

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências/Campus de Bauru

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Luciana Daniele Trino

**FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES E
ESTUDO DE ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS
EM ÓXIDOS METÁLICOS**

Bauru

2018

LUCIANA DANIELE TRINO

FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES E ESTUDO DE ADSORÇÃO DE
BIOMOLÉCULAS EM ÓXIDOS METÁLICOS

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/Bauru.

Orientador: Paulo Noronha Lisboa Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS -
FACULDADE DE CIÊNCIAS - UNESP

Bauru

2018

Trino, Luciana Daniele.

Funcionalização de superfícies e estudo de adsorção de biomoléculas em óxidos metálicos/ Luciana Daniele Trino, 2018
191 f.

Orientador: Paulo Noronha Lisboa Filho

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2018

1. Óxidos Metálicos. 2. Funcionalização. 3. Biomateriais. 4. Peptídeos da DMP1. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LUCIANA DANIELE TRINO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 19 dias do mês de abril do ano de 2018, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro da Seção Técnica de Pós Graduação - Faculdade de Ciências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, Prof. Dr. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia / Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, Profª Drª ANGELA MARIA MORAES do(a) Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos / UNICAMP, Profª Drª ANA PAULA RAMOS do(a) Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de LUCIANA DANIELE TRINO, intitulada **FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES E ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM ÓXIDOS METÁLICOS** . Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO
Prof. Dr. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA
Profª Drª ANGELA MARIA MORAES
Profª Drª ANA PAULA RAMOS
Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

Dedico este trabalho aos meus pais Lazara e Roberto.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

À minha família, Lazara, Roberto, Juliana, Raphael, Isabella e Nice, por acreditarem em mim, aceitarem e apoiarem minhas escolhas, por todo amor, carinho, paciência, incentivo e dedicação para comigo, por terem sido a peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou.

Ao meu namorado Gustavo não apenas pelo carinho, paciência, apoio e companheirismo, mas também pelos inúmeros momentos de discussão referentes a este trabalho que resultaram numa parceria, também, profissional. Obrigada por elucidar minhas ideias e por podermos trabalhar juntos.

Ao prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação e pelos inúmeros ensinamentos, os quais me fizeram crescer, profissionalmente e pessoalmente.

Aos companheiros e amigos de laboratório Erika, Bruna, Yendry, Orisson, Leonardo, Carolina, Igor, Ana Carolina, Marcela e Odair pelas discussões extremamente produtivas, pelas inúmeras ajudas e pelas descontrações que tornaram os dias de trabalho ainda mais agradáveis. Em especial à Érika por ter feito parte da concepção da ideia deste trabalho, por todas as explicações e discussões referentes aos processos químicos envolvidos no estudo, pela amizade e companheirismo ao longo destes anos.

A todos os colegas do POSMAT/UNESP pelo apoio e troca de experiências que contribuíram para a execução deste trabalho.

À professora Dr. Anne George pela confiança e por disponibilizar todos os equipamentos e reagentes necessários para o estudo de biocompatibilidade dos materiais na Universidade de Illinois em Chicago. Aos pesquisadores de seu laboratório, em especial à Amsa por todo acompanhamento e ensinamento.

Ao professor Dr. Mathew T. Mathew por todos os ensinamentos referentes à parte de corrosão e tribocorrosão e por disponibilizar vários equipamentos na Universidade de Illinois em Chicago e na Rush University Medical Center. Agradeço também aos membros de sua equipe e colegas Dmitry, Maria Fernanda, Maria João, Pamela, Sofia e Sweetu pelas discussões, ensinamentos e amizade.

Aos membros do IBTN-USA e IBTN-BR pelas discussões produtivas.

À professora Dr. Elidiane Cipriano Rangel pelas medidas de ângulo de contato e energia de superfície, ao professor Dr. Marcelo Orlandi pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura, ao professor Dr. Valmor Mastelaro pelas medidas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios x, e ao professor Dr. Carlos Graeff pelas medidas de corrosão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através da bolsa concedida no país (processo nº 2014/01713-3), vinculada ao projeto temático CEPID (processo nº 2013/07296-2). Também agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro através da bolsa concedida para realização de estágio no exterior (processo nº 2014/27015-0). Além disso, agradeço à FAPESP pelo financiamento dos projetos do grupo (processo nº 2014/20471-0 e 2017/15035-5), os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

TRINO, L. D. “**Funcionalização de superfícies e estudo de adsorção de biomoléculas em óxidos metálicos**”. 2018 Tese (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais). UNESP, Bauru, 2018.

RESUMO

O titânio e suas ligas são utilizados em diversas aplicações, dentre elas em implantes ortopédicos e dentários devido à sua reconhecida biocompatibilidade. No entanto, falhas e subseqüentes efeitos colaterais clínicos ainda são recorrentes em implantes. Neste contexto, melhorias podem ser alcançadas projetando biomateriais nos quais o *bulk* e a superfície do titânio são independentemente modificadas. Deste modo, filmes finos nanoestruturados de óxidos metálicos, tais como TiO₂ e ZnO, podem melhorar as propriedades físico-químicas, a biocompatibilidade e a resistência à corrosão dos implantes de titânio. Além disso, a conjugação de biomoléculas, como peptídeos derivados da proteína da matriz dentinária 1 (DMP1), na superfície dos óxidos metálicos pode melhorar sua bioatividade, acelerando o processo de osteointegração.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi funcionalizar óxidos metálicos com diferentes moléculas bifuncionais e investigar as propriedades físico-químicas de grupos silano, amino, ácido carboxílico, tiol e hidroxila que atuaram como espaçadores entre os óxidos metálicos e os peptídeos da DMP1. Além disso foram realizadas análises de biocompatibilidade, mineralização, resistência à corrosão e à tribocorrosão das superfícies bio-funcionalizadas com os peptídeos da DMP1.

Neste trabalho, filmes de TiO₂ e ZnO nanométricos foram sintetizados pelo método sol-gel e depositados pela técnica *spin coating* em substratos de titânio.

Posteriormente, os filmes finos de óxidos metálicos foram funcionalizados com (3-aminopropil) trimetoxissilano (APTMS), ácido 3- (4-aminofenil) propiônico (APPA), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) ou polietilenoglicol (PEG), que atuam como espaçadores entre os óxidos metálicos e os peptídeos da DMP1.

As análises físico-químicas por XPS, microscopia confocal, AFM, ângulo de contato e energia de superfície revelaram a efetiva modificação das superfícies dos óxidos metálicos com APTMS, APPA, MPA e PEG. Após a bio-funcionalização as análises físico-químicas confirmaram a presença dos peptídeos da DMP1 na superfície dos óxidos metálicos. Além disso, testes biológicos indicaram que os peptídeos puderam modular a afinidade, proliferação e diferenciação de células mesenquimais humanas. Para a amostra contendo o dióxido de titânio, foram observados melhores resultados para o TiO_2 funcionalizado com MPA e os peptídeos da DMP1. Já para o óxido de zinco, melhores resultados de biocompatibilidade foram observados para ZnO funcionalizado com APPA e os peptídeos. Além disso, a imobilização dos peptídeos da DMP1 através dos espaçadores APPA e MPA, para ambos os óxidos, levou à formação de biominais de apatita. Os resultados eletroquímicos indicaram um aumento da resistência à corrosão nos materiais bio-funcionalizados, sendo que melhores resultados foram observados para o TiO_2 quando comparado ao ZnO. Além disso a análise de tribocorrosão apresentou menor perda de massa para as amostras de TiO_2 bio-funcionalizadas. Considerando os aspectos de biocompatibilidade, diferenciação osteogênica, mineralização, resistência à corrosão e à tribocorrosão a amostra de TiO_2 funcionalizada com MPA e os peptídeos da DMP1 foi a que apresentou melhores resultados. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a bio-funcionalização de

óxidos metálicos é capaz de projetar implantes de melhor qualidade aplicados à medicina regenerativa.

Palavras chave: óxidos metálicos, funcionalização, biomateriais, peptídeos da DMP1, diferenciação osteogênica.

TRINO, L. D. **“Surface functionalization and biomolecules attachment study upon metallic oxides”**. 2018 Thesis (Post Graduate Program in Science and Technology of Materials). UNESP, Bauru, 2018.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are used in a variety of applications, including orthopedic and dental implants because of their recognized biocompatibility. However, failures and subsequent clinical side effects are still recurrent in implants. In this context, improvements can be achieved by designing biomaterials in which the bulk and surface of the titanium are independently tailored. Thus, nanostructured metal oxides thin films, such as TiO₂ and ZnO, can improve the physicochemical properties, biocompatibility and corrosion resistance of titanium implants. In addition, the conjugation of biomolecules, such as peptides derived from the dentin matrix 1 protein (DMP1), on the surface of the metal oxides can improve their bioactivity, accelerating the osteointegration process.

Therefore, the objective of this work was to functionalize metal oxides with different bifunctional molecules and to investigate the physicochemical properties of silane, amino, carboxylic acid, thiol and hydroxyl groups that act as spacers between metal oxides and DMP1 peptides. In addition, biocompatibility, mineralization, corrosion and tribocorrosion resistance of the bio-functionalized surfaces were performed.

In this work, nanosized TiO₂ and ZnO thin films were synthesized by sol-gel method and deposited by spin coating technique on titanium substrates. Subsequently, the thin films of metal oxides were functionalized with (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS), 3-(4-aminophenyl) propionic acid (APPA), 3-mercaptopropionic acid (MPA) or

polyethylene glycol (PEG), which acted as spacers between the metal oxides and the DMP1 peptides.

The physicochemical analyzes by XPS, confocal microscopy, AFM, contact angle and surface energy revealed the effective modification of the metal oxides surfaces with APTMS, APPA, MPA and PEG. After the bio-functionalization the physicochemical analyzes confirmed the presence of the DMP1 peptides on the surface of the metal oxides. In addition, biological tests indicated that the peptides could modulate the affinity, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. For the sample containing the titanium dioxide, better results were observed for the TiO₂ functionalized with MPA and the DMP1 peptides. On the other hand, better biocompatibility results were observed for ZnO functionalized with APPA and peptides. In addition, the immobilization of the DMP1 peptides through the APPA and MPA spacers for both oxides led to the formation of apatite biominerals. The electrochemical results indicated an increase in corrosion resistance in the bio-functionalized materials, and better results were observed for TiO₂ when compared to ZnO. In addition, the tribocorrosion analysis presented lower mass loss for the bio-functionalized TiO₂ samples. Considering the aspects of biocompatibility, osteogenic differentiation, mineralization, resistance to corrosion and tribocorrosion, the TiO₂ functionalized with MPA and DMP1 peptides presented the best results. Therefore, the results suggest that the bio-functionalization of metal oxides can design better quality implants applied to regenerative medicine.

Keywords: metal oxides, functionalization, biomaterials, DMP1 peptides, osteogenic differentiation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PROPRIEDADES DA SUPERFÍCIE DO BIOMATERIAL QUE INFLUENCIAM NO COMPORTAMENTO DO IMPLANTE. ADAPTADO DE: (ELLINGSEN; LYNGSTADAAS, 2003).	26
FIGURA 2. DIAGRAMA DE FASES DE EQUILÍBRIO DO Ti EM FUNÇÃO DA PRESSÃO E TEMPERATURA. NO PONTO TRIPLO OCORRE A EXISTÊNCIA DAS TRÊS FASES (A, B E Ω), SENDO QUE OS BIOMATERIAIS SÃO FORMADOS PRINCIPALMENTE PELAS DUAS PRIMEIRAS FASES. ADAPTADO DE (HENNIG ET AL., 2008).	29
FIGURA 3. CELA UNITÁRIA TETRAGONAL DAS FASES RUTILO (A) E ANATASE (B) DO DIÓXIDO DE TITÂNIO. AS ESFERAS VERMELHAS REPRESENTAM O ELEMENTO OXIGÊNIO E AS CINZAS O TITÂNIO. ADAPTADO DE (LUSCHTINETZ ET AL., 2009).	32
FIGURA 4. PROCESSO DE FORMAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA NA SUPERFÍCIE DO TiO ₂ , EVIDENCIANDO DOIS DIFERENTES TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE O OXIGÊNIO E O TITÂNIO, O QUAL INFLUENCIA NAS PROPRIEDADES DO ÓXIDO. ADAPTADO DE (HANAWA, 2011).	34
FIGURA 5. EFICÁCIA DA SILANIZAÇÃO EM DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES. ADAPTADO DE: (PUJARI ET AL., 2014)	39
FIGURA 6. MECANISMO DA FORMAÇÃO DE MONOCAMADAS PELOS SILANOS EM TRÊS ETAPAS. ADAPTADO DE: (PUJARI ET AL., 2014).	41
FIGURA 7. POSSÍVEIS MEIOS DE ADESÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS SOBRE A SUPERFÍCIE DE TiO ₂ . ADAPTADO DE: (QU ET AL., 2010).	43
FIGURA 8. MEIOS DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS NAS SUPERFÍCIES DE ÓXIDOS METÁLICOS (MeOX): INTERAÇÕES HIDROFÍLICAS (I), RECOBRIMENTO HIDROFÓBICO (II), ADESÃO IÔNICA (III), LIGAÇÃO COVALENTE (IV), LIGAÇÃO COVALENTE COM A PRESENÇA DE ESPAÇADOR (V) E ACOPLAMENTO DE ANTICORPO ESPECÍFICO (VI). FONTE: (KILLIAN, 2013).	49
FIGURA 9. ESQUEMA DOS TRÊS TIPOS DE MECANISMOS PROPOSTOS PARA O EFEITO VROMAN, NO QUAL A COR AZUL REPRESENTA AS BIOMOLÉCULAS DE MENOR PESO MOLECULAR E A COR VERMELHA AS DE MAIOR PESO MOLECULAR. ADAPTADO DE: (HIRSH ET AL., 2013).	51
FIGURA 10. VANTAGENS E DESVANTAGENS ASSOCIADAS AO USO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS NA ENGENHARIA DE TECIDOS. ADAPTADO DE: (VISSER ET AL., 2016).	54

FIGURA 11. ETAPAS QUE OCORREM DURANTE O PROCESSO DE INTERAÇÃO DAS CÉLULAS COM IMPLANTES. ADAPTADO DE: (GEETHA ET AL., 2009).....	55
FIGURA 12. INTERFACE DA SUPERFÍCIE METÁLICA COM O AMBIENTE BIOLÓGICO, NO QUAL O METAL É RECOBERTO POR UMA CAMADA DE ÓXIDO NATIVO, SEGUIDO DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS (BIOFILME) PELO QUAL OS ÍONS METÁLICOS PODEM PASSAR PARA A SOLUÇÃO. ADAPTADO DE: (YASZEMSKI, 2003).....	59
FIGURA 13. SISTEMA MONTADO PARA A ANÁLISE DE CORROSÃO (A), CÉLULA ELETROQUÍMICA EM DESTAQUE (B) E PROTOCOLO DE CORROSÃO EMPREGADO (C), NO QUAL OCP INDICA O POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO, EIS A ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA E PD ENSAIO DE POTENCIODINÂMICA.....	70
FIGURA 14. SISTEMA MONTADO PARA ENSAIOS DE TRIBOCORROSÃO (A), CÉLULA ELETROQUÍMICA E BOLA DE ALUMINA EM DESTAQUE (B) E PROTOCOLO DE TRIBOCORROSÃO EMPREGADO (C).	71
FIGURA 15. ESPECTRO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DOS FILMES DE TiO ₂ , SENDO OBSERVADA A PRESENÇA DA FASE RUTILO.	84
FIGURA 16. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE (A) E DA SEÇÃO TRANSVERSAL (B) PARA OS FILMES DE TiO ₂	85
FIGURA 17. ESPECTRO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DOS FILMES DE ZnO, SENDO OBSERVADA A PRESENÇA DA FASE WURTZITA.....	87
FIGURA 18. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE (A) E DA SEÇÃO TRANSVERSAL (B) PARA OS FILMES DE ZnO.....	88
FIGURA 19. ESPECTRO SURVEY DE XPS PARA AS AMOSTRAS DE TiO ₂ (A) FUNCIONALIZADAS, E ESPECTRO DE ALTA RESOLUÇÃO DO O 1s PARA O FILME DE TiO ₂ (B).....	91
FIGURA 20. ESPECTROS DE XPS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA C 1s (A), N 1s (B) E O 1s (C) DO APTMS SOBRE O FILME DE TiO ₂	92
FIGURA 21. ESPECTRO DE XPS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA O C 1s (A) E N 1s (B) DA MOLÉCULA APPA SOBRE TiO ₂ . UMA COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE O 1s DO TiO ₂ COM E SEM FUNCIONALIZAÇÃO É MOSTRADA EM (C).	93
FIGURA 22. ESPECTROS DE XPS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA C 1s (A), E S 2p (B) DA AMOSTRA DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM MPA.	95

FIGURA 23. ESPECTRO DE XPS DE ALTA RESOLUÇÃO PARA O C 1s (A) E O 1s (B) DA MOLÉCULA PEG SOBRE TiO ₂ . UMA COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE Ti 2P DO TiO ₂ COM E SEM FUNCIONALIZAÇÃO É MOSTRADA EM (C).	96
FIGURA 24. ESPECTRO <i>SURVEY</i> DE XPS PARA AS AMOSTRAS DE ZNO (A) FUNCIONALIZADAS, E ESPECTRO DE ALTA RESOLUÇÃO DO O 1s PARA O FILME DE ZNO (B).	97
FIGURA 25. ESPECTRO DE XPS DE ALTA RESOLUÇÃO DO C 1s (A) E O 1s (B) PARA OS FILMES DE ZNO FUNCIONALIZADOS COM APPA, APTMS, MPA E PEG.	99
FIGURA 26. ESPECTROS DE ALTA RESOLUÇÃO DE N 1s PARA AS SUPERFÍCIES ZNO FUNCIONALIZADAS COM MOLÉCULAS DE APPA E APTMS.	100
FIGURA 27. IMAGENS DE AFM PARA AS AMOSTRAS DE Ti (A), TiO ₂ (B), TiO ₂ APPA (C), TiO ₂ APTMS (D), TiO ₂ MPA (E) E TiO ₂ PEG (F). É POSSÍVEL OBSERVAR A FORMAÇÃO DE MULTICAMADAS PARA APTMS E PEG.	101
FIGURA 28. MÉDIA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL PARA AS AMOSTRAS DE TiO ₂ ANALISADAS.	102
FIGURA 29. MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO (A) E ENERGIA DA SUPERFÍCIE (B) PARA AS AMOSTRAS CONTROLE (Ti E TiO ₂) E PARA AS AMOSTRAS FUNCIONALIZADAS, INDICANDO UMA MAIOR MOLHABILIDADE, EXCETO PARA A AMOSTRA APTMS, E UM AUMENTO DA ENERGIA DE SUPERFÍCIE PARA AS SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS.	104
FIGURA 30. IMAGENS DE AFM PARA AS AMOSTRAS DE Ti (A), ZNO (B), ZNO APPA (C), ZNO APTMS (D), ZNO MPA (E) E ZNO PEG (F).	107
FIGURA 31. MÉDIA DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL PARA AS AMOSTRAS DE ZNO ANALISADAS.	108
FIGURA 32. ÂNGULO DE CONTATO DA ÁGUA (A) E ENERGIA DE SUPERFÍCIE (B) MEDIDAS PARA AS AMOSTRAS CONTROLE (Ti E ZNO) E AS AMOSTRAS DE ZNO FUNCIONALIZADAS.	109
FIGURA 33. POSSÍVEL MODELO ESQUEMÁTICO DE ADESÃO PARA AS MOLÉCULAS BIFUNCIONAIS APTMS (A), APPA (B), MPA (C) E PEG (D) NA SUPERFÍCIE TiO ₂ . O APTMS ADERIU À SUPERFÍCIE POR GRUPOS SILANO QUE REAGIRAM RAPIDAMENTE POR CONDENSAÇÃO COM A SUPERFÍCIE E GRUPOS SILANÓIS VIZINHOS, RESULTANDO EM MULTICAMADAS NÃO HOMOGÊNEAS E DESORDENADAS. AS MOLÉCULAS DE APPA SE LIGARAM A SUPERFÍCIE PREFERENCIALMENTE ATRAVÉS DO GRUPO COOH, DE FORMA MONO OU BIDENTADA FORMANDO MONO- OU MULTI-CAMADAS. A ADESÃO AO MPA OCORRE PELO GRUPO MERCAPTO QUE PODE	

