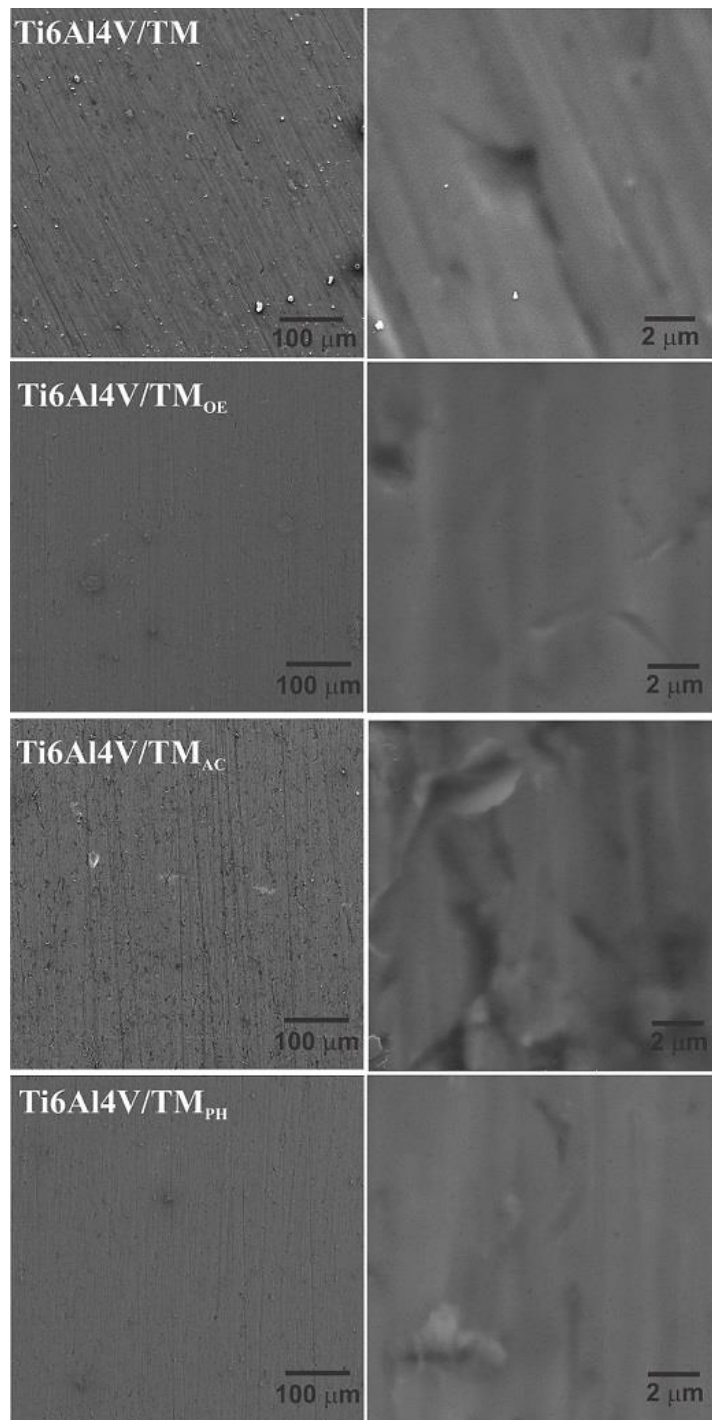
Figura 23. Micrografias no MEV/FEG do substrato de Ti6Al4V após esterilização com os diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



Da mesma forma, os processos de esterilização não provocaram significativas alterações na morfologia do revestimento híbrido protetivo.

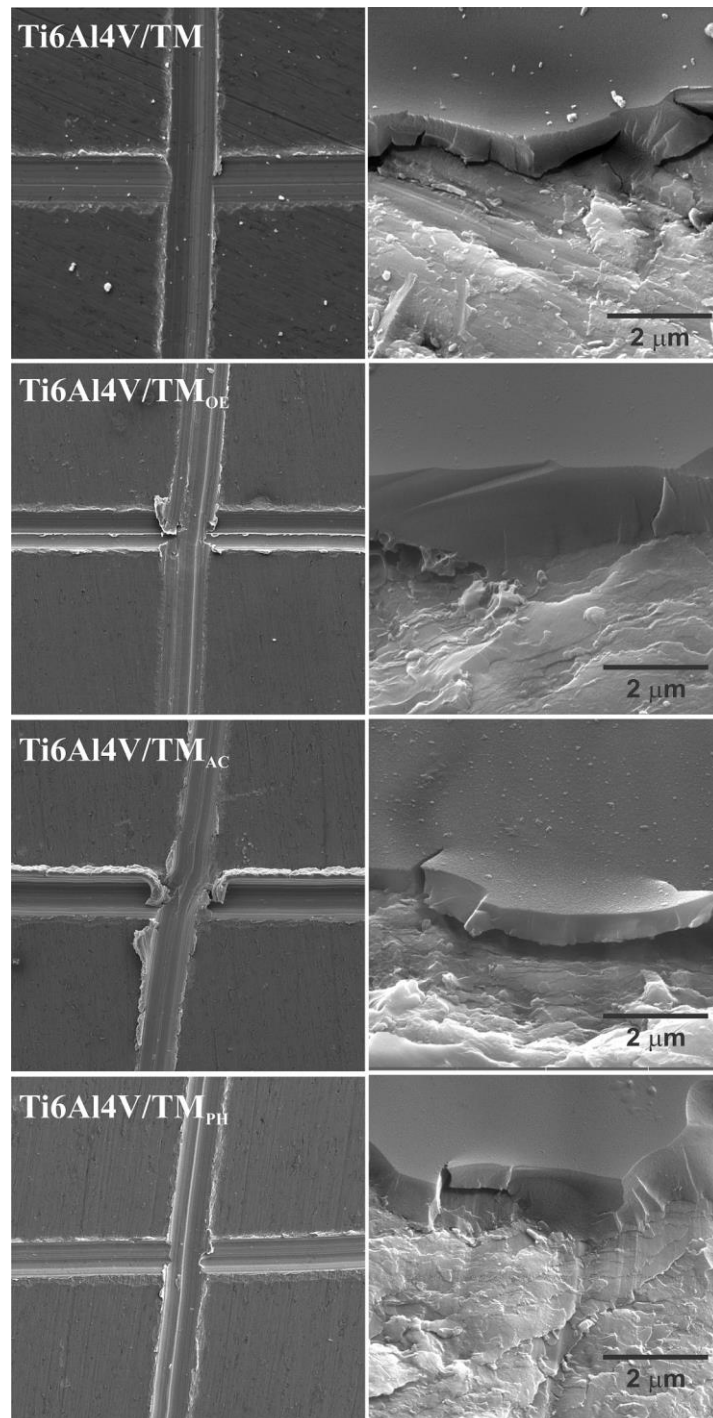
Yavuz et al. (2016) avaliaram o efeito da esterilização por óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio sobre filmes de Poli(metacrilato de metila) PMMA e também não observaram alterações morfológicas decorrentes das mesmas.

Figura 24. Micrografias no MEV/FEG do revestimento protetivo após esterilização com os diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



A Figura 25 apresenta as micrografias no MEV/FEG das áreas de destacamento onde foram realizados os ensaios de adesão dos revestimentos esterilizados, juntamente com micrografias das vistas em ângulo das superfícies de ruptura após a realização do teste *Crosshatch and Tape Pull Test*, de acordo com a norma ASTM D-3359.

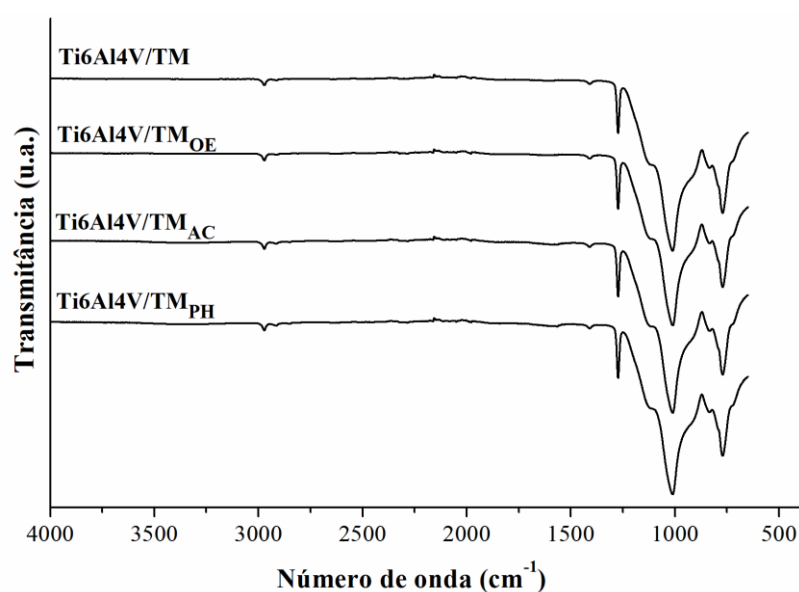
Figura 25. Micrografias obtidas por MEV/FEG das áreas analisadas em ensaio de adesão do revestimento protetivo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 40.000 x original).



Pela análise da morfologia se observou a integridade dos revestimentos após a esterilização, não havendo o comprometimento do comportamento adesivo das camadas depositadas aos substratos metálicos. Resultados similares foram encontrados por Walke et al. (2016) quando da esterilização de revestimentos silanos compostos por TEOS e TMOS obtidos sobre AISI 316 L em autoclave e óxido de etileno.

A Figura 26 apresenta os espectros no FTIR do revestimento híbrido protetivo após a realização dos processos de esterilização.

Figura 26. FTIR do revestimento híbrido protetivo antes do processo de esterilização e esterilizado pelos diferentes processos.



Pela análise dos espectros não foram observadas mudanças químicas estruturais significativas no revestimento híbrido, após os diferentes processos de esterilização, uma vez que não foi identificada a formação de novos grupos funcionais nem mesmo a alteração das bandas já existentes. Galante et al. (2017) também não observaram mudanças estruturais em amostras de hidrogéis de silicone esterilizadas pelos mesmos processos avaliados neste trabalho.

Almeida et al. (2015) avaliaram o efeito da esterilização por radiação sobre o revestimento à base dos silanos TEOS e Polidimetilsiloxano (PDMS) e após a realização da mesma, os autores não evidenciaram consideráveis mudanças nas propriedades químicas e estruturais denotando a estabilidade do mesmo. No entanto, obtiveram considerável melhoria nas propriedades térmicas do revestimento proposto em decorrência do processo de esterilização.

As Tabelas 8 e 9 apresentam os parâmetros de rugosidade micrométrica e nanométrica obtidos pelas análises de perfilometria de contato e AFM para Ti6Al4V esterilizada com os diferentes processos. A Figura 27 apresenta os perfis de topografia nanométrica obtidos em AFM.

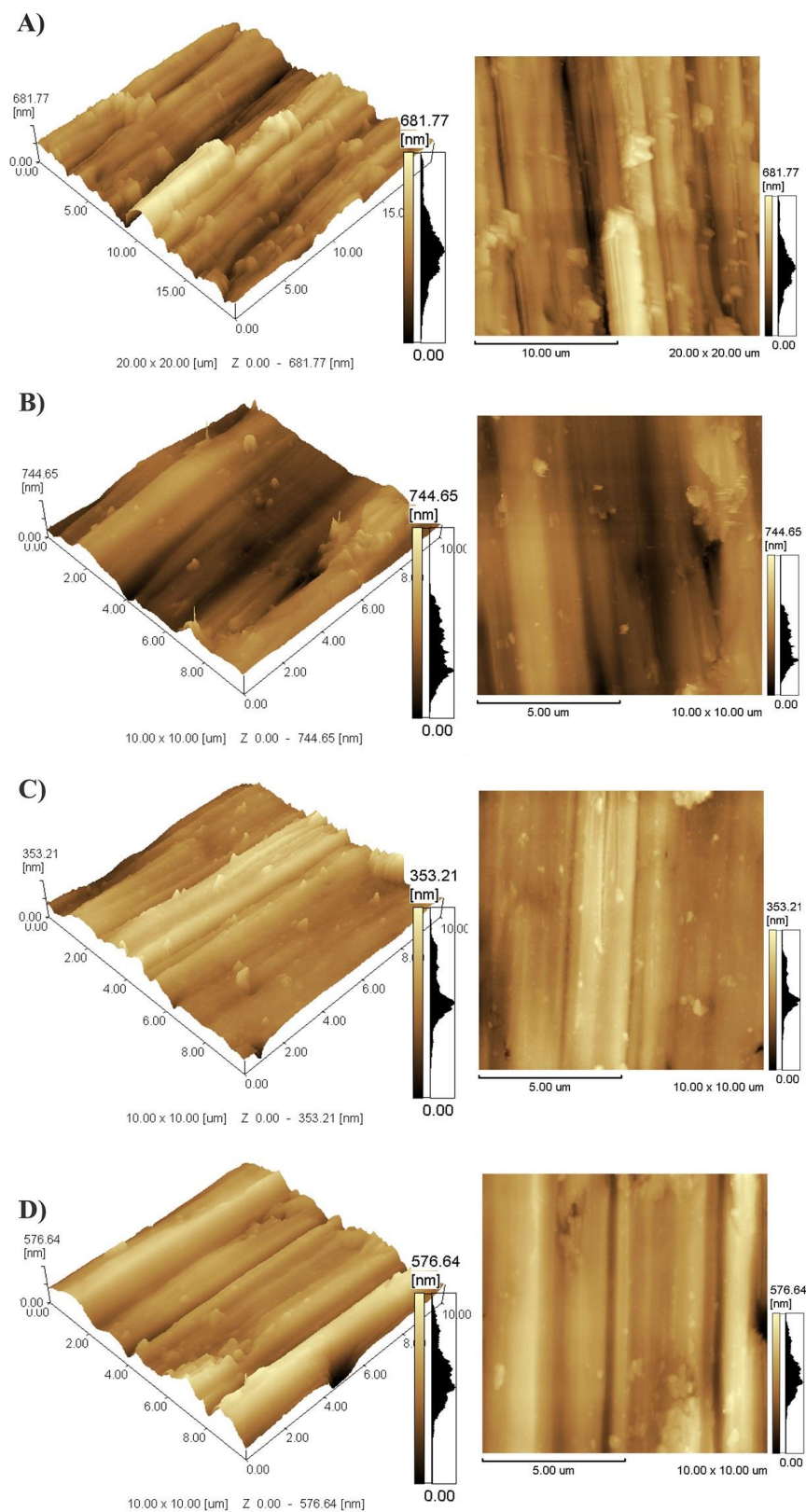
Tabela 8. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos.

Amostra	Ra (μm)	Ry (μm)	Rz (μm)
Ti6Al4V	$0,12 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,23$	$1,08 \pm 0,12$
Ti6Al4V _{OE}	$0,12 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,16$	$1,16 \pm 0,11$
Ti6Al4V _{AC}	$0,12 \pm 0,01$	$1,63 \pm 0,47$	$1,16 \pm 0,07$
Ti6Al4V _{PH}	$0,14 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,16$	$1,20 \pm 0,08$

Tabela 9. Valores médios de rugosidade em escala nanométrica determinados por AFM para Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos.

Amostra	Ra (nm)	Ry (nm)	Rz (nm)
Ti6Al4V	81 ± 12	700 ± 31	342 ± 16
Ti6Al4V _{OE}	87 ± 7	399 ± 19	270 ± 77
Ti6Al4V _{AC}	39 ± 2	480 ± 17	229 ± 79
Ti6Al4V _{PH}	61 ± 8	619 ± 67	285 ± 40

Figura 27. Imagens obtidas por AFM para (A) Ti6Al4V não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos: (B) Ti6Al4V_{OE}, (C) Ti6Al4V_{AC} e (D) Ti6Al4V_{PH}.



Em escala micrométrica, os valores obtidos dos parâmetros de rugosidade para a liga não esterilizada (Ti6Al4V), comparativamente a liga esterilizada pelos diferentes

processos não indicam uma alteração topográfica das amostras (Tabela 8). Ainda que, segundo literatura, o processo de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio possa causar o aumento da rugosidade superficial (PARK et al., 2012; JUNKAR et al., 2016).

No entanto, em escala nanométrica a amostra Ti6Al4V_{AC} apresentou significativa redução da rugosidade nanométrica ($R_a = 81$ para $R_a = 39$ nm), o que pode ser relacionada ao nivelamento observado nas imagens obtidas por MEV/FEG, (Figura 23) e por AFM, Figura 27(C). Estas observações podem estar relacionadas ao aumento da espessura da camada de óxido ou ao depósito de contaminantes orgânicos durante o processo de esterilização em autoclave (WILSON E NAYAK, 2013; OH et al., 2011). De acordo com Park et al. (2012) a utilização da pressão e de temperatura durante o processo de esterilização em autoclave pode modificar a morfologia da camada de óxido existente na superfície de nanotubos de TiO₂.

Para a amostra esterilizada por óxido de etileno não se observou a redução da rugosidade média nanométrica da superfície, porém a redução do valor de R_y pode prever o nivelamento da mesma. Um indicativo do que possa ter provocado esse nivelamento foi descrito em estudo realizado por Pegueroles et al. (2008), no qual os autores evidenciaram maior concentração de espécies carbonáceas em amostras esterilizadas pelo processo de óxido de etileno comparativamente à autoclave.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os parâmetros de rugosidade micrométrica e nanométrica obtidos a partir das análises de perfilometria de contato e de AFM de Ti6Al4V/TM esterilizada com os diferentes processos. A Figura 28 apresenta os perfis de topografia obtidos para ambas as amostras em AFM.

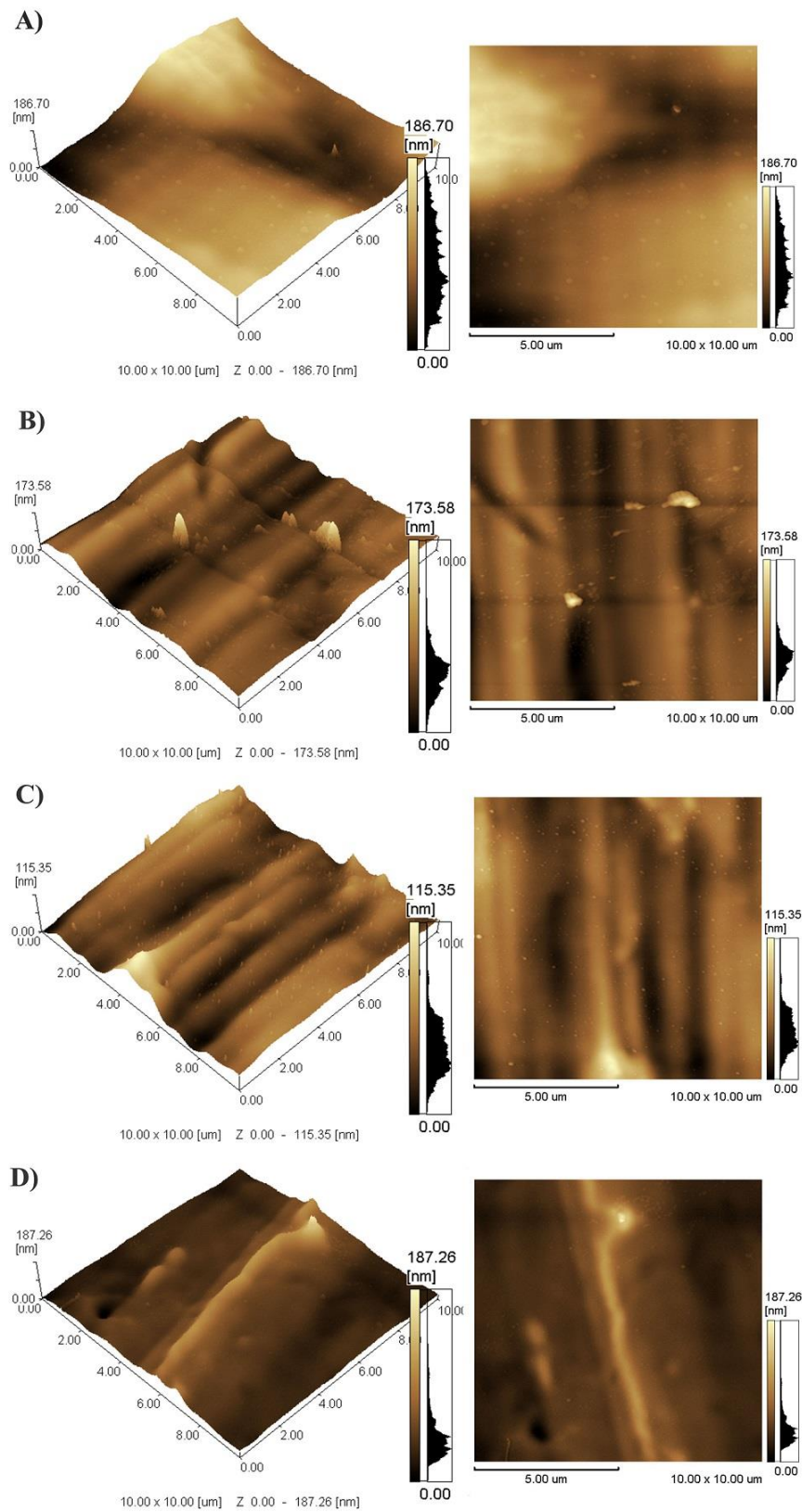
Tabela 10. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V/TM não esterilizado e esterilizado com os diferentes processos.

Amostra	Ra (μm)	Ry (μm)	Rz (μm)
Ti6Al4V/TM	$0,08 \pm 0,01$	$1,23 \pm 0,27$	$0,84 \pm 0,15$
Ti6Al4V/TM _{OE}	$0,09 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,14$
Ti6Al4V/TM _{AC}	$0,09 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,10$	$0,83 \pm 0,10$
Ti6Al4V/TM _{PH}	$0,16 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,18$	$1,11 \pm 0,10$

Tabela 11. Valores médios de rugosidade em escala nanométrica determinados por AFM para Ti6Al4V/TM não esterilizado e esterilizado com os diferentes processos.

Amostra	Ra (nm)	Ry (nm)	Rz (nm)
Ti6Al4V/TM	34 ± 2	213 ± 98	106 ± 49
Ti6Al4V/TM _{OE}	14 ± 1	164 ± 28	80 ± 15
Ti6Al4V/TM _{AC}	16 ± 1	132 ± 66	65 ± 33
Ti6Al4V/TM _{PH}	10 ± 3	167 ± 18	80 ± 10

Figura 28. Imagens obtidas por AFM para (A) Ti6Al4V/TM não esterilizada e esterilizada pelos diferentes processos: (B) Ti6Al4V/TM_{OE}, (C) Ti6Al4V/TM_{AC} e (D) Ti6Al4V/TM_{PH}.



A deposição do revestimento híbrido (Ti6Al4V/TM) promoveu a redução das rugosidades nanométrica (de Ra = 81 para Ra = 34 nm) e micrométrica (de Ra = 0,12 para Ra = 0,08 μ m) quando comparada ao substrato de Ti6Al4V não revestido.

De maneira geral, da mesma forma que foi observada para a liga não revestida (Tabela 8), os processos de esterilização não provocaram modificações importantes na rugosidade micrométrica para a amostra Ti6Al4V/TM (Tabela 10). Com exceção do processo de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio, que afetou todos os parâmetros de rugosidade.

O aumento da rugosidade micrométrica para a amostra Ti6Al4V/TM_{PH} pode estar associado ao modo de ação deste processo de esterilização. Na esterilização por plasma, o gás ionizado bombardeia a superfície do material promovendo a remoção de uma camada superficial. A espessura de camada removida, bem como, as modificações provocadas no material são dependentes do tipo e da pureza do gás utilizado, da pressão aplicada e da posição da amostra no equipamento durante o processo esterilização (PARK et al., 2012; GAN E BERNDT, 2015).

Todos os processos de esterilização provocaram a redução dos parâmetros de rugosidade nanométrica em relação à amostra não esterilizada (Tabela 11). Este nivelamento pode ser associado as distintas formas de atuação dos processos de esterilização sobre as superfícies. Para as amostras Ti6Al4V/TM_{OE} e Ti6Al4V/TM_{PH} apesar dos processos de esterilização fazerem uso de baixas temperaturas, o nivelamento nanométrico observado pode ter ocorrido em consequência da natureza oxidativa dos gases utilizados (LEE et al., 2008; VETTEN et al., 2014). Da mesma forma, mesmo não sendo observadas alterações nos espectros de FTIR, outra possível explicação para a redução da rugosidade nanométrica de Ti6Al4V/TM_{OE} pode estar associada a retenção de resíduos oriundos deste processo de esterilização na superfície da amostra (LEE et al., 2008). Tem sido relatado que estes resíduos possuem características tóxicas que podem afetar negativamente o crescimento celular sobre o biomaterial (HOLYAK et al., 1996; FLEITH et al., 2005; LEE et al., 2008).

A redução da rugosidade nanométrica nas amostras esterilizadas em autoclave pode ter ocorrido devido ao uso de alta temperatura combinada a pressão, provocando consequentemente o espessamento da camada de SiO₂ e/ou o aparecimento de defeitos

superficiais, embora tenha sido observada a estabilidade térmica do revestimento na curva TG do revestimento após cura (Figura 14), (FLEITH et al., 2005).

Walke et al. (2016), avaliaram o efeito da esterilização pelos processos de autoclave e óxido de etileno sobre as propriedades físico-químicas do substrato de aço inoxidável revestida com filmes silanos a base de TEOS e TMOS e concluíram que independentemente do agente de esterilização ocorria uma redução da rugosidade média nanométrica das superfícies analisadas.

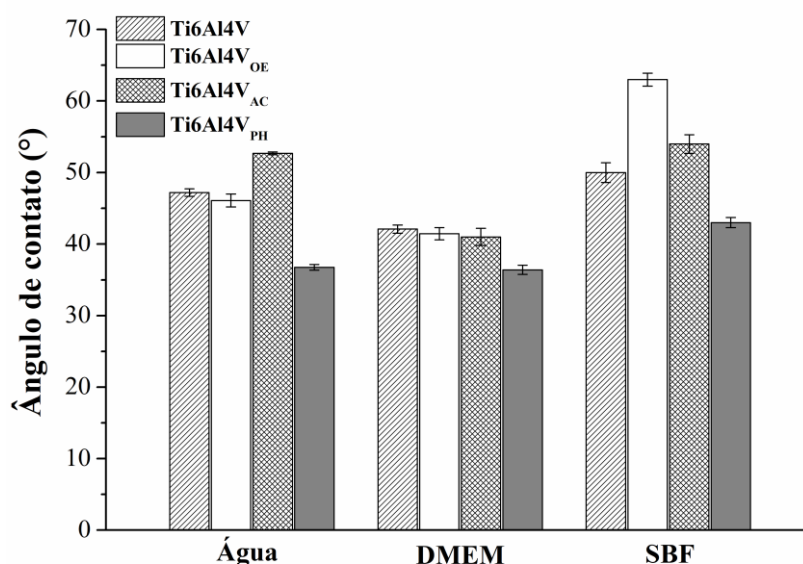
França et al. (2013) avaliaram a influência do processo de esterilização por óxido de etileno em amostras de quitosana e justificaram o nivelamento da mesma e a redução da rugosidade média pela ocorrência de uma reação de oxidação química da superfície. Lee et al. (2008) também observaram o nivelamento da superfície do polímero PLGA esterilizado por plasma de peróxido de hidrogênio aliada a redução de aproximadamente 50% da porosidade do material. Yavuz et al. (2016) concluíram que a esterilização do polímero PMMA por plasma de peróxido de hidrogênio e por óxido de etileno promoveu uma maior redução na rugosidade superficial comparativamente ao processo de autoclave.

A Tabela 12 e a Figura 29 apresentam os valores médios obtidos de ângulo de contato para as amostras de Ti6Al4V esterilizadas pelos diferentes processos. Observou-se pequena influência do processo de esterilização sobre a molhabilidade das amostras em água e DMEM. Contudo, em SBF é possível observar que a esterilização com óxido de etileno, diminui de forma importante a molhabilidade. Isso pode estar associado, como foi mencionado anteriormente, à interação desta solução (SBF) com os resíduos oriundos desse processo de esterilização, que ficam adsorvidos na superfície da amostra (LEE et al., 2008).

Tabela 12. Ângulos de contato médios para Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.

Amostra	Ângulo (°)		
	Água	DMEM	SBF
Ti6Al4V	47 ± 0,5	42 ± 0,6	50 ± 1,4
Ti6Al4V _{OE}	46 ± 0,9	41 ± 0,9	63 ± 0,9
Ti6Al4V _{AC}	52 ± 0,7	43 ± 0,8	54 ± 1,3
Ti6Al4V _{PH}	37 ± 0,4	36 ± 0,6	43 ± 0,7

Figura 29. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.



Conforme mencionado por Serro, (2003), a análise de molhabilidade de uma superfície permite a detecção de pequenas mudanças na composição ou na morfologia da mesma.

De um modo geral, percebeu-se uma tendência no comportamento de molhabilidade para as amostras de Ti6Al4V, em que os maiores valores de ângulo de contato foram apresentados por SBF, seguido por água e DMEM.

Neste estudo foi evidenciada a influência de diferentes interações intemoleculares entre as superfícies de Ti6Al4V e os líquidos ensaiados, bem como, o efeito dos processos

de esterilização sobre os resultados de molhabilidade, ambos correlacionados as modificações superficiais anteriormente observadas nas análises de rugosidade.

Para a amostra Ti6Al4V_{PH}, o aumento da molhabilidade evidenciada pela diminuição dos ângulos de contatos (água, DMEM e SBF) em relação à amostra não esterilizada, e mesmo em relação às amostras submetidas aos outros processos de esterilização, pode ser justificado pela remoção de contaminantes (espécies adsorvidas) e óxidos superficiais. Do mesmo modo, a remoção de contaminantes orgânicos de natureza predominante apolar quando da esterilização por superfícies por plasma de peróxido de hidrogênio removem alterando a energia livre de superfície e ângulo de contato com água. Segundo, Gentleman e Gentleman, (2014), o processo de esterilização a plasma pode modificar a energia superficial pela remoção de componentes orgânicos, de natureza apolar, fracamente ligados a superfície ou pela modificação química da mesma, provocando alterações nos valores de ângulo de contato.

Spriano et al. (2017) analisaram o comportamento de molhabilidade de substratos de titânio puro esterilizados por irradiação UV em diferentes líquidos (inorgânicos, biológicos e sangue). A alteração de água para uma solução inorgânica (SBF) apresentou uma redução da molhabilidade, enquanto para o fluido biológico os valores se mantiveram próximos aos obtidos em água. Os autores relacionaram estes resultados à distintos modos de adsorção de íons na superfície analisada. Estes resultados estão coerentes com os apresentados para a amostra Ti6Al4V_{PH}.

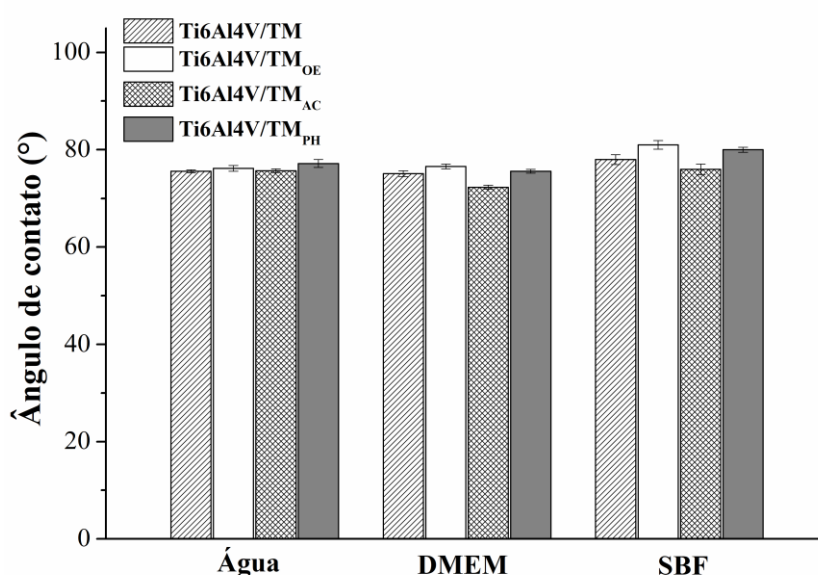
Ao contrário, para as amostras de Ti6Al4V esterilizadas por óxido de etileno e autoclave, a redução da molhabilidade comparativamente a amostra não esterilizada, deu-se em virtude do nivelamento causado pela deposição de contaminantes, espessamento da camada de óxido ou modificação da mesma. De acordo com Vezeu et al. (1996), além de contaminantes carbonáceos pode ter ocorrido a deposição de contaminantes de natureza inorgânica, provenientes das impurezas presentes na água utilizada para a obtenção do vapor quando da esterilização por autoclave. Tal observação também foi feita por Liu et al. (2013) em que obtiveram uma redução da hidrofiliidade de superfícies de Mg e MgCa esterilizadas por óxido de etileno e autoclave e relacionaram à deposição de contaminantes desta mesma natureza.

A Tabela 13 e a Figura 30 apresentam os valores médios obtidos de ângulo de contato para o revestimento protetivo esterilizado com os diferentes processos.

Tabela 13. Ângulos de contatos médios obtidos para Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos em água, DMEM e SBF.

Amostra	Ângulo (°)		
	Água	DMEM	SBF
Ti6Al4V/TM	76 ± 0,3	75 ± 0,6	78 ± 1,0
Ti6Al4V/TM _{OE}	76 ± 0,6	76 ± 0,5	81 ± 0,9
Ti6Al4V/TM _{AC}	75 ± 0,4	72 ± 0,4	76 ± 1,1
Ti6Al4V/TM _{PH}	77 ± 0,8	75 ± 0,4	80 ± 0,6

Figura 30. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos.



Não evidenciou-se a influência dos processos de esterilização sobre a molhabilidade dos revestimentos híbridos, isso porque todas as amostras apresentaram valores de contato próximos. Apesar das pequenas variações encontradas, observou-se o aumento dos valores de ângulo de contato para as amostras esterilizadas por óxido de etileno e peróxido de hidrogênio e a diminuição do mesmo para a superfície esterilizada em autoclave. Igualmente ao substrato metálico, pode-se correlacionar o comportamento de molhabilidade às modificações morfológicas observadas em análise de MEV/FEG e perfil de rugosidade (Figura 28).

A menor molhabilidade de Ti6Al4V/TM_{OE} e Ti6Al4V/TM_{PH} em relação à amostra não esterilizada, deu-se pela alteração da composição superficial em decorrência da oxidação ou deposição de material oriundos do processo de esterilização. Igualmente ao substrato metálico, a presença de óxidos superficiais (de caráter apolar) pode ter contribuído para a diminuição da molhabilidade destas amostras em relação à SBF (maior caráter polar comparativamente aos demais líquidos, água e DMEM).

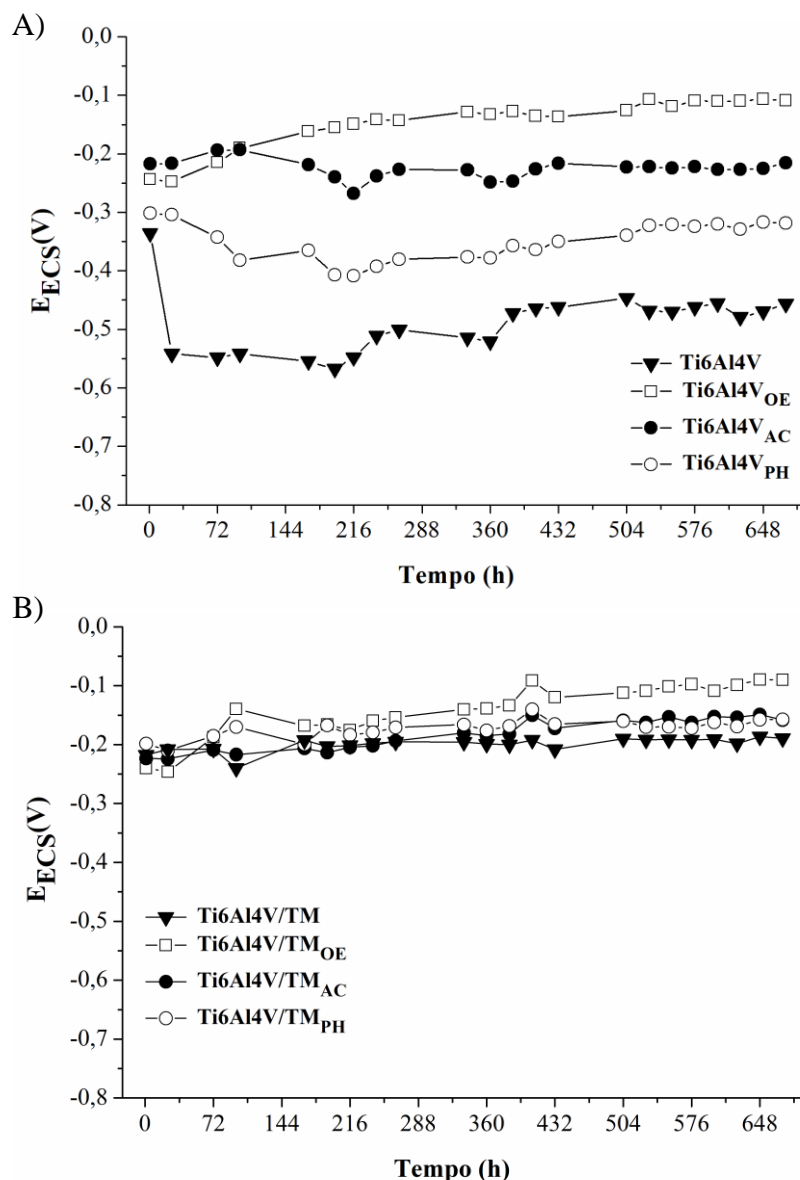
Para Ti6Al4V/TM_{AC} possíveis defeitos e discontinuidades superficiais podem ter atuado como sítios de adsorção de hidroxilas (OH) ou provocado a variação dos grupos CH₃ devido à sensibilização a pressão, promovendo a redução da molhabilidade apresentada para esta amostra (FLEITH et al., 2005; OH et al., 2011; HIRANO et al., 2014).

5.1.2.2. Caracterização eletroquímica

O comportamento protetivo dos revestimentos híbridos esterilizados foi estudado pelo monitoramento do potencial de circuito aberto e curvas de polarização potenciodinâmicas.

A Figura 31 apresenta os valores dos potenciais de circuito aberto diários obtidos durante 672 horas de imersão em solução simulada de fluido corpóreo das amostras com o revestimento protetivo esterilizados com os diferentes processos.

Figura 31. Potencial de circuito aberto (OCP) diário em SBF a 37 ± 3 °C durante 672 horas de imersão; (A) Ti6Al4V e (B) Ti6Al4V/TM esterilizadas com diferentes processos.



A influência do processo de esterilização pode ser claramente observada durante o monitoramento de OCP para as amostras de Ti6Al4V, as quais após esterilização apresentaram um deslocamento dos valores de potenciais em sentido de valores mais positivos em relação à Ti6Al4V não esterilizada. O maior deslocamento de potencial foi observado para a amostra Ti6Al4V_{OE}, seguida pela amostra Ti6Al4V_{AC} e pode ser atribuído à diminuição da reatividade do substrato (RIBEIRO et al., 2013), devido à oxidação do substrato em contato com o eletrólito ou ainda devido a deposição de espécies, conforme mencionado anteriormente. A amostra Ti6Al4V_{PH} foi a que apresentou menor deslocamento do potencial de circuito aberto, comparativamente a

amostra não esterilizada, e isso deve estar associada à não alteração morfológica observada após a realização deste processo sobre a superfície metálica.

Para as amostras recobertas com o revestimento híbrido, não se observou a influência da esterilização sobre o potencial de circuito aberto, como pode-se ver na Figura 31(B), a evolução do potencial de circuito aberto ficou muito próxima para todos os sistemas. No entanto, a presença da barreira física formada devido a deposição do revestimento híbrido sobre o substrato metálico não esterilizado pode ser observada devido aos valores mais positivos de Ti6Al4V/TM em relação a Ti6Al4V, Figura 31(A e B), corroborando com os achados de Liu et al. (2013).

As Figuras 32 e 33 apresentam os valores dos potenciais de circuito aberto medidos durante 1800 segundos anteriormente a realização das curvas de polarização em solução simulada de fluido corpóreo após 1 hora e 672 horas de imersão do substrato metálico e para as amostras revestidas com o revestimento protetivo esterilizados com os diferentes processos.

Figura 32. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão de Ti6Al4V esterilizado com diferentes processos.

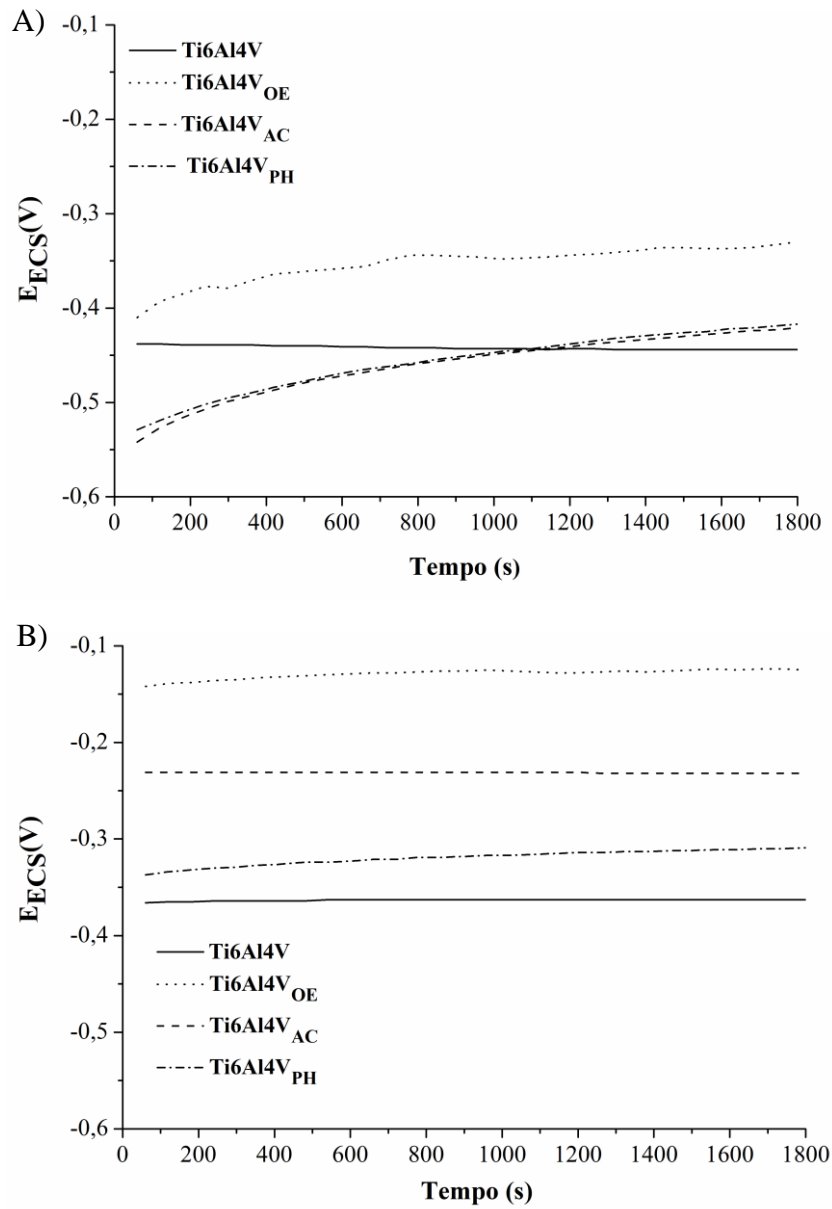
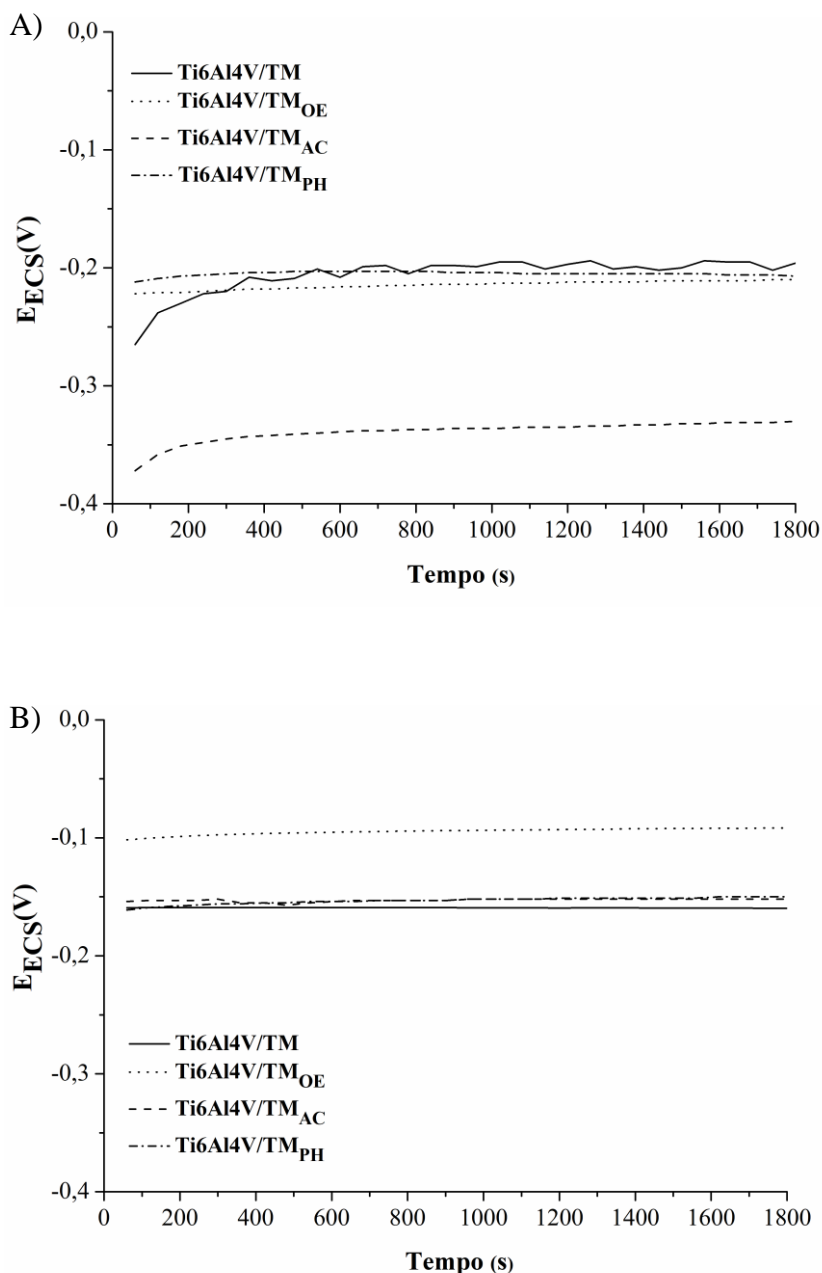


Figura 33. Potencial de circuito aberto (OCP) em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão de Ti6Al4V/TM esterilizado com diferentes processos.



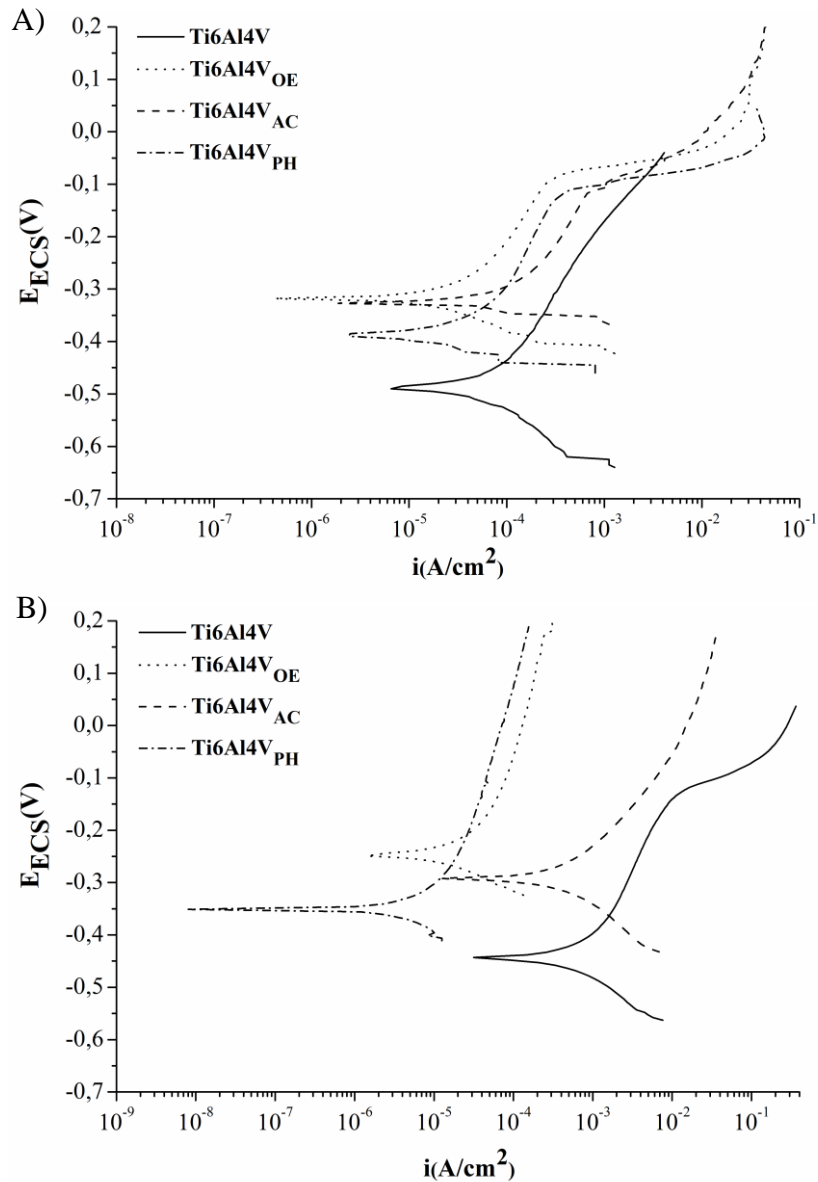
Os valores dos potenciais de circuito aberto observados para Ti6Al4V anteriormente a realização das curvas de polarização foram similares aos obtidos no monitoramento do potencial diário; em que todas as amostras esterilizadas apresentaram valores de potenciais mais positivos comparativamente a liga não esterilizada, indicando a influência dos processos de esterilização no comportamento eletroquímico da mesma, senso este comportamento mais evidente para a amostra esterilizada em óxido de etileno.

Para Ti6Al4V/TM em 1 hora de imersão se observou o comportamento similar entre a amostra não esterilizada e as amostras esterilizadas pelos processos de óxido de

etileno e plasma de peróxido de hidrogênio, Figura 33(A). Evidenciou-se também o deslocamento para valores inferiores dos potenciais apresentados Ti6Al4V/TM_{AC}, o que pode estar associado a uma possível degradação desse revestimento após esterilização em autoclave.

Nas Figuras 34 e 35 estão apresentadas as curvas de polarização em solução simulada de fluido corpóreo (1 hora e 672 horas de imersão prévia) para Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados pelos diferentes processos.

Figura 34. Curvas de polarização de Ti6Al4V esterilizado pelos diferentes processos em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão.



Como pode-se observar (Figura 34), para todas as amostras esterilizadas com imersão prévia de 1 hora, os valores de densidade de corrente desenvolvidos foram menores, comparativamente a amostra não esterilizada. Isso indica o efeito da esterilização sobre a reatividade da amostra, como já havia sido mencionado. No entanto, neste ensaio, o deslocamento das curvas das amostras esterilizadas é muito semelhante para todos os processos de esterilização. Quanto ao potencial de corrosão, a esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio foi a que menos deslocou o potencial de corrosão comparativamente aos demais processos de esterilização (Figura 34). Autores já têm reportado a formação de uma camada passiva sobre os substratos após esterilização,

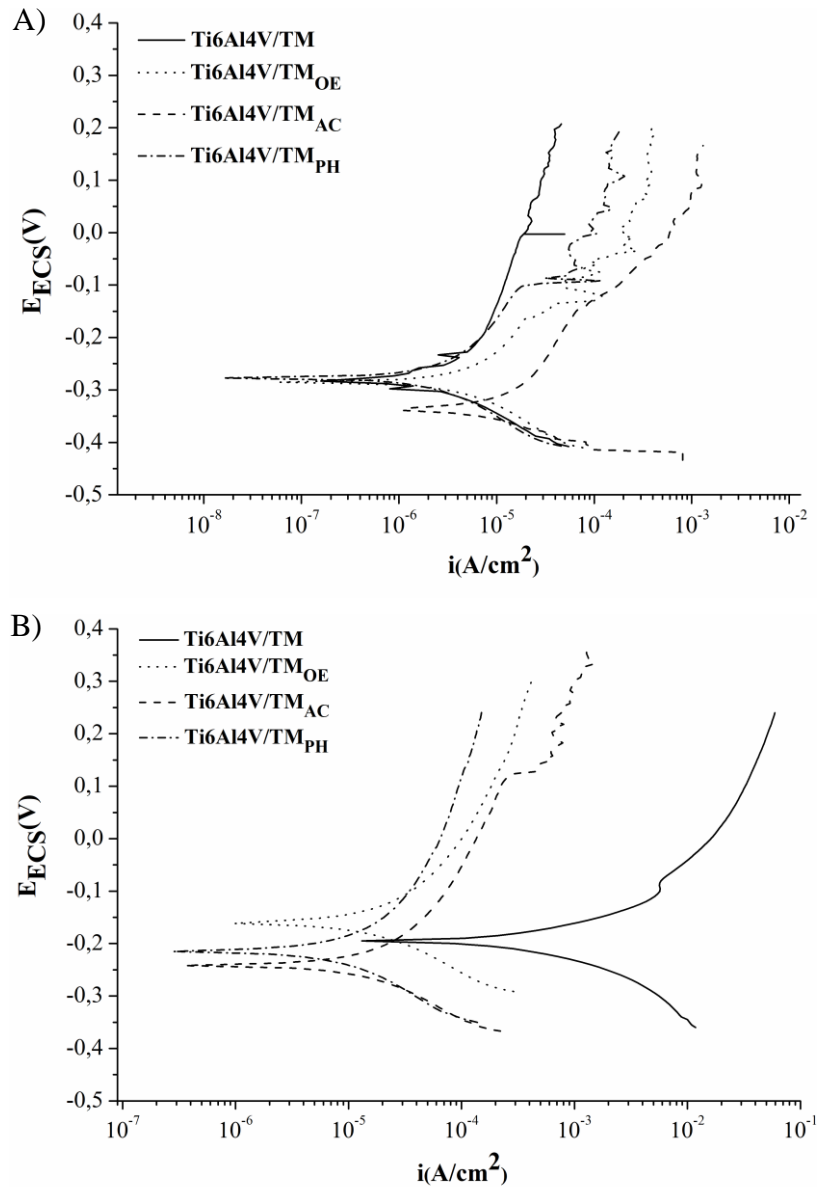
devido à diminuição das reações eletroquímicas atuantes na deterioração da liga Ti6Al4V (LÓPEZ et al. 2016).

Após 672 horas de imersão prévia, o efeito do processo de esterilização é ainda mais acentuado, e as amostras Ti6Al4V_{OE} e Ti6Al4V_{PH} foram as que apresentaram o desenvolvimento de menores densidade de corrente (icorr), comparativamente às amostras Ti6Al4V_{AC} e não esterilizadas (Figura 34), evidenciando a formação de uma camada protetiva sobre essas amostras quando da imersão em SBF por 672 horas.

Szewczenko et al. (2015) relacionou tal comportamento a existência de uma camada de óxido porosa sobre Ti6Al4V, que quando imersa em SBF, tende a se degradar parcialmente, possibilitando a permeabilidade do eletrólito levando a formação de uma nova camada de óxido quando em contato do mesmo com a liga metálica.

Kiel-Jamrozik et al. (2015) observaram para a liga Ti6Al4V esterilizada em autoclave que a corrosão por pite foi simultaneamente suprimida pela recriação de uma camada de óxido na superfície do material. Paszenda, Walke e Jadacka, (2010) observaram uma maior estabilidade eletroquímica de óxidos de titânio esterilizados em autoclave em relação aos não esterilizados e associaram isso à utilização de vapor de água sob pressão durante a execução do processo. Os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que a esterilização à plasma e em óxido de etileno teriam efeitos ainda mais positivos quanto ao comportamento eletroquímico da liga Ti6Al4V do que a esterilização em autoclave.

Figura 35. Curvas de polarização de Ti6Al4V/TM esterilizado pelos diferentes processos em SBF a 37 ± 3 °C após (A) 1 hora e (B) 672 horas de imersão.