FORMAR MONO- OU MULTI-CAMADAS. NO CASO DE PEG, ESTAS MOLÉCULAS FORMAM <i>CROSSLINKING</i> ENTRE SI POR MEIO DE POLIMERIZAÇÃO, FORMANDO MULTICAMADAS.....	112
FIGURA 34. POSSÍVEL MECANISMO DE ADESÃO PARA AS MOLÉCULAS BIFUNCIONAIS NA SUPERFÍCIE ZNO. A MOLÉCULA APPA MOSTROU UMA ADESÃO PREFERENCIAL PELO SÍTIO ÁCIDO CARBOXÍLICO (A). A MOLÉCULA DE APTMS FORMOU GRUPOS Si-O-Si POR CONDENSAÇÃO COM OS GRUPOS -OH DA SUPERFÍCIE, SE LIGANDO ATRAVÉS DE GRUPOS SILANO (B). A MOLÉCULA DE MPA INDICOU UMA ADESÃO POR GRUPOS S-H QUE REAGIRAM COM OS GRUPOS -OH DA SUPERFÍCIE FORMANDO LIGAÇÕES S-O (C). A MOLÉCULA DE PEG ADERIU À SUPERFÍCIE POR POLIMERIZAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA COM OS GRUPOS -OH DA SUPERFÍCIE (D).....	113
FIGURA 35. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA CONTROLE DE Ti FUNCIONALIZADA COM PEPTÍDEOS DA DMP1.	116
FIGURA 36. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA CONTROLE DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM PEPTÍDEOS DA DMP1.....	117
FIGURA 37. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM APPA E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	118
FIGURA 38. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM APTMS E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	119
FIGURA 39. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM MPA E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	120
FIGURA 40. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE TiO ₂ FUNCIONALIZADA COM PEG E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	121
FIGURA 41. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE ZNO E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	123
FIGURA 42. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE ZNO FUNCIONALIZADA COM APPA E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	124
FIGURA 43. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE ZNO FUNCIONALIZADA COM APTMS E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	125
FIGURA 44. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE ZNO FUNCIONALIZADA COM MPA E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	126

FIGURA 45. ESPECTROS DE XPS PARA A AMOSTRA DE ZNO FUNCIONALIZADA COM PEG E OS PEPTÍDEOS DA DMP1.....	127
FIGURA 46. IMAGEM DE AFM PARA AS SUPERFÍCIES DE Ti (A), TiO ₂ (B), TiO ₂ APPA (C), TiO ₂ APTMS (D), TiO ₂ MPA (E) E TiO ₂ PEG (F) FUNCIONALIZADAS COM OS PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DMP1.	129
FIGURA 47. IMAGENS DE ÂNGULO DE CONTATO DA ÁGUA PARA AS AMOSTRAS DE TiO ₂ BIO-FUNCIONALIZADAS ..	130
FIGURA 48. IMAGEM DE AFM PARA AS SUPERFÍCIES DE Ti (A), ZNO (B), ZNO APPA (C), ZNO APTMS (D), ZNO MPA (E) E ZNO PEG (F) FUNCIONALIZADAS COM OS PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DMP1.	132
FIGURA 49. IMAGENS DE ÂNGULO DE CONTATO DA ÁGUA PARA AS AMOSTRAS DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS ...	133
FIGURA 50. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL PARA CÉLULAS hMSC-GFP CULTIVADAS SOBRE AS AMOSTRAS DURANTE SETE DIAS.....	134
FIGURA 51. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS HUMANAS POR 1, 3 E 5 DIAS.	135
FIGURA 52. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS CRISTAIS DE FOSFATO DE CÁLCIO FORMADOS SOBRE AS DIFERENTES SUPERFÍCIES ANALISADAS.....	139
FIGURA 53. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO PARA O MECANISMO DE CRESCIMENTO DOS CRISTAIS DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	140
FIGURA 54. EXPRESSÃO GÊNICA EM MEIO OSTEOGÊNICO PARA AS AMOSTRAS DE TiO ₂ BIO-FUNCIONALIZADAS.	143
FIGURA 55. EXPRESSÃO GÊNICA EM MEIO OSTEOGÊNICO PARA AS AMOSTRAS DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS..	144
FIGURA 56. RESULTADOS DOS TESTES DE CORROSÃO: OCP (A), EIS NYQUIST (B), EIS BODE (C), ÂNGULO DE FASE (D), CURVAS DE POLARIZAÇÃO (E) E VALORES DA DENSIDADE DE CORRENTE DE CORROSÃO (I_{CORR}) E DO POTENCIAL DE CORROSÃO (E_{CORR}) (F).....	148
FIGURA 57. CIRCUITOS EQUIVALENTES PARA AS AMOSTRAS Ti (A), Ti P (B), TiO ₂ (C), TiO ₂ P (D) E TiO ₂ APPA P OU TiO ₂ MPA P (E) UTILIZADOS PARA ESTIMAR A CAPACITÂNCIA TOTAL E A RESISTÊNCIA TOTAL DE CADA SISTEMA.	151
FIGURA 58. POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO (OCP) PARA AS AMOSTRAS DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS.....	153
FIGURA 59. GRÁFICOS DE IMPEDÂNCIA POR BODE (A) E ÂNGULO DE FASE (B) PARA AS AMOSTRAS DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS.....	154

FIGURA 60. CIRCUITO EQUIVALENTE COM UMA CONSTANTE DE TEMPO PARA Ti E Ti P (A). UM CIRCUITO EQUIVALENTE COM DUAS CONSTANTES DE TEMPO É APRESENTADO PARA ZNO, ZNO P, ZNO APPA P E ZNO MPA P (B).....	155
FIGURA 61. POTENCIAL DE CORROSÃO (E_{CORR}) E TAXA DE CORROSÃO (I_{CORR}) PARA AS AMOSTRAS DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS.....	158
FIGURA 62. EVOLUÇÃO DO POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO COM O TEMPO (A) E COEFICIENTE DE ATRITO (B) MEDIDOS DURANTE ENSAIOS DE TRIBOCORROSÃO PARA AS AMOSTRAS ANALISADAS.....	160
FIGURA 63. ANÁLISE DA MARCA DE DESGASTE APÓS TRIBOCORROSÃO DAS AMOSTRAS DE Ti (A), Ti P (B), TiO ₂ (C), TiO ₂ P (D), TiO ₂ APPA P (E) E TiO ₂ MPA P (F).....	162
FIGURA 64. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE TRIBOCORROSÃO QUE OCORREM NAS SUPERFÍCIES TESTADAS NÃO FUNCIONALIZADAS E BIO-FUNCIONALIZADAS: Ti (A), TiO ₂ (B), Ti P (C), TiO ₂ P, TiO ₂ APPA P E TiO ₂ MPA P (D).....	164

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE TITÂNIO COMERCIALMENTE PURO (ASTM F67) E DA LIGA TI-6AL-4V (ASTM 13608).	28
TABELA 2. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS NO PLASMA SANGUÍNEO E NO FLUIDO EXTRACELULAR.	57
TABELA 3. AMOSTRAS FUNCIONALIZADAS COM A MISTURA DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA DMP1.	66
TABELA 4. RAZÃO ATÔMICA DE CA/P ANALISADA POR EDS.	137
TABELA 5. PARÂMETROS OBTIDOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS CIRCUITOS EQUIVALENTES DOS DADOS DE EIS PARA RESISTÊNCIA TOTAL (RT), CAPACITÂNCIA TOTAL (CT) E VALOR DE χ^2 REFERENTE AO MELHOR AJUSTE ALCANÇADO.	151
TABELA 6. PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS EXTRAÍDOS DOS DADOS DE IMPEDÂNCIA PARA AS AMOSTRAS DE CONTROLE E DE ZNO BIO-FUNCIONALIZADAS.	156

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

Ti CP4: titânio comercialmente puro grau IV

HC: hexagonal compacto

CCC: cúbico de corpo centrado

ZnO: óxido de zinco

TiO₂: dióxido de titânio

Pcz: ponto de carga zero

SAMs: camadas auto-organizadas

APPA: ácido 3-(4-aminofenil) propiônico

APTMS: (3-aminopropil) trimetoxisilano

MPA: ácido 3-mercaptopropiônico

PEG: polietileno glicol

DMP1: proteína da matriz dentária 1

hMSC-GFP: células mesenquimais humanas contendo o gene da proteína fluorescente verde

MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]

HA: hidroxiapatita

OCP: potencial de circuito aberto

EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica

PD: potenciodinâmica.

Sumário

1. Introdução e Motivação	23
2. Fundamentação Teórica.....	25
2.1 A utilização de titânio e suas ligas em biomateriais.....	27
2.2 Óxidos metálicos	30
2.2.1 Dióxido de titânio	30
2.2.2 Óxido de zinco.....	35
2.3 Funcionalização de óxidos metálicos com moléculas orgânicas	38
2.3.1 Silano	39
2.3.2 Ácido carboxílico	42
2.3.3 Tiol.....	44
2.3.4 Amina	45
2.3.5 Álcool.....	46
2.4 Funcionalização com biomoléculas	47
2.5 Interações das células com implantes.....	54
2.6 Corrosão e tribocorrosão em biomateriais.....	56
2.7 Desafios atuais	59
3. Objetivo	61
4. Plano de Trabalho	61
5. Materiais e Métodos	62

5.1 Síntese dos óxidos metálicos	62
5.2 Preparação dos substratos metálicos.....	63
5.3 Deposição dos óxidos metálicos	64
5.4 Funcionalização dos óxidos com moléculas orgânicas	64
5.5 Funcionalização com biomoléculas	66
5.6 Testes de adesão e viabilidade celular.....	67
5.7 Testes de mineralização.....	68
5.8 Testes de diferenciação com células mesenquimais humanas	68
5.9 Ensaio de corrosão	69
5.10 Ensaio de tribocorrosão.....	70
5.11 Difração de Raios X.....	72
5.12 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	74
5.13 Microscopia de Força Atômica	75
5.14 Microscopia Óptica Confocal	76
5.15 Ângulo de Contato e Energia de Superfície	77
5.16 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X	78
5.17 Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência.....	79
5.18 Ensaio de proliferação e viabilidade celular	80
5.19 Reação em Cadeia da Polimerase	81
6. Resultados e Discussão	83

6.1 Caracterização dos óxidos metálicos	83
6.2 Propriedades físico-químicas dos óxidos metálicos funcionalizados.....	89
6.3 Funcionalização com peptídeos derivados da proteína da matriz dentária 1 (DMP1)	114
6.4 Adesão e proliferação celular	133
6.5 Resposta osteoindutiva	136
6.6 Propriedades eletroquímicas e mecânicas	145
7. Implicações Clínicas	166
8. Conclusões.....	167
9. Lista de Publicações.....	170
10. Bibliografia.....	171

1. Introdução e Motivação

No corpo humano existe um grupo especial de materiais orgânicos mineralizados constituído por osso, cemento, dentina e esmalte, o qual é conhecido como tecido conjuntivo mineralizado. Os ossos fornecem apoio e proteção para órgãos vitais e atuam em conjunto com músculos esqueléticos para realizar os movimentos corporais. Os tecidos mineralizados do dente permitem que o mesmo resista a uma grande quantidade de estresse, à pressão da força mastigatória, à mudança de temperatura e variação de pH. Além disso, os dentes estão associados com a estética e autoestima dos indivíduos. Estes tecidos mineralizados do corpo humano são propensos a lesões devido a acidentes e doenças, além disso, no caso dos dentes, os danos podem ser causados por falta de higiene bucal. Quando o tecido não pode ser recuperado, a fixação interna, externa ou a substituição do tecido danificado é parte do tratamento. O material implantado tem por objetivo restaurar a função do tecido vivo natural, desta forma, uma alta biocompatibilidade do implante é importante. Os materiais são classificados como biocompatíveis quando são capazes de desempenhar uma resposta apropriada numa determinada aplicação com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos (RATNER et al., 2013).

Os biomateriais metálicos, como o titânio, possuem uma combinação de propriedades tal qual flexibilidade, ductilidade, resistência à corrosão e biocompatibilidade necessárias para aplicações que requerem suporte de carga, sendo bastante utilizados em implantes dentários, de joelho e de quadril. Nos Estados Unidos, mais de três milhões de pessoas possuem implantes dentários, e este número cresce

em torno de 500.000 por ano (VILLANUEVA et al., 2017). Com relação aos implantes de joelho e quadril, o número de dispositivos fabricados em 2002 foi em torno de 250.000 para cada um dos tipos de implante nos EUA (RATNER et al., 2013). Devido principalmente ao aumento da expectativa de vida, o campo de biomateriais está projetado para gerar cerca de 80 bilhões de dólares até o final desta década (MANIVASAGAM; WEBSTER; SUBRAMANIAN, 2015). No entanto, apesar das boas características do *bulk*, ainda existe um número indesejável de falhas nos implantes. Com relação aos implantes dentários, o número de falhas encontra-se entre 1 e 20% (ALVES et al., 2017). A periimplantite e a falta de osseointegração são considerados os principais fatores que levam à falha do implante, já a sobrecarga oclusal, estado clínico do paciente, tabagismo e as características do implante estão entre as outras causas de falha do implante dentário (KATE, PALASKAR, KAPOOR, 2016). Apesar desta porcentagem não ser elevada, levando-se em consideração o número de implantes executados anualmente, existe milhares de indivíduos que necessitam realizar uma cirurgia de revisão, causando mais sofrimento ao paciente. Já nos implantes de joelho e quadril as principais causas de falha são o afrouxamento do mesmo e infecção. Esses fatores são responsáveis por 40 a 45% dos casos de cirurgia de revisão para implantes de joelho e 35% das cirurgias de revisão de implantes de quadril (TOBIN, 2017). Além disso, estes implantes ortopédicos possuem um tempo de vida em torno de 10 a 15 anos, necessitando de uma nova operação e troca do implante após este período.

A fim de superar estes problemas, melhorias podem ser alcançadas através do desenvolvimento de biomateriais onde o *bulk* e a superfície são independentemente alterados. A função do *bulk* em implantes é fornecer sustentação e resistir ao estresse mecânico criado nas regiões em que serão implantados. Por outro lado, as

propriedades de superfície do biomaterial podem ser modificadas de acordo com as características biológicas do meio onde o implante será colocado, melhorando a biocompatibilidade, bioatividade e osseointegração do mesmo. O processo de osseointegração envolve uma cascata de eventos biológicos que são diretamente ou indiretamente afetados pela físico-química da superfície do material. Portanto, uma maior atenção deve ser dada à superfície do biomaterial, uma vez que a sua reação com o tecido hospedeiro é normalmente decisiva na implantação.

Dessa forma a proposta deste trabalho é modificar a superfície do titânio metálico com óxidos metálicos nanoestruturados (TiO_2 ou ZnO) e funcionalizar a superfície destes óxidos com moléculas orgânicas bifuncionais e biomoléculas a fim de investigar as propriedades físico-químicas, a biocompatibilidade, a resistência à corrosão e à tribocorrosão destes materiais.

2. Fundamentação Teórica

Os implantes metálicos têm sido utilizados de várias formas desde que Lane introduziu uma placa metálica de aço para fixação óssea em 1895 (LANE, 1895). Nos anos subsequentes Lambotte (1909) e Sherman (1912) apresentaram as suas versões para placa de fixação óssea interna. Em especial, destaca-se o trabalho de Sherman que desenvolveu o primeiro metal especificamente para uso humano, conhecido como "Sherman Vanadium Steel" (UHTHOFF; POITRAS; BACKMAN, 2006; YASZEMSKI, 2003). Contudo, estes implantes foram abandonados devido a problemas com elevada corrosão e resistência insuficiente. Ao longo dos anos, novos materiais foram desenvolvidos com propriedades melhoradas, como maior resistência à fratura, conferindo um melhor desempenho do implante em situações de suporte de carga.

Outra vantagem de metais e ligas é a relativa facilidade de fabricação e moldagem utilizando técnicas bem estabelecidas e amplamente disponíveis, como fundição, forjamento e usinagem. No entanto, a biocompatibilidade de metais e ligas continua sendo uma preocupação porque eles podem corroer em contato com os fluidos biológicos e liberar partículas metálicas citotóxicas, resultando em efeitos indesejáveis. Desta forma, a fim de melhorar a biocompatibilidade dos implantes e diminuir o desgaste e a corrosão, a modificação superficial dos implantes metálicos tem sido bastante empregada (SILVA-BERMEDEZ; RODIL, 2013; YASZEMSKI, 2003). A Figura 1 resume as propriedades de superfície que governam o comportamento do material implantado.

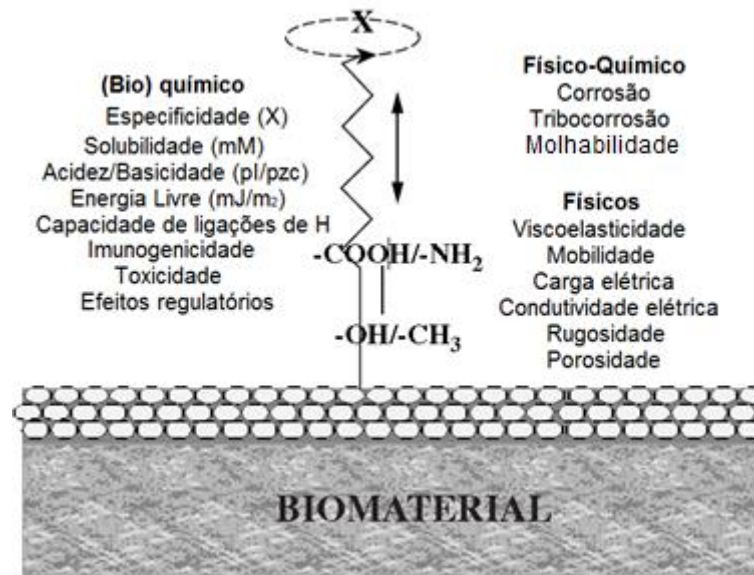


Figura 1. Propriedades da superfície do biomaterial que influenciam no comportamento do implante. Adaptado de: (ELLINGSEN; LYNGSTADAAS, 2003).

Assim, compreender as características do material, os processos de fabricação, os mecanismos de funcionalização para melhorar as propriedades do material, bem como seu processo de corrosão e de interação com o corpo humano é

crucial para garantir uma implantação eficiente, evitando a dor do paciente ou a necessidade de cirurgia de revisão.

2.1 A utilização de titânio e suas ligas em biomateriais

O titânio e suas ligas tornaram-se gradualmente os biomateriais mais utilizados na ortopedia e em implantes dentários devido à sua combinação de propriedades em termos de biocompatibilidade adequada, características mecânicas únicas e alta resistência à corrosão (ALVES et al., 2015). Estas características são resultantes de processos de modificação estrutural, de composição ou de topografia superficial as quais os materiais a base de titânio são submetidos. Os mais comumente empregados são o titânio comercialmente puro (Ti CP), e as ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (PANDIT; PLANELL; NAVARRO, 2013). O Ti CP possui quatro principais materiais classificados neste grupo pela ASTM International, American Society for Testing and Materials. Cada um destes materiais contém uma concentração que difere ligeiramente nos níveis de N, Fe, e O. A quantidade de C e H é especificada como sendo $\leq 0,10\%p$ e $\leq 0,015\%p$, respectivamente (MCCRACKEN, 1999; OSHIDA, 2007). A composição máxima dos elementos presentes nos principais tipos de titânio comercialmente puro e na liga Ti-6Al-4V pode ser verificada na Tabela 1.

Os implantes de Ti CP apresentam uma microestrutura de fase α hexagonal compacta (α -Ti, HC), porém, acima de 885°C ele pode existir na fase cúbica de corpo centrado (β -Ti, CCC). A adição de elementos intersticiais (α -estabilizadores) ou elementos de liga (β -estabilizadores) confere uma mudança entre as fases cristalinas por aquecimento ou resfriamento do material (CORDEIRO; BARÃO, 2017).

Os elementos intersticiais dissolvem-se na matriz de titânio levando a uma pequena variação da temperatura de transformação da fase cristalina HC do titânio puro, quando aquecido, para a estrutura CCC; e também da fase CCC para HC após o arrefecimento, conforme indicado no diagrama de fases do titânio na Figura 2.

Tabela 1. Composição química dos principais tipos de titânio comercialmente puro (ASTM F67) e da liga Ti-6Al-4V (ASTM 13608).