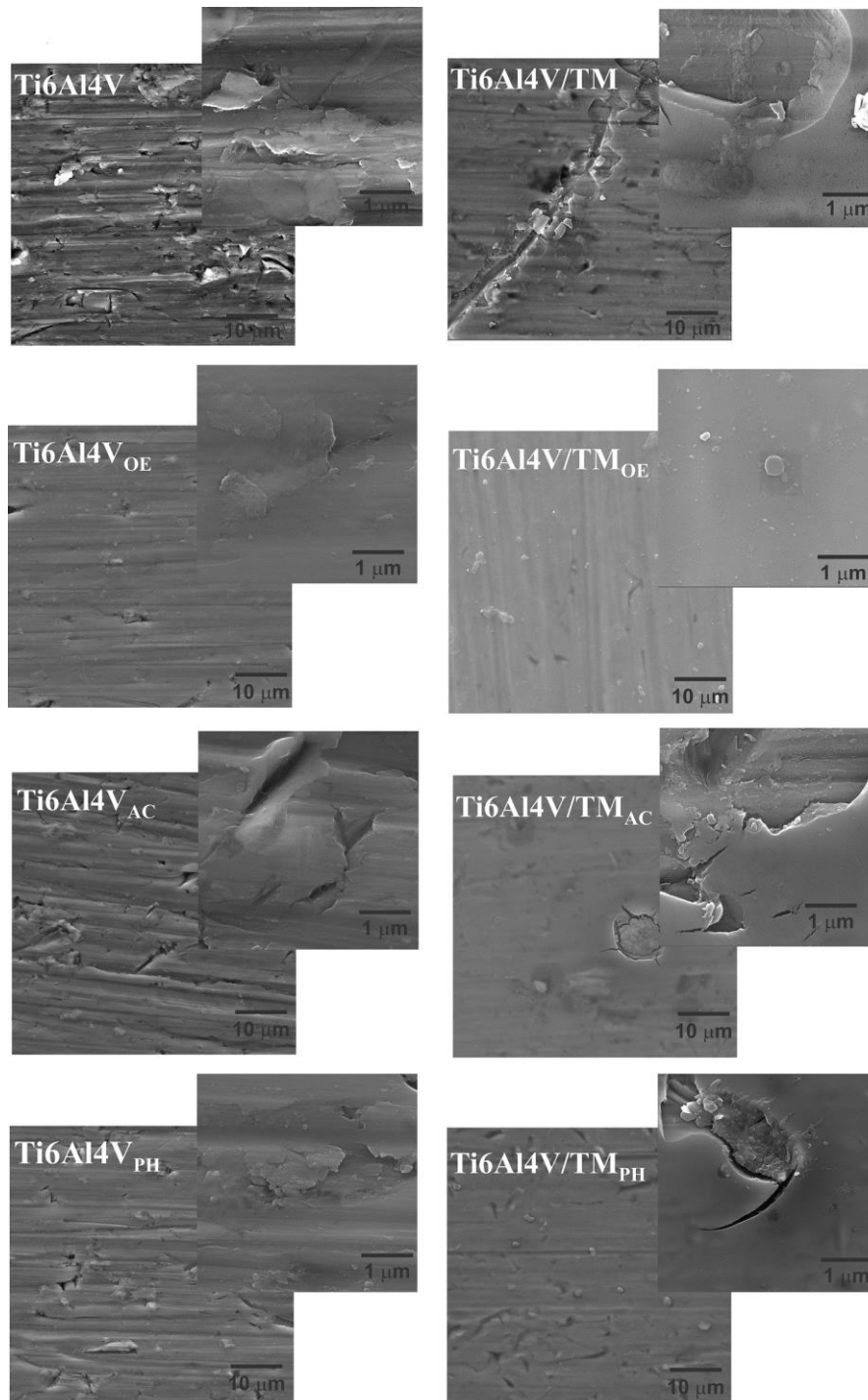


As amostras revestidas e esterilizadas, após 1 hora de imersão prévia (Figura 35), desenvolveram maiores densidades de corrente comparativamente a amostra revestida não esterilizada. Isso indica que os processos de esterilização empregados provocaram a degradação do efeito barreira dos revestimentos, sendo esse comportamento mais pronunciado para a amostra esterilizada em autoclave (Ti6Al4V/TM_{AC}). O revestimento esterilizado por esse processo foi o que apresentou o menor valor de ângulo de contato em SBF, indicando que essa é uma superfície com maior molhabilidade, o que pode ter favorecido a corrosão.

Após 672 horas de imersão prévia, todas as amostras revestidas e esterilizadas desenvolveram menores valores de densidade de corrente comparativamente a amostra revestida não esterilizada (Figura 35). Walke et al. (2016) observaram um comportamento semelhante e atribuíram isso à formação de uma camada de caráter protetor sobre o revestimento de SiO₂ esterilizado e imerso em SBF. De acordo com esses autores isso promoveria uma melhora nas propriedades resistivas do revestimento. No entanto, os valores de densidade de corrente observados no presente trabalho estão na faixa daqueles observados para a liga não revestida após 1 hora de imersão prévia (Figura 34). Dessa forma, esse resultado reforça o que foi mencionado anteriormente, ou seja, com 1 hora de imersão prévia fica evidenciado o comprometimento do efeito barreira do revestimento pelos processos de esterilização. Com o efeito barreira comprometido, o eletrólito permeou através do revestimento causando a corrosão da liga. O contato do eletrólito com a interface do substrato metálico, pode ter promovido o desencadeamento da formação de óxidos passivos de titânio e/ou a formação de produtos de corrosão com propriedades protetivas (GARCIA, CERÉ E DURAN, 2006; BASIAGA et al. 2016).

Com o intuito de analisar o efeito do meio sobre os revestimentos esterilizados após o ensaio de polarização potenciodinâmica foram obtidas imagens por MEV/FEG das amostras ensaiadas imersas previamente por 672 horas em SBF (Figura 36).

Figura 36. Micrografias no MEV/FEG após o ensaio de polarização de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados pelos diferentes processos e imersos por 672 horas em SBF a $37 \pm 3^\circ\text{C}$. Imagens obtidas em diferentes magnificações (5.000 x original e 50.000 x original).



Nas micrografias obtidas para a liga metálica sem revestimento por MEV/FEG (Figura 36) observou-se similaridade apresentada entre as superfícies de Ti6Al4V_{PH} e

Ti6Al4V, enquanto a maior modificação superficial foi observada para a amostra Ti6Al4V_{OE} devido ao nivelamento da superfície.

Dentre as amostras revestidas esterilizadas, a amostra Ti6Al4V/TM_{OE}, foi a que apresentou um revestimento de aparência regular e aparentemente isento de significativos defeitos superficiais, tendo sido observado a presença de aglomerados localizados em algumas regiões da superfície da amostra (Figura 36). As demais amostras revestidas, incluindo a não esterilizada, apresentaram degradação do revestimento com fissuras e descolamento da camada depositada.

5.1.2.3. Caracterização biológica

A caracterização biológica do revestimento híbrido protetivo foi realizada afim verificar o comportamento celular, quando da utilização deste revestimento na área de biomateriais, objetivando somente aumentar a resistência a corrosão de próteses de Ti6Al4V.

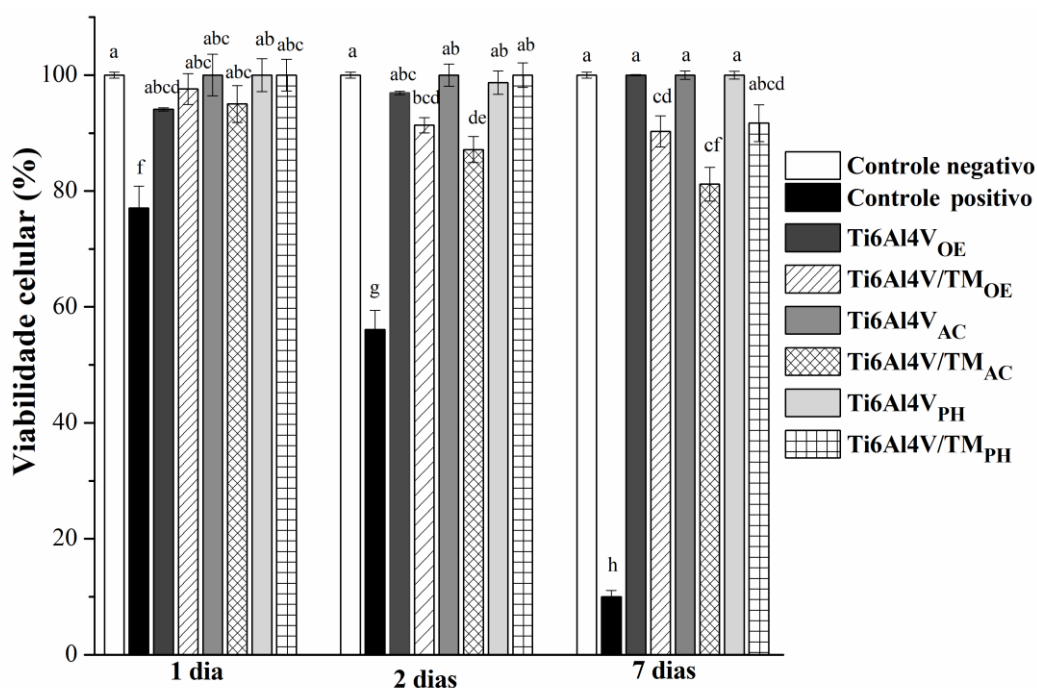
5.1.2.3.1. Citotoxicidade

A Figura 37 apresenta um comparativo da atividade citotóxica do extrato obtido pela imersão dos substratos de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizadas pelos diferentes processos, bem como o comparativo com o controle negativo e positivo nas células MG-63 após 1, 2 e 7 dias. Nos diferentes tempos de tratamento, verificou-se que para todos os substratos de Ti6Al4V os valores de viabilidade celular permaneceram acima dos 75 %, resultado que indicou reduzida atividade citotóxica, fato que não se observou para o controle positivo (DMSO 5 %), o qual apresentou viabilidade reduzida com valor em torno de 10 % no sétimo dia de análise. Dentre todas as amostras avaliadas, as que apresentaram menores percentuais de viabilidade celular foram Ti6Al4V/TM_{OE} após 1 dia e Ti6Al4V/TM_{AC} em 2 e 7 dias de avaliação, porém ainda apresentaram índices superiores a 70 %, em conformidade com valores preconizado pela ISO 10993-5-2009-2.

A influência dos processos de esterilização sobre o revestimento protetivo pode ser notada após 7 dias de exposição, na qual obteve-se uma redução na viabilidade celular, sendo esta acentuada para Ti6Al4V/TM_{AC}. Porém, todas as amostras de Ti6Al4V/TM

esterilizadas permaneceram com viabilidade acima de 75 %, indicando novamente comportamento benéfico do revestimento, nas concentrações e parâmetros testados.

Figura 37. Citotoxicidade de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados por diferentes processos sobre a viabilidade de células MG-63 tratadas durante 1, 2 e 7 dias com o extrato obtido pela realização de ensaio indireto de acordo com norma ISO 10993-5-2009-2. *Letras correspondem as diferenças estatisticamente significativas, utilizando-se o teste ANOVA-Tukey ($p \leq 0,05$).

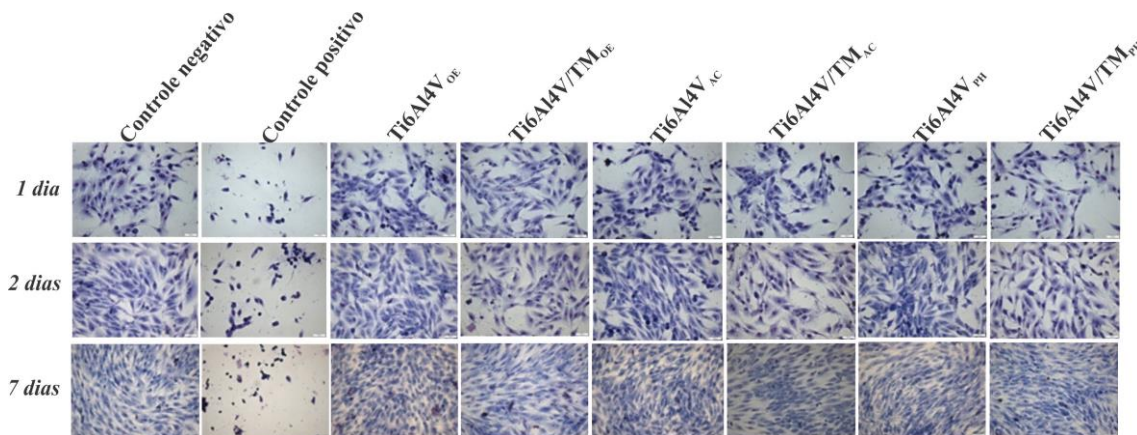


Pela análise das imagens obtidas com coloração de *Giemsa* em microscopia de luz invertida, foi possível avaliar a morfologia celular de MG-63 (Figura 38) após 1, 2 e 7 dias. Observou-se que as alterações celulares foram compatíveis com os resultados apresentados pelo MTT.

Pela interpretação das imagens notou-se que as células do controle negativo se apresentaram envoltas em citoplasma abundante, bem definido e íntegro. Esse comportamento é oposto ao controle positivo, o que já se era esperado, devido ao aumento substancial na citotoxicidade celular promovendo consequentemente alterações nas morfologias celulares. Após 1 e 2 dias de exposição com os diferentes extratos observou-se um incremento na densidade celular. Após 7 dias a densidade celular se mostrou mais intensa para todas as condições avaliadas, com pequena evidência de condensação de estruturas celulares. Sendo assim, os resultados obtidos sobre todos os substratos testados

neste estudo (Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM), submetidas ou não aos diferentes processos de esterilização) corroboram a ausência de atividade citotóxica discutida anteriormente.

Figura 38. Morfologia celular de MG-63 tratadas durante 1, 2 e 7 dias visualizadas em microscopia de luz invertida com aumento de 200 x.

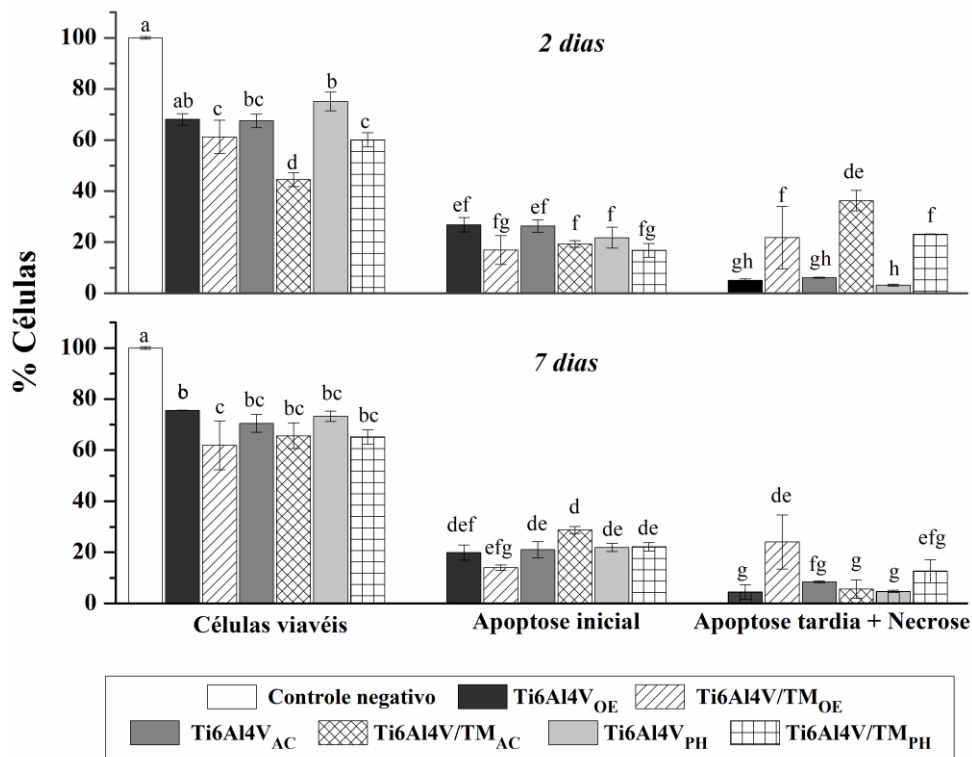


5.1.2.3.2. Viabilidade, adesão e morfologia celular

A Figura 39 apresenta o percentual dos eventos de viabilidade celular, apoptose inicial e apoptose tardia e/ou necrose de células MG-63 quando em contato direto com Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizados pelos três diferentes processos, e coradas pela técnica de laranja de acridina e brometo de etídio.

Na literatura é reportado a importância dos parâmetros de superfície na resposta celular. Além disso, células do tipo osteoblastos MG-63 respondem de forma diferencial a estes parâmetros e a composição do material (GYORGYEV et al., 2013). No presente estudo, foi possível verificar a influência da composição, uma vez que o perfil de viabilidade celular se mostrou inferior para as amostras contendo o revestimento híbrido quando comparado ao substrato metálico.

Figura 39. Porcentagem de células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio após realização de ensaio de contato direto de acordo com norma ISO 10993-5-2009-2, com modificações. (*Letras correspondem as diferenças estatisticamente significativas, utilizando-se o teste ANOVA-Tukey $p \leq 0,05$).



Após 2 dias de incubação, as amostras não revestidas, independentemente do processo de esterilização (Figura 39), apresentaram maior viabilidade do que as amostras revestidas. Pela análise morfológica apresentada anteriormente, a presença do revestimento híbrido provocou a diminuição das rugosidades micrométrica e nanométrica e a diminuição da molhabilidade (apresentando tendência a um caráter mais hidrofóbico).

A rugosidade da superfície do metal é conhecida por ter um efeito *in vitro* considerável sobre parâmetros como adesão, proliferação e diferenciação celular (CHEN E KO, 2013). Como já reportado na literatura, rugosidades em escala nanométrica têm relação com a adesão e proteínas e conseqüentemente no comportamento celular, já as rugosidades em escala micrométrica favorecem a adesão celular influenciando no processo de osteointegração (LIKIBI, JIANG e LI, 2008; WIRTH et al., 2008).

Oh et al. (2011) e Park et al. (2012) observaram que a resposta celular é influenciada pelos parâmetros de superfície e que esses ainda são dependentes dos diferentes processos de esterilização utilizados. Para Liu et al. (2013) o parâmetro

molhabilidade é um dos mais importantes que afeta a resposta celular de um material para implante. Sabe-se que esse interfere diretamente na adsorção de proteínas e adesão celular. É possível que as células tenham preferência por superfícies hidrofílicas, mas proteínas tendem a absorver preferencialmente sobre superfícies hidrofóbicas (PEGUEROLES et al., 2008).

Após 2 dias de incubação, obteve-se também um percentual de células viáveis similar para as amostras revestidas e esterilizadas por plasma de peróxido de hidrogênio e óxido de etileno, o que pode estar associado ao fato de que muito provavelmente as proteínas adsorvem em titânio com a porção mais hidrofóbica voltada para a superfície do metal e hidrofílica voltada ao meio de cultivo (MULLER et al., 2014).

Zhao et al. (2010) observaram que os efeitos degradantes provocados pela esterilização em autoclave de nanotubos de titânio são os responsáveis pela menor aderência e proliferação celular, provocando a redução da biocompatibilidade. De acordo com Pegueroles et al. (2008), o aumento da espessura de camada de óxido e a presença de contaminantes após processo de esterilização, alterações similares as anteriormente observadas neste estudo, afetam a resposta biológica de biomateriais, justificando os índices observados para Ti6Al4V/TM_{AC} em 2 dias de incubação

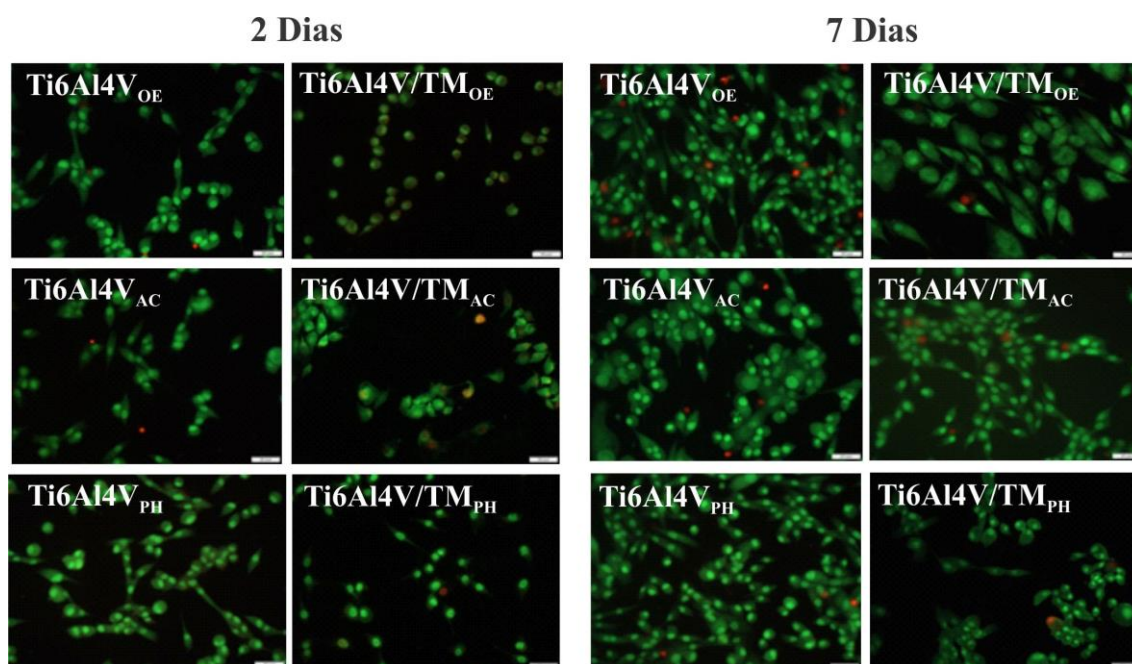
Porém, segundo Martin et al. (1995), em maiores períodos de exposição, as células MG-63 proliferaram melhor em superfícies lisas, corroborando com o aumento do percentual da viabilidade celular obtido para as amostras esterilizadas por autoclave de 2 para 7 dias de incubação. Resultados similares foram encontrados por Munarin et al. (2017) e Monaco et al. (2013) quando da esterilização por óxido de etileno de polissacarídeos e colágeno.

Os níveis de apoptose inicial em 2 dias para as amostras revestidas foram menores do que para o substrato metálico independente dos processos de esterilização. De forma similar, observou-se que os níveis de apoptose tardia e ou necrose foram inferiores para todas as amostras testadas, contudo com os maiores índices apresentados pelas amostras contendo o revestimento. Isso pode ser relacionado aos baixos valores de rugosidade média e aos comportamentos mais hidrofóbicos apresentados pelos revestimentos comparativamente aos substratos metálicos, ambos podem ter contribuído para o impedimento da adesão celular, induzindo as células ao processo de morte.

Após 7 dias de incubação, o perfil de apoptose inicial tornou-se heterogêneo e a amostra Ti6Al4V/TM_{AC} foi a que apresentou maior percentual, em torno de 29 %. Junto a isso ressalta-se o maior nível de apoptose e ou necrose apresentado pela amostra Ti6Al4V/TM_{OE} (25 %), que pode ser uma consequência da retenção de resíduos oriundos do processo (PARK et al., 2012; HOLYOAK et al., 1996); que com o decorrer do tempo foram liberados, motivando o aumento dos índices de apoptose tardia e necrose observados em função do tempo. Apesar dos percentuais apresentados para apoptose, os mesmos são considerados baixos comparativamente aos obtidos na viabilidade celular

A Figura 40 apresenta as imagens obtidas em microscopia de fluorescência das células MG-63 coradas com laranja de acridina e brometo de etídio quando em ensaio por contato direto.

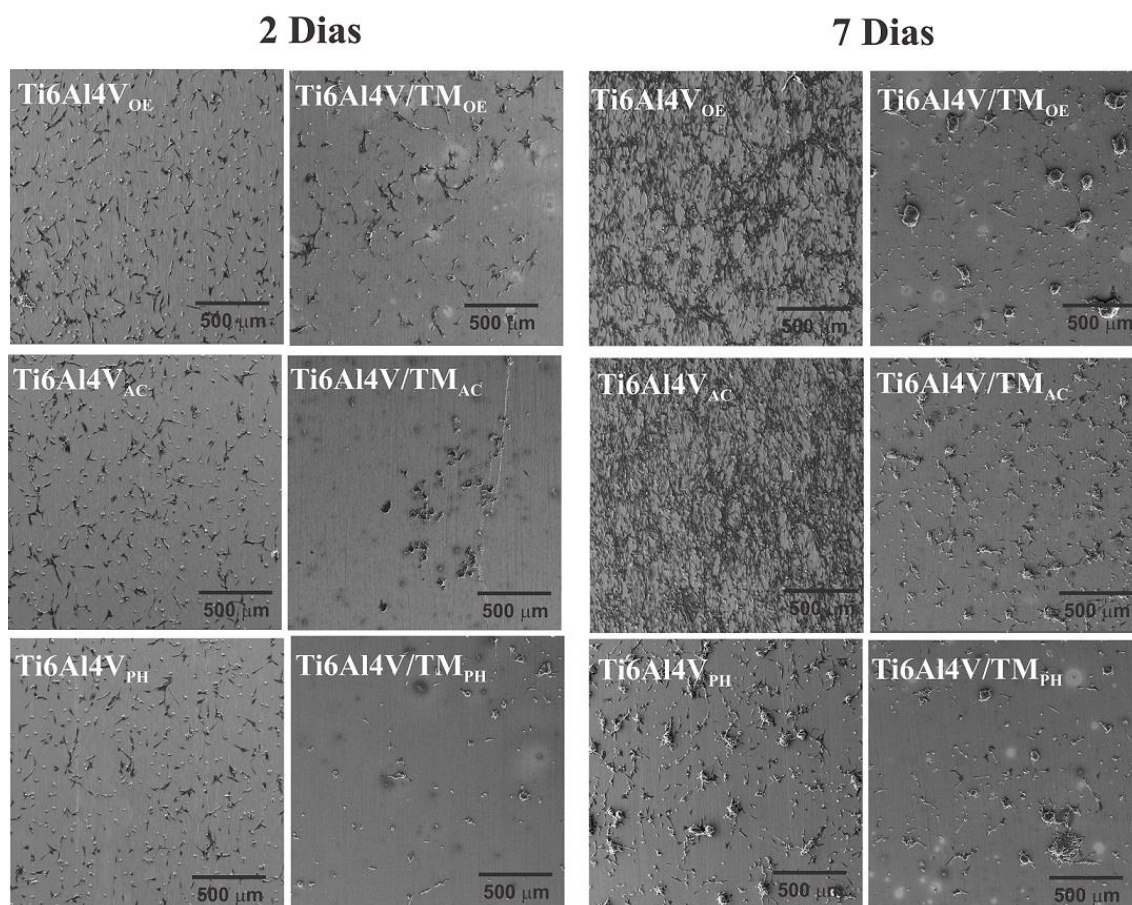
Figura 40. Células MG-63 coradas com laranja de acridina e brometo de etídio visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 200 x.



Pela técnica de análise de fluorescência foi possível realizar uma medição direta das alterações morfológicas celulares (ZHANG et al., 2015; SHARMA et al., 2016). Por meio da interação celular, este método permite a diferenciação de células viáveis (coradas em verde) e células em processo de apoptose e ou necrose (coradas em vermelho). Pela interpretação das imagens não se verificou o efeito deletério das células em análise, somente o aumento da viabilidade celular de 2 para 7 dias de incubação; tais resultados estão de acordo com os expostos anteriormente.

A Figura 41 apresenta as micrografias no MEV/FEG das células sobre os substratos avaliados após 2 e 7 dias de incubação.

Figura 41. Morfologia no MEV/FEG das células MG-63 sobre as superfícies de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM esterilizadas pelos diferentes processos após 2 e 7 dias de incubação. Imagens obtidas com magnificação de 150 x original.



Pela análise das imagens obtidas observou-se distintas morfologias celulares para os diferentes substratos Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM, porém não foram encontradas significativas diferenças de acordo com o processo de esterilização utilizado. Isso porque para todas as amostras de Ti6Al4V, as células MG-63 apresentaram morfologia fusiforme, sendo tal comportamento acentuado em função do tempo. Dentre os processos de esterilização, as células observadas sobre Ti6Al4V_{PH} parecem apresentar maiores alterações morfológicas.

De acordo com Junkar et al. (2016) os parâmetros de superfície além de modificarem a fisiologia, alteram a morfologia celular; segundo os autores a esterilização por peróxido de oxigênio de folhas de titânio promoveu um aumento da espessura do óxido que em consequência proporcionou uma maior interação da mesma com células do

tipo Hbo. Esta observação é coerente com os resultados encontrados para Ti6Al4V_{AC} e Ti6Al4V_{OE}, uma vez que para essas notou-se a presença de células alongadas e mais distribuídas nas superfícies de análise após 7 dias de incubação.

Apesar do alto percentual de viabilidade celular, as células sobre os revestimentos protetivos esterilizados pelos diferentes processos, apresentaram-se com morfologia esférica atenuada, independentemente do tempo de incubação; o que pode indicar uma baixa força de interação com a superfície (JUNKAR et al., 2016). Tal morfologia também foi observada em células MG-63 sobre ligas de Mg e MgCa esterilizadas por processos similares. Ti6Al4V/TM_{OE} e Ti6Al4V/TM_{PH} apresentaram aglomerados celulares que se tornaram dispersos em função do tempo (LIU et al., 2013). Por outro lado, para Ti6Al4V/TM_{AC} se observou um pequeno alongamento da membrana, comportamento esse muito semelhante a Ti6Al4V_{AC}. Este alongamento pode estar relacionado com o inferior comportamento barreira apresentado por este revestimento, colocando em evidencia características do substrato metálico pela formação de óxidos oriundos do mesmo.

5.1.3. Conclusões parciais

Neste capítulo os resultados obtidos com relação a obtenção, caracterização e esterilização do revestimento protetivo permitiram concluir:

- a) A combinação do alcoxissilano TEOS com o organoalcoxissilano MTES aplicado pela técnica de *dip coating* resultou na aplicação de um revestimento aderente e com cobertura homogênea sobre o substrato da liga de Ti6Al4V;
- b) Os processos de esterilização avaliados promoveram modificações nas propriedades morfológicas e físico-químicas do substrato metálico e do revestimento híbrido;
- c) Em relação às propriedades eletroquímicas, o revestimento híbrido formado por TEOS/MTES apresentou um caráter protetivo ao substrato metálico da liga Ti6Al4V. No entanto, para o revestimento híbrido, o comportamento de proteção foi comprometido independentemente do processo de esterilização utilizado. Além disso, visualizou-se o efeito dos processos de esterilização no comportamento anódico dos substratos de Ti6Al4V, devido ao desenvolvimento de densidades de corrente menores comparativamente a amostra não esterilizada;

d) Os substratos de Ti6Al4V e Ti6Al4V/TM apresentaram citotoxicidade mínima as células MG-63, entretanto apresentaram diferentes comportamentos em decorrência das modificações superficiais provocadas pelos distintos processos de esterilização. Após 1 dia de incubação, todos os revestimentos híbridos apresentaram inferiores percentuais de células viáveis e índices superiores de apoptose tardia e necrose comparativamente ao substrato metálico não revestido, sendo esses comportamentos mais evidenciados para a amostra esterilizada em autoclave. Após 7 dias de incubação, Ti6Al4V/TM_{OE} foi o que apresentou menor percentual de viabilidade e maior de mortalidade celular, respectivamente.

5.2. Obtenção e esterilização do revestimento híbrido bioativo - ETAPA 2

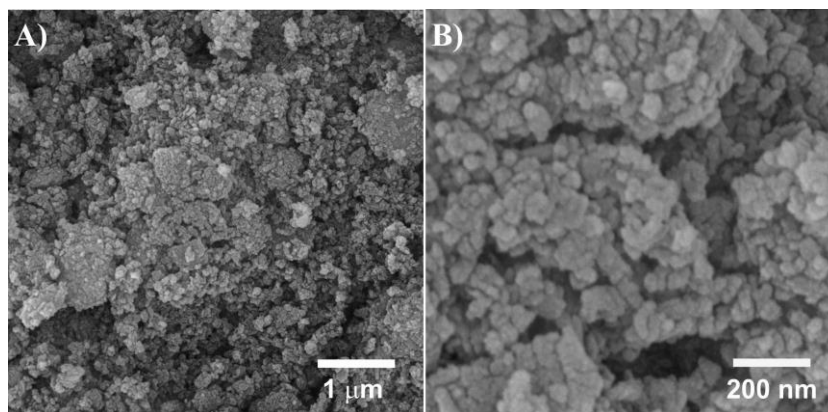
5.2.1. Obtenção e caracterização do revestimento híbrido bioativo

Para a obtenção do revestimento com propriedades bioativas depositado sobre o revestimento protetivo anteriormente estudado foram incorporadas partículas de hidroxiapatita no mesmo e por isso a caracterização morfológica e química dessas foi realizada.

5.2.1.1. Caracterização das partículas de hidroxiapatita

A Figura 42 apresenta as micrografias no MEV/FEG das partículas de hidroxiapatita na forma como recebida. Observou-se que as partículas apresentaram dimensão nanométrica, porém com polidispersão e na forma de aglomerados.

Figura 42. Micrografias no MEV/FEG das partículas de hidroxiapatita na forma como recebida. Imagens obtidas em diferentes ampliações (50.000 x original e 250.000 x original).



De acordo com Nasiri-Tabrizi et al. (2013) a formação de aglomerados se dá quando duas partículas primárias adjacentes de mesma orientação cristalográfica colidem e coalescem para a formação de uma partícula secundária. Como o tamanho dessas partículas secundárias é ainda muito pequeno, é razoável que as mesmas continuem a colidir e a coalescer, promovendo o processo de aglomeração.

Em literatura é reportado que a redução do tamanho das partículas de hidroxiapatita para aplicação em biomateriais pode promover o aumento da biocompatibilidade do sistema devido ao aumento da área superficial, da reatividade

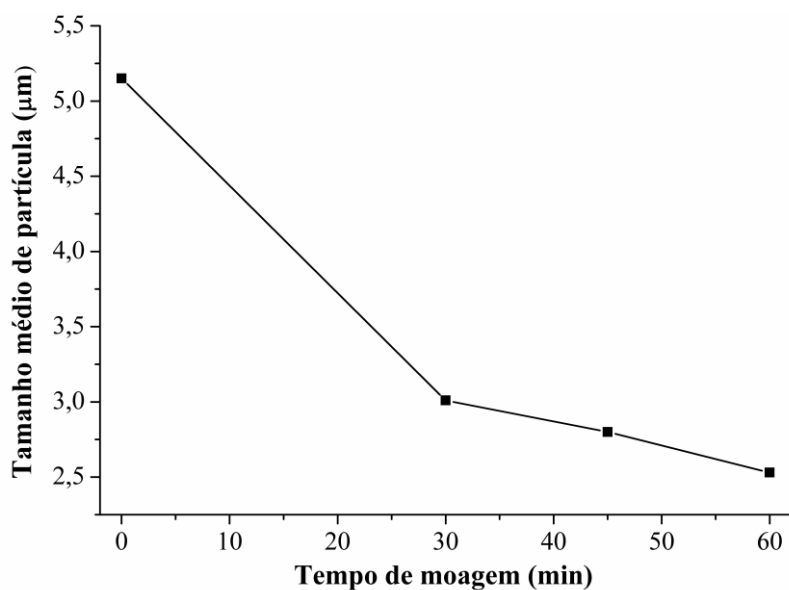
química e atividade biológica (GARCIA, CERÉ E DURAN, 2004; LEITUNE et al., 2013). Da mesma forma, segundo Rogina et al. (2017) a homogeneidade e a distribuição de partículas de hidroxiapatita na amostra é crucial na bioresorbabilidade, influenciando o gradiente de pH local do tecido circundante e, finalmente nas reações imunológicas.

Segundo Seo et al. (2012), tratando-se da desaglomeração de partículas, a utilização de suspensões é recomendada para a criação de forças de repulsão entre as partículas, uma vez que atuam de forma a aumentar a distância entre as mesmas, evitando novamente a formação de aglomerados. As suspensões são preparadas pela dispersão dos pós em um solvente e por meio de atrito com os corpos moedores promove-se a quebra das partículas.

Desta forma, visando a maior dispersão e estabilidade das partículas de hidroxiapatita adicionadas a solução de TEOS/MTES para a preparação do revestimento bioativo, a moagem dos aglomerados anteriormente visualizados em MEV/FEG foi realizada em solvente álcool etílico.

A Figura 43 apresenta os tamanhos médios das partículas de hidroxiapatita obtidos pela técnica de Difração de raio laser em função do tempo de moagem em moinho planetário.

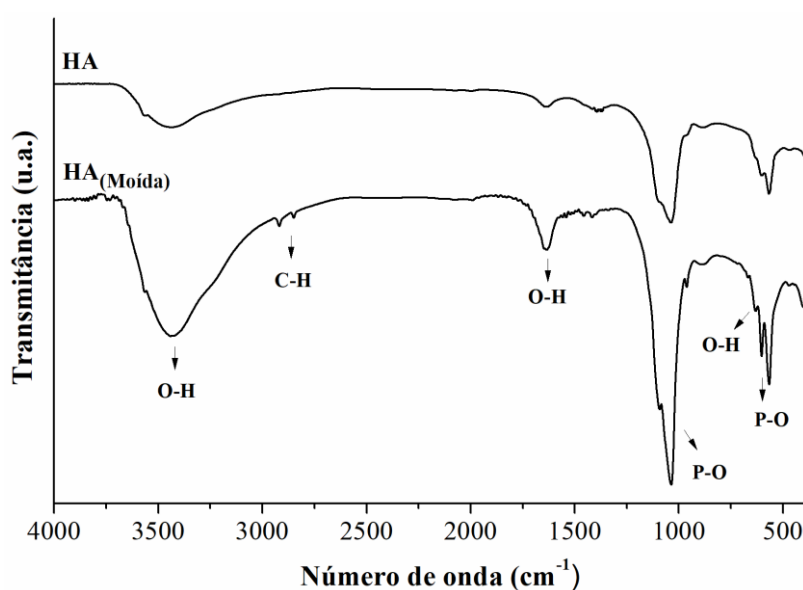
Figura 43. Tamanho das partículas de hidroxiapatita obtida em Difração de raio laser *versus* tempo de moagem.



Observou-se a redução no tamanho média de partículas em função do tempo, obtendo-se o tamanho médio de 2,5 μm após 60 minutos de moagem (redução de 50 % do tamanho inicial). Ressalta-se que, para que novamente não houvesse a formação de aglomerados, as partículas de hidroxiapatita permaneceram em suspensão até a etapa de dispersão na solução de TEOS/MTES hidrolisada.

A Figura 44 apresenta o espectro no FTIR da hidroxiapatita (HA) antes e após o processo de moagem por 60 minutos em moinho planetário.

Figura 44. FTIR da hidroxiapatita antes e após a etapa de moagem por 60 minutos em moinho planetário.

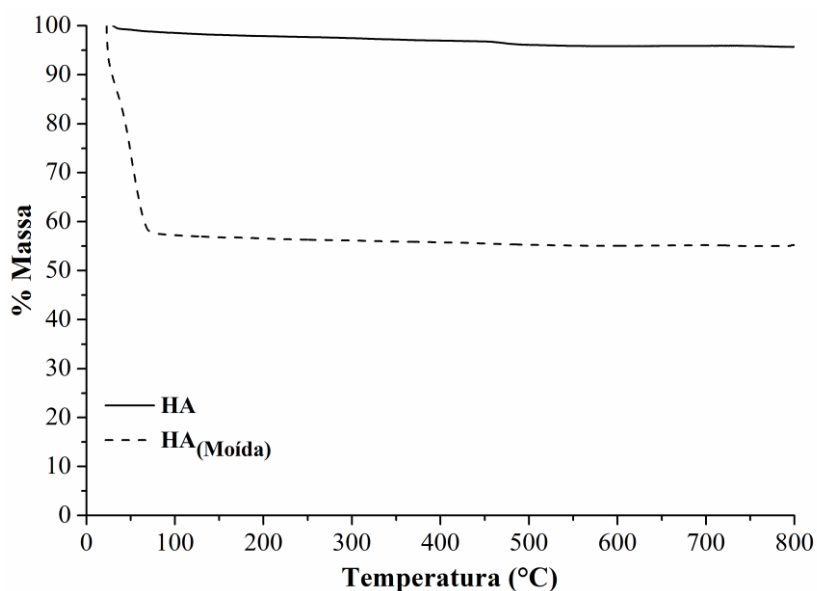


Pela interpretação dos espectros apresentados, observou-se que as bandas obtidas para a estrutura química da hidroxiapatita utilizada neste estudo, na forma como recebida, estão de acordo as encontradas para a mesma em literatura. A ampla banda entre 3000 e 3600 cm^{-1} juntamente com a apresentada próximo a 3400 cm^{-1} , foram atribuídas ao estiramento dos grupamentos hidroxila ($-\text{OH}$). As bandas localizadas em 560, 601, 1034 e 1089 cm^{-1} foram relacionadas a vibração das ligações $\text{P}-\text{O}$ e a apresentada em 958 cm^{-1} associada ao estiramento assimétrico de PO_4^{3-} . Ressalta-se também o aparecimento da banda entre os valores de 1630 e 1640 cm^{-1} , referente a vibração da ligação ($\text{O}-\text{H}$) presente na água, justificada pela adsorção de moléculas de água na superfície das partículas de hidroxiapatita (ZHANG, GUAN E ZHANG, 2011; MARTÍNEZ et al., 2012; ROJAE E et al., 2013). Após 60 minutos de moagem, mantida em suspensão de álcool etílico, apresentou similaridade ao da amostra na forma como recebida, não sendo

detectadas alterações químicas na estrutura da mesma. No entanto, as bandas referentes a ligação O–H, características do grupo funcional do álcool etílico foram observadas em maior intensidade, junto ao aparecimento da banda a cerca de 2900 cm^{-1} associada ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações C–H (CH_2 e CH_3) da estrutura do álcool.

A Figura 45 apresenta as curvas TG da hidroxiapatita antes e após a etapa de moagem. Esta análise foi realizada a fim de identificar o comportamento das partículas de hidroxiapatita em função das temperaturas utilizadas no desenvolvimento revestimento proposto.

Figura 45. Curvas TG da hidroxiapatita antes e após a etapa de moagem por 60 minutos em moinho planetário.



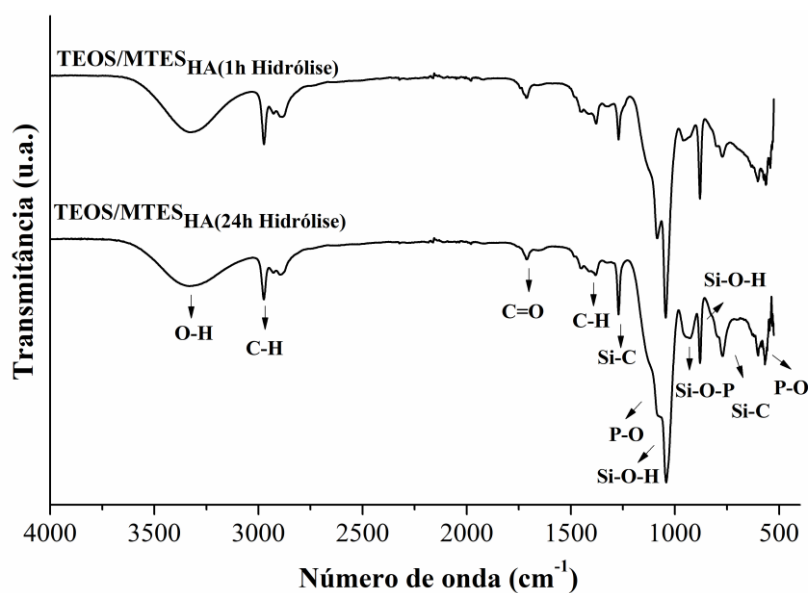
Foi observado na curva TG um único evento de perda de massa de aproximadamente 5 % da totalidade da amostra na temperatura de aproximadamente 450 °C. Pode-se associar tal evento a dessorção das moléculas de água presentes na superfície das partículas (MANDAL et al., 2014). Para a amostra de hidroxiapatita em suspensão, observou-se um evento de perda de massa, de aproximadamente 40 % entre 25 à 100 °C, relacionado a evaporação do álcool etílico. Evidenciou-se a coerência destes resultados com os encontrados em análise de FTIR.

5.2.1.2. Caracterização química

De acordo com Hernández-Escolano et al. (2012), a temperatura de cura utilizada em revestimentos a base de silanos pode influenciar as propriedades dos mesmos; temperaturas mais altas são utilizadas para a obtenção de revestimentos inorgânicos de SiO₂ visando, na maioria das vezes, a resistência a corrosão de substratos metálicos e temperaturas mais baixas são utilizadas para a obtenção de revestimentos orgânicos-inorgânicos que, especificamente na área biomédica, são utilizados como osteoindutores para implantes metálicos. Tomando como base essas informações, optou-se durante o desenvolvimento deste estudo, avaliar a obtenção do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.

A Figura 46 apresenta os espectros no FTIR da solução de TEOS/MTES hidrolisada com a adição das partículas de hidroxiapatita após 1 hora e 24 horas.

Figura 46. FTIR da solução de TEOS/MTES hidrolisada com a adição das partículas de hidroxiapatita após 1 hora e 24 horas.



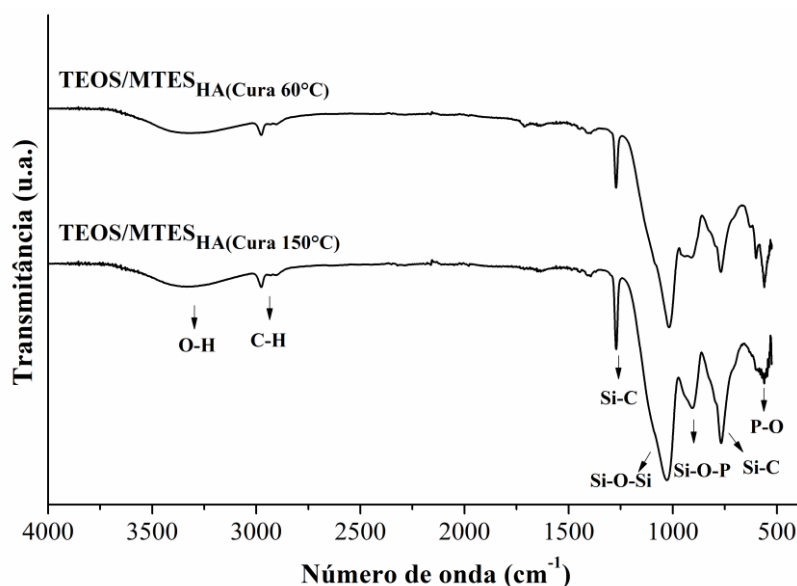
Como pode ser observado, a maioria das bandas apresentadas para a solução hidrolisada do revestimento bioativo foram semelhantes as anteriormente visualizadas para revestimento protetivo, o que já era esperado, devido a similaridade da composição de ambos. Também foram observadas as bandas típicas da estrutura química da hidroxiapatita dispersa na solução hidrolisada.

Constatou-se o aparecimento de uma banda em 876 cm⁻¹, correspondente a formação da ligação química Si-O-P, resultante da reação dos grupamentos hidroxilas

presentes na estrutura da hidroxiapatita e do grupamento silanol proveniente da hidrólise dos precursores silanos (WANG, SONG e LOU, 2010; RAKMAE et al., 2012; REHMAN et al. 2016). A formação desta ligação também foi confirmada pela menor intensidade das bandas relacionadas a ligação Si–OH no espectro de 24 horas aliada a maior intensidade da banda Si–O–P em relação à 1 hora de hidrólise.

A Figura 47 apresenta os espectros no FTIR do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.

Figura 47. FTIR do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.



A partir da análise dos espectros obtidos para as amostras curadas nas diferentes temperaturas, evidenciou-se a ocorrência da reação de condensação entre os grupamentos silanol devido a formação das ligações de siloxanos (Si–O–Si), associado ao aparecimento da banda em aproximadamente 1020 cm⁻¹. No entanto, para a amostra curada a 150 °C, observou-se a maior intensidade relativa apresentada por esta banda em relação à 60 °C, o que de acordo com Franket et al. (2003) está relacionada a aceleração da reação de condensação devido ao aumento da temperatura de cura utilizada, promovendo a maior reticulação destes revestimentos. Segundo Kunst et al. (2014), o aumento da temperatura utilizado durante o processo de cura, provoca o aumento das reações de reticulação, formando uma camada de comportamento protetor e hidrofóbica, de reduzida reatividade e de maior resistência mecânica.

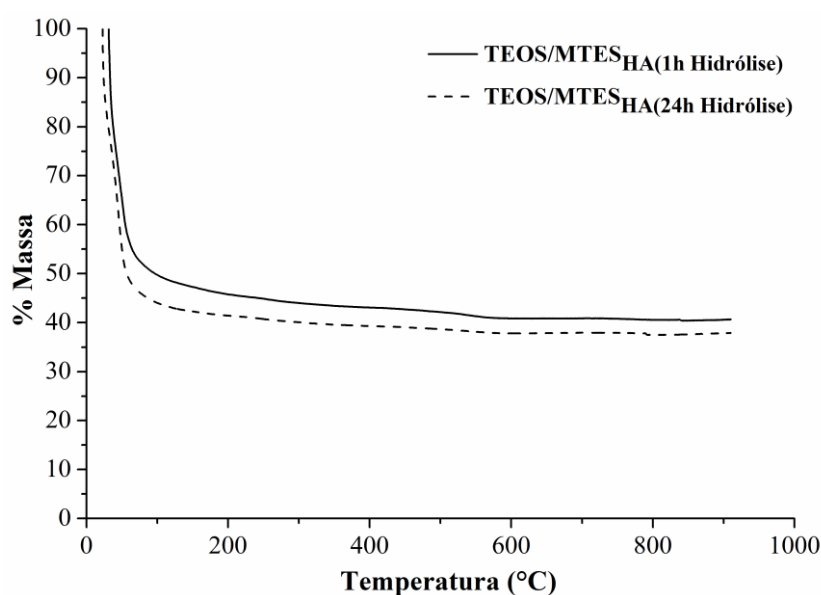
Observou-se também a permanência das bandas associadas as ligações C–H (CH₂ e CH₃) e Si–C presentes no grupamento lateral do organoalcoxissilano MTES e da banda

referente a ligação O–H, denotando a retenção da água e a presença de grupos silanol (entre 3200 e 3700 cm^{-1}) em ambos os revestimentos obtidos.

5.2.1.3. Caracterização térmica

A Figura 48 apresenta as curvas TG da solução de TEOS/MTES hidrolisada após 1 e 24 horas da adição das partículas de hidroxiapatita.

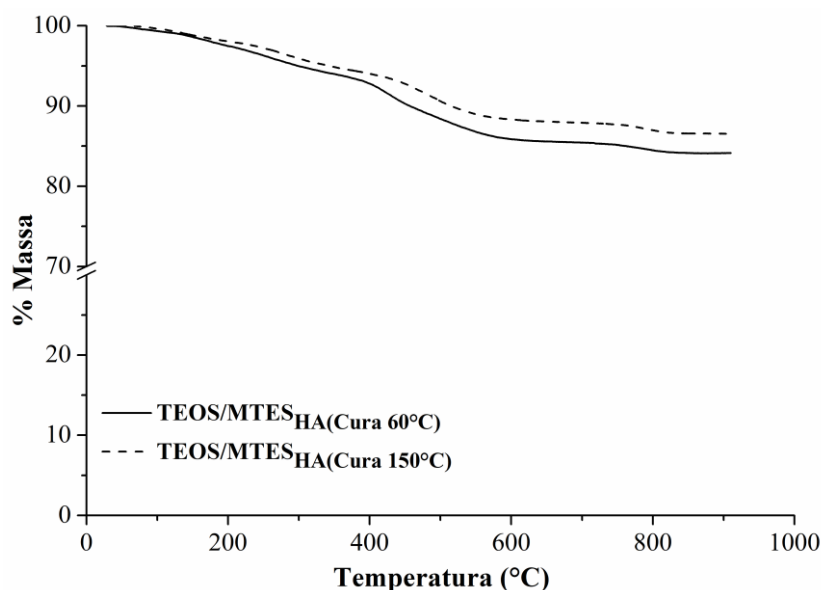
Figura 48. Curvas TG da solução TEOS/MTES hidrolisada após 1 e 24 horas da adição de partículas de hidroxiapatita.



As curvas de TG para as soluções hidrolisadas com a adição de partículas de hidroxiapatita após 1 hora e 24 horas apresentaram um único evento de perda de massa de aproximadamente 45 e 55 % para os diferentes tempos de hidrólise, esse ocorrido entre as temperaturas de 25 a 100 °C. Atribui-se este evento à evaporação de água e solventes orgânicos presentes na formulação do revestimento bioativo. A diferença de perda de massa entre as curvas de TG (entorno de 10 %) pode ser relacionada à maior formação de grupamentos silanol (Si–OH) em decorrência do maior tempo hidrólise (24 horas).

A Figura 49 apresenta as curvas TG do revestimento bioativo após a etapa de condensação e curados nas diferentes temperaturas (60 e 150 °C).

Figura 49. Curvas TG do revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.



A partir das curvas TG foi observada a presença de três eventos de perda de massa para os revestimentos curados a 60 e 150 °C; o primeiro abaixo de 400 °C relacionado à remoção da água adsorvida e à evaporação de solventes voláteis presentes na matriz híbrida; entre 400 e 600 °C relacionado à volatilidade de oligômeros, especificamente a oxidação dos grupos metila presente na estrutura lateral do organoalcoxissilano MTES e, por fim, um de menor intensidade entre 750 e 850 °C, atribuído a decomposição da estrutura polimérica e a desidratação dos grupos silanol, respectivamente (SMITH et al., 2007; PHANASGAONKAR et al., 2009; SARMENTO et al., 2010).

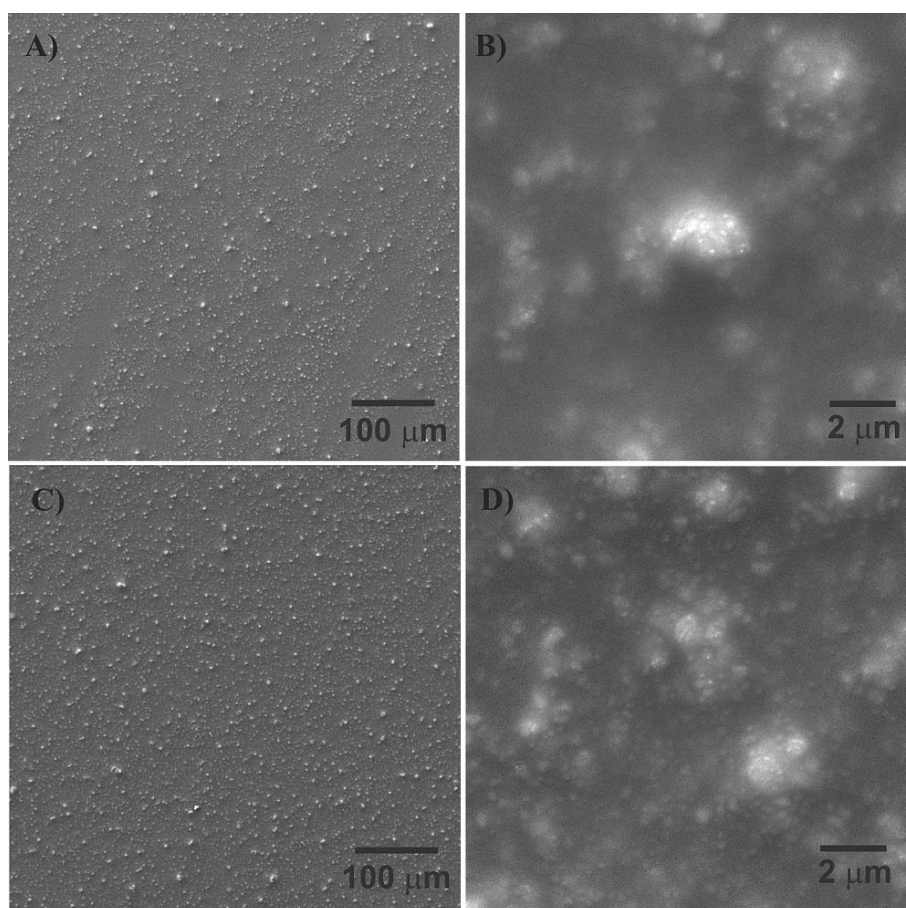
Comparando-se os termogramas obtidos para os revestimentos curados nas diferentes temperaturas, observou-se que o revestimento curado a 60 °C apresentou maior perda de massa comparativamente à 150 °C, devido a formação de uma rede siloxano menos reticulada e conseqüentemente de menor estabilidade térmica (SALVADOR et al., 2017).

5.2.1.4. Caracterização morfológica

A Figura 50 apresenta as micrografias obtidas no MEV/FEG com vista de topo do revestimento bioativo curado nas diferentes temperaturas (60 e 150 °C). Para ambas as amostras, independente da temperatura utilizada, observou-se a deposição de um revestimento homogêneo, isento de defeitos e com partículas de hidroxiapatita

distribuídas uniformemente, porém, com a presença de pequenos aglomerados na superfície analisada. Junto a isso, visualizou-se que os aglomerados se encontram recobertos pelo revestimento híbrido.

Figura 50. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado nas diferentes temperaturas; (A e B) Ti6Al4V/TM/TM_{HA-60°C} (C e D) Ti6Al4V/TM/TM_{HA-150°C}. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



As Figuras 51 e 52 mostram as imagens do mapeamento elementar de cores obtidas por Difração de energia dispersiva bem como as micrografias de vista de topo e em perspectiva obtidas no MEV/FEG, após a realização do ensaio de adesão dos revestimentos bioativos curados a 60 e 150 °C, depositados sobre o revestimento protetivo.

Pelo mapeamento elementar de cores se confirmou a deposição do revestimento a base de silano sobre o revestimento protetivo, isso atribuído a presença dos elementos químicos, silício e oxigênio, principais constituintes da ligação siloxano. Detectou-se também a presença dos principais elementos da estrutura da hidroxiapatita, cálcio e fósforo.

Figura 51. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado a 60 °C em diferentes áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento elemental de acordo com a composição do revestimento, (B) região de destacamento com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.