Elemento	Composição (% massa/massa)				
	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Ti-6Al-4V
N	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05
C	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
H	0,015	0,015	0,015	0,015	0,012
Fe	0,20	0,30	0,30	0,50	0,25
O	0,18	0,25	0,35	0,40	0,13
Al	-	-	-	-	5,5 - 6,5
V	-	-	-	-	3,5 - 4,5
Ti	99,5	99,3	99,2	99,0	88,5 - 90,4

Fonte: ASTM F6713

Os elementos intersticiais C, O, Al e N são classificados como α -estabilizadores, e geram o endurecimento do metal utilizando fortalecimento de solução sólida intersticial. Nas soluções sólidas intersticiais o elemento de liga (soluto) impõe tensões e deformações no reticulado ao redor destes átomos. A interação entre estes campos de tensão e as discordâncias provoca, conseqüentemente, uma restrição no movimento das discordâncias, endurecendo a liga. No caso, o nitrogênio apresenta um

efeito de fortalecimento duas vezes maior quando comparado ao carbono e ao oxigênio (OSHIDA, 2007). A adição de elementos β -estabilizadores, tal como os metais de transição V, Mo e Nb, proporcionam maior friabilidade ao material. O Ti CP possui uma maior resistência à corrosão quando comparado às ligas de titânio. Com relação às ligas de titânio, ligas de titânio-alfa possuem propriedades como resistência ao calor e soldabilidade superiores as ligas β , porém estas apresentam uma resistência mecânica e moldabilidade inferior (DEE, 2000). Além destes elementos de liga apresentados, Fe, Cu, Ni, Si são geralmente adicionados às ligas de Ti a fim de melhorar a resistência mecânica, estabilidade química, moldabilidade ou refinação de grãos (PARK; LAKES, 2007).

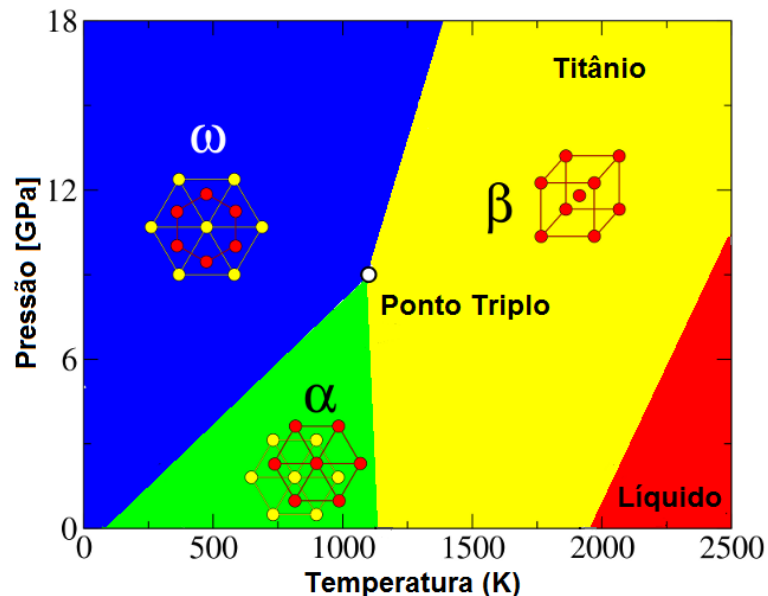


Figura 2. Diagrama de fases de equilíbrio do Ti em função da pressão e temperatura. No ponto triplo ocorre a existência das três fases (α , β e ω), sendo que os biomateriais são formados principalmente pelas duas primeiras fases. Adaptado de (HENNIG et al., 2008).

2.2 Óxidos metálicos

O ambiente biológico do corpo humano em que o implante é inserido é considerado corrosivo para materiais metálicos. Muitos implantes constituídos por metal dependem da formação de filmes de óxido passivo amorfo ou de um recobrimento artificial com óxido metálico que os protege da corrosão e mantém uma boa resposta biológica do implante. A seguir são descritas as propriedades de dois óxidos metálicos empregados no recobrimento de Ti para aplicação em biomateriais: o dióxido de titânio e o óxido de zinco. O dióxido de titânio pode ocorrer naturalmente sobre a superfície do implante de Ti, ou assim como o óxido de zinco, é possível depositá-lo sobre a superfície de Ti com propriedades controladas.

2.2.1 Dióxido de titânio

O Ti CP e suas ligas apresentam a formação espontânea de uma camada de óxido nativa, cuja composição consiste em dióxido de titânio (TiO_2), com espessura entre 1,8 e 17 nm, o qual previne a corrosão do metal (SUL et al., 2002). Esta camada passiva de TiO_2 é responsável pela excelente biocompatibilidade dos implantes de titânio, devido ao baixo nível de condutividade eletrônica, alta resistência à corrosão e estabilidade termodinâmica em vários pHs fisiológicos (ANANTH et al., 2015; PARK; LAKES, 2007; RATNER et al., 2013; SUL et al., 2002). O óxido nativo é amorfo e não apresenta um controle da camada formada em termos de estrutura, morfologia e composição, as quais estão intimamente relacionadas com as propriedades de biocompatibilidade do material (SUNDELL et al., 2017). A fim de se obter um maior domínio sobre as características do filme é possível crescer a camada de óxido otimizando o tipo de síntese, deposição, espessura, porosidade, tamanho da partícula,

temperatura de tratamento térmico e fase cristalina conforme as propriedades finais desejadas (SUNDELL et al., 2017).

O TiO_2 pode ser encontrado nas fases cristalinas anatase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e brookita (ortorrômbica), cuja formação depende do procedimento de síntese e das condições de processamento empregadas. As fases cristalinas do dióxido de titânio mais importantes para aplicação em biomateriais são rutilo e anatase (Figura 3), devido à considerável melhora na capacidade de osseointegração dos implantes (PATTANAIK; PAWAR; PATTANAIK, 2012). Ambas as estruturas cristalinas possuem arranjos atômicos favoráveis ao crescimento de cristais de apatita biologicamente ativos, ou seja, similares à estrutura óssea (ROSSI et al., 2007; UCHIDA et al., 2003), o que não é observado na camada amorfa natural de TiO_2 (WANG et al., 2000). No entanto, a fase cristalina anatase, quando comparada à rutilo, proporciona melhores condições de nucleação da hidroxiapatita em implantes de Ti, o que está relacionado aos parâmetros de rede cristalina da anatase e da hidroxiapatita (DRNOVŠEK et al., 2012; VERISSIMO et al., 2014). Porém, uma das grandes vantagens da fase rutilo com aplicação em biomateriais é o aumento da resistência à tribocorrosão do implante de Ti sem comprometer as propriedades biológicas da superfície (ALVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Esta característica é observada devido à elevada dureza do TiO_2 rutilo, o qual apresenta um maior empacotamento atômico em comparação com a fase anatase (KHALIFA; LIN; ISMAT SHAH, 2010).

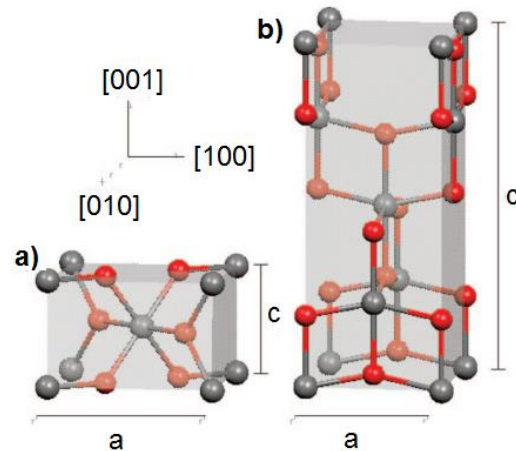
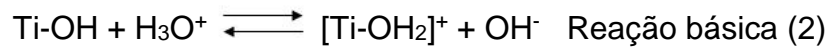
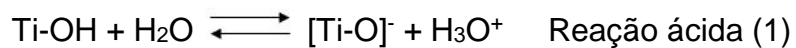


Figura 3. Cella unitária tetragonal das fases rutilo (a) e anatase (b) do dióxido de titânio. As esferas vermelhas representam o elemento oxigênio e as cinzas o titânio. Adaptado de (LUSCHTINETZ et al., 2009)

Outros fatores que também apresentam grande influência com relação à resposta biológica do dióxido de titânio é a rugosidade superficial, a morfologia e o tamanho das partículas (GITTENS et al., 2014; THAKRAL et al., 2014). Existe uma tendência atual de desenvolver materiais biomédicos com micro ou nano-topografia. Materiais nanoestruturados desempenham um papel fundamental na pesquisa em ortopedia e dentística, pois o osso é composto de fibrilas de colágeno nanoestruturadas e nanocristais de apatita (WU et al., 2014). Assim, a incorporação de características nano-topográficas que imitam a organização do osso é uma área de pesquisa emergente na engenharia de tecidos, sendo que nanomateriais de TiO₂ têm sido empregados como *scaffolds* a fim de promover a regeneração óssea (CHU et al., 2013; ZHAO et al., 2012). Dentre os tipos de nanomateriais de TiO₂ encontram-se nanopartículas, nanobastões, nanofolhas, nanofibras e nanotubos, os quais são obtidos por diferentes métodos de preparação, tal como processo sol-gel, hidrotermal ou anodização eletroquímica (KULKARNI et al., 2015). Uma estrutura composta por micro

ou nano-constituintes oferece uma topografia de superfície adequada para funções celulares, uma vez que a matriz extracelular natural pode ser mimetizada.

A superfície do dióxido de titânio reage rapidamente com a água presente no ar formando grupos hidroxila (-OH). Estes grupos -OH apresentam característica anfotérica, ou seja, exibem comportamento ácido e básico, conforme apresentado na reação a seguir:



Quando ocorre a reação ácida, há formação de carga negativa, enquanto a reação básica forma cargas positivas na superfície do óxido. Os dois tipos de íons hidroxila estão ligados de maneira diferente na superfície do TiO_2 (Figura 4), o hidróxido básico se liga com um cátion Ti e o hidróxido ácido se liga por dois cátion Ti levando a um aumento da polarização da superfície e transferência de elétron do átomo de oxigênio para o titânio (TEXTOR et al., 2001). Existe um pH de equilíbrio onde a carga aparente da superfície é nula, conhecido como ponto de carga zero (pcz), no qual a quantidade de cargas positivas e negativas encontra-se igual. Além disso, o pcz indica se o óxido possui propriedades ácidas ou básicas. No caso do TiO_2 rutilo o pcz é igual a 5,3, enquanto a fase anatase apresenta um valor de 6,2 (HANAWA, 2011). Isso indica que a superfície do TiO_2 na fase rutilo apresenta característica ácida em pH abaixo de 5,3 e básica em pH acima deste valor. Estes grupos hidroxila e a carga elétrica que eles geram na superfície do TiO_2 são extremamente importantes para interações com proteínas e conseqüente contato com as células. Além disso, os grupos hidroxila são tidos como sítios ativos para a imobilização com moléculas orgânicas, biomoléculas

(proteínas e peptídeos) e nucleação de cristais de apatita, melhorando a resposta biológica do material implantado (HONG et al., 2014; XU et al., 2015).

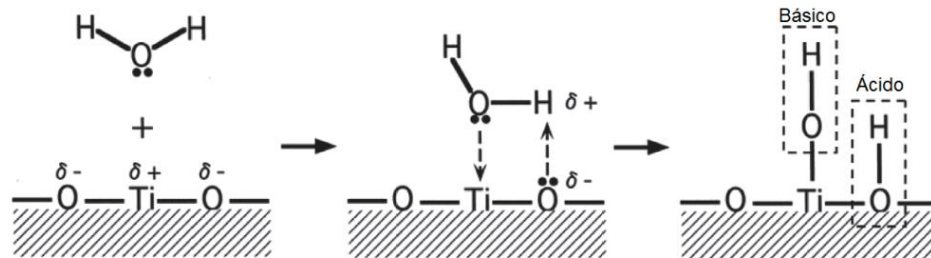


Figura 4. Processo de formação dos grupos hidroxila na superfície do TiO_2 , evidenciando dois diferentes tipos de interação entre o oxigênio e o titânio, o qual influencia nas propriedades do óxido. Adaptado de (HANAWA, 2011).

A combinação de propriedades do TiO_2 (resistência à corrosão, nanotopografia e presença de grupos hidroxila) aliada a características como boa estabilidade mecânica do Ti, torna o implante de titânio um dos únicos materiais da atualidade a exibir o processo de osseointegração. O termo osseointegração foi introduzido por Brånemark, que no ano de 1960 iniciou a análise da aplicação de implantes dentários em cachorros sem observar reações adversas significativas dos tecidos duros ou moles e, posteriormente, em 1965 deu início aos estudos em humanos no qual ressaltou um contato direto entre o osso e a superfície do implante em nível de ampliação microscópica (BRANEMARK, 1983; OSHIDA, 2007). Afirma-se atualmente que um implante é considerado osseointegrado quando não há movimento relativo progressivo entre o implante e o osso, com o qual o primeiro tem contato direto. Isso significa que na osseointegração existe um mecanismo de ancoragem pelo qual componentes não vitais podem ser incorporados ao tecido ósseo de modo a resistir às condições normais de carga a que o osso é submetido (SHANBHAG; RUBASH; JACOBS, 2005). Além da osseointegração os implantes de titânio modificados com

TiO₂ podem ser chamados de bioativos quando estimulam a formação óssea (osteogênese). No entanto, o sucesso da implantação é extremamente dependente, não apenas das características do material, mas também do procedimento clínico realizado, do organismo do paciente e dos cuidados do mesmo durante o período pós-implantação.

2.2.2 Óxido de zinco

Nanoestruturas de óxido de zinco, ZnO, têm atraído bastante interesse, pois apresentam aplicação em várias áreas do campo de biomateriais, como em sistemas de *drug-delivery*, em dispositivos ópticos e acústicos, assim como materiais baseados em suas propriedades bactericidas (ZHANG et al., 2016). O ZnO é considerado um dos óxidos metálicos seguros e aprovados para uso pela agência americana de regulamentação Food and Drug Administration (FDA) (BAKRUDEEN; SUGUNALAKSHMI; REDDY, 2015). A toxicidade de nanopartículas de ZnO em humanos é dependente da sua concentração, dissolução, e do pH do meio (SENAPATI; KUMAR, 2018), sendo que exposição crônica, acima de 300 mg/kg está associada à danos oxidativos no DNA (BAHADAR et al., 2016). Estas propriedades estão associadas à fase cristalina wurtzita das nanoestruturas de ZnO, na qual os cátions de zinco e os ânions de oxigênio estão arranjados com coordenação tetragonal.

Uma das principais características das nanoestruturas de ZnO é o fato destas exibirem propriedades piezelétricas (ZHAO; WANG; MAO, 2004). Um material é dito piezelétrico quando apresenta a capacidade de transformar energia mecânica em energia elétrica. Essas mesmas propriedades são encontradas nos ossos. O osso é

composto por nanopartículas de apatita combinado com fibrilas de colágeno. O colágeno apresenta um efeito piezelétrico no osso, de modo que quando submetidos a esforço (ao caminhar, por exemplo) os ossos apresentam diferenças de potencial, causando a circulação de uma pequena corrente elétrica que ativa a produção de células novas e aumenta a absorção de cálcio, resultando no remodelamento e regeneração óssea (BYSTROV et al., 2012; DENNING et al., 2014; LIRANI; LAZARETTI-CASTRO, 2005). Dessa maneira, as propriedades elétricas dos materiais são importantes em aplicações como marcapassos, bem como em implantes piezelétricos, uma vez que a inclusão de um elemento ativo piezelétrico no implante ósseo, como o ZnO, pode gerar corrente elétrica *in vivo* estimulando o crescimento do osso.

Um dos grandes problemas da falha da implantação está associado à infecção por bactérias, o que leva a uma nova cirurgia de remoção do implante. A incorporação de um material com atividade antibacteriana contribui para evitar tais falhas. Os materiais inorgânicos com atividade bactericida são estáveis por longos períodos, até mesmo sob condições de processamento do produto, além disso, são mais seguros e biocompatíveis com relação aos compostos orgânicos e antibióticos, uma vez que as bactérias adquirem resistência sobre estes em longo prazo. O óxido de zinco apresenta propriedade bactericida sobre luz UV, luz visível na região do azul ou até mesmo sem iluminação (JIANG et al., 2016; LUBART, 2012; SHARMA; AGARWAL; BALANI, 2016; WANG et al., 2009). O efeito bactericida do ZnO pode ocorrer de duas maneiras: sob irradiação de luz UV ou azul gerando espécies reativas de oxigênio; ou através da liberação de íons Zn^{+2} que se ligam com a membrana celular da bactéria. Na presença de radiação são geradas espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 , HO^{\bullet} e

O_2^- ; que danificam proteínas, DNA e lipídeos da bactéria causando sua morte (LUBART, 2012; WANG et al., 2009). Já a liberação de íons Zn^{+2} não necessita da presença de luz. Neste processo os íons Zn^{+2} penetram na membrana celular da bactéria reagindo com os grupos sulfidríla presentes na proteína da membrana celular. Isso provoca um dano na atividade de síntese enzimática do microrganismo, restringindo sua divisão celular e causando sua morte (SHARMA; AGARWAL; BALANI, 2016).

As nanopartículas de ZnO apresentam emissão na região do azul, do UV próximo e também podem apresentar emissão na região do verde devido às vacâncias de oxigênio (HONG et al., 2015; ZHANG et al., 2013). Estas características podem ser ajustadas dopando as nanopartículas de ZnO com elementos específicos ou funcionalizando com moléculas orgânicas, peptídeos ou proteínas. A superfície de ZnO é rica em grupos hidroxila (NOEI et al., 2008), podendo ser funcionalizada com diferentes tipos de moléculas orgânicas ou biomoléculas, o que influencia nas propriedades de fluorescência das nanopartículas, sendo possível empregá-las em imageamento celular (ZHANG et al., 2013). Além disso, a funcionalização da superfície com biomoléculas melhora a biocompatibilidade do material, uma vez que a etapa de adsorção de proteínas após a implantação é uma etapa crucial na integração de um implante no ambiente biológico, pois as proteínas são responsáveis por induzir as subsequentes etapas de adesão e proliferação celular (ABDOLMALEKI; MALLAKPOUR; BORANDEH, 2011; WANG et al., 2015).

2.3 Funcionalização de óxidos metálicos com moléculas orgânicas

A modificação ou funcionalização das superfícies de óxidos metálicos é bastante relevante na área de biomateriais uma vez que esta é capaz de controlar a molhabilidade do material (PESEK; MATYSKA, 1997), a energia de superfície (RYU et al., 2005), a adesão de proteínas (LIU; CHU; DING, 2010), a liberação de drogas (SKORB; ANDREEVA, 2013) e a interação das células com o implante (SAFONOV et al., 2014).

As superfícies dos óxidos metálicos são normalmente terminadas por grupos hidroxila tornando possível a ligação com outras moléculas por meio de reações de condensação (PUJARI et al., 2014). Diversos grupos funcionais reagem com a hidroxila terminal, levando à formação de camadas conhecidas como auto-organizadas, ou SAM's, do inglês *self assembled monolayers*. Através de interações químicas específicas moléculas orgânicas podem se organizar espontaneamente sobre vários tipos de superfície. Normalmente as moléculas possuem em uma de suas extremidades um grupo funcional que apresenta afinidade pela superfície a ser modificada. A adsorção destas moléculas é, portanto resultante da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, o qual apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003). A força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas (por exemplo, do tipo van der Waals) das cadeias longas ligadas ao grupo funcional. A seguir são descritos diferentes tipos de grupos funcionais capazes de interagir com a superfície de óxidos metálicos.

2.3.1 Silano

A utilização de alquilsilanos na funcionalização de óxidos metálicos é um dos métodos mais empregados para formação de monocamadas devido ao seu baixo custo, facilidade de deposição e estabilidade (RATNER; HOFFMAN, 2013). Sua fórmula química geral pode ser descrita como $R-SiX_3$, onde R é o grupo orgânico não hidrolisável e X é a parte hidrolisável. Os silanos são bifuncionais, o grupo não hidrolisável (por exemplo, metacrilato, vinil, isocianato) pode polimerizar com monômeros contendo ligações duplas; e o grupo hidrolisável, como metoxi (-O-CH₃) ou etoxi (-O-CH₂-CH₃), reage com a parte inorgânica que contém grupos hidroxilas (VALLITTU, 2012). Normalmente a reação de silanização é feita sobre superfícies hidroxiladas, podendo ser empregada em superfícies de vidro, silício, alumina, dióxido de titânio e vários outros óxidos metálicos ricos em grupos -OH (Figura 5).

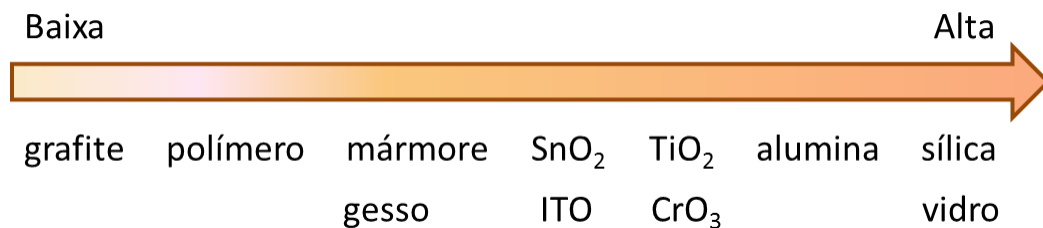


Figura 5. Eficácia da silanização em diferentes tipos de superfícies. Adaptado de: (PUJARI et al., 2014)

Uma das maiores vantagens da utilização de silanos é a formação rápida de uma ligação covalente entre o substrato e o grupo funcional da molécula orgânica. Esta ligação estabiliza a monocamada e permite que ocorram outras modificações sem que esta seja danificada (PUJARI et al., 2014). A quantidade de grupos hidrolisáveis é um parâmetro importante que determina a conformação da molécula. Trialcoxissilanos, ou

seja, silanos que contêm três grupos alcóxido, são mais estáveis, porém apresentam característica higroscópica. Silanos com apenas um grupo alcóxido, por sua vez, são os mais hidrofóbicos e menos estáveis (MATINLINNA, 2014). Assim, devem-se levar em consideração as características desejáveis da superfície a ser modificada durante a escolha da molécula com grupo silano.

A funcionalização com silanos pode ser realizada por dois meios, via reação em solução ou a partir da fase vapor. A modificação por fase vapor requer horas ou dias de exposição do substrato ao silano, sob altas temperaturas (50-120 °C), e ainda assim é difícil obter monocamadas estáveis (PUJARI et al., 2014). Por outro lado, a deposição via solução pode ser realizada à temperatura ambiente, sendo necessário controlar a viscosidade e polaridade do solvente, além da quantidade de água presente no meio líquido. A concentração de água na solução é um fator determinante para a formação das monocamadas. Um teor de água muito baixo, leva a formação de monocamadas incompletas; contudo, uma quantidade elevada resulta na polimerização do silano e no aumento da rugosidade superficial (HAENSCH; HOEPPENER; SCHUBERT, 2010).

O mecanismo da reação do grupo silano com os grupos hidroxila da superfície dos óxidos pode ser descrito conforme a Figura 6. No primeiro passo, os organosilanos são hidrolisados por moléculas de água, as quais já estão adsorvidas na superfície de óxido metálico, formando o hidroxissilano correspondente (tipicamente RSi(OH)_3) na Etapa 1. No segundo passo ocorre uma ordenação, estes hidroxissilanos são ligados à superfície do óxido metálico por ligações de hidrogênio (Etapa 2). Isto leva à agregação das moléculas por meio de forças de van der Waals, ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Por fim, ocorre condensação entre os grupos Si-OH

formando ligações Si-O-Si (Etapa 3). A reação não ocorre apenas com os grupos -OH da superfície, mas também entre grupos silanol vizinhos. Assim, forma-se uma rede reticulada entre os silanos que também contém inúmeras ligações covalentes com o substrato (PUJARI et al., 2014).

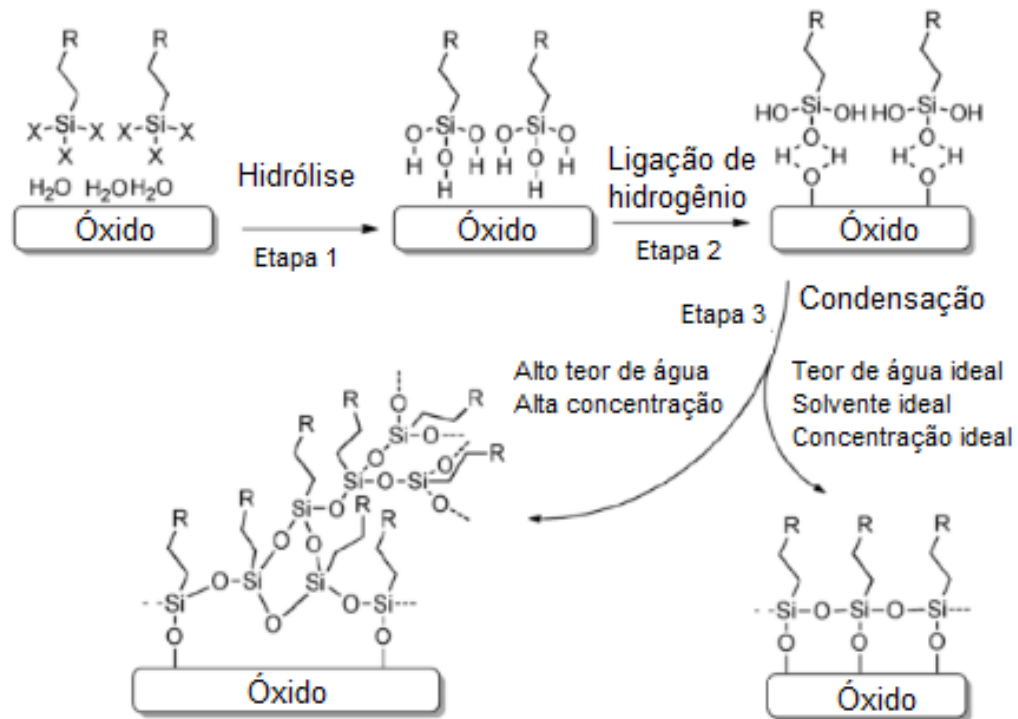


Figura 6. Mecanismo da formação de monocamadas pelos silanos em três etapas. Adaptado de: (PUJARI et al., 2014).

Dentre as aplicações das superfícies modificadas com silanos, a molécula APTES ((3-aminopropil)trietoxissilano), a qual contém além do grupo silano um grupo amino, é bastante empregada sobre óxidos metálicos a fim de promover a adesão de proteínas e crescimento celular em implantes biológicos, atuando como uma molécula espaçadora (AWSIUK et al., 2013; SONG; HILDEBRAND; SCHMUKI, 2010; SZILI et al., 2009). Outros silanos bifuncionais contendo alcenos, ácidos carboxílicos e sulfetos têm sido empregados para adesão de biomoléculas (TANAKA et al., 2013; THAKURTA;

SUBRAMANIAN, 2011), como agentes bactericidas e fungicidas (OOSTERHOF et al., 2006; YOSHINO et al., 2011) e também em compósitos a fim de melhorar as propriedades mecânicas de materiais dentários (MITTAL, 2009).

2.3.2 Ácido carboxílico

Os ácidos carboxílicos são os compostos capazes de formar monocamadas auto-organizadas mais estudados devido à diversidade de materiais encontrados com este grupo funcional e também pelo fato dos ácidos carboxílicos serem ambientalmente aceitáveis, não causando danos à natureza. Existem três métodos mais frequentemente utilizados para aderir monocamadas de ácido carboxílico na superfície de óxidos metálicos, sendo eles: por imersão do substrato em solução aquosa, por Langmuir-Blodgett (LB) ou através da evaporação de moléculas orgânicas contendo o grupo ácido carboxílico (GARLAND et al., 2008; RAMAN et al., 2010). A rota de deposição via imersão do substrato em solução pode gerar monocamadas mais estáveis com o aquecimento da solução, ou através da geração de cargas na superfície do óxido (KIM et al., 2013; RAMAN; GAWALT, 2007).

A adesão dos ácidos carboxílicos com a superfície hidroxilada dos óxidos metálicos, como por exemplo, de TiO_2 , pode ocorrer de diversas maneiras, incluindo adsorção por interação eletrostática, por ligação de hidrogênio ou por adsorção química através de ligação monodentada entre o metal e o éster (carboxilatos); por interação bidentada ou por quelatação bidentada, conforme apresentado na Figura 7 (QU et al., 2010; WENG et al., 2003; WILLIAMS, 2010; YU; GONG, 2015). Os carboxilatos são um dos grupos reativos responsáveis pela imobilização covalente de moléculas biológicas

ativas (SLOW et al., 2006). O tipo de adesão preferencial será dependente da estrutura do óxido, da espessura do filme de óxido metálico, do tamanho da partícula, do tamanho da cadeia carbônica da molécula e das condições experimentais.

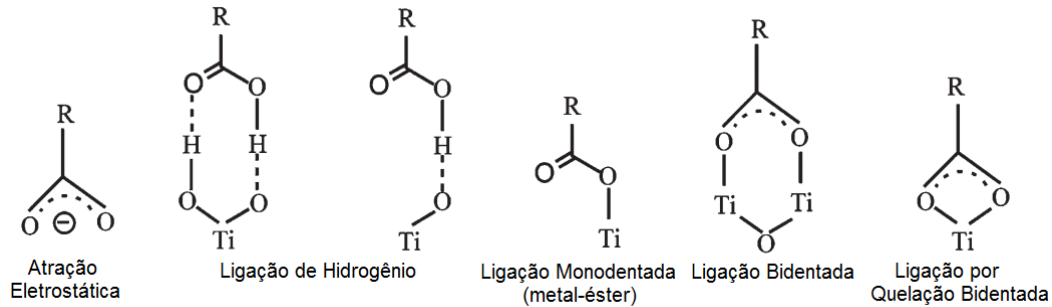
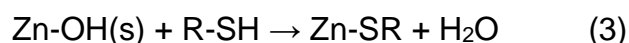


Figura 7. Possíveis meios de adesão de ácidos carboxílicos sobre a superfície de TiO_2 . Adaptado de: (QU et al., 2010).

A aplicação de superfícies funcionalizadas com ácido carboxílico é limitada pela instabilidade das ligações monodentadas em longo prazo, as quais podem sofrer hidrólise. A fim de aprimorar a estabilidade das monocamadas de ácido carboxílico, tem-se utilizado moléculas com dois ou três grupos carboxílicos funcionais, promovendo uma maior interação com a superfície do óxido (ALEXANDER, 2016; PUJARI et al., 2014). O ácido hialurônico, encontrado em diversos organismos, é um biopolímero também utilizado para modificar a superfície de óxidos metálicos como *scaffold* a fim de receber uma resposta celular positiva (RAJAN UNNITHAN et al., 2017; YANG et al., 2012). Além disso, os ácidos carboxílicos têm sido bastante empregados na funcionalização de polímeros para aplicação em biomateriais (BINAULD; STENZEL, 2013; DELAITTRE et al., 2012; SLOW et al., 2006), na fabricação de hidrogéis (HELEGSHABTAI et al., 2015; NGUYEN; ALSBERG, 2014; QIU; HU, 2013) e no campo da engenharia de tecidos (RAO; WINTER, 2009; SANTORO et al., 2016; VARAPRASAD et al., 2017).

2.3.3 Tiol

Superfícies de cobre, prata, platina e principalmente ouro podem adsorver moléculas de grupos funcionais tiol devido às fortes interações entre os átomos de enxofre e os da superfície destes materiais (WANG et al., 2016b). Alguns óxidos metálicos, como ZnO, são reconhecidos por adsorver enxofre, assim o grupo funcional da molécula de tiol pode facilmente aderir à superfície de ZnO formando uma monocamada auto organizada (SARAVANAN; BALASUBRAMANIAN, 2013; MULLINS; MCDONALD, 2008). O mecanismo de adesão entre o ZnO e as moléculas contendo o grupo tiol é dependente do tipo de estrutura do óxido (HALEVI; VOHS, 2005). Um dos possíveis mecanismos de reação propostos entre o ZnO e moléculas de tiol pode ser representado como:



Na reação 3, a superfície do óxido de zinco é composta por grupos hidroxila, de modo que as moléculas de tiol se ligam pelo enxofre diretamente aos átomos de zinco, e não ao oxigênio (SINGH et al., 2009). Além disso, as vacâncias de oxigênio da rede cristalina de ZnO permite a interação com orbitais de moléculas adsorventes, no caso dos tióis, formando ligações Zn-S (JAYALAKSHMI; GOPALAKRISHNAN; BALASUBRAMANIAN, 2013; JAYALAKSHMI; SARAVANAN; BALASUBRAMANIAN, 2013).

A funcionalização do dióxido de titânio com moléculas bifuncionais contendo grupo tiol e silano tem sido estudada com relação à adesão de proteínas, células e à sua citotoxicidade (FARIAS, 2009; LIU et al., 2009; THANH; GREEN, 2010). Os tióis

têm sido empregados também em biointerfaces de adsorção seletiva (HUANG et al., 2014); na modificação de superfícies bactericidas (BUCKHOLTZ et al., 2016; CHENG; CHANG; CHU, 2012); bem como na fabricação de hidrogéis para adsorção de proteínas, regeneração de tecidos e crescimento ósseo (GANTAR et al., 2016; KAZEMIRAD; HERIS; MONGEAU, 2016; SEO et al., 2012).

2.3.4 Amina

Aminas de cadeia linear têm sido mais empregadas no recobrimento de óxidos metálicos do que aminas aromáticas, pois caso o átomo de nitrogênio se encontre fora do anel aromático, o mesmo pode afetar a reatividade do grupo -NH_2 (OZALTIN et al., 2017; TAO; BERNASEK, 2012).

A funcionalização pode ser feita tanto por imersão em solução quanto por polimerização a plasma (WEN, 2015). O filme orgânico formado pelas aminas é mecanicamente fraco. A função orgânica amina da molécula pode formar uma ligação de hidrogênio com os grupos hidroxila da superfície. Espera-se também que a porção amina seja protonada por conta da interação com água. Tal protonação diminui a energia coesiva devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados. Especificamente para monocamadas em contato com o ar, entre 35-40% dos grupos NH_2 formam carbamatos devido à presença de CO_2 atmosférico dissolvido na camada de água adsorvida. Isto leva a uma reação rápida do CO_2 com a amina, formando alquilamônio e alquilcarbonatos, os quais possuem carga positiva e negativa, respectivamente, estabilizando a monocamada por interações fracas (PUJARI et al., 2014).

Por conta da fraca interação dos grupos $-NH_2$ com a superfície dos óxidos, a funcionalização é normalmente realizada com moléculas bifuncionais, contendo o grupo amino e outro grupo funcional, como silano ou ácido carboxílico. Dessa forma, é preferível que os grupos amino atuem como ponto de ancoragem de biomoléculas, e não da superfície do óxido, pois o grupo amino é um nucleófilo forte abundante em peptídeos e proteínas e que pode interagir com os ácidos carboxílicos destas biomoléculas (BRUNETTE et al., 2001). Outras aplicações em biomateriais dos grupos $-NH_2$ incluem sistemas de *drug delivery* (PATEL et al., 2016), superfícies bactericidas (CHEN et al., 2016) e adsorção seletiva de peptídeos e proteínas (SONG et al., 2016).

2.3.5 Álcool

Moléculas orgânicas contendo o grupo funcional álcool têm sido utilizadas para modificação de óxidos metálicos. As moléculas contendo grupos $-OH$ mais empregadas são polímeros hidrofílicos, como polivinil álcool (PVA) e polietileno glicol (PEG) (NGADIMAN et al., 2015; SANAEIFAR et al., 2017; SHALUMON et al., 2011). A imobilização destes polímeros em óxidos metálicos pode ocorrer por método químico através de imersão em solução, foto-imobilização ou por eletrodeposição (HANAWA, 2011; SANAEIFAR et al., 2017). A reação entre os grupos funcionais álcoois e a superfície dos óxidos hidroxilados ocorre da seguinte maneira: os grupos $M-OH$ na superfície do óxido metálico (onde M representa o elemento metálico) reagem com o grupo funcional $-OH$ e uma camada da molécula orgânica é criada através da ligação éster $M-O-C$ (ALCANTAR; AYDIL; ISRAELACHVILI, 2000). A interação dos álcoois com a superfície do óxido é fraca quando formada a temperatura ambiente, o aumento da

temperatura e o emprego de moléculas com mais de um ponto de ancoragem, leva à formação de camadas mais estáveis (PUJARI et al., 2014).

O polietileno glicol é um polímero não tóxico, não imunogênico, e bastante empregado como estratégia a fim de superar desvantagens associadas a alguns produtos biofarmacêuticos. A vantagem do PEG reside no fato deste possuir boa solubilidade em meio aquoso e orgânico, flexibilidade e alta capacidade de hidratação. O acoplamento covalente do PEG com outra molécula, por exemplo, uma proteína específica, recebe um termo próprio conhecido como PEGlação. A PEGlação altera as propriedades físico-químicas da biomolécula, como sua conformação, ligação eletrostática e hidrofobicidade, resultando em uma melhoria no comportamento farmacocinético do fármaco, por exemplo. É importante considerar a estrutura e a massa molecular dos PEGs, bem como o comportamento dos PEGs lineares e ramificados. PEGs com diferentes pesos moleculares têm demonstrado atividade biológica e biodisponibilidade do produto funcionalizado (VERONESE; MERO, 2008). O PEG modificado pode apresentar outros grupos funcionais (TANAKA et al., 2007), como amina ou tiol, contribuindo para seu amplo uso na pesquisa biomédica, dentre os quais se destacam a administração de fármacos, engenharia de tecidos, biosensores (TAIWAD; BODADE; CHAUDHARI, 2014), *scaffolds* (PULEO; BIZIOS, 2009) e proteção de implantes metálicos contra corrosão (MÎNDROIU et al., 2013).

2.4 Funcionalização com biomoléculas

Um dos primeiros eventos que ocorrem imediatamente após um material entrar em contato com o meio biológico é a adsorção de moléculas de água, íons e

proteínas (ANBAZHAGAN et al., 2016; RABE; VERDES; SEEGER, 2011). A configuração das proteínas adsorvidas impulsiona a subsequente interação do material com células, atuando como uma interface entre as propriedades de superfície do material e os receptores celulares e, portanto, determinando fortemente o destino do implante no ambiente biológico (SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013). Dessa forma, a funcionalização de óxidos metálicos com proteínas, peptídeos e até mesmo fatores de crescimento, induz a uma melhor interação entre o implante e as células, atuando sob o bloqueio do ataque do sistema imunológico e do encapsulamento do mesmo com uma camada fibrosa (RATNER, 2013; XIAO et al., 2017).

As biomoléculas podem se adsorver na superfície do óxido metálico diretamente ou por meio de agentes ligantes. Estas apresentam um grande potencial para adsorver em quase todos os tipos de interface, cuja característica é conferida pelos aminoácidos que as constituem, de modo que estas moléculas biológicas podem apresentar simultaneamente regiões hidrofóbicas, polares não carregadas e polares carregadas em sua superfície (HORBETT, 2013). Assim, as interações podem ser devidas à hidrofilicidade, hidrofobicidade, interações iônicas ou pela formação de ligações covalentes com um grupo funcional específico da molécula. Frequentemente, as moléculas ligantes atuam como espaçadores, concedendo maior liberdade estérica às proteínas e peptídeos, o que por sua vez permite uma maior atividade específica. Exemplos de imobilização de proteínas são apresentados na Figura 8. A adsorção não específica de proteínas ocorre através de interações hidrofóbicas ou hidrofílicas com o substrato; por meio de ligações covalentes da amina livre ou grupos de ácido carboxílico da proteína; ou ainda, quando a hidrofobicidade e hidrofilicidade da superfície estão próximas, as interações eletrostáticas entre a proteína e o óxido podem

assumir um papel dominante, uma vez que a carga elétrica total de uma proteína ou peptídeo é dada pelo somatório das cargas dos grupos funcionais dos aminoácidos, as quais dependem, por sua vez, dos pK_a s e do pH do meio. A adsorção específica das proteínas é seletiva, feita por um ligante específico, o qual interage com uma região da proteína chamada de sítio de ligação (KILLIAN, 2013). A adsorção feita por meio de interações fracas, como ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals, é conhecida como fisissorção; já a adsorção química por meio de interação iônica ou ligações covalentes através dos grupos -OH da superfície dos óxidos ou por meio de interações covalentes com os espaçadores é designada como quimissorção.