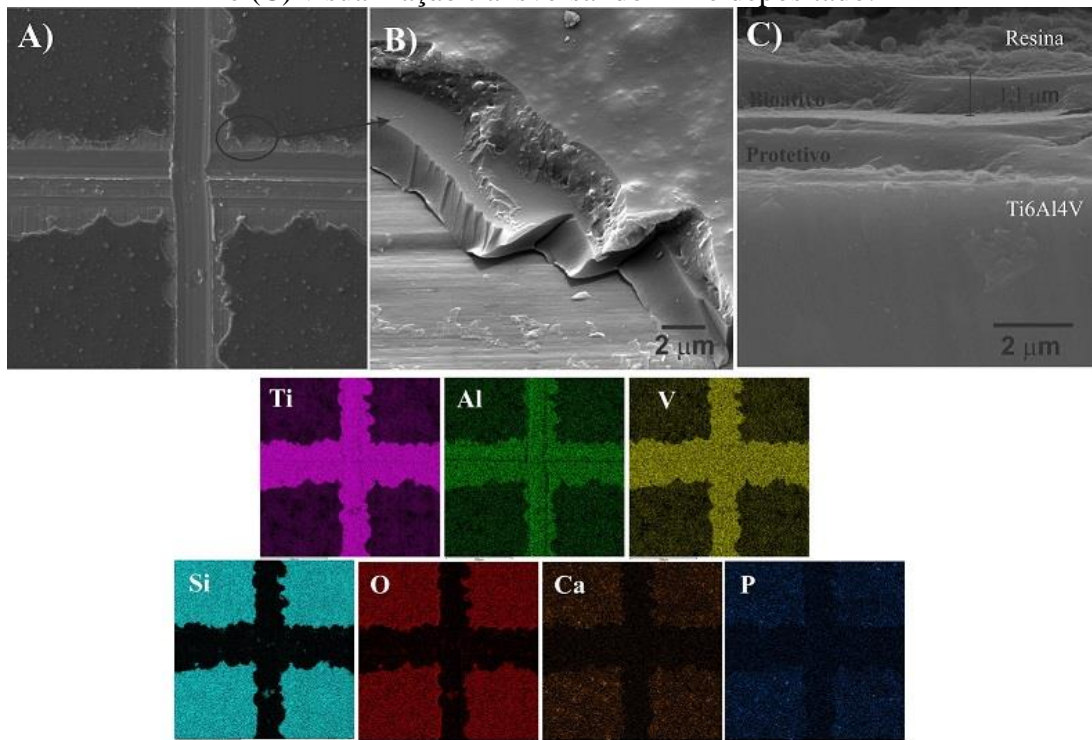
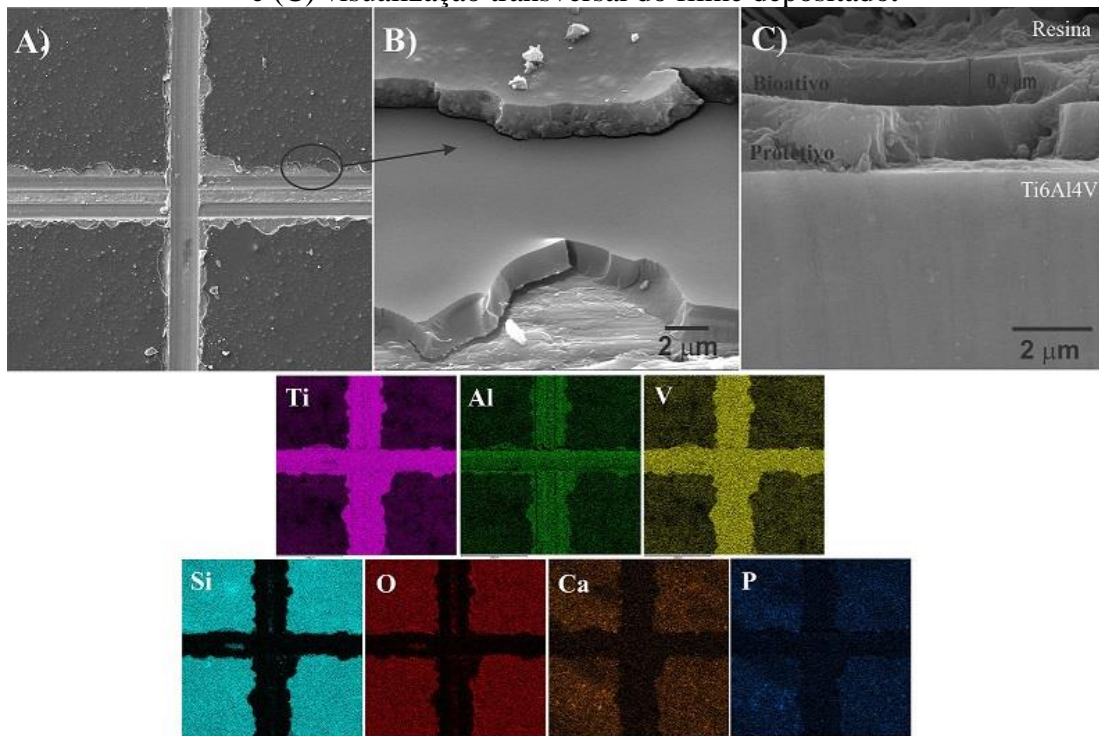


Figura 52. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo curado a 150 °C em diferentes áreas analisadas em (A) ensaio de adesão e mapeamento elemental de acordo com a composição do revestimento, (B) região de destacamento com inclinação de 35° e (C) visualização transversal do filme depositado.



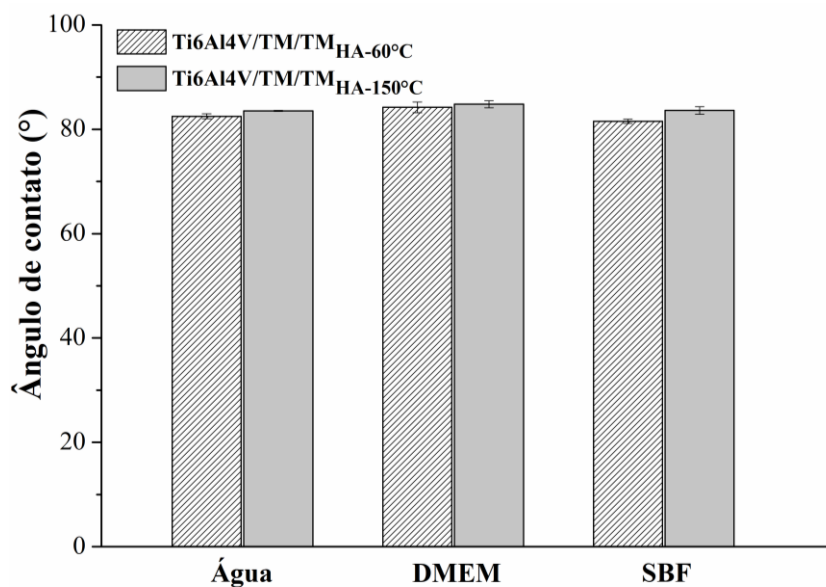
Analisando as imagens obtidas no MEV/FEG e EDS, observou-se que ambos os revestimentos apresentaram satisfatória adesão sobre o revestimento subjacente, uma vez que observou-se a remoção dos mesmos somente em pequenas regiões além das demarcadas em ensaio, Figuras 51(A) e 52(A), no entanto, pelas imagens obtidas com a inclinação de 35° das amostras se pode observar que o revestimento curado a 60 °C apresentou maior interação com o revestimento protetivo comparativamente à 150 °C, Figuras 51(B) e 52(B). As espessuras dos revestimentos foram mensuradas pelas imagens do corte transversal das amostras nas quais para Ti6Al4V/TM/TM_{HA-60°C} obteve-se uma espessura de aproximadamente 1,1 µm e para Ti6Al4V/TM/TM_{HA-150°C} 0,9 µm. Na literatura, resultados semelhantes foram obtidos por Ballarre et al. (2010) para revestimentos TEOS/MTES contendo partículas bioativas dispersas e curados nestas temperaturas.

A Tabela 14 e a Figura 53 apresentam os valores medidos para a determinação do ângulo de contato em três diferentes líquidos para o revestimento bioativo curado nas temperaturas de 60 e 150 °C.

Tabela 14. Ângulos de contato médios obtidos para Ti6Al4V/TM/TM_{HA} curado nas temperaturas de 60 e 150 °C em água, DMEM e SBF.

Amostra	Ângulo (°)		
	Água	DMEM	SBF
Ti6Al4V/TM/TM _{HA-60°C}	82 ± 0,5	84 ± 1,0	81 ± 0,2
Ti6Al4V/TM/TM _{HA-150°C}	83 ± 0,9	85 ± 0,7	84 ± 0,7

Figura 53. Medida de ângulo de contato médio para Ti6Al4V/TM/TM_{HA} curado nas temperaturas de 60 e 150 °C em água, DMEM e SBF.



Observou-se uma pequena diferença entre os valores de ângulo de contato obtidos para as diferentes temperaturas de cura do revestimento bioativo, nas quais o revestimento curado à 60 °C apresentou maior molhabilidade superficial comparativamente à 150 °C, independentemente do líquido ensaiado. Estes resultados concordam com as análises anteriormente discutidas de TGA e FTIR, uma vez que a presença de grupamentos hidroxilas tende a acentuar a hidrofiliicidade de filmes a base de silanos (PAN, SCHAEFER E ILAVSKY, 2006).

Hao et al. (2016) avaliaram o comportamento de células-tronco mesenquimais obtidas de ratos sobre superfícies com diferentes composições químicas e obtiveram que melhor comportamento de adesão e proliferação celular sobre as superfícies contendo grupos de caráter hidrofílico (-OH) à hidrofóbico (-CH₃). Somado a isso, Romero-Gavilan et al. (2016) observaram que a degradabilidade hidrolítica de revestimentos a base dos silanos, visando a liberação de compostos de silício é favorecida em superfícies hidrofílicas, provocando maior degradação da rede sol-gel.

Hernández-Escolano et al. (2012) enfatizaram a importância da presença do grupamento hidroxila nas superfícies de revestimentos silanos em biomateriais, uma vez que esses em contato com o fluido corpóreo favorecem a nucleação de apatita em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Diante disso, devido as propriedades requeridas para o revestimento bioativo, optou-se pela temperatura de cura de 60 °C para dar prosseguimento a este estudo.

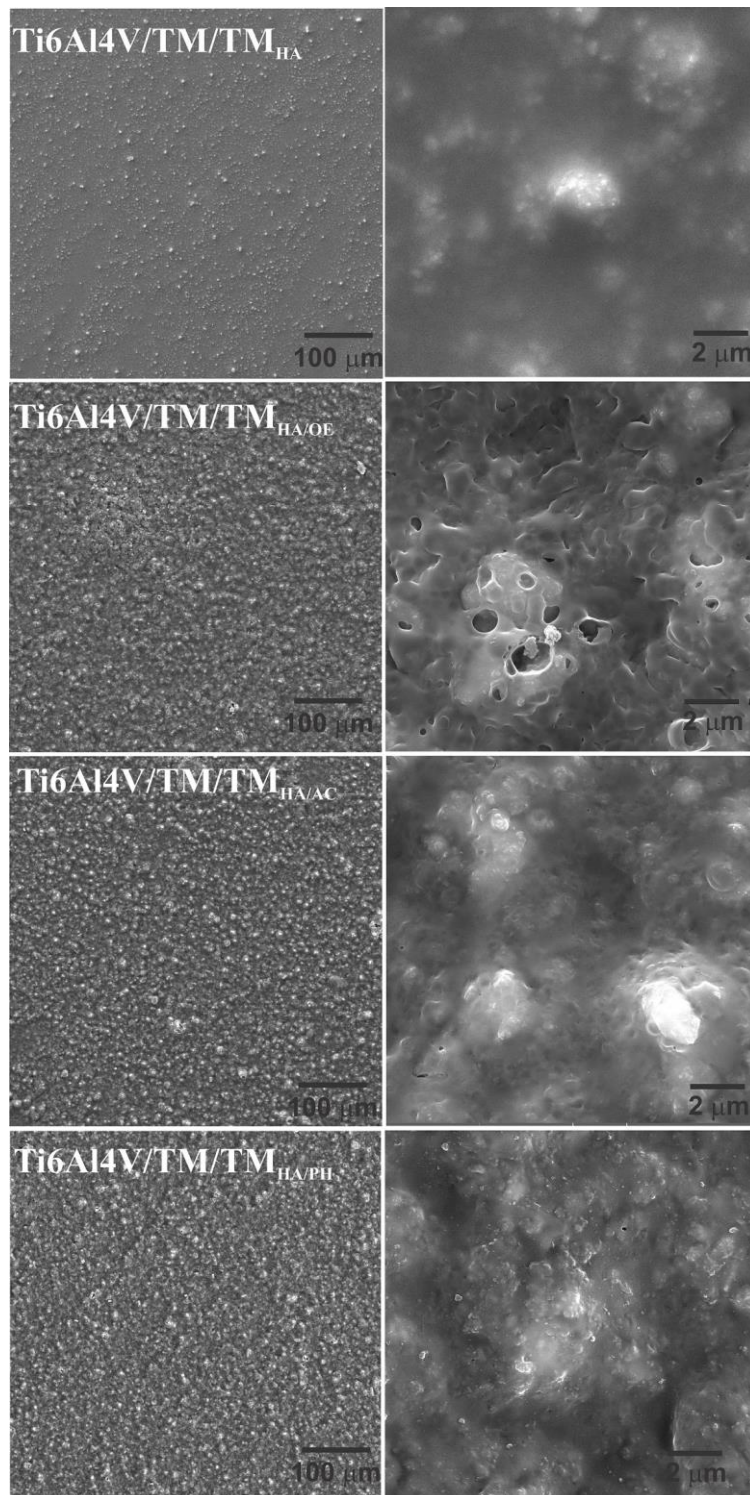
5.2.2. Influência dos processos de esterilização sobre o revestimento híbrido bioativo

5.2.2.1. Caracterização morfológica

A Figura 54 mostra as micrografias obtidas no MEV/FEG do revestimento bioativo antes e após a realização dos diferentes processos de esterilização.

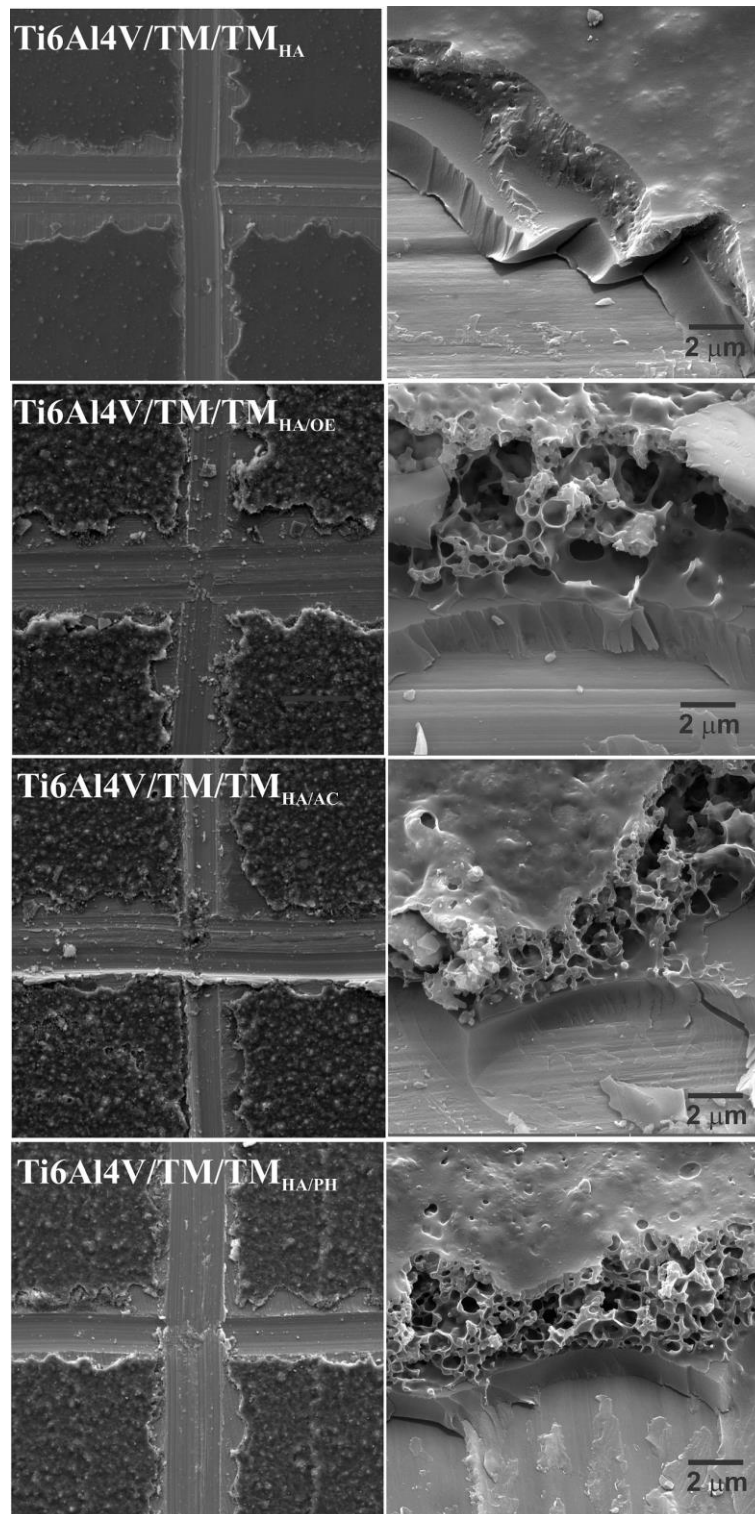
Foi possível observar que todos os processos de esterilização modificaram a morfologia do revestimento bioativo em relação à amostra não esterilizada, Ti6Al4V/TM/TM_{HA}, aparentando irregularidade topográfica da superfície. Também perceberam-se diferenças entre as morfologias dos revestimentos após a realização dos processos de esterilização, nas quais, a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE} foi a que apresentou maior porosidade superficial e alteração morfológica do revestimento. Para a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC}, ainda que recobertas pelo revestimento bioativo, evidenciou-se uma maior exposição das superfícies das partículas de hidroxiapatita.

Figura 54. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo antes e após a esterilização pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



A Figura 55 apresenta as micrografias obtidas no MEV/FEG dos revestimentos bioativos esterilizados após a realização do ensaio de adesão bem como as imagens em perspectiva das regiões onde ocorreram as rupturas dos mesmos.

Figura 55. Micrografias no MEV/FEG das áreas analisadas após a realização do ensaio de adesão do revestimento bioativo (TEOS/MTES + HA, curado a 60 °C) aplicado sobre o revestimento protetivo e esterilizado pelos diferentes processos. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).

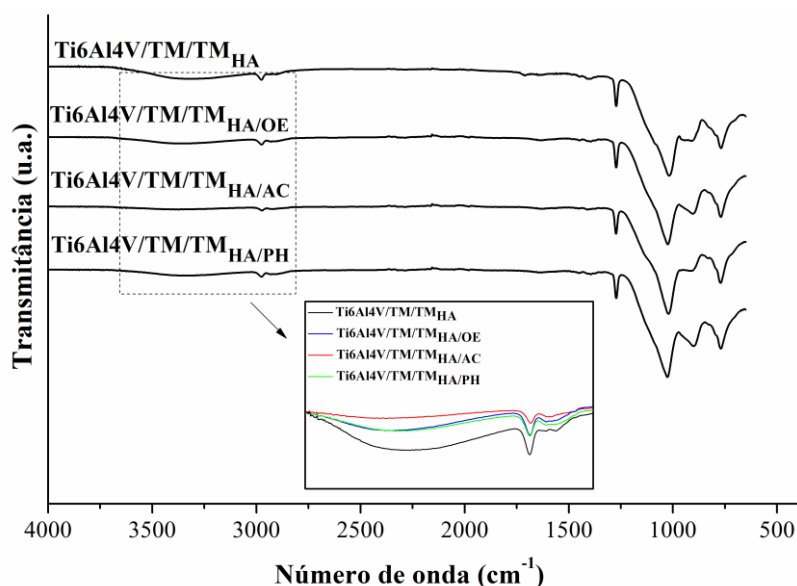


Os processos de esterilização utilizados não comprometeram o comportamento de adesão entre os revestimentos (bioativo e o protetivo) e também mantiveram a integridade

da camada depositada (Figura 55). No entanto, pelas imagens obtidas por MEV/FEG foi possível observar claramente as alterações morfológicas provocadas pelas esterilizações no interior da camada bioativa. Independentemente do processo de esterilização, os revestimentos apresentaram aumento da espessura de camada, que se apresentou completamente porosa, ainda que menos porosa na superfície externa. Contudo, a camada do revestimento protetivo, parece morfológicamente inalterada (em corte transversal) (Figura 55). É importante ressaltar, que o revestimento protetivo não contém HA e foi curado à temperatura de 450 °C.

A Figura 56 apresenta os espectros no FTIR do revestimento híbrido bioativo antes e após a realização dos processos de esterilização.

Figura 56. FTIR do revestimento híbrido bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos.



Pela análise dos espectros no FTIR dos revestimentos bioativos observou-se que os processos de esterilização provocaram alterações na estrutura química dos mesmos. Foram detectadas modificações nas bandas entre 3000 e 3600 cm⁻¹ e 2900 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento O–H devido a retenção da água e presença do grupamento silanol e a ligação C–H (CH₃), presentes no grupamento lateral do organoalcoxissilano MTES, respectivamente, que diminuíram de intensidade para amostras esterilizadas em relação à não esterilizada. Tais alterações podem ser relacionadas à utilização da temperatura durante a esterilização, que pode ter promovido a maior reticulação destes revestimentos. Além disso, dentre as amostras esterilizadas, Ti6Al4V/TM/TM_{HA}/AC foi a que apresentou a maior variação destas bandas, o que igualmente a esterilização do revestimento

protetivo, podem ser justificadas devido a variação dos grupos CH₃ por sensibilização a pressão (FLEITH et al., 2005).

A Tabela 15 apresenta os parâmetros de rugosidade micrométrica obtidos por perfilometria de contato.

Tabela 15. Valores médios de rugosidade em escala micrométrica determinados por perfilometria de contato para Ti6Al4V/TM/TM_{HA} não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos.

Amostra	Ra (μm)	Ry (μm)	Rz (μm)
Ti6Al4V/TM/TM _{HA}	0,22 \pm 0,03	2,23 \pm 0,19	1,73 \pm 0,10
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/OE}	0,39 \pm 0,02	3,91 \pm 0,31	3,02 \pm 0,08
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/AC}	0,44 \pm 0,04	3,64 \pm 0,71	2,97 \pm 0,47
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/PH}	0,24 \pm 0,02	2,38 \pm 0,33	1,84 \pm 0,18

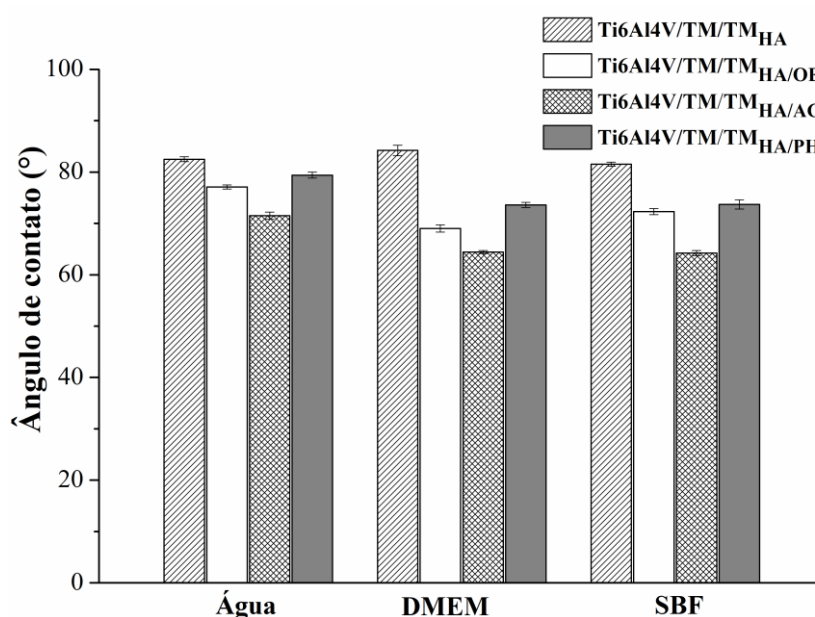
Pelos parâmetros de rugosidade evidenciou-se que os processos de esterilização provocaram o aumento da rugosidade micrométrica do revestimento bioativo comparativamente a amostra não esterilizada, sendo tais modificações coerentes com as mudanças morfológicas anteriormente visualizadas em análise de MEV/FEG. Considerando às variações observadas para os valores médios, não foi possível detectar uma diferença de rugosidade entre as amostras esterilizadas pelos diferentes processos de esterilização.

A Tabela 16 e a Figura 57 apresentam os valores médios obtidos para os ângulos de contato juntamente com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 16. Ângulos de contato médios obtidos para Ti6Al4V/TM/TM_{HA} esterilizado com os diferentes processos em água, DMEM e SBF.

Amostra	Ângulo (°)		
	Água	DMEM	SBF
Ti6Al4V/TM/TM _{HA}	82 ± 0,5	84 ± 1,0	81 ± 0,2
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/OE}	77 ± 0,4	71 ± 0,7	72 ± 0,7
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/AC}	71 ± 0,7	64 ± 0,3	64 ± 0,5
Ti6Al4V/TM/TM _{HA/PH}	79 ± 0,6	73 ± 0,5	74 ± 0,9

Figura 57. Medida de ângulo de contato médio obtido para Ti6Al4V/TM/TM_{HA} esterilizado com os diferentes processos em água, DMEM e SBF.



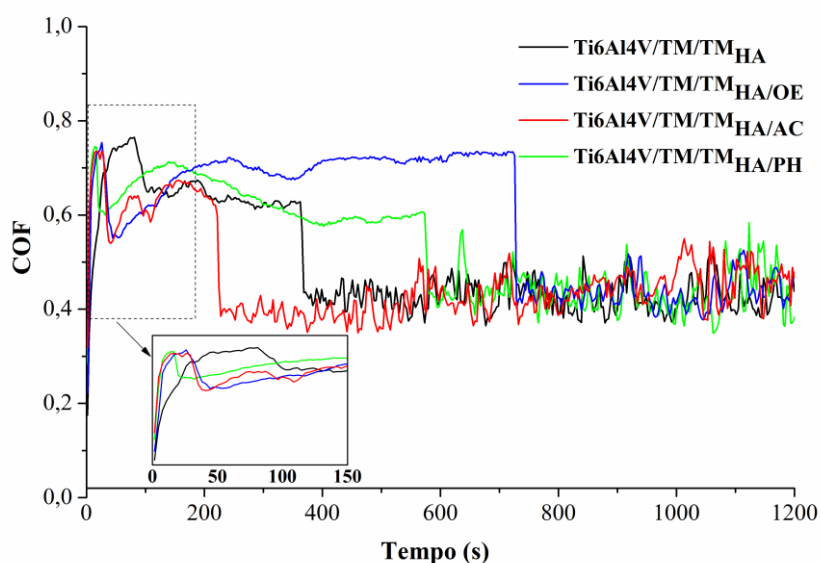
Os processos de esterilização aumentaram a molhabilidade do revestimento bioativo em relação ao revestimento bioativo não esterilizado (Tabela 16 e Figura 57), uma possível justificativa para isso pode estar associada à redução da intensidade das bandas referentes ao grupamento CH₃, observada em FTIR, conferindo aos revestimentos híbridos propriedades hidrofílicas (WANG et al., 2013). Ressalta-se que tal comportamento foi predominante em relação à redução do grupo hidroxila também observada anteriormente. Resultados semelhantes já foram publicados por Wittenburg et al. (2013) e Han et al. (2017) quando da esterilização de superfícies de vidro e zircônia por processos similares.

A molhabilidade dos revestimentos bioativos seguiu a mesma tendência, independentemente do líquido usado, sendo os menores valores de ângulo de contato encontrados para as amostras esterilizadas em autoclave, seguidas de óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio, respectivamente.

5.2.2.2. Resistência ao desgaste por abrasão

Com o objetivo de avaliar a propriedade mecânica dos revestimentos, foi realizado o ensaio de resistência ao desgaste por abrasão. A Figura 58 apresenta os resultados para a determinação do coeficiente de atrito em função do tempo, do revestimento não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos.

Figura 58. Coeficiente de atrito (COF) do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos em função do tempo (carga de 0,3 N, frequência de 1 Hz e comprimento da trilha de 0,2 mm, contra corpo = esfera de zircônia estabilizada com ítria).



Nos primeiros momentos de ensaio todas as amostras esterilizadas apresentaram inferiores comportamentos de resistência ao desgaste em relação ao obtido para a amostra não esterilizada. Dentre os processos avaliados não se observou significativa diferença nos coeficientes de atrito obtidos, com valores próximos à $\mu = 0,7$.