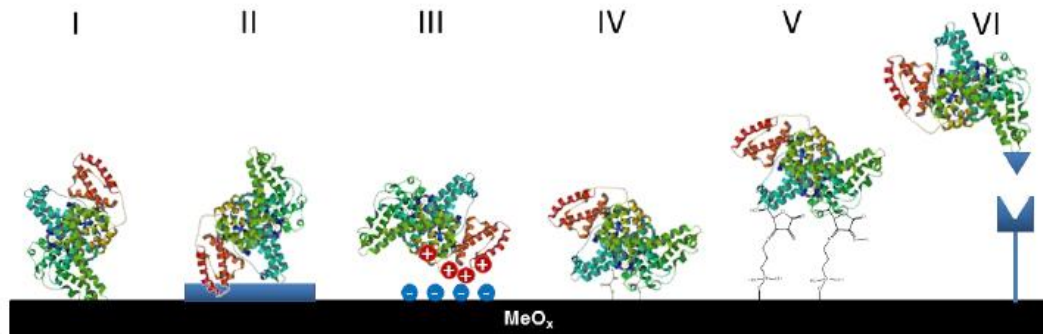


Figura 8. Meios de adsorção de proteínas e peptídeos nas superfícies de óxidos metálicos (MeO_x): interações hidrofílicas (I), recobrimento hidrofóbico (II), adesão iônica (III), ligação covalente (IV), ligação covalente com a presença de espaçador (V) e acoplamento de anticorpo específico (VI). Fonte: (KILLIAN, 2013).

A introdução de ligações covalentes para imobilizar as proteínas e peptídeos na superfície do material fornece um recobrimento com maior estabilidade da biomolécula mesmo em condições de stress físico ou químico, como por exemplo, gradientes de temperatura e pH ou estresse por forças de cisalhamento (VOGT-EISELE; OFFENHÄUSSER; KNOLL, 2005; VRANA, 2015).

As condições sob as quais os experimentos de adsorção das proteínas são conduzidos influenciam fortemente no comportamento de adesão das biomoléculas. Parâmetros externos como pH, força iônica e temperatura podem afetar a cinética, o estado de equilíbrio e a conformação da proteína. Além disso, a adesão é influenciada por propriedades da superfície e também características específicas de cada biomolécula (RABE; VERDES; SEEGER, 2011).

No caso de existir mais de um tipo de biomolécula em solução para adsorver na superfície do biomaterial, ocorrerá uma competição entre as mesmas, caracterizado como efeito Vroman, o qual consiste em uma sequência de etapas de transporte, adsorção e repulsão de biomoléculas (VROMAN; ADAMS, 1969). Biomoléculas com menor peso molecular ou em maior concentração se difundem mais rapidamente e, portanto, são as espécies dominantes no estágio inicial de adsorção. Proteínas ou peptídeos de maior peso molecular normalmente se ligam mais fortemente à superfície devido à maior área de contato, maior flexibilidade conformacional e porque possuem maior afinidade pela superfície (HIRSH et al., 2013). Como consequência, o tipo de proteína ou peptídeo e a massa total da biomolécula adsorvida na superfície podem variar durante o período de adsorção até que se atinja um estado de equilíbrio. Existem três tipos de mecanismos propostos para a ocorrência do efeito Vroman na literatura (Figura 9). No primeiro modelo as biomoléculas inicialmente adsorvidas desorvem, deixando uma vacância na superfície, a qual é preenchida por outro tipo de proteína ou peptídeo; no segundo, a proteína ou peptídeo inicialmente adsorvido é deslocado por outra biomolécula que tem maior afinidade de ligação à superfície; o terceiro mecanismo proposto afirma que a biomolécula de maior peso molecular incorpora-se na proteína ou peptídeo previamente adsorvido para formar um complexo transitório, o

qual depois expõe a biomolécula que se adsorveu primeiramente à solução fazendo com que esta desorva e a outra biomolécula permaneça na superfície (HIRSH et al., 2013).

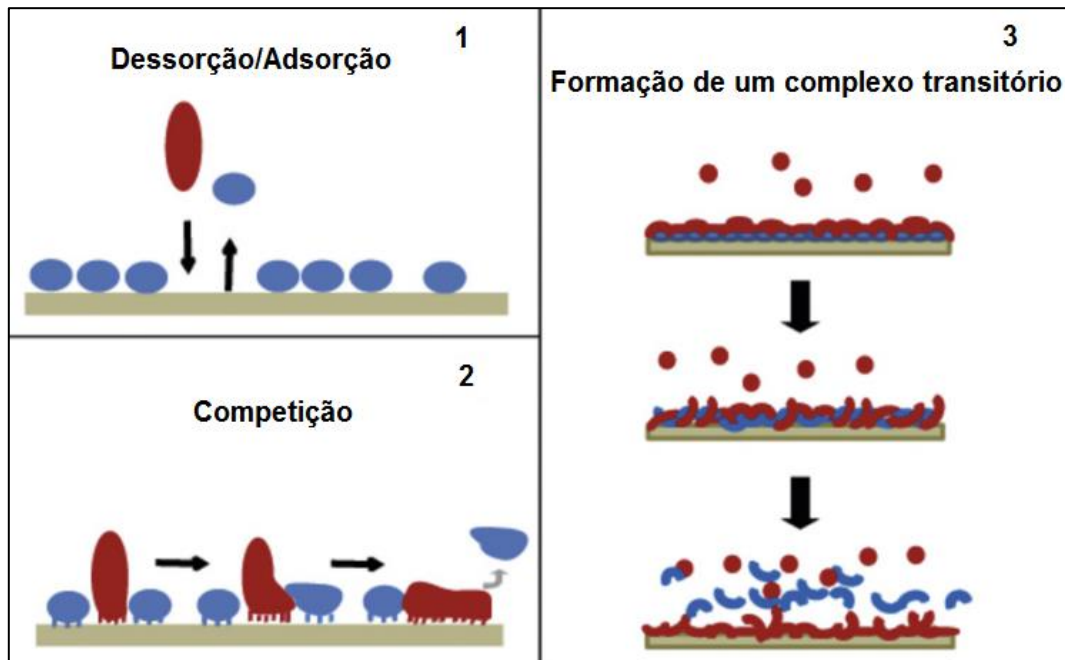


Figura 9. Esquema dos três tipos de mecanismos propostos para o efeito Vroman, no qual a cor azul representa as biomoléculas de menor peso molecular e a cor vermelha as de maior peso molecular. Adaptado de: (HIRSH et al., 2013).

Outro importante aspecto relacionado à adsorção das biomoléculas é a formação de agregados ou clusters de proteínas ou peptídeos em oligômeros, os quais influenciam na cinética de adsorção bem como na espessura e organização da camada resultante (GSPONER; VENDRUSCOLO, 2006; RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Este fenômeno pode ocorrer a partir de monômeros de proteínas ou peptídeos em solução que se agregam preferencialmente sobre clusters já adsorvidos na superfície. Neste caso, a afinidade dos clusters de biomoléculas é dependente do seu tamanho, quanto maior o oligômero maior sua afinidade, e a taxa de adsorção é mais elevada

conforme a superfície vai sendo recoberta. Os clusters também podem se formar em solução, onde posteriormente depositam-se e espalham-se sobre a superfície. A taxa de espalhamento depende da química da superfície, sendo mais rápida em superfícies hidrofóbicas do que em superfícies hidrofílicas. O mecanismo de espalhamento está relacionado com a habilidade das biomoléculas de se moverem na superfície, dessa forma proteínas ou peptídeos com baixa mobilidade formam camadas mais densas.

Existem duas abordagens teóricas que explicam o comportamento das biomoléculas ao entrarem em contato com a superfície, a cinética e a termodinâmica (FANG; SZLEIFER, 2001; RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Os modelos cinéticos descrevem eventos e fenômenos durante o curso da adsorção ou dessorção. Normalmente começam com uma superfície não preenchida e modelam a cinética de adsorção até atingir a saturação da superfície. Por outro lado, existem modelos termodinâmicos que consideram os aspectos energéticos envolvidos na adsorção de proteínas para prever o equilíbrio final do sistema. Considerando o modelo termodinâmico à temperatura e pressão constantes, o fator que mais contribui para que as biomoléculas adsorvam na superfície é a diminuição da energia livre de Gibbs (G) através do aumento da entropia do sistema (S) (ELLINGSEN; LYNGSTADAAS, 2003). As contribuições para o aumento da entropia do sistema são a desidratação dos adsorvatos (biomoléculas) e do adsorvente (superfície) e o aumento da entropia interna da biomolécula após a adsorção na superfície. Variações de entalpia não são consideradas neste caso. Portanto, a adsorção é favorecida quando o processo é exotérmico, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$.

As proteínas mais empregadas em biomateriais utilizados em implantes ortopédicos e dentários, nos quais os revestimentos de óxido metálico podem ser

aplicados, são aquelas que apresentam interação da superfície com as células do tecido conjuntivo, como osteoblastos, e com os constituintes do plasma, tais como plaquetas e leucócitos (SIN et al., 2015). Vitronectina e fibronectina são empregadas para promover a adesão celular (SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013), enquanto a albumina desempenha um papel na bioatividade e resistência à corrosão do implante (ANBAZHAGAN et al., 2016; D'ELIA et al., 2017; HÖHN et al., 2017). O fibrinogênio é outra proteína relevante altamente envolvida nos processos de hemocompatibilidade, e tem sido relacionada com processos de homeostase e promoção da adesão celular *in vitro* (CACCIAFESTA et al., 2000; WANG et al., 2015). Outras proteínas comuns são aquelas relacionadas ao sistema imunológico, tal como a lisozima e algumas globulinas. Estas proteínas controlam a resposta imunológica de um material estranho ao ambiente biológico, levando a aceitação do implante pelo organismo ou desencadeando respostas imunológicas de rejeição (WILSON et al., 2005). Proteínas estruturais, como o colágeno, também são bastante relevantes no processo de interação entre tecidos conjuntivos e a superfície dos biomateriais (LI et al., 2016).

Os peptídeos podem ser facilmente produzidos *in vitro* utilizando procedimentos de síntese de baixo custo por fase líquida ou sólida, e devido ao seu pequeno tamanho, são mais difíceis de provocar respostas imunológicas. Além disso, seu menor tamanho com relação às proteínas também permite que mais moléculas sejam adsorvidas em um biomaterial por unidade de área, exibindo mais sítios ativos para adesão das células (VISSER et al., 2016). A Figura 10 mostra as vantagens e desvantagens em se utilizar proteínas ou peptídeos na engenharia de tecidos. A sequência do peptídeo bioadesivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) é uma das mais empregadas em materiais para aplicação ortopédica e dentária, pois é

reconhecida pela integrina $\alpha 2\beta 1$ altamente expressa pelos osteoblastos, melhorando a diferenciação osteoblástica e a deposição mineral (GITELMAN; RAPAPORT, 2014). No entanto, diversos peptídeos com sequências de aminoácidos curtas e longas têm sido descritos na literatura por adsorver sobre óxidos metálicos melhorando a biocompatibilidade do material (COSTA; SAVIO; PRADIER, 2016; MICKSCH et al., 2014). Dentre os peptídeos empregados, a implementação de domínios que se ligam ao colágeno em peptídeos derivados da proteína da matriz dentária 1 (DMP1) tem apresentado papel crucial na biomineralização (PADOVANO et al., 2015).

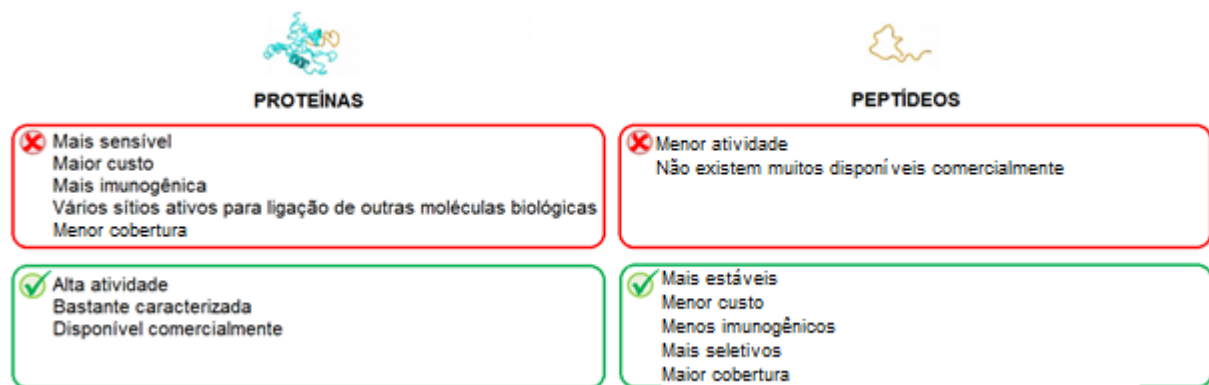


Figura 10. Vantagens e desvantagens associadas ao uso de proteínas e peptídeos na engenharia de tecidos. Adaptado de: (VISSER et al., 2016)

2.5 Interações das células com implantes

A interação das células com o biomaterial é um processo complexo que envolve várias etapas, conforme mostra a Figura 11, como a adsorção de moléculas de água, íons e proteínas, seguidos de deposição de matriz extracelular (MEC), adesão, proliferação e diferenciação celular (GEETHA et al., 2009). Vários parâmetros biológicos e superficiais influenciam na interação entre as células e os implantes. Com relação ao material, a química de superfície, a rugosidade e as propriedades mecânicas

devem ser levadas em consideração ao analisar a interação das células com o biomaterial. As características biológicas podem ser distinguidas pela resposta celular ao material com relação ao tempo de cultura. A quantificação da adesão a curto e longo prazo permite estabelecer relações entre as propriedades adesivas das células e as características da superfície.

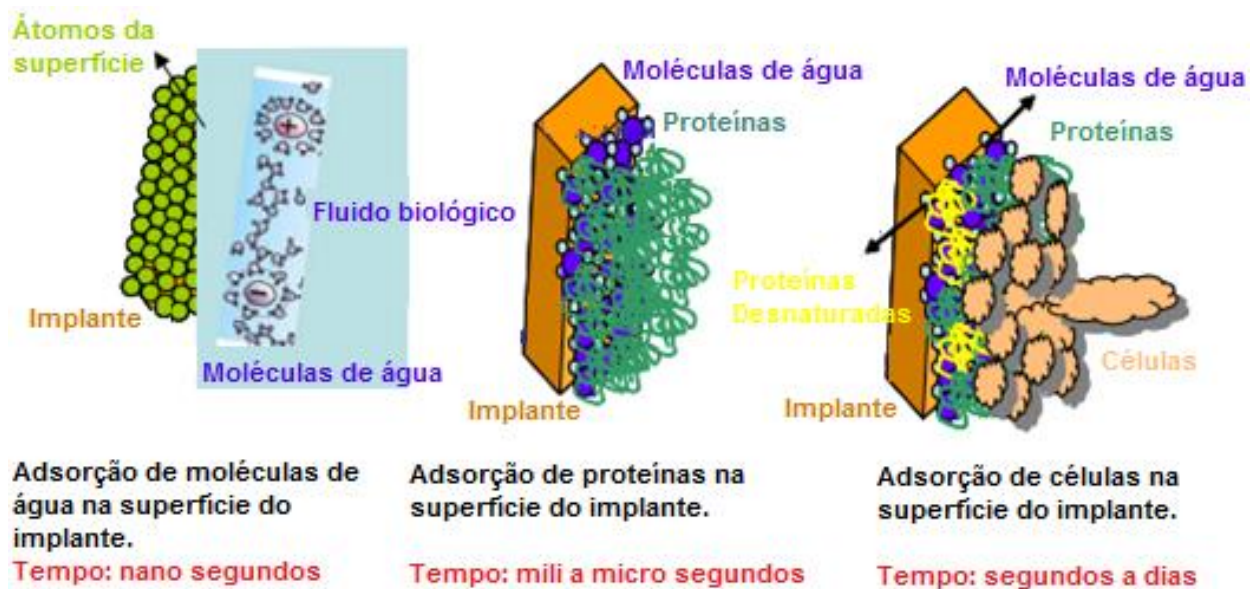


Figura 11. Etapas que ocorrem durante o processo de interação das células com implantes. Adaptado de: (GEETHA et al., 2009).

A realização adequada das fases de adsorção da MEC na superfície, do reconhecimento dos componentes da matriz extracelular por receptores celulares e do rearranjo citoesquelético gera funções específicas nas células com subsequente formação do tecido especializado (SHOTORBANI et al., 2017; VRANA, 2015). Durante o processo *in vivo*, as células não interagem diretamente com a superfície dos biomateriais, mas com a camada adsorvida de proteínas da MEC. A adesão de células nas superfícies dos materiais pode ocorrer na ausência de qualquer proteína adsorvida,

mas em geral, as células não conseguem se espalhar, resultando em sua desorção e morte. As células interagem com a matriz extracelular através das integrinas, fatores de crescimento, receptores de proteoglicanos e várias moléculas de adesão (BARTOLO; BADER, 2013; GEFEN, 2006). Existem diferentes tipos de interações célula-MEC: (1) as mediadas por integrina e receptores de proteoglicanos são importantes nos processos de adesão e durante a migração celular; (2) as que ocorrem via fator de crescimento ou receptores de citosina afetam a proliferação celular, indução e manutenção da diferenciação; e (3) as que são mediadas por receptores responsáveis pelos processos de apoptose (VRANA, 2015).

A modificação da superfície do biomaterial mimetizando a MEC fornece informações específicas às células, direcionando seu comportamento e desencadeando a regeneração do tecido específico, como o ósseo no caso de implantes ortopédicos e dentários. Em particular, o aumento da biofuncionalidade do material pode ser alcançado pela adição de biomoléculas específicas tais como enzimas, peptídeos e proteínas, as quais se ligam a receptores celulares induzindo a uma ancoragem mais forte das células. Estas biomoléculas podem ser simplesmente adsorvidas na superfície do material, ou ligadas covalentemente através de grupos espaçadores previamente aderidos na superfície. A resposta biológica após a biomodificação da superfície dependerá de parâmetros estruturais da biomolécula e das características físico-químicas da superfície.

2.6 Corrosão e tribocorrosão em biomateriais

O ambiente biológico em que os biomateriais são expostos após a implantação consiste em um meio aquoso com íons, substâncias orgânicas e oxigênio

dissolvido que podem degradar o material. A Tabela 2 apresenta a concentração de cátions e ânions presentes no plasma sanguíneo e no fluido extracelular. Além da grande concentração de íons e proteínas existe a influência de outros dois fatores, a temperatura e o pH do meio que contribuem para o desgaste do biomaterial. A temperatura do corpo fica em torno de 36,5 °C e o pH do meio é normalmente 7, mas pode variar até 4 ou 5 quando ocorre inflamação do tecido. A estabilidade do material no ambiente biológico é quem determina sua susceptibilidade à degradação. No caso, os metais são mais propensos à corrosão, enquanto as cerâmicas exibem uma variação de susceptibilidade à corrosão, dependendo da sua solubilidade no meio.

Tabela 2. Concentração de íons no plasma sanguíneo e no fluido extracelular.

Íons	Plasma Sanguíneo (mM)	Fluido Extracelular (mM)
Cl ⁻	96-116	112-120
HCO ₃ ⁻	16-31	25,3-29,7
HPO ₄ ²⁻	1-1,5	193-102
SO ₄ ²⁻	0,35-1	0,4
H ₂ PO ₄ ⁻	2	-
Na ⁺	131-155	141-15
Mg ⁺²	0,7-1,9	1,3
Ca ⁺²	1,9-3	1,4-1,55
K ⁺	35-5,6	3,5-4

Fonte: (WILLIAMS; WILLIAMS, 2013)

A degradação de implantes metálicos é resultante da dissolução eletroquímica e da perda de massa do material, as quais ocorrem frequentemente em

uma combinação sinérgica (MATHEW; JACOBS; WIMMER, 2012). A corrosão está relacionada com os processos de degradação de superfície envolvendo reações químicas ou eletroquímicas. A tribocorrosão, por sua vez, se refere aos mecanismos de degradação da superfície no qual os processos de desgaste mecânico, químico/eletroquímico interagem entre si. O processo de degradação do material é desvantajoso, pois reduz a integridade estrutural do material e seus produtos podem reagir com o tecido sendo um dos principais motivos de falha dos implantes, resultando em falha mecânica, perda óssea (no caso de implantes ortopédicos ou dentários) e até mesmo necrose dos tecidos adjacentes.

O titânio é relativamente resistente à corrosão devido à presença da camada de óxido nativo formada em sua superfície (TEXTOR et al., 2001). A interface entre o metal com camada de óxido passivo e o fluido corporal pode ser resumida pela Figura 12. No caso da camada de óxido nativa, antes da implantação, a superfície metálica reage espontaneamente com o ambiente para formar uma camada de óxido metálico passivo, a qual é amorfa e não uniforme. Uma camada de óxido age como sítio de nucleação e cresce sobre a superfície metálica. Esta contém defeitos que permitem transporte eletrônico e iônico de espécies carregadas através do filme. Espécies como oxigênio, fosfatos, hidróxidos ou proteínas se adsorvem a partir da solução sobre a superfície da camada de óxido, podendo alterar as propriedades do filme. Existe também um campo elétrico que atua como força motriz para o movimento destes íons através da camada de óxido. Se a intensidade do campo elétrico for alterada, por exemplo, ao mudar o potencial aplicado, o filme de óxido pode aumentar ou diminuir sua espessura a fim de manter o campo elétrico a uma intensidade constante (YASZEMSKI, 2003). Dependendo das condições, o filme pode mudar sua estrutura

cristalina. Vários tratamentos de superfície podem ser aplicados a fim de melhorar a resistência à corrosão do material, incluindo tratamento com ácidos, anodização e funcionalização da superfície.

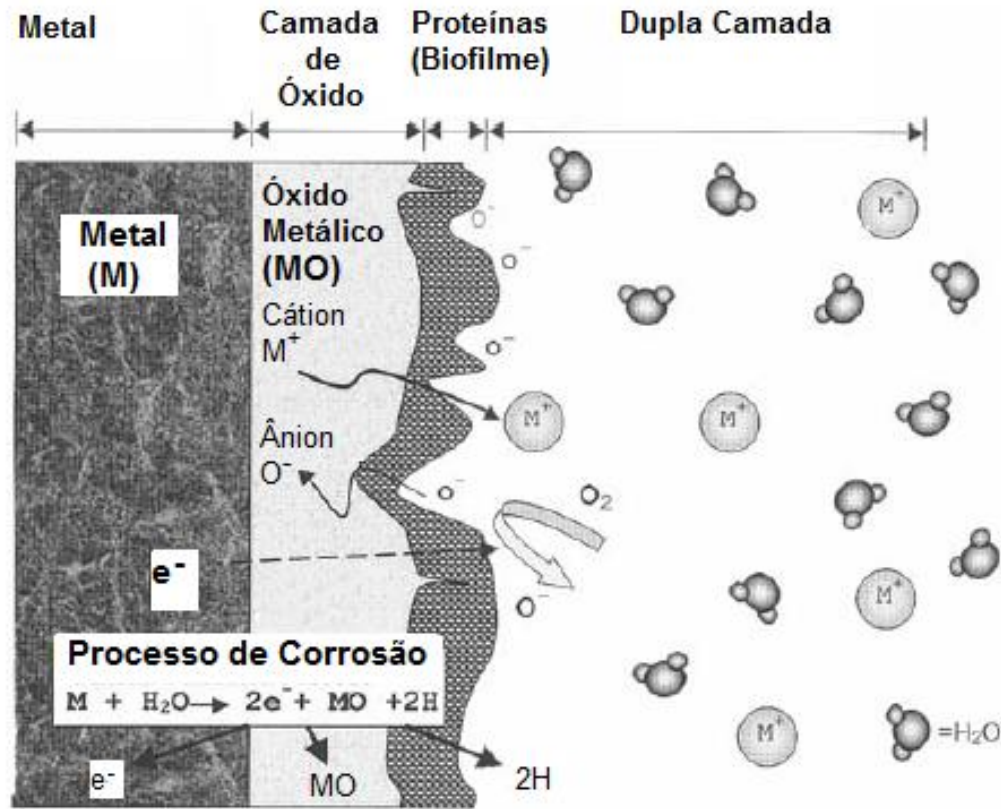


Figura 12. Interface da superfície metálica com o ambiente biológico, no qual o metal é recoberto por uma camada de óxido nativo, seguido da adsorção de proteínas (biofilme) pelo qual os íons metálicos podem passar para a solução. Adaptado de: (YASZEMSKI, 2003).

2.7 Desafios atuais

Ao longo dos anos houve uma grande evolução com relação ao desenvolvimento de materiais bioativos para implantes ortopédicos e dentários nos quais a avaliação da biocompatibilidade se torna mais específica e significativa. Dentre os aspectos responsáveis pela evolução nesta área destaca-se o conhecimento adquirido dos avanços das ciências biológicas, especificamente em biologia molecular e

celular, bioquímica e fisiologia. Essas abordagens foram motivadas pelo reconhecimento de que eventos celulares e moleculares que ocorrem *in vivo* no microambiente das interfaces tecido/implante ditam o destino dos implantes e, portanto, têm implicações clínicas cruciais. Além disso, outro campo que apresentou um grande avanço foi o desenvolvimento de materiais nanoestruturados que mimetizam o tecido a ser reparado.

No entanto, infelizmente, a avaliação da biocompatibilidade ou avaliação da resposta biológica não se desenvolveu no mesmo ritmo e, portanto, os objetivos e metas da avaliação da resposta biológica requerem reconsideração e reavaliação. Dessa forma é necessário que sejam estabelecidas algumas normas antes do uso clínico destes novos biomateriais:

- 1- Realizar testes de citotoxicidade em que sejam consideradas células e tecidos específicos que irão entrar em contato com o dispositivo médico ou biomaterial. Além disso, incluir o tempo para a proliferação, taxa de proliferação e controles apropriados nas análises de citotoxicidade;
- 2- Avaliar a degradação destes materiais, bem como investigar a ação dos subprodutos formados no ambiente biológico;
- 3- Identificar mecanismos moleculares responsáveis pela resposta biológica do biomaterial;
- 4- Realizar a validação *in vivo* dos resultados *in vitro*;

3. Objetivo

Funcionalizar com moléculas orgânicas bifuncionais e biomoléculas substratos de titânio comercialmente puro recobertos com filmes de TiO₂ ou ZnO nanoestruturados, a fim de melhorar a biocompatibilidade e bioatividade dos implantes metálicos e acelerar o processo de mineralização e diferenciação celular em osteoblastos.

4. Plano de Trabalho

Funcionalizar óxidos metálicos com diferentes moléculas bifuncionais e investigar o modo de adesão de grupos silano, amino, ácido carboxílico, tiol e hidroxila sobre óxido de zinco e dióxido de titânio através da análise da química de superfície, rugosidade superficial e topografia das amostras.

Determinar a influência de moléculas bifuncionais, que atuam como espaçadores, na imobilização de biomoléculas sobre a superfície de óxidos metálicos a partir da avaliação da química de superfície, rugosidade superficial e topografia.

Avaliar a biocompatibilidade e bioatividade dos materiais funcionalizados por meio de testes de adesão, viabilidade, proliferação e diferenciação de células mesenquimais humanas.

Analisar a influência das biomoléculas na nucleação e formação de cristais de fosfato de cálcio a partir de testes de mineralização *in vitro*.

Identificar as respostas mecânica e eletroquímica das amostras funcionalizadas frente aos ensaios de corrosão e tribocorrosão.

5. Materiais e Métodos

A seguir são descritos os materiais utilizados, as metodologias empregadas bem como as técnicas de caracterização utilizadas na análise deste trabalho.

5.1 Síntese dos óxidos metálicos

5.1.1 Síntese da suspensão de dióxido de titânio

A solução de dióxido de titânio foi sintetizada por via sol gel. A síntese ocorreu por hidrólise e reação de condensação do isopropóxido de titânio (IV) empregando uma razão molar elevada de água: álcool (200:1), isopropanol como co-solvente, ácido nítrico (HNO_3 , 65%) como catalisador e Triton X-100 como surfactante (VORKAPIC; MATSOUKAS, 1998; OSKAM, et al., 2003). Foi misturada água destilada (185 mL) com isopropanol (56,7 mL, Merck) e ácido nítrico (2,6 mL, Synth). Em seguida, adicionou-se isopropóxido de titânio (IV) (15 mL, Aldrich) e agitou-se a mistura durante 30 min. Posteriormente, iniciou-se a peptização cobrindo o béquer de reação e aquecendo a solução a 85 °C sob agitação magnética por quatro horas. Nesta etapa, a evaporação dos solventes durante a hidrólise resulta na condensação do coloide, que apresenta uma cor azul translúcida clara. Para formar a fase de gel, a solução foi mantida sob aquecimento e agitação até que a solução apresentasse uma cor branca. Finalmente, adicionou-se o surfactante Triton X-100, pois este desempenha um papel importante na distribuição de tamanho das partículas e na posterior adesão do filme. Foram adicionados 0,816 g de surfactante (Synth) em 50 mL da solução e agitou-se durante 15 min para obter a solução final a ser depositada.

5.1.2 Síntese da resina de óxido de zinco

A resina do óxido de zinco nanométrico foi obtida a partir do ZnO comercial (TRINO et al., 2018). O ácido cítrico (72,05 g, Synth) foi dissolvido em aproximadamente 200 mL de água destilada em um béquer. Em seguida, foram adicionados à mistura 15 mL de ácido nítrico e 10,17 g de óxido de zinco (99,9%, Sigma-Aldrich), empregando a proporção de 1 mol de ZnO para 3 moles de ácido cítrico. A solução foi então aquecida a 100 °C por aproximadamente quinze minutos. Em seguida, sob agitação constante, adicionou-se o etilenoglicol (P.A., Synth) considerando a relação entre a quantidade em massa de ácido cítrico e etilenoglicol de 60/40, respectivamente. A temperatura deste sistema foi elevada para 150 °C e a solução foi mantida nestas condições até que atingisse 100 mL. Em seguida esta foi diluída em uma razão de 8 mL de água destilada para 3 mL da resina de ZnO.

5.2 Preparação dos substratos metálicos

Discos de titânio comercialmente puro (ACNIS do Brasil) grau IV (12,7 mm de diâmetro x 3 mm de espessura) foram polidos até uma rugosidade superficial de aproximadamente 150 nm, conforme verificado por microscopia óptica confocal, utilizando lixas de granulometria 320, 400, 600 e 800, a fim de retirar a camada de óxido natural formada bem como impurezas sobre a superfície, deixando-a mais homogênea. Posteriormente, os substratos foram limpos com isopropanol e água deionizada durante 15 minutos cada em banho de ultrassom. As amostras foram hidroxiladas em solução Piranha (mistura de 7:3 v/v 98% H₂SO₄ e 30% H₂O₂) durante

duas horas. Por fim, os substratos foram lavados com água deionizada para deposição imediata de óxido.

5.3 Deposição dos óxidos metálicos

A deposição das soluções dos óxidos metálicos foi realizada utilizando 60 μ L de solução em um *spin-coater* (PWM32-PS-R790, Headway Research INC) a 2000 RPM por 60 segundos, o procedimento foi repetido três vezes para cada amostra. Entre as deposições, as amostras foram aquecidas por cinco minutos em uma placa aquecedora a 40 °C e 80 °C para TiO₂ e ZnO, respectivamente. Depois disso, as amostras revestidas com TiO₂ foram tratadas a 850 °C durante duas horas numa taxa de aquecimento de 1 °C/min a fim de obter a fase polimórfica cristalina rutilo. As amostras de ZnO foram tratadas termicamente em duas etapas, a primeira a 350 °C durante duas horas numa taxa de aquecimento de 1 °C/min, e depois a 500 °C durante 30 minutos numa taxa de aquecimento de 5 °C/min.

A caracterização dos óxidos foi realizada em triplicatas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a fim de determinar a espessura do filme e a morfologia das partículas. Análises de Difração de raios X (DRX) indicaram a fase cristalina dos óxidos.

5.4 Funcionalização dos óxidos com moléculas orgânicas

A superfície de TiO₂ e ZnO foi funcionalizada com quatro moléculas bifuncionais diferentes, formando quatro grupos distintos de amostras, pelo método de imersão (TRINO, et al., 2018), conforme descrito a seguir:

Ácido 3-mercaptopropiônico (MPA): Uma solução aquosa de 1 mM foi preparada com MPA (Aldrich) ajustando o pH da solução a 3 com HCl (37,5%, Synth). As amostras foram imersas durante 10 minutos na solução à temperatura ambiente.

Ácido 3-4-aminofenilpropionico (APPA): Preparou-se uma solução de APPA (Aldrich) 2 mM em etanol anidro (Merck) agitando a solução na placa magnética por 5 minutos. Após dissolução completa, aqueceu-se até 40 °C e depois o substrato foi imerso por 5 minutos.

3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS): Preparou-se uma solução 10 mM de APTMS (Aldrich) em etanol (Merck) e imergiu-se o substrato na solução durante 1 minuto à temperatura ambiente.

Polietileno glicol (PEG): Preparou-se uma mistura na proporção de 1 g de PEG (PM 8000, Synth) e 4 mL de água deionizada. Quando o PEG foi diluído, os substratos foram adicionados à solução e mantidos por um período de aproximadamente 15 h. As amostras foram então enxaguadas com água deionizada após imersão.

Posteriormente às deposições das moléculas orgânicas, todas as amostras foram mantidas em um dessecador à temperatura ambiente a fim de evaporar o solvente. Estas amostras foram analisadas em triplicata por XPS, microscopia óptica confocal, ângulo de contato, energia de superfície e AFM com a finalidade de determinar o modo de adsorção das moléculas, a rugosidade, a molhabilidade da superfície e a topografia da superfície. Para as análises de microscopia óptica confocal os dados foram coletados a partir de seis pontos diferentes de cada amostra para obter uma média aritmética de rugosidade superficial (Ra).

5.5 Funcionalização com biomoléculas

Os peptídeos pA (ESQES) e pB (QESQSEQDS) derivados da proteína da matriz dentária 1 (DMP1) foram sintetizados por fase sólida pelos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa com Proteínas da Universidade de Illinois em Chicago (PADOVANO et al., 2015). Os peptídeos foram diluídos na proporção 1 de pA para 4 de pB em PBS (Aldrich) e solução tampão de carbonato, de modo a ter uma concentração de 1 mg/mL (PADOVANO et al., 2015). Os grupos das amostras funcionalizadas com peptídeos são apresentados na Tabela 3. As amostras foram colocadas numa placa de 24 poços e cobertas com a solução de peptídeos. Para que os peptídeos reticulassem entre si através dos grupos ácidos, as amostras foram mantidas por 15 h sob luz ultravioleta em condições estéreis.

Tabela 3. Amostras funcionalizadas com a mistura de peptídeos derivados da DMP1.

Controle	Titânio	TiO ₂	ZnO
		TiO ₂ + APPA	ZnO + APPA
Moléculas orgânicas	-	TiO ₂ + MPA	ZnO + MPA
		TiO ₂ + APTMS	ZnO + APTMS
		TiO ₂ + PEG	ZnO + PEG

A química da superfície e a topografia das amostras bio-funcionalizadas foram avaliadas por XPS, ângulo de contato e AFM.

5.6 Testes de adesão e viabilidade celular

A linhagem de células mesenquimais humanas com expressão do gene da Proteína Fluorescente Verde (hMSCs-GFP) de segunda passagem foram semeadas (2×10^4 células) sobre as amostras e estas foram colocadas em uma incubadora a 37 °C e concentração de CO₂ de 5% durante 24 horas e sete dias, até atingirem a confluência. O meio de cultura completo foi preparado com α -MEM (meio mínimo essencial com modificação alfa, Gibco, Thermo-Fisher), 20% de FBS (Gibco, Thermo-Fisher), L-glutamina e antibiótico. De modo a avaliar o papel dos peptídeos na biocompatibilidade dos materiais, as células foram cultivadas sobre um conjunto de grupos apresentado na Tabela 3, com e sem os peptídeos.

As amostras com as células em suas superfícies foram mantidas em placas de 24 poços. Após 7 dias de cultura foi analisada a adesão destas células sobre os substratos. Para isso, as células hMSC-GFP foram fixadas adicionando 1 mL de formalina neutra tamponada a 10% em cada poço contendo as amostras. Estas foram mantidas sob refrigeração e após 24 h foram retiradas da placa de 24 poços e observadas em um microscópio confocal de fluorescência (Zeiss LSM 710) com ampliação de 20x.

A fim de determinar o número de células viáveis em ensaios de proliferação ou citotoxicidade foi utilizado um método colorimétrico (MTS) empregando o kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA). As células foram cultivadas durante 1, 3 e 5 dias. As placas foram medidas em um leitor de placas modelo Synergy 2, a 490 nm. A quantidade de produto de formazan medida por absorbância a 490 nm foi diretamente proporcional ao número de células viáveis, segundo informações do fabricante do kit.

5.7 Testes de mineralização

A nucleação foi realizada sob altas concentrações de cálcio e fosfato (He et al., 2003). As amostras foram imersas em solução de cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich) 1 M durante um período de 30 minutos. Em seguida, foram lavadas extensivamente em água deionizada para remover o cálcio ligado de modo não específico. Depois foram imersas em solução de fosfato de sódio (Sigma-Aldrich) 1 M durante um período de 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada e desidratadas com solução de etanol (Merck) a 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90 e 100% para, por fim, adicionar hexametildissilazano (HMDS, SPI-CHEM) a fim de desidratar as amostras e verificar a morfologia dos fosfatos de cálcio por microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM JEOL 7500F). Para obtenção das imagens as amostras foram revestidas com ouro. A análise foi realizada com uma tensão de 2,00 kV e uma distância de trabalho de 8 mm.

5.8 Testes de diferenciação com células mesenquimais humanas

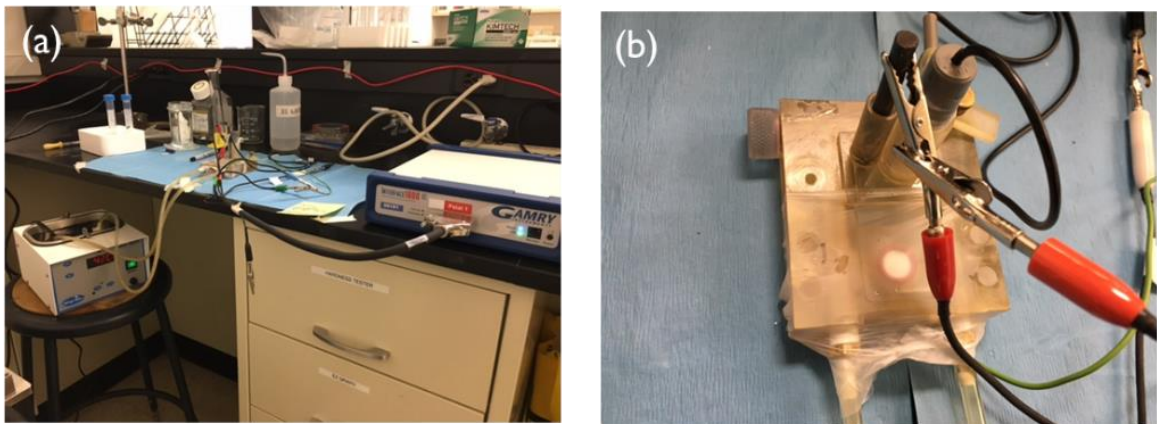
A análise da diferenciação celular foi realizada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A purificação do RNA total das células hMSC-GFP foi realizada utilizando a técnica de rotação. Foram cultivadas $2,5 \times 10^4$ células sobre os substratos por 7 dias. Foram analisados dois conjuntos de amostras, um controle com meio de cultura padrão e um com meio de cultura osteogênico, o qual consiste de meio de cultura α MEM, ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona. As células foram rompidas em tampão RLT (Qiagen) e homogeneizadas. Foi então adicionado etanol ao lisado, criando condições que promoveram a ligação seletiva do RNA à membrana do kit RNeasy (Qiagen). A amostra foi então aplicada à coluna de rotação RNeasy Mini. O

RNA total ligou-se à membrana da coluna e os contaminantes foram lavados de forma eficiente. O RNA foi então eluído em água isenta de RNase. Todos os passos de ligação, lavagem e eluição foram realizados por centrifugação numa microcentrífuga. Os genes relacionados à osteogênese que foram testados são: o colágeno humano tipo 1 alfa 1 (Col1a1), a osteocalcina (OCN), o fator de transcrição 2 (Runx2), a sialoproteína óssea (BSP), a osteopontina (OPN) e a fosfatase alcalina (ALP). As soluções foram colocadas em placa de 96 poços para serem analisadas em um leitor de PCR em tempo real (StepOnePlus, Applied Biosystems).