Com o tempo de desgaste se observou a ruptura dos filmes bioativos com a diminuição do coeficiente de atrito de $\mu = 0,7$ para ordem de $\mu = 0,55- 0,65$ (Figura 58). Da mesma forma, os revestimentos bioativos esterilizados romperam logo nos primeiros

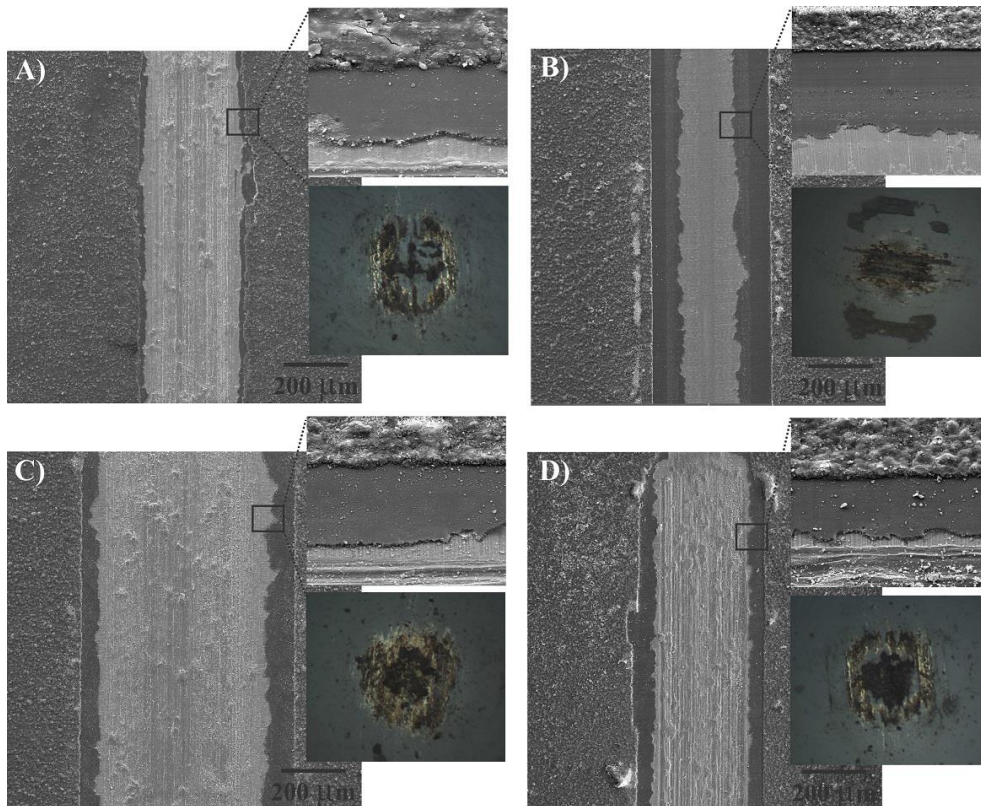
segundos de atrito, e todos praticamente ao mesmo tempo. Enquanto a camada bioativa não esterilizada rompeu em aproximadamente 100 segundos de desgaste.

A ruptura da camada protetiva com a diminuição do coeficiente de atrito de $\mu = 0,55-0,65$ para o valor da ordem de $\mu = 0,4$, apresentou-se com intensa oscilação do valor, devido provavelmente a presença das partículas, resultantes da quebra dos filmes, as quais atuam com um terceiro corpo no desgaste (Figura 58). Essa última alteração do coeficiente de atrito com posterior comportamento constante do mesmo até o final do tempo de análise prevê a ruptura dos dois revestimentos depositados e a partir disso pode-se verificar o coeficiente de atrito para o substrato de Ti6Al4V ($\mu = 0,4$), coerente com os valores mencionados na literatura (BUCIUMEANU et al., 2017; BARTOLOMEU et al., 2017).

Mesmo com a aplicação do revestimento bioativo, o comportamento ao desgaste do revestimento protetivo subjacente foi influenciado pelas distintas esterilizações. Como pode-se observar no gráfico do COF, a amostra esterilizada em óxido de etileno foi a que apresentou maior resistência a ruptura, seguida por plasma de peróxido de hidrogênio e autoclave. Além disso, as amostras esterilizadas por óxido de etileno e por plasma de peróxido de hidrogênio apresentaram maior resistência ao desgaste que o revestimento não esterilizado, colocando em evidência a influência positiva desses métodos de esterilização sobre as propriedades mecânicas destes revestimentos.

A superior resistência ao desgaste superior para a camada protetiva, comparativamente à camada bioativa, pode estar associada à temperatura de cura superior empregada para a camada protetiva (450 °C), o que deve favorecer a maior reticulação deste revestimento, aumentando conseqüentemente sua resistência mecânica. Além disso, é preciso considerar que a adição de HA à camada bioativa também pode contribuir para o comprometimento da resistência mecânica da mesma. A Figura 59 apresenta as imagens obtidas no MEV/FEG das trilhas onde foram realizados os ensaios de desgaste bem como das esferas utilizadas nos mesmos.

Figura 59. Micrografias no MEV/FEG das trilhas e das esferas após a realização dos ensaios de desgaste; (A) Ti6Al4V/TM/TM_{HA}, (B) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE}, (C) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC} e (D) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH}. Imagens obtidas em diferentes magnificações (250 x original e 5.000 x original).



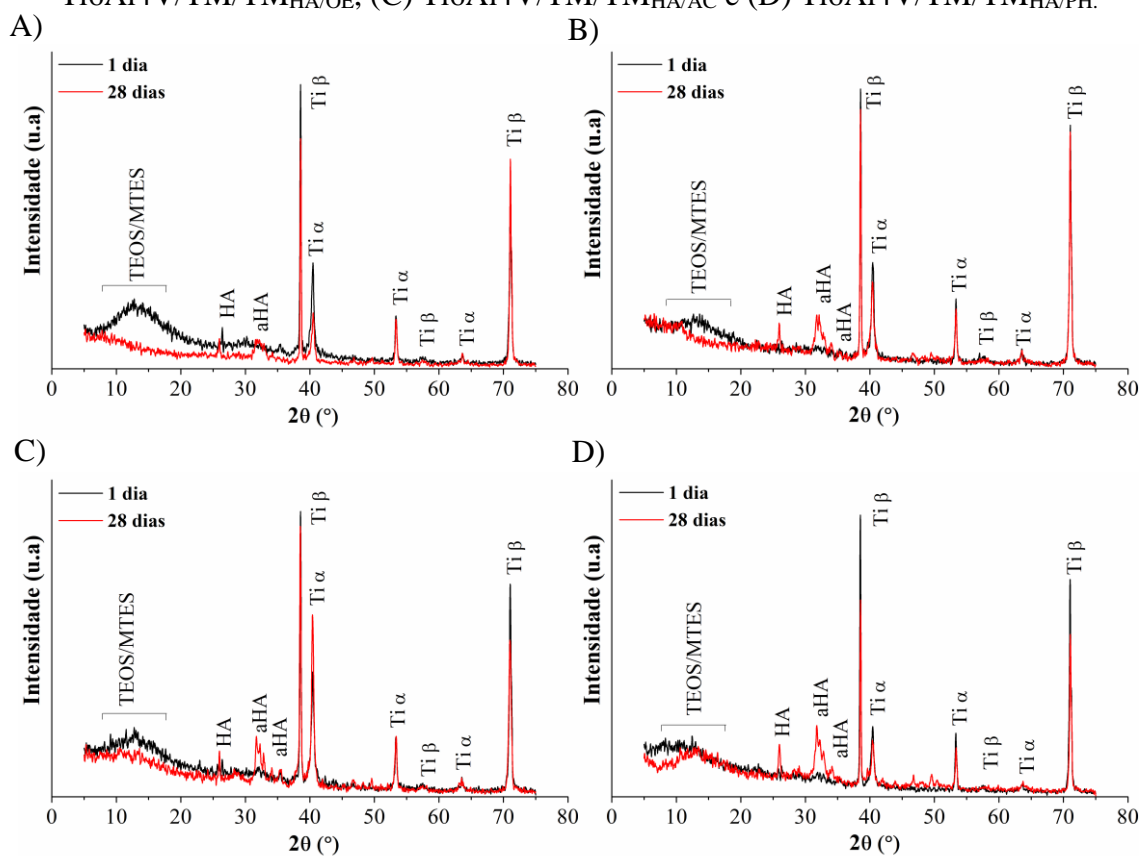
Pela análise das micrografias das trilhas após a realização dos ensaios de desgaste foi possível confirmar o rompimento dos revestimentos bioativos, independente do processo de esterilização utilizado (Figura 59). Além disso, observou-se também o rompimento dos revestimentos protetivos, aplicados anteriormente aos bioativos, caracterizando os distintos comportamentos mecânicos dos mesmos.

Isso pode ser identificado nas trilhas pelos diferentes níveis de arrancamento dos revestimentos protetivos dos substratos metálicos e pelas diferentes larguras das trilhas obtidas. A amostra esterilizada por autoclave foi a que apresentou a trilha de maior largura e com maior remoção de material, Figura 59 (C), enquanto a amostra esterilizada por óxido de etileno, foi aquela que apresentou maior resistência ao desgaste (menor largura da trilha), Figura 59 (B), inclusive, comparativamente à amostra não esterilizada, Figura 59(A).

5.2.2.3. Estudo da bioatividade

A Figura 60 apresenta os resultados obtidos pela realização do ensaio de Difração de raios-X com ângulo rasante (5°) do revestimento bioativo antes e após a realização dos processos de esterilização, imersos por 1 dia e por 28 dias em SBF, a temperatura de aproximadamente 37°C .

Figura 60. Difratomogramas de DRX para o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1 e 28 dias em SBF; (A) Ti6Al4V/TM/TM_{HA}, (B) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE}, (C) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC} e (D) Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH}.



Comparando os resultados de DRX obtidos com os apresentados em literatura, evidenciou-se que todas as amostras, independentes do processo de esterilização e do tempo de imersão, apresentaram picos referentes as fases α e β o substrato metálico de Ti6Al4V, esses próximos à ($40, 53$ e 63°) e ($36, 57$ e 71°), respectivamente (VARIOLA et al., 2008; MORCELLI, 2009; ANTONINI, 2016).

Para o revestimento bioativo, todas as amostras apresentaram um pico no intervalo entre 10 e 15° , que de acordo com Bareiro e Santos, (2014); Tanski et al. (2017), refere-se a estrutura amorfa de SiO_2 , proveniente da rede siloxano. Também a estrutura cristalina

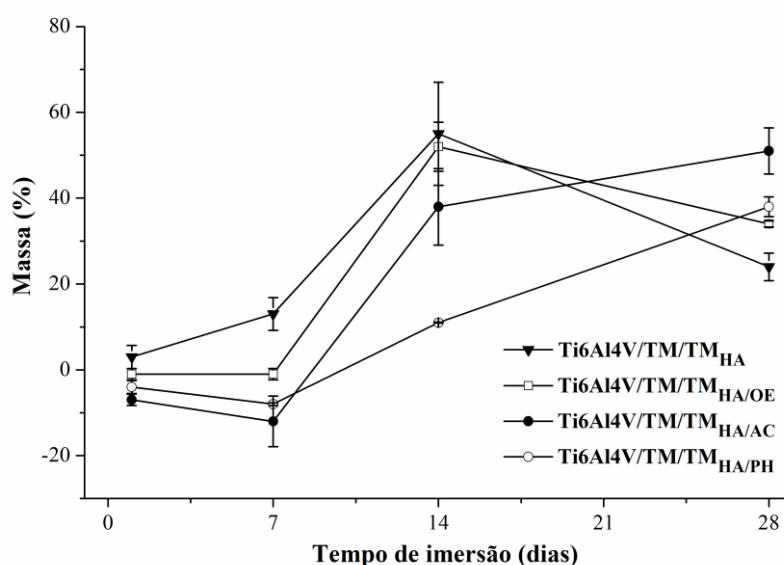
da hidroxiapatita incorporada no revestimento híbrido foi observada devido a presença do pico próximo a 26° (CHOUDHURY E AGRAWAL, 2011).

Na literatura é descrito que os íons Ca^{+2} e PO_3^{-4} presentes na solução SBF são adsorvidos pelos grupos silanol (Si-OH), induzindo a nucleação da apatita, que uma vez nucleada tende ao crescimento espontâneo para formação do fosfato de cálcio amorfo, que posteriormente se cristaliza na superfície do biomaterial (RIGO et al., 2004; SURMENEV, SURMENEVA E IVANOVA, 2014; KHOSHNOOD, ZAMANIAN E MASSOUDI, 2016).

De acordo com Ballarre et al. (2007), a bioatividade de revestimentos contendo partículas cerâmicas quando imersos em SBF, pode ser comprovada pelo aparecimento dos picos próximos à 32 e 34°, relacionados a deposição de hidroxiapatita na forma amorfa (apatita). No presente estudo, também foi identificado o aparecimento de tais picos, independente do processo de esterilização, sendo esses mais evidentes nos difratogramas obtidos após 28 dias de imersão.

A Figura 61 apresenta a variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos em solução simulada de fluido corpóreo (SBF) por diferentes tempos de análise.

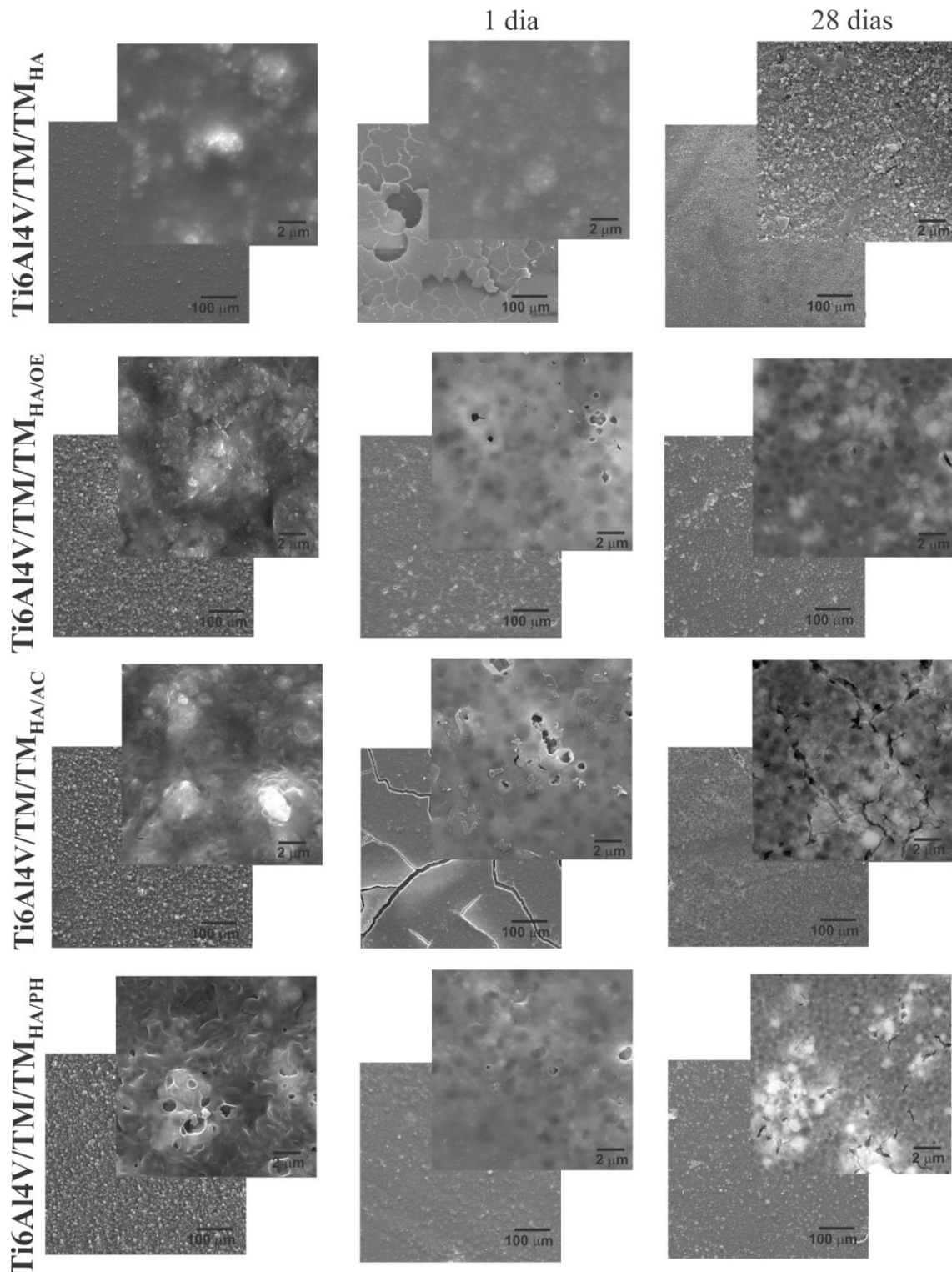
Figura 61. Variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos imersos por 1, 7, 14 e 28 dias em SBF.



Até 7 dias de imersão, notou-se que a amostra não esterilizada foi a única que apresentou ganho de massa. Dentre os revestimentos esterilizados, a amostra de óxido de etileno manteve sua massa praticamente inalterada, seguida por peróxido de hidrogênio e autoclave, sendo essa última a que apresentou maior perda de massa em relação as demais. Após 14 dias, todas as amostras apresentaram aumentos significativos dos percentuais mássicos, entorno de 55, 50, 40 e 10 % para Ti6Al4V/TM/TM_{HA}, Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE}, Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC} e Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH}, respectivamente. Em 28 dias, novamente todas as amostras apresentaram ganhos de massa, porém as amostras Ti6Al4V/TM/TM_{HA} (25 %) e Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE} (35 %) apresentaram percentuais inferiores as demais amostras Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH} (38 %) e Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC} (51 %).

A Figura 62 apresenta as micrografias no MEV/FEG dos revestimentos bioativos não esterilizado e esterilizados pelos diferentes processos, imersos por 1 dia e 28 dias em solução SBF.

Figura 62. Micrografias no MEV/FEG do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1 e 28 dias em SBF a $37 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Imagens obtidas em diferentes magnificações (500 x original e 20.000 x original).



A discussão da influência dos processos de esterilização sobre o comportamento de bioatividade dos revestimentos pode ser baseada na correlação dos resultados obtidos na análise de difração de raios-X e ensaio de variação de massa em SBF. Até 7 dias de

imersão, independente do processo de esterilização, a permeabilidade do eletrólito pelos revestimentos provocou a instabilidade das redes de ligações siloxano, provocando a dissolução das partículas de hidroxiapatita, presentes nos mesmos, que em contato com a solução SBF desencadearam a formação de apatita amorfa sobre esses.

A verificação desse comportamento está baseada na redução da intensidade dos picos de SiO_2 , nos percentuais de perda de massa obtidos nos períodos iniciais, seguidos pela maior intensidade dos sinais referentes a presença de hidroxiapatita amorfa e aos aumentos dos percentuais mássicos apresentados por todos os revestimentos em função do tempo de análise.

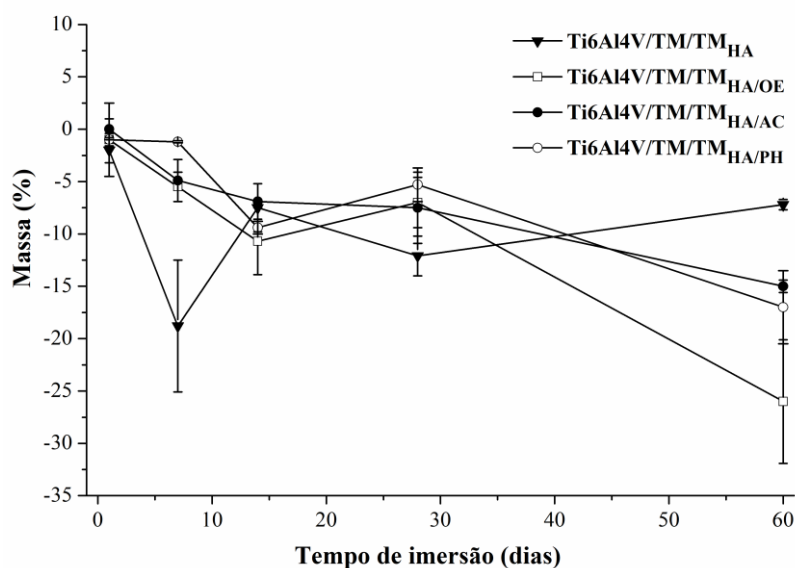
Comparando-se os processos de esterilização, a amostra $\text{Ti6Al4V/TM/TM}_{\text{HA/OE}}$ apresentou superior comportamento bioativo nos primeiros 14 dias de imersão, seguida pelas amostras $\text{Ti6Al4V/TM/TM}_{\text{HA/AC}}$ e $\text{Ti6Al4V/TM/TM}_{\text{HA/PH}}$ após 28 dias.

Pela análise das imagens de MEV/FEG (Figura 62), independente do processo de esterilização, pode-se confirmar o comportamento bioativo do revestimento proposto, uma vez que se observou a minimização dos defeitos superficiais apresentados após 1 dia de imersão, decorrente da permeabilidade da solução pelos revestimentos.

5.2.2.4. Comportamento de degradação do revestimento híbrido bioativo e liberação de silício

A Figura 63 apresenta a variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos em solução DMEM por diferentes tempos de análise.

Figura 63. Variação de massa em função do tempo do revestimento bioativo não esterilizado e esterilizado pelos diferentes processos, imersos por 1, 7, 14, 28 e 60 em solução DMEM.



Pela análise dos percentuais constatou-se que todos os revestimentos apresentaram comportamento de perda de massa em função do tempo. Visualmente não foi possível detectar a presença de partículas de hidroxiapatita nas soluções nas quais foram imersos os revestimentos, então associou-se tais perdas à degradação hidrolítica das redes siloxanos.

A degradação gradativa dos revestimentos bioativos em solução DMEM foi constatada devido ao aumento de perda de massa durante o período analisado. Para o revestimento não esterilizado e esterilizado em autoclave, a maior degradação dos mesmos foi observada em 7 e 28 dias, o que para as amostras esterilizadas em óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio foi observado após 14 e 60 dias de imersão. Apesar do início da degradação de Ti6Al4V/TM/TM_{HA}/OE e Ti6Al4V/TM/TM_{HA}/PH ser mais lento em relação as demais amostras, com a progressiva perda de massa fez com que, após 60 dias, essas amostras apresentassem superiores percentuais de perda de massa.

Diante disso, propõem-se também que ao final da degradação hidrolítica do revestimento bioativo ocorreu a permeabilidade da solução DMEM até a interface com o revestimento protetivo, gerando um novo processo de degradação. A menor perda de massa observada para a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA} após 60 dias, pode ser relacionada, a maior permeação da solução DMEM pelo revestimento protetivo atingindo o substrato

de Ti6Al4V proporcionando a formação de produtos de corrosão que por possuírem caráter protetivo, podem ter conferido estabilidade ao sistema.

O comportamento de degradação hidrolítica para os revestimentos bioativos esterilizados pode ser relacionado à molhabilidade dos mesmos, uma vez que a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/AC} foi a que apresentou maior molhabilidade em solução DMEM, facilitando o rompimento por hidrólise das ligações Si–O–Si, o que pode ter contribuído para maior dissolução do mesmo em função do tempo (HERNÁNDEZ-ESCOLANO et al., 2012). Além disso, a maior densificação dos revestimentos provocada pelos processos de esterilização pode ter contribuído para a maior estabilidade dos mesmos em solução, comparativamente a amostra não esterilizada, apesar de a mesma ter apresentado a menor molhabilidade entre todas as amostras analisadas.

Ibãñez et al. (2016) observaram que a presença de compostos funcionais em revestimentos silanos afeta negativamente a formação da rede siloxano, facilitando o comportamento de degradação hidrolítica dos mesmos. Romero-Gavilan et al. (2016) avaliaram a degradação hidrolítica de revestimentos a base de silanos com diferentes percentuais de TEOS, e concluíram que a mesma é favorecida quando da retenção de água nos mesmos, possibilitando a maior liberação de compostos de Si que contribuem na regeneração óssea.

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos na quantificação de silício presente nas soluções DMEM, nas quais foram imersos os revestimentos bioativos esterilizados.

Tabela 17. Determinação direta de Si (mg.L⁻¹) por HR-CS GF AAS.

Amostra	1 dia	60 dias
Ti6Al4V/TM _{HA}	0,128 ± 0,010	10,1 ± 0,23
Ti6Al4V/TM _{HA/OE}	0,172 ± 0,014	12,0 ± 0,21
Ti6Al4V/TM _{HA/AC}	0,110 ± 0,013	10,8 ± 0,13
Ti6Al4V/TM _{HA/PH}	0,124 ± 0,011	16,0 ± 0,25

Com relação as concentrações obtidas, evidenciou-se pelos valores a migração de silício dos revestimentos para as soluções DMEM, e que essas apresentaram uma evolução em função do tempo. Ao final do ensaio, a amostra esterilizada em plasma de peróxido de hidrogênio foi a que apresentou maior concentração de silício em solução,

seguida por óxido de etileno e autoclave. Segundo Zhai et al. (2013) a liberação do silício ocorre na forma de $\text{Si}(\text{OH})_3\text{O}^-$ quando em meio aquoso, com pH abaixo de 9, pela reação de hidrólise.

Estes resultados de liberação de silício corroboram com os anteriormente observados para degradação hidrolítica dos revestimentos, em que as amostras Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE} e Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH} foram as que apresentaram maiores percentuais de perda de massa e conseqüentemente apresentaram maior concentração de silício em solução após 60 dias.

Resultados similares foram encontrados por Juan Diaz et al. (2016), em que analisaram a degradação hidrolítica em água de revestimentos silanos, mensurando a liberação de silício pela técnica de ICP-MS e, obtiveram uma concentração de silício próxima a 10 ppm em solução. Os autores também detectaram a migração de silício a partir da biodegradação *in vivo* destes revestimentos e verificaram que a presença do mesmo após 1 e 2 semanas influenciou positivamente nas regenerações dos ossos cortical e trabecular.

5.2.3. Conclusões parciais

Com base nos objetivos propostos para o desenvolvimento do revestimento bioativo se pode concluir que:

- a) Obteve-se a deposição revestimento híbrido sobre o revestimento protetivo já depositado sobre substrato de Ti6Al4V, e este apresentou morfologia regular, isento de defeitos e com a distribuição de partículas de hidroxiapatita uniforme por toda a superfície de análise;
- b) O comportamento de adesão entre os revestimentos (protetivo e bioativo), a espessura e a molhabilidade do revestimento obtido foram diretamente influenciadas pelas diferentes temperaturas de cura estudadas e optou-se por prosseguir o estudo com o revestimento bioativo curado a temperatura de 60 °C;
- c) Os revestimentos bioativos esterilizados apresentaram semelhantes comportamentos de resistência ao desgaste, porém inferiores ao revestimento não esterilizado. Além disso, observou-se também que as camadas protetivas aplicadas anteriormente a bioativas foram influenciadas pelos processos de esterilização, uma

vez que apresentaram distintos comportamentos à ruptura em função do tempo, sendo o revestimento esterilizado em autoclave o de menor resistência mecânica comparativamente aos demais.

d) A bioatividade dos revestimentos propostos em solução simulada de fluido corpóreo foi confirmada pela deposição de hidroxiapatita amorfa sobre os mesmos, bem como, pelos ganhos de massa apresentados por todas as amostras em função do tempo de imersão. Os processos de esterilização afetaram a estabilidade da rede siloxanos dos revestimentos, provocando a maior exposição das partículas bioativas e conseqüentemente, aumentando a bioatividade dos mesmos comparativamente a amostra não esterilizada; ao final do tempo de análise, a amostra esterilizada em autoclave apresentou superior comportamento bioativo devido ao maior percentual de ganho de massa observado;

e) O estudo de degradação hidrolítica dos revestimentos possibilitou prever o efeito da esterilização sobre a estabilidade dos mesmos em solução DMEM. Após 60 dias de imersão, os revestimentos bioativos esterilizados em óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio foram os que apresentaram os maiores percentuais de degradação do revestimento bioativo e proporcionalmente a isso apresentaram as maiores concentrações de liberação de silício para a solução.

5.3. Estudo do comportamento de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento híbrido protetivo e bioativo - ETAPA 3

Nesta etapa do estudo foi avaliada a influência dos diferentes processos de esterilização no comportamento de citotoxicidade, adesão, viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais do revestimento híbrido protetivo e bioativo.

Primeiramente, a Figura 64 apresenta a caracterização das células-tronco mesenquimais obtidas bem como após a diferenciação das mesmas nos meios adipogênico, osteogênico e condrogênico, respectivamente. Da mesma forma, pela Tabela 18 se pode observar que a análise imunofenotípica das 3 culturas primárias mostrou resultados altamente positivos para os marcadores de CTMs, comportamento contrário observado para os marcadores de células hematopoéticas que apresentaram baixa expressividade.

Figura 64. Imagens de diferenciação celular: (A) diferenciação adipogênica, (B) diferenciação osteogênica, (C) diferenciação condrogênica e (D) controle – células não submetidas aos protocolos de diferenciação.

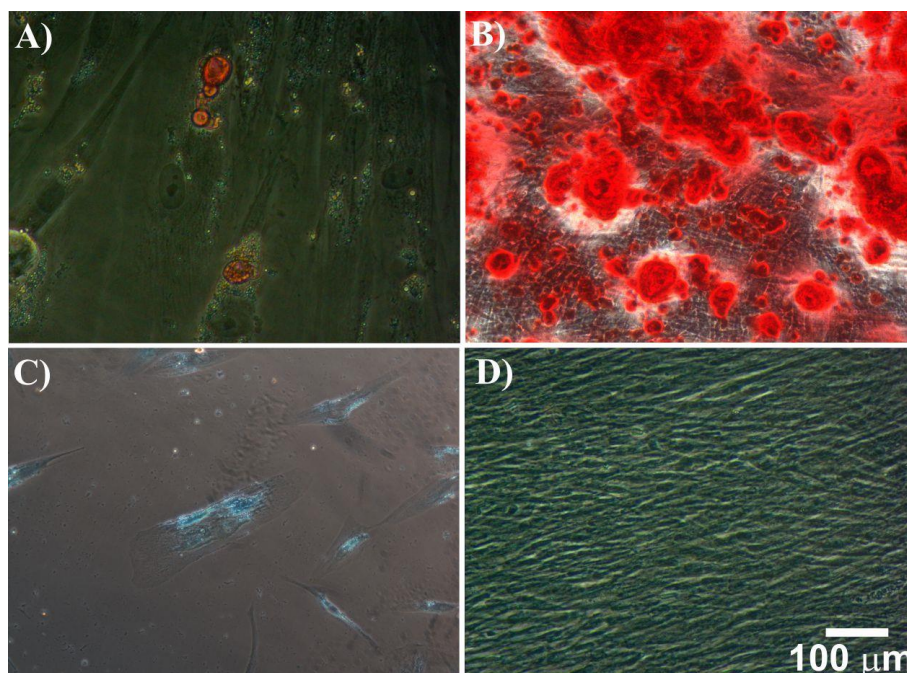


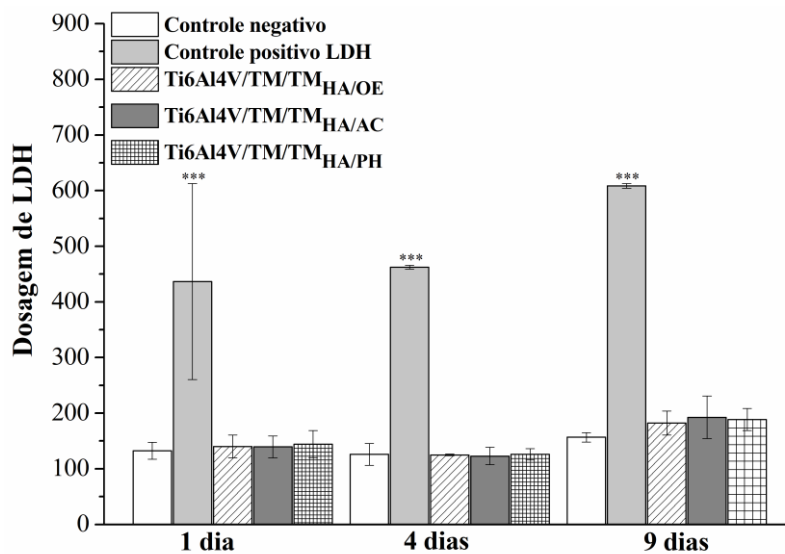
Tabela 18. Média de expressão imunofenotípica (n=3) de marcadores de células mesenquimais e não-mesenquimais.

Marcadores	CD90	CD29	CD44	CD73	CD14	CD34	HLA-DR	STRO-1	CD45	CD184
Porcentagem (%)	100	88,2	76	92,7	0,2	0	0,1	1,9	0	0

5.3.1. Citotoxicidade

A Figura 65 apresenta o potencial citotóxico dos revestimentos as células-tronco mesenquimais quando da análise da solução sobrenadante em que os mesmos foram imersos.

Figura 65. Citotoxicidade do revestimento bioativo esterilizado por diferentes processos mensurado pela dosagem de LDH no sobrenadante após 1, 4 e 9 dias de exposição das células-tronco mesenquimais sobre os revestimentos. (***) correspondem as diferenças estatisticamente significativas obtidas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,001$).



Ao comparar os resultados obtidos para os revestimentos bioativos esterilizados pelos diferentes processos com o controle negativo, observou-se que não houve significativa diferença entre os mesmos, porém quando comparados com o controle positivo, considerado como a máxima liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura (poços de controle de morte celular), foi possível evidenciar diferença nos comportamentos, denotando que os revestimentos não apresentaram comportamentos citotóxicos as células-tronco mesenquimais.

5.3.2. Adesão, viabilidade e morfologia celular

A Figura 66 apresenta os resultados obtidos em ensaio de adesão das células-tronco mesenquimais sobre os revestimentos bioativos esterilizados após 6 horas. Considerou-se pelas quantidades de células aderidas sobre os revestimentos que os resultados foram estatisticamente semelhantes entre si e ao do grupo controle. Da mesma forma, pela análise das imagens apresentadas na Figura 67 (núcleos celulares corados com DAPI) foi possível observar semelhantes comportamentos de adesão entre as amostras, em que as células aderidas se mostraram distribuídas por todas as superfícies analisadas, independente do processo de esterilização.

Figura 66. Comportamento de adesão das células-tronco mesenquimais sobre o revestimento bioativo esterilizado com os diferentes processos.

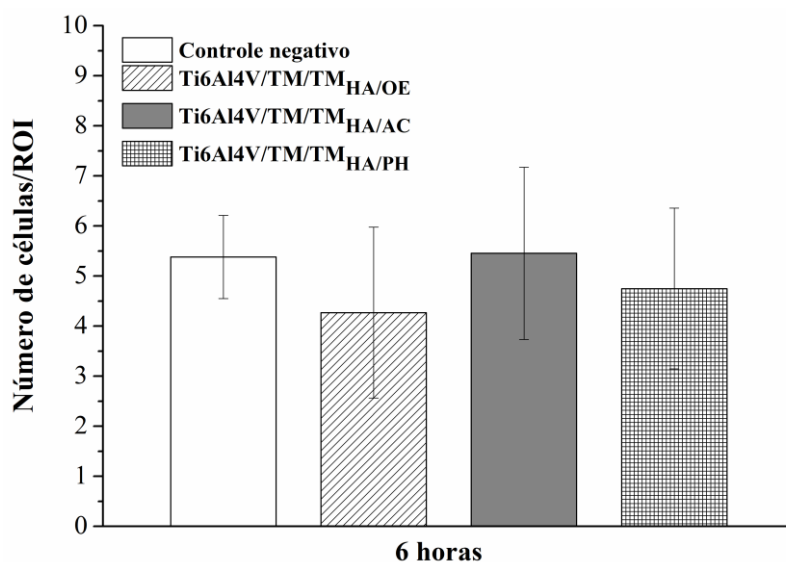
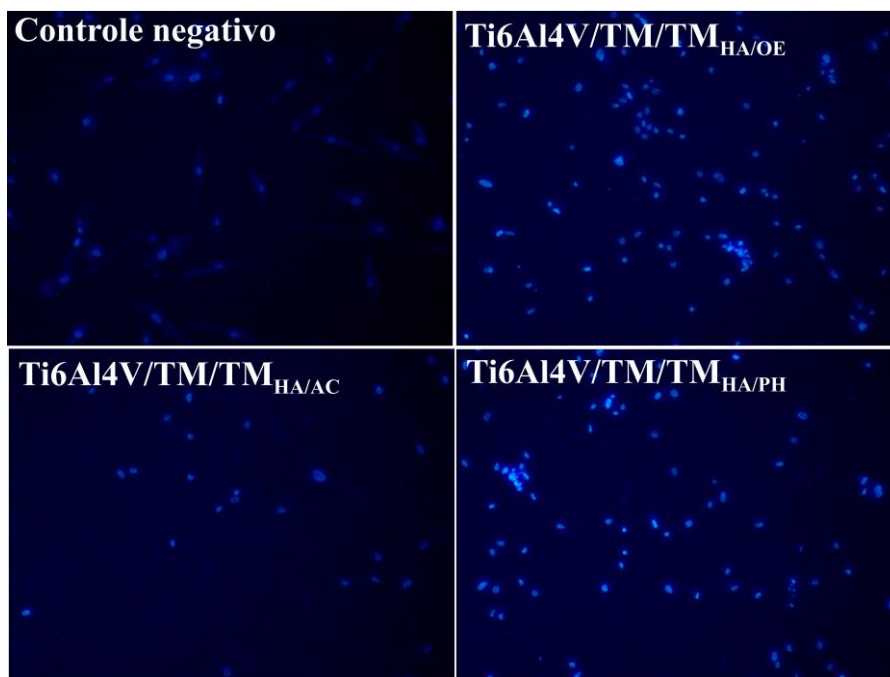
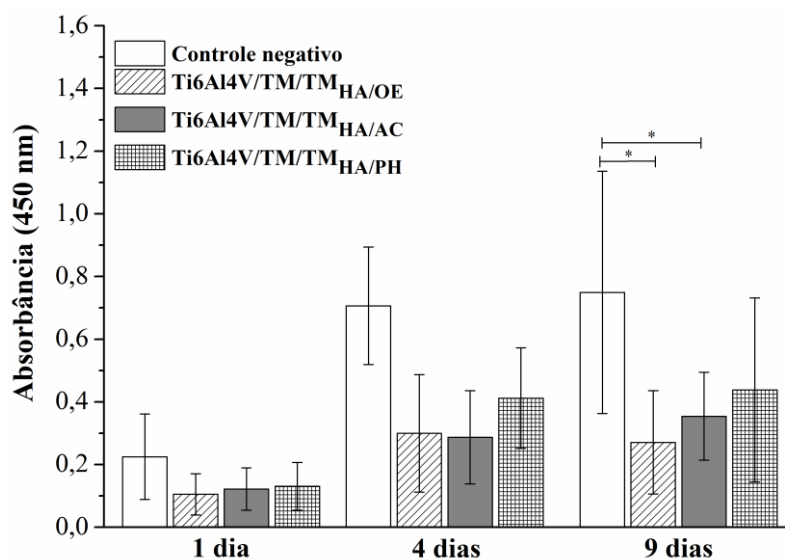


Figura 67. Células-tronco mesenquimais coradas com DAPI e visualizadas em microscopia de luz invertida com aumento de 400 x.



A Figura 68 apresenta os eventos de viabilidade celular dos revestimentos bioativos esterilizados pelos três diferentes processos tratadas com o reagente WST-8 após 1, 4 e 7 dias.

Figura 68. Viabilidade das células-tronco mesenquimais após 1, 4 e 9 dias de exposição sobre o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos. (* corresponde as diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,05$).



Com relação aos resultados de viabilidade celular se observou que comparativamente a amostra controle, padrão ouro de cultivo de células-tronco, as amostras revestidas apresentaram menores valores de viabilidade celular (exceto para a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH}) que por apresentar maior viabilidade as demais esterilizadas, não apresentou diferença estatística quando comparada a amostra controle).

Para todas as amostras analisadas foi identificada a proliferação celular sobre as mesmas pelo aumento da viabilidade celular em função do tempo, sendo este mais significativo para as amostras esterilizadas em autoclave e plasma de peróxido de hidrogênio. Além disso, apesar das pequenas diferenças de viabilidade celular observadas entre os métodos de esterilização, a amostra esterilizada por plasma de peróxido de hidrogênio foi a que apresentou maior viabilidade após 4 e 9 dias.

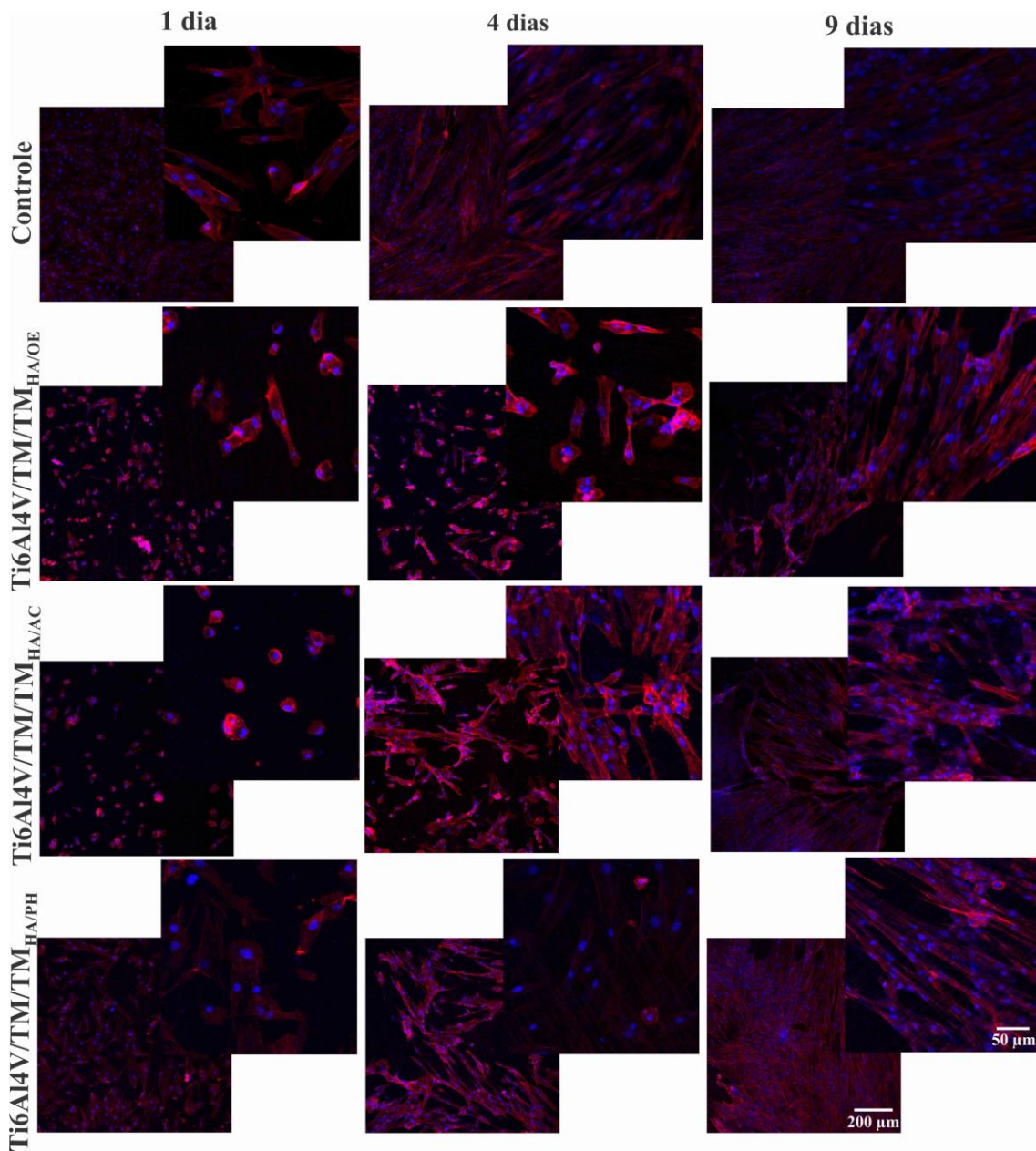
Chen et al. (2012) avaliaram o comportamento de adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais sobre substratos de titânio grau 2, submetidos a diferentes processos (atacado, revestido com o organosilano MPTMS e revestido com o organosilano MPTMS com a dispersão de peptídeos). Os autores observaram que nos estágios iniciais de cultura celular, a modificação química das superfícies pela deposição de revestimentos silanos prevaleceu sobre a influência da rugosidade superficial.

Além disso, autores na literatura preconizam o parâmetro de molhabilidade como fator chave para a adesão e viabilidade celular, e a maioria desses referencia a utilização de superfícies de maior molhabilidade para provocar o aumento de ambos (LIU et al., 2013; HIRANO et al., 2014; JUNKAR et al., 2016). No presente trabalho o comportamento inverso foi observado, uma vez que a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH} foi a que obteve maior valor de ângulo de contato comparativamente as demais. Evidencia-se que este resultado também foi obtido na caracterização biológica do revestimento protetivo com a utilização das células MG-63.

O comportamento inferior apresentado pelo revestimento Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE} após 9 dias pode ser relacionado a retenção de produtos da esterilização, que ao serem liberados em função do tempo, promovem danos celulares (MATUSKA e MCFETRIDGE, 2015).

A Figura 69 apresenta a morfologia das células-tronco mesenquimais sobre os revestimentos bioativos esterilizados pelos diferentes processos após 1, 4 e 9 dias.

Figura 69. Morfologia das células-tronco sobre o revestimento bioativo esterilizado pelos diferentes processos após 1, 4 e 9 dias.



Pela interpretação das imagens foi possível constatar que as mesmas apresentaram coerência com os comportamentos de adesão e viabilidade celular. Após 1 dia, observou-se maior distribuição dos núcleos celulares (marcados em azul) na amostra esterilizada por plasma de peróxido de hidrogênio a autoclave e óxido de etileno. Este resultado foi coerente ao observado anteriormente no comportamento de adesão celular.

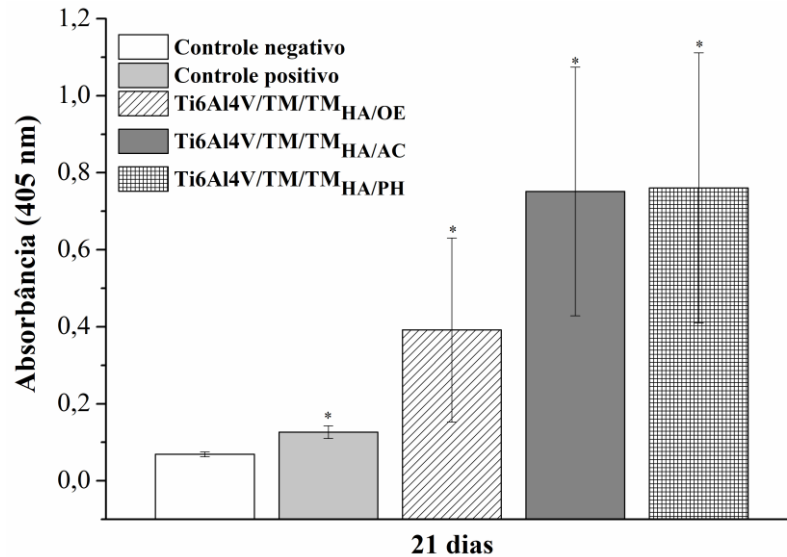
Após 9 dias as células-tronco mesenquimais se estenderam sobre as superfícies contendo os revestimentos bioativos e independente do processo de esterilização, observou-se o aumento da densidade celular com o alongamento das extensões citoplasmáticas, denotando a citocompatibilidade do revestimento proposto; a predominância de tal comportamento foi mais evidente para a amostra Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH}.

Para as amostras Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE} constatou-se a contração do material extracelular, com as células se apresentando de forma mais arredondada até o 4º dia de ensaio. Esse comportamento está de acordo com os resultados anteriormente visualizados em viabilidade celular e se torna mais uma evidência dos efeitos causados pelos resíduos remanescentes do processo de esterilização por óxido de etileno.

5.3.3. Diferenciação osteogênica

A Figura 70 apresenta os resultados obtidos para a mineralização da matriz óssea através das células-tronco diferenciadas após 21 dias de ensaio a partir do marcador Alizarin Red S. Segundo Rogina et al. (2017), a mineralização extracelular é considerada um dos principais indicadores para a diferenciação osteogênica, sendo esta mensurada pela medida indireta da presença de sais de cálcio.

Figura 70. Mineralização óssea quantificada indiretamente pela deposição de cálcio decorrente da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais em contato por 21 dias com o revestimento bioativo esterilizado por diferentes processos. (* corresponde as diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste ANOVA $p \leq 0,05$).



Pode-se observar que os revestimentos bioativos apresentaram índices superiores de depósito de cálcio quando comparados aos controles positivo e negativo, evidenciando o promissor comportamento de diferenciação osteogênica proporcionado pela presença do revestimento, comportamento semelhante ao encontrado por Chen e Ko, (2013). Entre as amostras esterilizadas, apesar da não detecção da diferença estatística, observou-se que a mineralização foi de maior intensidade para as amostras esterilizadas por plasma de peróxido de hidrogênio e autoclave, comparativamente a óxido de etileno.

Curran, Chen e John, (2006) e Phillips et al. (2010) avaliaram a influência de diferentes grupos funcionais presentes em compostos silanos no comportamento de diferenciação osteogênica de células-tronco. Em ambos os estudos, os autores verificaram maiores índices da proteína osteocalcina para o grupamento $\text{CH}_3 \rightarrow \text{OH}$, e concluíram que apesar de acentuar o comportamento hidrofóbico das superfícies a presença do grupo metila favoreceu a diferenciação osteogênica.

Segundo Kenry et al. (2018), os revestimentos de SiO_2 podem interferir na osteogênese de células-tronco igualmente aos parâmetros de superfície. Deste modo, o comportamento apresentado por $\text{Ti6Al4V/TM/TM}_{\text{HA/PH}}$ pode ter relação com a maior degradação hidrolítica junto a liberação de silício observadas para este revestimento em imersão em solução DMEM. Juan Diaz et al. (2016) relacionaram os maiores índices de

mineralização decorrentes da diferenciação de células-tronco, oriundas do tecido adiposo, com os maiores percentuais de liberação de silício em revestimentos silanos. Shei et al. (2011) avaliaram o comportamento células osteoblásticas em função da liberação de silício provenientes do precursor TEOS com nitrato de cálcio e observaram a existência de uma concentração limite de silício liberado em solução DMEM (4 mM), que favoreceu a viabilidade celular e conseqüentemente promoveu a maior mineralização (presença de sais de cálcio), sendo esse ultrapassado, as células tenderam à apoptose.

Apesar do similar comportamento de degradação apresentado por Ti6Al4V/TM/TM_{HA/PH} e Ti6Al4V/TM/TM_{HA/OE}, igualmente ao observado para a viabilidade celular, a liberação dos resíduos gerados durante o processo de esterilização por óxido de etileno, pode ter afetado negativamente na diferenciação osteogênica desta amostra em relação às demais.

Para o revestimento esterilizado em autoclave, a mais rápida degradação em solução DMEM em relação as demais amostras, pode ter promovido a maior exposição das partículas de hidroxiapatita ao meio celular. Rogina et al. (2017) avaliaram o comportamento de células-tronco mesenquimais sobre *scaffolds* de quitosana com diferentes percentuais de hidroxiapatita e verificaram que altas concentrações das mesmas (adição de 50 %) podem ocasionar a redução da mineralização por depósitos de cálcio. Maeno et al. (2005) demonstraram a influência da concentração de íons cálcio no comportamento de células osteoblásticas, em que a presença de índices superiores à 30 mM promoveu a redução da proliferação celular bem como dos marcadores indicativos do evento de mineralização.

5.3.4. Conclusões parciais

- a) Os revestimentos bioativos, independente do processo de esterilização, não apresentaram comportamento citotóxico as células-tronco mesenquimais após os diferentes tempos analisados;
- b) Nenhum dos métodos de esterilização provocou alteração nos resultados de adesão celular bem como na distribuição das células-tronco mesenquimais sobre os revestimentos;

c) Com relação aos resultados de viabilidade celular, independente do processo de esterilização utilizado, houve o aumento da proliferação das células em função do tempo; no entanto após 9 dias de análise os revestimentos esterilizados em plasma de peróxido de hidrogênio e óxido de etileno foram os que apresentaram maior e menor índices de viabilidade, respectivamente. Ressalta-se que não foi possível relacionar os resultados de viabilidade celular com as alterações superficiais provocadas pelos processos de esterilização.

d) Após 21 dias de análise, todos os revestimentos bioativos esterilizados apresentaram índices elevados de diferenciação osteogênica quando comparados aos controles utilizados. Os comportamentos de diferenciação osteogênica reproduziram os resultados obtidos em viabilidade celular, novamente evidenciando o efeito positivo do processo de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio; isso pode ter sido motivado pela degradação progressiva deste revestimento juntamente à maior liberação silício do mesmo para o meio.

6. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes processos de esterilização (autoclave, óxido de etileno e plasma de peróxido de hidrogênio) sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais em revestimentos híbridos com propriedades protetivas e bioativas, aplicados em Ti6Al4V.

Os resultados obtidos com relação à *obtenção, caracterização e esterilização do revestimento híbrido protetivo* permitiram concluir que a combinação do alcoxissilano TEOS com o organoalcoxissilano MTES aplicado pela técnica de *dip coating* apresentou a formação de um revestimento aderente com cobertura homogênea e de caráter protetivo ao substrato da liga Ti6Al4V. Os processos de esterilização avaliados promoveram modificações nas propriedades morfológicas, físico-químicas do revestimento proposto, bem como provocaram o comprometimento do efeito barreira do mesmo, independentemente da esterilização utilizada. O estudo de biocompatibilidade do revestimento protetivo demonstrou mínima citotoxicidade as células MG-63, entretanto comparativamente a Ti6Al4V, percebeu-se que os revestimentos esterilizados apresentaram inferiores percentuais de células viáveis e índices superiores de apoptose tardia e necrose; dentre os processos de esterilização, autoclave foi a que apresentou menor percentual de células viáveis após 1 dia de incubação, e óxido de etileno foi o que apresentou menor percentual de viabilidade e maior mortalidade celular após 7 dias.

O estudo de *obtenção, caracterização e esterilização do revestimento híbrido bioativo* possibilitou concluir que a combinação dos precursores TEOS e MTES com a adição de hidroxiapatita permitiu a formação de um revestimento uniforme, aderente ao revestimento subjacente e com partículas de hidroxiapatita uniformemente distribuídas pelo mesmo. Novamente, os métodos de esterilização provocaram alterações morfológicas e físico-químicas do revestimento proposto. Contudo, dentre os processos de esterilização não se observou diferença na resistência ao desgaste por abrasão, no entanto os mesmos apresentaram comportamentos inferiores à amostra não esterilizada. O estudo de bioatividade dos revestimentos demonstrou que os processos de esterilização favoreceram a deposição de apatita sobre os mesmos, e ao final do tempo de ensaio, o revestimento esterilizado em autoclave foi o que apresentou superior comportamento bioativo comparativamente aos demais. Da mesma forma, o revestimento esterilizado em

autoclave foi o que apresentou maior instabilidade da rede siloxano em curto espaço de tempo, ao inverso do esterilizado em plasma de peróxido de hidrogênio, que apresentou progressivo comportamento de degradação hidrolítica e conseqüentemente após 60 dias foi o que proporcionou a maior liberação de silício para a solução DMEM.

Referente ao efeito dos processos de esterilização sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais pode-se concluir que o revestimento híbrido protetivo e bioativo proposto não apresentou citotoxicidade as mesmas. Obteve-se similar comportamento de adesão celular, independentemente do processo de esterilização utilizado. A maior viabilidade e diferenciação osteogênica (mineralização) ocorreram no revestimento esterilizado por plasma de peróxido de hidrogênio, podendo ter sido motivadas pela degradação progressiva do revestimento bioativo e subsequente exposição parcial das partículas de hidroxiapatita. Esse comportamento foi observado em menor intensidade para revestimento esterilizado por óxido de etileno, muito provavelmente devido a liberação de produtos tóxicos provenientes do processo de esterilização.

Dessa forma, com base nas conclusões obtidas durante a realização deste trabalho, ressalta-se a relevância do estudo da esterilização durante o desenvolvimento de um biomaterial, uma vez que por ser a última etapa antes da implantação do mesmo no corpo humano, a escolha do processo de esterilização a ser utilizado influenciará nas propriedades finais do material.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

- Artigo completo publicado em periódico

BALDIN, E. K.K. et al. Effect of sterilization processes on the properties of a silane hybrid coating applied to Ti6Al4V alloy. **Journal of Materials Research**, v. 33, n.02, p. 161-177, 2017.

- Resumo publicado em anais de congresso

BALDIN, E. K. K., BRANDALISE, R. N., MALFATTI, C. F. Effect of sterilization processes on the properties of a hybrid coating applied on Ti6Al4V alloy. International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology (ICONAN), Barcelona, 2017.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. et al. Enhanced corrosion protection and biocompatibility of a PLGA-silane coating on AZ31MG alloy for orthopedic application. **RSC Advances**, v. 5, p. 113871-113883, 2016.

AHMED, R. A. et al. Improvement of corrosion resistance and antibacterial effect of NiTi orthopedic materials by chitosan and gold nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 292, p. 390–399, 2014.

ALMEIDA, J. C. et al. Evaluating structural and microstructural changes of PDMS –SiO₂ hybrid materials after sterilization by gamma irradiation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 354–358, 2015.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, “Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test.” ASTM D3359-09.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, “Standard Specification for Wrought Titanium-6-Aluminium-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Application.” ASTM F136-13.

ALLEY, M.C. et al. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Research**, v.48, n.3, p.589–601, 1988.

AMATO, L. E. et al. Electrochemical characterization of sol–gel hybrid coatings in cobalt-based alloys for orthopaedic implants. **Materials Letters**, v. 59, n. 16, p. 2026–2031, 2005.

ANDREWS, K.D.; HUNT, J.A.; BLACK, R.A. Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. **Biomaterials**, v.28, n.6, p.1014–1026, 2007.

ANTONINI, L. M. Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

ASRI, R. I. M. et al. A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol–gel and electrochemical depositions on biocompatible metals. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p. 95–108, 2016.

BALLARRE, J. et al. Protective hybrid sol–gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel: Surface characterization. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 17, p. 7260–7264, 2007.

BALLARRE, J. et al. Electrochemical evaluation of multilayer silica–metacrylate hybrid sol–gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 203, n. 1–2, p. 80–86, 2008.

BALLARRE, J. et al. Improving the osteointegration and bone–implant interface by incorporation of bioactive particles in sol–gel coatings of stainless steel implants. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1601–1609, 2010.

BALLARRE, J. et al. Morphologic and nanomechanical characterization of bone tissue growth around bioactive sol–gel coatings containing wollastonite particles applied on stainless steel implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 3, p. 545–552, 2011.

BAREIRO, O.; SANTOS, L. A. Tetraethylorthosilicate (TEOS) applied in the surface modification of hydroxyapatite to develop polydimethylsiloxane/hydroxyapatite composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 400–405, 2014.