5.9 Ensaio de corrosão

O ensaio eletroquímico foi conduzido utilizando uma célula de corrosão de três eletrodos padrão e um potenciostato. As amostras de TiO_2 foram analisadas em um potenciostato modelo G700 da marca Gamry Inc. (Warminster, PA, EUA) no laboratório do Instituto de Biomateriais Tribocorrosão e Nanomedicina da Universidade de Illinois em Chicago. Por outro lado, as amostras de ZnO foram analisadas em um potenciostato modelo PGSTAT302 da marca Metrohm Autolab (Utrecht, The Netherlands), equipado com o módulo FRA32M do Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos da UNESP de Bauru. A montagem eletroquímica é vista na Figura 13. As amostras foram empregadas como eletrodo de trabalho e cada disco apresentava 1 cm^2 de área superficial exposta no poço de corrosão. Os outros dois eletrodos utilizados foram um contra-eletrodo e um eletrodo de referência. No caso das amostras de TiO_2 , o contra-eletrodo era de grafite e o eletrodo de referência era um eletrodo de calomelano saturado. Já para as amostras de ZnO , o contra-eletrodo era de platina e o eletrodo de

referência de Ag/AgCl. Utilizou-se uma quantidade de 15 mL de PBS como o eletrólito para cada amostra. Todos os ensaios foram mantidos à temperatura fisiológica de 37 °C usando um banho de água durante o protocolo de tratamento eletroquímico. O mesmo protocolo de corrosão foi executado para as amostras de TiO₂ e ZnO (Figura 13 c).



(c)	OCP 1	OCP 2	EIS	PD	OCP 3
	300 s	3600 s	100kHz - 0.01Hz	-0.8V - +1.8V	600 s

Figura 13. Sistema montado para a análise de corrosão (a), célula eletroquímica em destaque (b) e protocolo de corrosão empregado (c), no qual OCP indica o Potencial de Circuito Aberto, EIS a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e PD ensaio de Potenciodinâmica.

5.10 Ensaio de tribocorrosão

As amostras de TiO₂ foram submetidas ao teste de tribocorrosão utilizando um tribômetro (Advanced Linear Reciprocating Tribometer, Ducom Instruments, Chicago, IL, EUA). Uma célula de corrosão de três eletrodos padrão e um potenciostato (G700, Gamry Inc., Warminster, PA, EUA) foram conectados ao sistema de tribocorrosão. As amostras foram empregadas como eletrodo de trabalho e cada disco apresentava 1 cm²

de área superficial exposta no poço de corrosão. Os outros dois eletrodos utilizados foram um contra-eletródo de grafite e um eletródo de referência, eletródo de calomelano saturado. Utilizou-se uma quantidade de 15 mL de PBS como o eletrólito para cada amostra aquecido a 37 °C. A sequência de testes de tribocorrosão é mostrada na Figura 14.

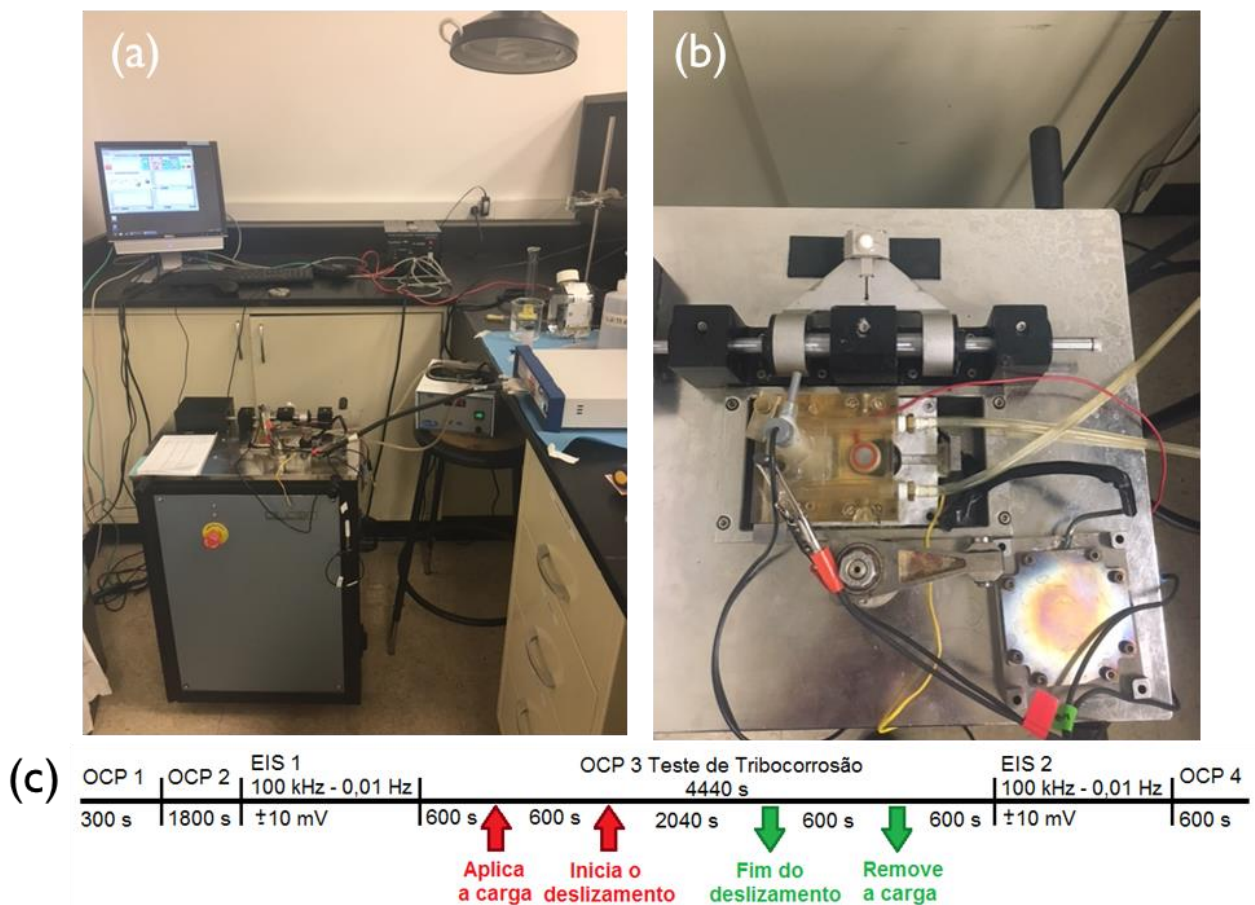


Figura 14. Sistema montado para ensaios de tribocorrosão (a), célula eletroquímica e bola de alumina em destaque (b) e protocolo de tribocorrosão empregado (c).

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada antes e depois do teste de tribocorrosão. Os parâmetros incluíram uma carga normal de 8,5 N aplicada com uma configuração "esfera sobre o plano". Aplicou-se uma distância de

deslizamento de 2 mm a uma frequência de 2 Hz por 3600 s, utilizando uma esfera de alumina (Al_2O_3) de 9,525 mm de diâmetro durante o OCP. O protocolo de tribocorrosão incluiu um OCP inicial (300s) para testar se as conexões estavam apropriadas, um segundo OCP (1800s) para estabilização de potencial inicial, um EIS (± 10 mV, 100 kHz-0,005 Hz) antes do deslizamento, OCP 3 (4440 s, durante a tribocorrosão), um segundo EIS (± 10 mV, 100 kHz - 0,005 Hz) após o deslizamento, e um OCP final (600 s) para estabilização do potencial.

5.11 Difração de Raios X

A difratometria de raios X (DRX) corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, com aplicação em várias áreas desde sua descoberta em 1912. Este método fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos presentes em uma amostra sólida, dentre elas a identificação das fases cristalinas presentes no material, visto que os planos de difração e suas distâncias interplanares são características específicas e únicas de cada sistema de ordenação.

Os raios X possuem comprimento de onda curto, cuja radiação eletromagnética é produzida pela desaceleração dos elétrons de alta energia ou pela transição eletrônica de elétrons dos orbitais internos dos átomos (HOLLER, SKOOG e CROUNCH, 2009, p. 317). Os raios X podem ser gerados pelo bombardeamento de um alvo metálico com um feixe de elétrons de alta energia, pela exposição de uma substância a um feixe primário de raios X para gerar um feixe secundário de

fluorescência de raios X, pelo uso de uma fonte radioativa cujo processo de decaimento resulta na emissão de raios X ou a partir de uma fonte de radiação síncrotron.

Quando um feixe de raios X incide sobre um plano do cristal com um ângulo θ , parte dele sofrerá um processo de espalhamento em todas as direções pelos elétrons dos átomos do cristal. Dependendo do ângulo e de um conjunto de planos específicos, os raios X espalhados estarão em fase entre si, resultando em uma interferência construtiva. Como cada material terá um conjunto de planos, com diferentes distâncias interplanares, através de uma varredura da intensidade pelo ângulo de difração (2θ), é possível localizar os picos que corresponderão a planos específicos permitindo, entre outras informações, a identificação do material e um estudo da formação e evolução das fases cristalográficas presentes na amostra. Portanto, as condições para que ocorra a difração de raios X vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg, ou seja, $n \lambda = 2 d \sin\theta$, onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, “n” a um número inteiro (ordem de difração), “d” à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos).

As medidas de difração de raios X foram realizadas a temperatura ambiente em um difratômetro multiusuários da marca Rigaku, modelo D/MAX-2100PC, da UNESP de Bauru, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5405\text{\AA}$) e filtro de Ni para eliminação da radiação $\text{K}\beta$. Foi utilizada fenda com abertura de 10 mm, com corrente de 20 mA e um potencial de 40 kV. A varredura do detector foi feita de 20 a 45° com velocidade de 2 °min⁻¹ e passo de 0,02 °min⁻¹.

5.12 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece informações morfológicas e topográficas de superfícies sólidas com ótima resolução, de até 300.000 x, dependendo do tipo de equipamento. Além disso, ela pode ter acoplada a si um detector de raios X para análise química da superfície por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Sendo assim, esta se apresenta como uma das técnicas mais adequadas para analisar e explicar os fenômenos que ocorrem na escala micrométrica e submicrométrica.

Na microscopia eletrônica de varredura a área a ser analisada é irradiada por um fino feixe de elétrons, sendo os sinais de maior interesse para a formação da imagem os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

Com relação ao EDS, a análise química é possível uma vez que ao incidir o feixe de elétrons sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos são excitados mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial liberam a energia adquirida, a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de cada átomo possuem energias distintas, é possível determinar quais elementos químicos estão presentes naquele local de incidência do feixe.

Para a obtenção das imagens, as amostras foram preparadas colando o substrato de Ti CP4 com uma fita de carbono dupla face sobre o porta amostra (stub). Posteriormente as amostras foram recobertas com ouro. As imagens apresentadas foram obtidas no Laboratório de Microscopia Avançada no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, através do microscópio eletrônico de varredura contendo canhão de emissão por campo (FEG), da marca JEOL modelo 7500F.

5.13 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) tem seu principal uso na medida da topografia superficial das amostras, fornecendo informações como rugosidade e morfologia da superfície. O princípio básico desta técnica é medir forças ou interações entre uma ponteira e a superfície da amostra. Neste procedimento, um braço (cantilever) flexível, sensível à força, é movimentado em um padrão contínuo sobre a superfície da amostra. A força que atua entre o braço e a superfície da amostra causa diminutas deflexões nos mesmos, as quais são detectadas por meios ópticos. Entre a ponteira e os átomos da superfície da amostra existem interações que podem ser atrativas ou repulsivas. Em grandes distâncias, as interações são predominantemente atrativas, devido às forças de Van der Waals. Se aproximarmos ainda mais a ponta com a superfície, as interações são repulsivas devido à repulsão entre os orbitais eletrônicos dos átomos da superfície da amostra e os da ponta do microscópio de força atômica. (HOLLER, SKOOG e CROUNCH, 2009).

As imagens apresentadas foram obtidas no Laboratório de Microscopia Avançada no Instituto de Química da UNESP de Araraquara em um microscópio de

força atômica da marca Veeco, modelo Nanoscope III. As ponteiros empregadas foram do modelo de sonda FESP (Veeco), com 8 mm de raio de curvatura e 75 kHz de frequência de ressonância.

5.14 Microscopia Óptica Confocal

A partir da microscopia óptica confocal é possível construir imagens tridimensionais utilizando um orifício de abertura, pinhole, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal. Através de um conjunto de lentes o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal (mantida a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto. Ao retornar pelo mesmo caminho óptico, a luz é separada e passa pelo pinhole, o qual é capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Com isso só a luz dos pontos em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores. Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bi e tridimensionais extremamente precisas podem ser construídas.

O microscópio óptico confocal utilizado para medidas de rugosidade superficial dos filmes é da marca Leica, modelo DCM 3D do Laboratório de Materiais Avançados Nanoestruturados da UNESP de Bauru. Foram feitas medidas com aumento de 100x (área igual a $1,27 \times 0,95 \text{ mm}^2$ e resolução de $2 \text{ }\mu\text{m}$) e 200 x (área igual a $636,61 \times 477,25 \text{ mm}^2$ e resolução de $1 \text{ }\mu\text{m}$).

5.15 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

O ângulo de contato se refere ao ângulo formado por um líquido ao entrar em contato com um sólido. O valor do ângulo de contato depende principalmente da relação que existe entre as forças adesivas entre o líquido e o sólido e as forças coesivas do líquido. Quando as forças adesivas com a superfície do sólido são muito grandes em comparação às forças coesivas, o ângulo de contato é menor que 90° . Já quando as forças coesivas do líquido são maiores que a força adesiva entre o líquido e o sólido, o ângulo de contato é maior que 90° .

Por definição tem-se que: quando $\theta > 90^\circ$, não há o molhamento do sólido pelo líquido, ou seja, não ocorre o espalhamento do líquido; quando $\theta < 90^\circ$, há o molhamento e o líquido se espalha espontaneamente; quando $\theta \approx 0^\circ$, o líquido se espalha indefinidamente sobre o sólido, ou seja, o molhamento é total (LUIZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C., 2008).

O conceito de energia de superfície está relacionado com as moléculas na superfície do líquido, as quais experimentam apenas forças atrativas ou repulsivas direcionadas para dentro do mesmo. Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia. E é justamente a diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material que se denomina energia de superfície. Além disso, a energia de superfície indica a capacidade de uma superfície em interagir espontaneamente com outros materiais, formando novas ligações (CALLOW et al., 2005).

O ângulo de contato e a energia de superfície foram avaliados pela técnica da gota séssil em um goniómetro (Ramé-Hart, 100-00) utilizando água deionizada (substância polar) e diiodometano (substância não polar) como líquidos de análise. Pelo

menos três gotas foram depositadas em diferentes posições das amostras e o ângulo de contato foi medido em cada lado da gota. As medições foram realizadas a temperatura ambiente e sob um ambiente de umidade controlada. O ângulo de contato e a energia de superfície foram avaliados pelo software DROPimage com base na equação de Young-Laplace descrevendo o perfil de queda de gotas sésseis. Mais especificamente, o cálculo da tensão superficial foi feito por meio de um método baseado em mínimos quadrados ajustados aos perfis teóricos produzidos por uma integração numérica da equação de Young-Laplace (HANSEN; RØDSRUD, 1991).

5.16 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) é amplamente usada para investigar a composição química das superfícies sendo baseada no efeito fotoelétrico. Na espectroscopia de fotoelétrons, uma fonte de radiação eletromagnética é usada para ejetar os elétrons da amostra, no XPS a fonte convencional de fótons são raios X para as linhas $K\alpha$ do magnésio (1253,6 eV) ou do alumínio (1486,6 eV). Estes fótons têm uma força de penetração no sólido limitada na ordem de 1 a 10 micrômetros, respectivamente. A identificação dos elementos presentes na superfície é feita diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos dos fotoelétrons de caroço (camada mais interna). A intensidade (área integrada de picos fotoelétricos) é proporcional ao número de átomos no volume da amostra detectado, permitindo, portanto, obter-se informações sobre a composição da superfície. Esta emissão de elétrons tem a energia cinética dada pela fórmula:

$$KE = h\nu - EB - \varphi_{sp} \quad (4)$$

Onde: KE = energia cinética; h = constante de Planck; ν = frequência; $h\nu$ = energia do fóton; EB = energia de ligação; e ϕ_{sp} = função de trabalho do espectrômetro.

As energias cinéticas do fotoelétron são, portanto, características de cada elemento, de modo que a distribuição de energia dos elétrons emitidos revela todos os elementos presentes na superfície, com exceção do hidrogênio.

O estado químico dos elementos presentes nas amostras foi analisado em um equipamento da marca Renishaw, modelo Kratos AXIS-165, do Centro de Recursos de Pesquisa da Universidade de Illinois em Chicago, utilizando uma fonte monocromática de raios X Al $K\alpha$. As amostras foram analisadas com um ângulo de saída, definido como o ângulo emitido com relação à superfície, de $54,7^\circ$. A resolução de energia foi igual a $0,45$ eV. Os espectros survey foram adquiridos com uma resolução da energia de varredura igual a 80 eV, e os espectros individuais de alta resolução com 20 eV. A fim de corrigir os dados de efeitos de carregamento, a energia de ligação do Ti $2p$ foi normalizada em $458,8$ eV. A deconvolução dos espectros foi realizada utilizando o software CasaXPS. A identificação dos picos foi baseada em um ajuste consistente.

5.17 Microscopia Óptica Confocal de Fluorescência

O microscópio confocal é um microscópio óptico que, assim como o microscópio de fluorescência, baseia-se no uso de compostos fluorescentes (fluoróforos) que, ligados a estruturas específicas, determinam sua localização. O uso dos fluoróforos para observação de células, por exemplo, acontece quando se quer localizar uma área específica da amostra ou para responder a um estímulo específico.

A fluorescência acontece por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons com energia proveniente de uma fonte (uma lâmpada ou um feixe laser) e passam de um estado fundamental (estado de mais baixa energia) para um estado excitado (de mais alta energia). Neste estado o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada e o elétron passa para um estado de menor energia, não necessariamente o estado fundamental. A diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia é emitida em forma de um fóton. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem. A fonte de luz do microscópio confocal é constituída por diversas linhas de lasers que se movem através de um scanner de modo a focalizar a amostra linha por linha. Após a excitação pelo laser, a amostra emite fluorescência em outro comprimento de onda, que é então determinado pelos diferentes detectores.

As imagens de microscopia óptica confocal de fluorescência das células mesenquimais humanas contendo o gene da proteína verde fluorescente foram adquiridas em um microscópio Zeiss LSM 710 do Centro de Recursos de Pesquisa da Universidade de Illinois em Chicago, com magnificação de 20x.

5.18 Ensaio de proliferação e viabilidade celular

O ensaio de proliferação celular empregou um composto tetrazólico conhecido como MTS, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio], e um agente acoplador de elétrons (etosulfato de fenazina; PES), o qual

melhora a estabilidade química da solução ao ser combinado com o MTS. Esta solução foi projetada para quantificar espectrofotometricamente o crescimento celular, a viabilidade e proliferação, podendo ser utilizado como um indicador direto de citotoxicidade.

O corante MTS é reduzido da mesma forma que o conhecido MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), pela enzima desidrogenase mitocondrial de células metabolicamente viáveis, com a formação de cristais de formazan. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário. Dessa forma, a redução do MTS à formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. A análise é realizada em um espectrofotômetro, sendo a absorbância medida diretamente proporcional à viabilidade celular.

A medida de absorbância foi adquirida com a análise a 490 nm em um espectrofotômetro Synergy 2 do Laboratório da professora Anne George na Universidade de Illinois em Chicago.

5.19 Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de reação em cadeia da polimerase, PCR, consiste basicamente na amplificação *in vitro* de uma região específica de DNA ou RNA com intuito de aumentar o número de cópias deste, a fim de produzir material suficiente para as diversas análises. A PCR em Tempo Real é uma variação da técnica de PCR, a qual permite que a amplificação e detecção ocorram simultaneamente. O resultado é

visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse, com capacidade ainda de gerar resultados quantitativos com maior precisão.

A progressão da reação de PCR em tempo real passa por duas fases distintas, a fase exponencial e a fase de *plateau*. Na fase exponencial ocorre a desnaturação das cadeias de DNA ou RNA, hibridação dos *primers* com síntese dos produtos através da ação da polimerase. O número de ciclos que a reação demora a entrar na fase exponencial depende da quantidade inicial de material, por isso nenhum intervalo específico pode ser definido, devendo ser identificado experimentalmente para cada sistema. Durante os primeiros ciclos da reação, o sinal de fluorescência é fraco e não é possível distinguir do *background*. Com o incremento da quantidade de produto formado o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente, até que se atinge a fase *plateau*, a qual corresponde aos ciclos finais da reação. Esta fase é atingida pela limitação dos reagentes, inativação da polimerase ou redução da eficiência da desnaturação. O sinal de fluorescência é detectado por um termociclador adaptado com um software, o qual traduz graficamente em tempo real os dados da emissão de fluorescência obtidos durante a amplificação.

As soluções foram colocadas em placas de 96 poços e analisadas em um leitor de PCR em tempo real modelo StepOnePlus da marca Applied Biosystems da Universidade de Illinois em Chicago.