BARTOLOMEU, F. et al. Wear behavior of Ti6Al4V biomedical alloys processed by selective laser melting, hot pressing and conventional casting. **Science Press**, v. 27, p. 829-838, 2017.

BASIAGA, M. et al. The effect of EO and steam sterilization on the mechanical and electrochemical properties of titanium Grade 4. **Materiali In Tehnologije**, v. 50, n. 1, p. 153–158, 2016.

BAYAT, N.; SANJABI, S.; BARBER, Z. H. Improvement of corrosion resistance of NiTi sputtered thin films by anodization. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 20, p. 8493–8499, 2011.

BELAUD, V. et al. Wettability versus roughness: Multi-scales approach. **Tribology International**, v. 82, p. 343–349, 2015.

BELLUCCI, D. et al. A comparative in vivo evaluation of bioactive glasses and bioactive glass-based composites for bone tissue repair. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 286–295, 2017.

BERNARDI, L. et al. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 973–979, 2011.

BOTTICELLI, D. et al. The Jumping Distance Revisited. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 1, p. 35–42, 2003.

BOUDRIOT, U. et al. Role of Electrospun Nanofibers in Stem Cell Technologies and Tissue Engineering. **Macromolecular Symposia**, v. 225, n. 1, p. 9–16, 2005.

BRINKER, C.J., SCHERER, G.W. Sol-Gel Science The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing." Academic Press, San Diego, 1990.

BUCIUMEANU, M. et al. Study of the tribocorrosion behavior of Ti6Al4V - HA biocomposites. **Tribology Internation**, v. 107, p. 77-84, 2017.

BUENO-VERA, J. A. et al. Electrochemical characterization of MC3T3-E1 cells cultured on γ TiAl and Ti6Al4V alloys. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 316–327, 2015.

CAPIOTTO, N. Uso do silano BTSE como protetivo contra a corrosão de laminados de aço carbono. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CARVALHO et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, p. 3–11, 2010.

CHANDEKAR, A.; SENGUPTA, S. K.; WHITTEN, J. E. Thermal stability of thiol and silane monolayers: A comparative study. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 9, p. 2742–2749, 2010.

CHELLAPPA, M.; VIJAYALAKSHMI, U. Electrophoretic deposition of silica and its composite coatings on Ti6Al4V, and its in vitro corrosion behaviour for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 879–890, 2017.

CHEN, C. H. et al. Mineralization of progenitor cells with different implant topographies. **Procedia Engineering**, v. 36, p. 173-178, 2012.

CHEN, H. et al. Construction of surface HA/TiO₂ coating on porous titanium scaffolds and its preliminary biological evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 1047–1056, 2017.

CHEN, J.; WANG, J.; YUAN, H. Morphology and performances of the anodic oxide films on Ti6Al4V alloy formed in alkaline-silicate electrolyte with aminopropyl silane addition under low potential. **Applied Surface Science**, v. 284, p. 900–906, 2013.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 87, p. 1–57, 2015.

CHEN, W. C.; KO, C. L. Roughened titanium surfaces with silane and further RGD peptide modification in vitro. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 5, p. 2713–2722, 2013.

CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D. C. Sol–gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 2–3, p. 360–365, 2011.

CHUAH, Y. J. et al. Combinatorial effect of substratum properties on mesenchymal stem sheet engineering and subsequent multi-lineage differentiation. **Acta Biomaterialia**, v. 23, p.52-62, 2015.

COSTA, D.M. Effect of hand hygiene and glove use on cleanline reusable surgical instruments. **Journal of Hospital Infection**, v. 97, n. 4, p. 348-352, 2017.

CRIADO, M.; SOBRADOS, I.; SANZ, J. Polymerization of hybrid organic–inorganic materials from several silicon compounds followed by TGA/DTA, FTIR and NMR techniques. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, n. 4, p. 880–891, 2014.

CURRAN, J.; CHEN, R.; JOHN, A. H. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in by controlled modification to the cell substrate. **Biomaterials**, v. 27, p. 4783-4793, 2006.

DIMAH, M. K. et al. Study of the biotribocorrosion behaviour of titanium biomedical alloys in simulated body fluids by electrochemical techniques. **Wear**, v. 294–295, p. 409–418, 2012.

DIMITRIEVSKA, S. et al. Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 98A, n. 4, p. 576–588, 2011.

DINCA, V. C. et al. Nickel–titanium alloy: Cytotoxicity evaluation on microorganism culture. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 13, p. 4619–4624, 2006.

DUBRUEL, P. et al. Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces. **Surface Science**, v. 600, n. 12, p. 2562–2571, 2006.

EL-HADAD, A. A. et al. Influence of substrate composition on corrosion protection of sol–gel thin films on magnesium alloys in 0.6M NaCl aqueous solution. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, n. 11, p. 1642–1652, 2014.

FLEITH, S. et al. Effect of several sterilisation techniques on homogeneous self assembled monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 1, p. 15–24, 2005.

FRANÇA, R. et al. The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and *in vitro* cytotoxicity of several kinds of chitosan: effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 8, p. 1444-1455, 2013.

FU, T. et al. Surface modification of NiTi alloy by sol-gel derived porous TiO₂ film. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 22, n. 7, p. 1661–1666, 2012.

GABBARDO, A. D. Influência do pH e do envelhecimento da solução precursora na deposição do revestimento a base do silano BTSE com adição do inibidor CeIII e estudo do envelhecimento desse revestimento aplicado sobre aço galvanizado. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Minas, Materiais e Metalúrgica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GALANTE, R. et al. Sterilization of silicone-based hydrogels for biomedical application using ozone gas: Comparison with conventional techniques. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 389–397, 2017.

GALTAYRIES et al. Bioengineered titanium surfaces affect the gene-expression and phenotypic response of osteoprogenitor cells derived from mouse calvarial bones. **European Cells and Materials**, p. 178–196, 2010.

- GAN, J. A.; BERNDT, C. C. Plasma surface modification of metallic biomaterials. In: **Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials**. Elsevier, p. 103–157, 2015.
- GARCÍA, C.; CERÉ, S.; DURÁN, A. Bioactive coatings prepared by sol–gel on stainless steel 316L. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 348, p. 218–224, 2004.
- GARCÍA, C.; CERÉ, S.; DURÁN, A. Bioactive coatings deposited on titanium alloys. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 3488–3495, 2006.
- GARCIA-HERAS, M. et al. Preparation and electrochemical study of cerium–silica sol–gel thin films. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 380, n. 1–2, p. 219–224, 2004.
- GIL-ALBAROVA, J. et al. In vivo osteointegration of three-dimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 10, p. 3777–3783, 2012.
- GITTENS, R. A. et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3395–3403, 2011.
- GOODMAN, S. B. et al. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. **Biomaterials**, v. 34, n. 13, p. 3174–3183, 2013.
- GOYENVALLE, E. et al. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered phosphate coating. **Biomaterials**, v. 27, p. 1119–1128, 2006.
- GYÖRGYÉY, Á. et al. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-ablated titanium implant material. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 4251–4259, 2013.
- HAN, A. et al. Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia in vitro. **Dental Materials**, v. 109, n.17, p. 30436, 2017.
- HAO, L. et al. Surface chemistry from wettability and charge for the control of mesenchymal stem cell fate through self-assembled monolayers. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 148, n.1, p. 549–556, 2016.
- HERNÁNDEZ-ESCOLANO, M. et al. Study of the thermal degradation of bioactive sol–gel coatings for the optimization of its curing process. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 107, n. 2, p. 499–508, 2012.
- HERNÁNDEZ-ESCOLANO, M. et al. The design and characterisation of sol–gel coatings for the controlled-release of active molecules. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 442–451, 2012.
- HIEDA, J. et al. Effect of terminal functional groups of silane layers on adhesive strength between biomedical Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy and segment polyurethanes. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 13, p. 3137–3141, 2012.

- HIRANO, M. et al. Effect of sterilization and water rinsing on cell adhesion to titanium surfaces. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 498–502, 2014.
- HOLY, C. E. et al. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 22, p. 25-31, 2000.
- HOLYAK, G. R. Toxic effects of ethylene oxide residues on bovine embryos. **Toxicology In Vitro**, v.108, n.1-2, p.33-38, 1996.
- HUANG, Q. et al. Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **Colloids and Surface b: Biointerfaces**, v. 145, p. 37-45, 2016.
- HUKOVIC, M. M.; TKALCEC, E.; PILJAC, J. An in vitro of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 165, p. 40-50, 2003.
- INNOCENZI, P.; ABDIRASHID, M. O.; GUGLIELMI, M. Structure and properties of sol-gel coatings from methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane. **Journal of sol-gel science and technology**, v. 3, n. 1, p. 47–55, 1994.
- INTERNATION STANDARD, “Biological Evaluation of Medical Devices, Test for in vitro cytotoxicity.” ISO 10993-5-09.
- INTERNATION STANDARD, “Biological Evaluation of Medical Devices, Ethylene oxide sterilization residuals.” ISO 10993-7-08.
- JUAN-DIAZ, M. J. et al. Development of hybrid sol-gel coatings for the improvement of metallic biomaterials performance. **Progress in Organic Coatings**, v. 96, p. 42–51, 2016.
- JUNKAR, I. et al. Influence of various sterilization procedures on TiO₂ nanotubes used for biomedical devices. **Bioelectrochemistry**, v. 109, p. 79–86, 2016.
- KE, D. et al. Effects of MgO and SiO₂ on plasma-sprayed hydroxyapatite coating: An in vivo study in rat distal femoral defects. **Applied Materials Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 25731-25737, 2017.
- KIEL-JAMROZIK, M. et al. Technological capabilities of surface layers formation on implant made of Ti6Al4V ELI alloy. **Acta of bioengineering and biomechanics**, v. 17, n. 1, p. 31-37, 2015.
- KLIMEK, K. et al. “False” cytotoxicity of ions-adsorbing hydroxyapatite — Corrected method of cytotoxicity evaluation for ceramics of high specific surface area. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 70–79, 2016.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.
- KENRY, et al. Ehen stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 155, p. 236-250, 2018.

KHOSHNOOD, N.; ZAMANIAN, A.; MASSOUDI, A. Effect of silane-coupling modification on bioactivity and in vitro properties of anodized titanium nanotube arrays. **Materials Letters**, v. 185, p. 374-375, 2016.

KREGIEL, D. Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review. **Food Control**, v. 40, p. 32–40, 2014.

KULKARNI, M. et al. Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 47–53, 2015.

KUNST, S. R. et al. Corrosion resistance of siloxane–poly(methyl methacrylate) hybrid films modified with acetic acid on tin plate substrates: Influence of tetraethoxysilane addition. **Applied Surface Science**, v. 298, p. 1–11, 2014.

KUNST, S. R. et al. Characterization of Siloxane-poly(methyl methacrylate) Hybrid Films Obtained on a Tinplate Substrate Modified by the Addition of Organic and Inorganic Acids. **Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 151–163, 2015.

KUWABARA, A. et al. Enhanced Biological Responses of a hydroxyapatite/TiO₂; Hybrid Structure When Surface Electric Charge Is Controlled Using Radiofrequency Sputtering. **Dental Materials Journal**, v.31, n. 3, p. 368–376, 2012.

LATIFI, S. M. et al. Simultaneous structural and surface modifications of nanophase hydroxyapatite for improving its dissolution and bioactivity. **Ceramics International**, v. 42, p. 6355-6359, 2016.

LEE, M. H. et al. Effects of low temperature hydrogen peroxide gas on sterilization and cytocompatibility of porous poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) scaffolds. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 22–23, p. 5762–5767, 2008.

LEE, W. H.; LOO, C. Y.; ROHANIZADEH, R. A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 823–834, 2014.

LEE, W. K.; LEE, S. M.; KIM, H. M. Effect of surface morphology of calcium phosphate on osteoblast-like HOS cell responses. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 677–682, 2009.

LEITUNE, V. C. B. et al. The addition of nanostructures hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. **Journal of Dentistry**, v.41, p. 321-327, 2013.

LIAO, S.; CHAN, C. K.; RAMAKRISHNA, S. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1189–1202, 2008.

LIKIBI, F.; JIANG, B.; LI, B. Biomimetic nanocoating promotes osteoblast cell adhesion on biomedical implants. **Journal of Materials Research**, v. 23, n. 12, p. 3222–3228, 2008.

- LIN, L. et al. Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 2, n. 1, p. 35–42, 2014.
- LIU, J. et al. Adsorption behavior of glycidoxypopyl-trimethoxy-silane on titanium alloy Ti–6.5Al–1Mo–1V–2Zr. **Applied Surface Science**, v. 264, p. 507–515, 2013.
- LIU, X. et al. Biofunctionalized Anti-Corrosive Silane Coatings for Magnesium Alloys. **Acta Biomaterialia**, v.9, n.10, p. 8671–8677, 2013.
- LIU, X.L. et al. Effect of sterilization process on surface characteristics and biocompatibility of our Mg and MgCa alloys. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 4144-4154, 2013.
- LÓPEZ, M. M. M. et al. Structural characterization and electrochemical behavior of 45S5 bioglass coating on Ti6Al4V alloy for dental applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 206, p. 30–38, 2016.
- LYNDON, J. A.; BOYD, B. J.; BIRBILIS, N. Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 63–75, 2014.
- MAENO, S. et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4847–4855, 2005.
- MANAM, N. S. et al. Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 701, p. 698–715, 2017.
- MANDAL, T. et al. Optimization of milling parameters for the mechanosynthesis of nanocrystalline hydroxyapatite. **Powder Technology**, v. 253, p. 650-656, 2014.
- MARINO, C. E. B. et al. Voltammetric stability of anodic films on the Ti6Al4V alloy in chloride medium. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 28, p. 6580–6583, 2006.
- MARINO, C. E. B.; MASCARO, L. H. Electrochemical testes to evaluate the stability of the anodic films on dental implants. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- MARINO, C. E. B.; MASCARO, L. H. EIS characterization of a Ti-dental implant in artificial saliva media: dissolution process of the oxide barrier. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 568, p. 115–120, 2004.
- MARTIN, J. Y. et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, p. 389-401, 1995.
- MARTÍNEZ I.M. et al. In vitro behavior of α -tricalcium phosphate doped with dicalcium silicate in the system $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. **Materials Characterization**, v. 63, p. 47-55, 2012.

MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, M. et al. Biological characterization of a new silicon based coating developed for dental implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 4, p. 80, 2016.

MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, M. et al. Design of nanostructured siloxane-gelatin coatings: Immobilization strategies and dissolution properties. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 481, p. 368-374, 2017.

MATUSKA, A. M.; MCFETRIDGE, P. S. The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion: Sterilization method modulates cell adhesion. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 2, p. 397–406, 2015.

MCENTIRE, B. J. et al. Ceramics and ceramic coatings in orthopaedics. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 35, n. 16, p. 4327–4369, 2015.

MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204–2213, 2006.

MIAO, Z. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 30, n. 9, p. 681–687, 2006.

MONACO, G. et al. Sterilization of collagen scaffolds designed for peripheral nerve regeneration: Effect on microstructure, degradation and cellular colonization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 335–344, 2017.

MOON, B.S. et al. Hierarchical micro-nano structured Ti6Al4V surface topography via two-step etching process for enhanced hydrophilicity and osteoblastic responses. **Materials Science and Engineering C**, v. 73, p. 90-98, 2017.

MORCELLI, A. E. Estudo dos micromecanismos de deformação e fratura da liga de titânio Ti6Al4V utilizando-se técnicas de microscopia eletrônica e difração de raios x. Tese de doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MÜLLER, G. et al. Poly (hexamethylene Biguanide) adsorption on hydrogen peroxide treated Ti–Al–V Alloys and effects on wettability, antimicrobial efficacy, and cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 35, n. 20, p. 5261–5677, 2014.

MUNARIN, F. et al. Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 74-84, 2013.

- MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1433–1445, 2011.
- NASIRI-TABRIZI, B.; FAHAMI, A.; EBRAHIMI-KAHRIZSANGI, R. Effect of milling parameters on the formation of nanocrystalline hydroxyapatite using different raw materials. **Ceramics International**, v. 39, n. 5, p. 5751–5763, 2013.
- NERSESYAN, A. et al. Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 10, p. 1835–1840, 2006.
- OH, S. et al. Influence of sterilization methods on cell behavior and functionality of osteoblasts cultured on TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p. 873–879, 2011.
- OLIVEIRA, L. S. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37–44, 18, 2010.
- OMAR, S. et al. Sol-gel coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 425, p. 1-10, 2015.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. D. M.; MANSUR, H.S. Biomaterias: Fundamentos e Aplicações, Rio de Janeiro. Cultura Médica, 2006.
- OLMEDO, D. G. et al. Exfoliative Cytology and Titanium Dental Implants: A Pilot Study. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 1, p. 78–83, 2013.
- OWENS, G. J. et al. Sol-gel based materials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1–79, 2016.
- PAN, G.; SCHAEFER, A. W.; ILAVSKY, J. Morphology and water barrier properties of organosilane films The effect of curing temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, p. 287-293, 2006.
- PARK, J. H. et al. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 5, p. 1966–1975, 2012.
- PARK, H. et al. Three-Dimensional Hydrogel Model Using Adipose-Derived Stem Cells for Vocal Fold Augmentation. **Tissue Engineering Part A**, v.16, n.2, p. 535–543, 2009.
- PEGUEROLES, M. et al. The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 15, p. 3470–3479, 2008.
- PFEIFFER, F.; HERZOG, B.; KERN, D.; SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER, J.; AND WOLBURG, H. Cell Reactions to Microstructured Implant Surfaces. **Microelectronic Engineering**, v. 67, p. 913–922, 2003.

- PHANASGAONKAR, A.; RAJA, V. S. Influence of curing temperature, silica nanoparticles- and cerium on surface morphology and corrosion behaviour of hybrid silane coatings on mild steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 203, n. 16, p. 2260–2271, 2009.
- PHILLIPS, J. E. et al. Human mesenchymal stem cell differentiation on self-assembled monolayers presenting different surface chemistries. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 12-20, 2010.
- PRESTON, S. L. et al. The new stem cell biology: something for everyone. **Molecular Pathology**, v. 56, n. 2, p. 86-96, 2003.
- PASZENDA, Z.; WALKE, W.; JADACKA, S. Electrochemical investigations of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys used on implants in bone surgery. **Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering**, v. 38, p. 24–32, 2010.
- QIU, J. et al. Three-dimensional porous graphene nanosheets synthesized on the titanium surface for osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. **Carbon**, v.125, p. 227-235, 2017.
- QIU, Q. Q.; SUN, W. Q.; CONNOR, J. Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin. Elsevier, LifeCell Corporation, USA, 2011.
- RAHIMI, H.; MOZAFFARINIA, R.; HOJJATI NAJAFABADI, A. Corrosion and wear resistance characterization of environmentally friendly sol–gel hybrid nanocomposite coating on AA5083. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 29, n. 7, p. 603–608, 2013.
- RAI, R. et al. Sterilization effects on the physical properties and cytotoxicity of poly(glycerol sebacate). **Materials Letters**, v. 105, p. 32–35, 2013.
- RAKMAE, S. et al. Effect of silane coupling agent treated bovine bone based carbonated hydroxyapatite on in vitro degradation behavior and bioactivity of PLA composites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1428–1436, 2012.
- RAMI AL-OWEINI; EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}''\text{Si}(\text{OR}')_3$ precursors. **Journal of Molecular Structure**, v. 919, n. 1–3, p. 140–145, 2009.
- RAPHEL, J. et al. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. **Biomaterials**, v. 84, p. 301–314, 2016.
- RIBEIRO, A. L. R. et al. Are new TiNbZr alloys potential substitutes of the Ti6Al4V alloy for dental applications? An electrochemical corrosion study. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 6, p. 065005, 2013.
- RIGO, E. C. S. et al. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 24, n. 5, p. 647–651, 2004.

RODRÍGUEZ-CANO, A. et al. Controlled silanization–amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 248–257, 2013.

ROGINA, A. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation Regulated by Hydroxyapatite Content within Chitosan-Based Scaffolds under Perfusion Conditions. **Polymers**, v. 9, n. 9, p. 387, 2017.

ROJAEI, R.; FATHI, M.; RAEISSI, K. Electrophoretic deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on AZ91 magnesium alloy implants with different surface treatments. **Applied Surface Science**, v. 285, p. 664–673, 2013.

ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem cells**, v. 21, n. 1, p. 105–110, 2003.

ROMERO-GAVILAN, F. et al. Control of the degradation of silica sol-gel hybrid coatings for metal implants prepared by the triple combination of alkoxysilanes. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 453, p. 66–73, 2016.

SALVADOR, D. G. et al. Influence of the pretreatment and curing of alkoxysilanes on the protection of the titanium-aluminum-vanadium alloy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 46, p. 45470, 2017.

SANAEI-RAD, P. et al. Enhancement of stem cell differentiation to osteogenic lineage on hydroxyapatite-coated hybrid PLGA/gelatin nanofiber scaffolds. **Biologicals**, v. 44, n. 6, p. 511–516, 2016.

SHI, X. et al. Improved osseointegration of long term stored SLA implant by hydrothermal sterilization. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 53, p. 312–319, 2016.

REHMAN, S. et al. Synthesis of nano-hydroxyapatite and its rapid mediated surface functionalization by silane coupling agent. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 675–681, 2016.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfection and sterilization in healthcare facilities. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities**. 2008

SAJNÓG, A. et al. Usefulness of laser ablation ICP-MS for analysis of metallic particles released to oral mucosa after insertion of dental implants. **Journal Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, p. 46–54, 2018.

SARMIENTO-GONZÁLEZ, A. et al. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 1, p. 335–343, 2009.

SARMENTO, V. H. V. et al. Corrosion protection of stainless steel by polysiloxane hybrid coatings prepared using the sol-gel process. **Surface & Coatings Technology**, v. 204, n.16-17, p. 2689–2701, 2010.

SAVARIS, M.; SANTOS, V. DOS; BRANDALISE, R. N. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 661–667, 2016.

SEO, S. M. et al. Effect of milling time on the viscosity of hydroxyapatite suspension. **Current Applied Physics**, v. 12, p. S71-S75, 2012.

SERRO, A. Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4749–4760, 2003.

SHARMA, S. et al. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1193–1204, 2016.

SMITH A, S. et al. Synthesis of Biocompatible hydrophobic silica-gelatin nano-hybrid by sol-gel process. **Colloids and Surfaces B: Interfaces**, v.55, p. 38-43, 2007.

SMITH, G. T. **Industrial Metrology**. London: Springer London, 2002.

SOMSANITH, N. et al. Surface medication of Ti–15Mo alloy by thermal oxidation: Evaluation of surface characteristics and corrosion resistance in Ringer's solution. **Applied Surface Science**, v. 356, p. 1117–1126, 2015.

SPRIANO, S. et al. How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? **Materials Science and Engineering: C**, v. 74, p. 542–555, 2017.

SUBRAMANI, K.; MATHEW, R. T. Titanium Surface Modification Techniques for Dental Implants—From Microscale to Nanoscale. **Emerging Nanotechnologies in Dentistry**. Elsevier, p. 85–102, 2012.

SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A.; IVANOVA, A. A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–579, 2014.

SZEWCZENKO, J.P.M. et al. Corrosion Resistance of Ti6Al4V Alloy in Modified SBF Environments. **Key Engineering Materials**, v. 687, p.79–86, 2015.

TAE YOUNG, A. et al. Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan bionanocomposites for bone tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1488–1491, 2016.

TAŃSKI, T. et al. Optical properties of thin fibrous PVP/SiO₂ composite mats prepared via the sol-gel and electrospinning methods. **Applied Surface Science**, v. 424, p. 184–189, 2017.

TOKER, S. M. et al. Evaluation of passive oxide layer formation–biocompatibility relationship in NiTi shape memory alloys: Geometry and body location dependency. **Materials Science and Engineering: C**, v. 36, p. 118–129, 2014.

- VAN OOIJ, W. J. et al. Corrosion protection properties of organofunctional silanes—an overview. **Tsinghua Science & Technology**, v. 10, n. 6, p. 639–664, 2005.
- VARIOLA, F. et al. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. **Biomaterials**, v. 29, n. 10, p. 1285–1298, 2008.
- VASILESCU, E. et al. Effect of thermo-mechanical processing on the corrosion resistance of Ti6Al4V alloys in biofluids. **Corrosion Science**, v. 51, n. 12, p. 2885–2896, 2009.
- VETTEN, M. A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2014.
- VEZEAU, P. J. et al. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 54, n. 6, p. 738–746, 1996.
- VOJTĚCH, D. et al. Surface structure and corrosion resistance of short-time heat-treated NiTi shape memory alloy. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 5, p. 1573–1582, 2010.
- WALKE, W. et al. Evaluation of physicochemical properties of SiO₂-coated stainless steel after sterilization. **Materials Science and Engineering: C**, v.63, p. 155-63, 2016.
- WANG, D. et al. Coatings for osseointegration of metallic biomaterials. **Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials**. Elsevier, p. 345–358, 2015.
- WANG, D.; BIERWAGEN, G. P. Sol–gel coatings on metals for corrosion protection. **Progress in Organic Coatings**, v. 64, n. 4, p. 327–338, 2009.
- WANG, M. et al. Improving endothelialization on 316L stainless steel through wettability controllable coating by sol–gel technology. **Applied Surface Science**, v. 268, p. 73–78, 2013.
- WANG, C. C. R.; HSIEH, M. C.; LEE, T. M. Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V. **Biointerphases**, v.6, n. 3, p. 87-97, 2011.
- WANG, P. Y.; THISSEN, H.; KINGSHOTT, P. Modulation of human multipotent and pluripotent stem cells using surface nanotopographies and surface-immobilised bioactive signals: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 45, p. 31–59, 2016.
- WANG, X.; SONG, G.; LOU, T. Fabrication and characterization of nano-composite scaffold of PLLA/silane modified hydroxyapatite. **Medical Engineering & Physics**, v. 32, n. 4, p. 391–397, 2010.
- WILSON, A. J.; NAYAK, S. Disinfection, sterilization and disposables. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 10, p. 423–427, 2013.
- WILLIAMS, D. J.; SEBASTINE, I. M. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Manufacturing Challenges. **IEE Proceedings - Nanobiotechnology**, v. 152, n. 6, p. 207, 2005.

- WIRTH, C. et al. Biomaterial surface properties modulate in vitro rat calvaria osteoblasts response: Roughness and or chemistry? **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 5–6, p. 990–1001, 2008.
- WITTENBURG, G. et al. Nanoscale topographic changes on sterilized glass surfaces affect cell adhesion and spreading: Nanoscale Topographic Changes On Sterilized Glass Surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 8, p. 2755–2766, 2014.
- WU, K. H. et al. Thermal stability and corrosion resistance of polysiloxane coatings on 2024-T3 and 6061-T6 aluminum alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 12, p. 5782–5788, 2007.
- YAACOUB, S. et al. Study of the mechanical properties of two organic–inorganic hybrid systems: GPTMS/colloidal silica and GPTMS/TEOS. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, n. 22, p. 3036–3041, 2012.
- YAVUZ, C. et al. Sterilization of PMMA microfluidic chips by various techniques and investigation of material characteristics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 114–121, 2016.
- YU, F.; ADDISON, O.; DAVENPORT, A. J. A synergistic effect of albumin and H₂O₂ accelerates corrosion of Ti6Al4V. **Acta Biomaterialia**, v. 26, p. 355–365, 2015.
- YU, M. et al. Electrophoretic deposition of hybrid coatings on aluminum alloy by combining 3-aminopropyltrimethoxysilane to silicon–zirconium sol solutions for corrosion protection. **Thin Solid Films**, v. 590, p. 33–39, 2015.
- YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. **Surface Science Techniques**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 51, p. 3–34, 2013.
- ZHAI, W. et al. Stimulatory effects of the ionic products from Ca–Mg–Si bioceramics on both osteogenesis and angiogenesis in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 8004–8014, 2013.
- ZHANG, E. et al. Influence of Cu content on the cell biocompatibility of Ti–Cu sintered alloys. **Materials Science and Engineering: C**, v. 46, p. 148–157, 2015.
- ZHANG, J.X.; GUAN, R.F.; ZHANG, X.P. Synthesis and Characterization of Sol–gel Hydroxyapatite Coatings Deposited on Porous NiTi Alloys. **Journal of Alloys and Compounds**, v.13, p. 4643–4648, 2011.
- ZHAO, J. et al. Surface modification of TiO₂ nanoparticles with silane coupling agents. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 413, p. 273–279, 2012.
- ZHAO, L. et al. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2055–2063, 2010.

ZHENG, C. Y. et al. Enhanced corrosion resistance and cellular behavior of ultrafine-grained biomedical NiTi alloy with a novel SrO–SiO₂–TiO₂ sol–gel coating. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 13, p. 5913–5918, 2011.

ZHU, D.; VAN OOIJ, W. J. Corrosion protection of metals by water-based silane mixtures of bis-[trimethoxysilylpropyl]amine and vinyltriacetoxysilane. **Progress in Organic Coatings**, v. 49, n. 1, p. 42–53, 2004.

ZHU, X. et al. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, v. 25, n.18, p. 4087–4103, 2004.

ZOMORODIAN, A. et al. Anti-corrosion performance of a new silane coating for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy in Hank's solution. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 21, p. 4368–4375, 2012.