6. Resultados e Discussão

A seguir são descritos os resultados obtidos para a análise da funcionalização de substratos de Ti CP4 com relação às suas propriedades físico-químicas, topografia e rugosidade superficial, biocompatibilidade, bioatividade, características eletroquímicas e mecânicas.

6.1 Caracterização dos óxidos metálicos

Os filmes de dióxido de titânio e de óxido de zinco foram analisados pela técnica de DRX a fim de identificar a fase cristalina destes materiais. Além disso, a topografia e espessura dos filmes foram analisadas por MEV. A seguir são descritos os resultados obtidos para os filmes de TiO_2 e ZnO .

6.1.1 TiO_2

Na Figura 15, o pico (110) do espectro de difração de raios X é bastante evidente para o TiO_2 em $2\theta = 27,7^\circ$, indicando a presença da fase cristalina polimórfica rutilo. Outros picos de difração característicos da fase TiO_2 rutilo são observados no intervalo de 2θ entre 20° e 45° com valores de $36,3^\circ(101)$, $39,4^\circ(200)$, $41,5^\circ(111)$ e $44,3^\circ(210)$. Dois picos de difração de baixa intensidade aparecem em torno de aproximadamente 25° e 40° , os quais podem ser atribuídos à fase anatase e ao titânio metálico, respectivamente. O pico de titânio metálico é originado do substrato. Uma vez que a camada de óxido depositada é fina, o sinal de raios X do substrato pode ser detectado.

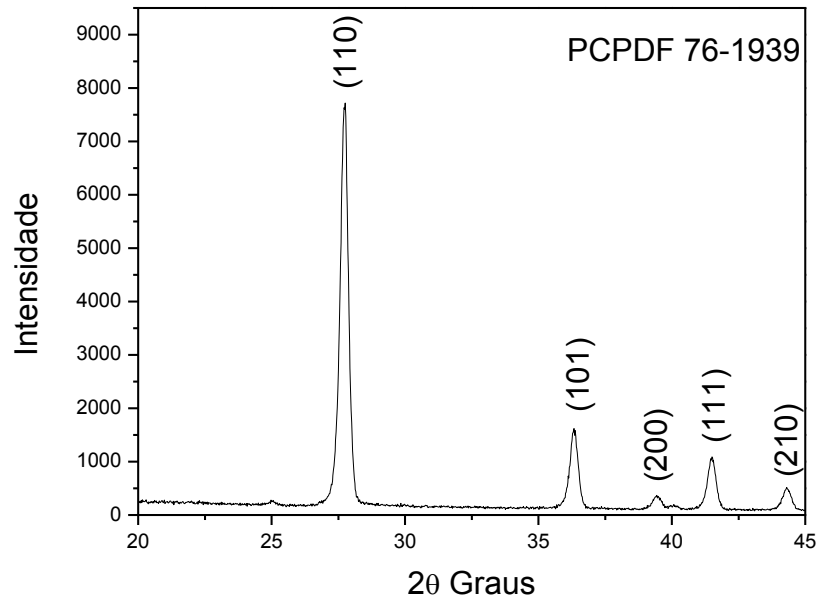


Figura 15. Espectro de difração de raios X dos filmes de TiO_2 , sendo observada a presença da fase rutilo.

Uma das grandes vantagens da fase rutilo com aplicação em biomateriais é o aumento da resistência à tribocorrosão do implante de Ti sem comprometer as propriedades biológicas da superfície (ALVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015). Esta característica é observada devido à elevada dureza do TiO_2 rutilo, o qual apresenta um maior empacotamento atômico em comparação com a fase anatase (KHALIFA; LIN; ISMAT SHAH, 2010).

A superfície dos filmes de TiO_2 foi analisada por MEV. Na Figura 16a é possível observar que o óxido apresenta uma estrutura rugosa, granular e com a presença de partículas sinterizadas devido à alta temperatura de tratamento térmico empregada. Porém, apesar do tratamento térmico à 850°C , não são observados defeitos na superfície. O tamanho médio das partículas foi estimado usando o Software Image J,

com o qual foi possível verificar que as partículas de TiO_2 rutilo encontram-se numa média de $75 (\pm 6)$ nm.

A imagem de seção transversal mostra uma boa adesão na interface entre substrato de titânio e o filme de TiO_2 (Figura 16b). A superfície de titânio normalmente não possui grupos hidroxilas intrínsecos suficientes para ligação covalente com o TiO_2 . Para superar isso, o uso da solução Piranha, um oxidante forte, forneceu uma superfície hidroxilada para formar ligações covalentes entre os grupos $-\text{OH}$ da superfície de titânio e o TiO_2 . Além disso, é possível observar pela Figura 16b que a espessura do filme de TiO_2 encontra-se em torno de 500 nm. A espessura do filme foi controlada pela viscosidade da solução precursora e pela velocidade de rotação durante a deposição por *spin-coating*.

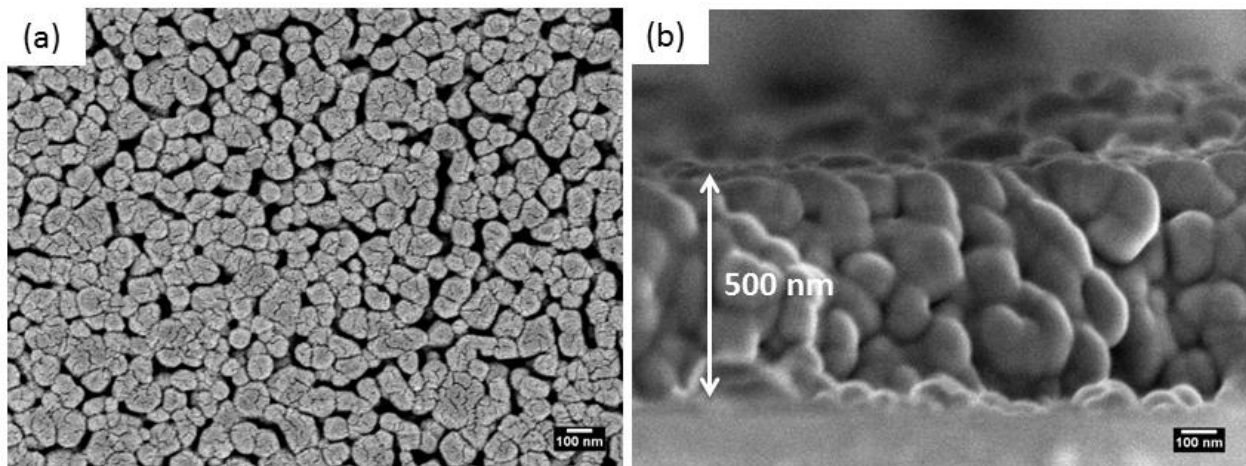


Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície (a) e da seção transversal (b) para os filmes de TiO_2 .

6.1.2 ZnO

Os filmes de ZnO apresentaram os picos de difração em 2θ igual a $31,8^\circ$ (100), $34,5^\circ$ (002) e $36,3^\circ$ (101), conforme apresentado na Figura 17. Estes picos de difração

correspondem à estrutura característica da fase wurtzita hexagonal das nanopartículas de ZnO (AMUTHA et al., 2016). A intensidade do plano (101) apresentou-se mais elevada, indicando que os cristalitos de ZnO encontram-se orientados preferencialmente neste plano. Uma das principais características das nanoestruturas de ZnO que permite sua aplicação em biomateriais é o fato destas exibirem propriedades bactericida e piezoelétricas (ZHAO; WANG; MAO, 2004), as quais estão associadas com a fase cristalina wurtzita das nanoestruturas de ZnO. Além dos picos de ZnO associados à fase wurtzita, é possível verificar no espectro de difração a presença de TiO_2 rutilo, devido ao óxido nativo existente na superfície do titânio, o qual tornou-se cristalino com o tratamento térmico aplicado. Além disso, também foi observada a presença de titânio metálico, uma vez que a camada de ZnO é bastante fina. Os raios X são radiações eletromagnéticas que são absorvidas pelos materiais, de modo que sua intensidade decai exponencialmente em relação ao caminho percorrido. A profundidade de penetração dos raios X é dependente do ângulo de incidência e também das propriedades do material, como densidade, e normalmente encontra-se na ordem de micrômetros (LIU; SAW; KIANG, 2010). Como a espessura do filme de ZnO é menor que no de TiO_2 , o pico de Ti metálico do substrato é mais intenso neste primeiro.

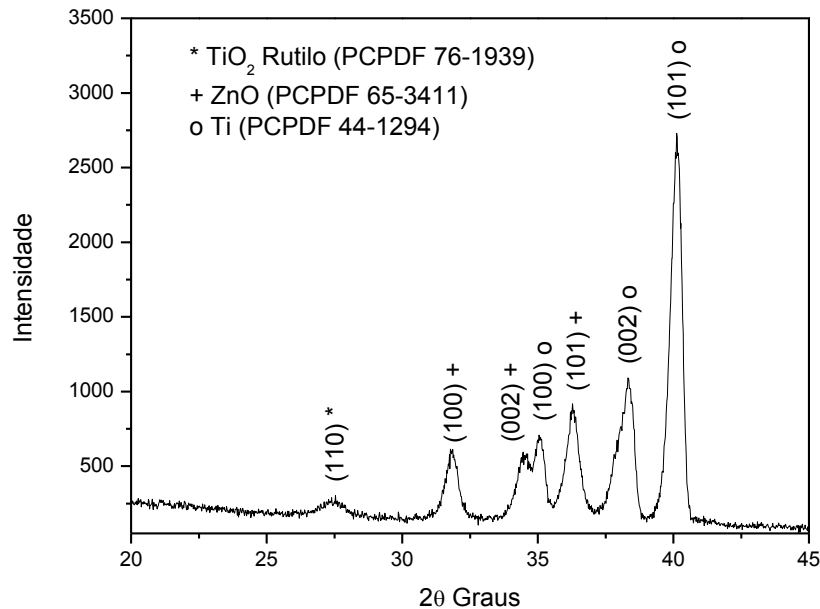


Figura 17. Espectro de difração de raios X dos filmes de ZnO, sendo observada a presença da fase wurtzita.

Os filmes de ZnO apresentaram uma topografia uniforme com partículas menores quando comparadas às do filme de TiO₂. O tamanho médio das partículas de ZnO wurtzita analisado pelo software Image J exibiu um valor de aproximadamente 67 (± 9) nm, conforme apresentado na Figura 18a. A espessura dos filmes de ZnO é apresentada na Figura 18b, sendo aproximadamente 100 nm. Apesar da metodologia de deposição dos filmes ser a mesma empregada para ambos os óxidos, a espessura e tamanho de partícula dos mesmos é diferente, pois a solução precursora e o tratamento térmico ao qual são submetidos não são os mesmos.

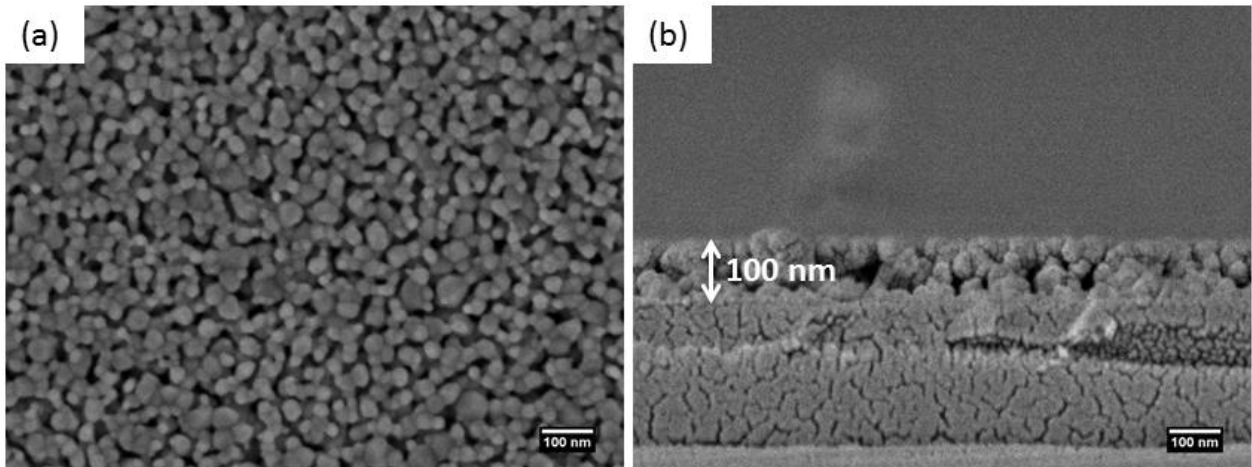


Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície (a) e da seção transversal (b) para os filmes de ZnO.

O processo de nucleação e crescimento das partículas inicia-se durante a deposição dos filmes, onde ocorre uma equalização entre as forças centrífuga e de cisalhamento, diminuindo a altura da película líquida. Em seguida, a evaporação do solvente torna-se a força dominante na redução da espessura do filme, resultando na concentração do soluto, TiO_2 ou ZnO , causando supersaturação e, por fim, a nucleação e o crescimento das partículas. Quando uma grande quantidade de energia é fornecida ao sistema, no caso como energia térmica durante a sinterização, maior é a força motriz para o crescimento das partículas, resultando em tamanhos maiores destas e, portanto, uma maior espessura do filme. Por isso, os filmes de ZnO apresentam tamanhos de partícula e espessura menores que o TiO_2 , uma vez que a temperatura máxima atingida durante o tratamento térmico foi de $500\text{ }^\circ\text{C}$ no primeiro caso e de $850\text{ }^\circ\text{C}$ no segundo.

6.2 Propriedades físico-químicas dos óxidos metálicos funcionalizados

As propriedades dos óxidos metálicos podem ser alteradas, conforme mencionado anteriormente, modificando-se a constituição química da superfície. A funcionalização química, ou quimissorção, do TiO_2 e ZnO com moléculas bifuncionais orgânicas pode transformar a superfície destes materiais, melhorando a molhabilidade, as propriedades eletroquímicas e a biocompatibilidade dos óxidos. As moléculas orgânicas, ou espaçadores, que irão interagir com a superfície dos óxidos apresentam dois grupos funcionais, os quais podem atuar de maneira diferente na superfície do biomaterial. O grupo funcional com maior afinidade pela superfície, “principal”, interage com os grupos hidroxila presente na mesma. O outro grupo funcional, “terminal”, fica livre para interagir com o meio biológico, determinando as propriedades de superfície do material funcionalizado (LOVE et al., 2005).

Pelo método de imersão de um substrato sólido em soluções contendo a molécula bifuncional orgânica, a adsorção espontânea destas moléculas leva à formação de uma monocamada orientada, ou SAMs. Dependendo do período de imersão e da estrutura da molécula, mais moléculas orgânicas podem ou não ser adsorvidas. A repetição cíclica do processo de imersão e secagem levará à formação de uma multicamada com orientação alternada, devido às interações hidrofóbicas ou hidrofílicas, de acordo com os grupos funcionais apresentados na molécula ligante (LOVE et al., 2005).

A interação covalente entre os filmes de TiO_2 e ZnO e as funções orgânicas depende das condições de reação e dos grupos funcionais presentes na molécula espaçadora, dessa forma, foram avaliados diferentes grupos funcionais a fim de se obter diferentes interfaces químicas. As moléculas orgânicas bifuncionais analisadas

foram (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$), ácido 3-(4-aminofenil)propiónico (APPA, $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), ácido 3-mercaptopropiónico (MPA, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), e polietileno glicol (PEG, $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$). A presença dos grupos espaçadores pode levar à uma ligação covalente entre a biomolécula e a molécula orgânica, diminuindo o impedimento estérico e resultando em um material mais estável. Para determinar se as condições aplicadas levaram à funcionalização dos óxidos, as superfícies foram analisadas por XPS, ângulo de contato, energia de superfície, AFM e microscopia óptica confocal.

6.2.1 XPS dos filmes de TiO_2 funcionalizados

A espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) foi utilizada para examinar a adsorção dos grupos amina, silano, mercapto, ácido carboxílico e hidroxila na superfície dos filmes de TiO_2 . Os resultados de XPS mostraram um aumento na intensidade do pico de C 1s para todas as amostras funcionalizadas quando comparado com a amostra revestida apenas com TiO_2 . A presença de C 1s associado aos picos de átomos específicos de cada molécula orgânica são indicativos de uma funcionalização efetiva dos óxidos (Figura 19a). Diferentes contribuições de oxigênio podem ser observadas no espectro de alta resolução de O 1s a partir do espécime TiO_2 (Figura 19b), o qual pode ser dividido em três picos: os dois primeiros localizados em energia mais baixa são típicos para as ligações de óxido metálico em TiO_2 (MOULDER, 1992), o outro localizado em 531,5 eV é atribuído ao oxigênio nas ligações Ti-OH (SHAHNAS BEEGAM; NARENDRANATH; PERIYAT, 2017). Os resultados XPS para o TiO_2 provaram que a superfície contém grupos hidroxila que atuam como pontos de

ancoragem para a formação de mono ou multicamadas das moléculas orgânicas bifuncionais (TRINO et al., 2018).

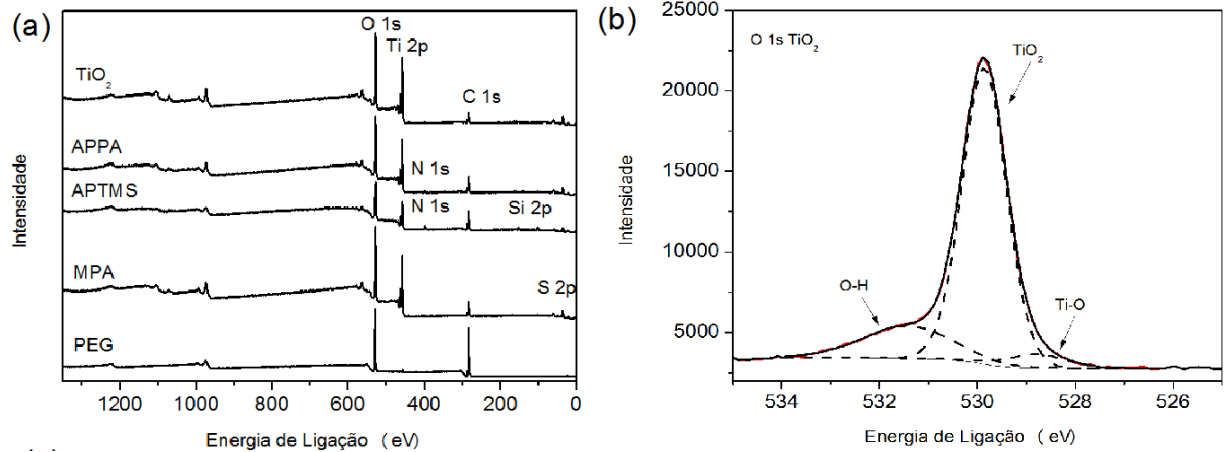


Figura 19. Espectro *survey* de XPS para as amostras de TiO₂ (a) funcionalizadas, e espectro de alta resolução do O 1s para o filme de TiO₂ (b).

A seguir são discutidos o modo de adesão preferencial das moléculas de APPA, APTMS, MPA e PEG na superfície de TiO₂, baseado no espectro de alta resolução dos elementos específicos de cada amostra.

O APTMS possui os grupos funcionais amino e silano, podendo aderir à superfície dos óxidos por ambos os lados. Analisando os dados de XPS é evidente, especialmente pelos espectros de N 1s e O 1s, que as moléculas de APTMS aderiram efetivamente à superfície de TiO₂. Várias características específicas permitem conclusões adicionais sobre a formação da ligação covalente e a conformação da ligação entre a molécula e a superfície do óxido. Após a adesão do APTMS o espectro de C 1s foi dividido em três componentes em 285,2, 287,0 e 288,8 eV, os quais podem ser atribuídos às espécies C-C, C-N e C-O-Si, respectivamente (Figura 20a). As espécies C-O-Si são provenientes de grupos etoxi do silano que não reagiram (TAN et al., 2011). No espectro de N 1s (Figura 20b) observa-se um pequeno pico largo em

397,8 eV atribuído à ligação N-Ti, indicando que uma pequena quantidade de moléculas de APTMS pode estar ligada através de grupos amina. No entanto, um pico acentuado e intenso em 399,4 eV, atribuído ao NH₂, e outro em 401,2 eV, relacionado com ligação C-N, indicam uma interação preferencial das moléculas de APTMS na superfície de TiO₂ através da silanização, pois quando ocorre acoplamento dos silanos são observados grupos NH₂ livres (SONG; HILDEBRAND; SCHMUKI, 2010). Além disso, caso ocorresse a adesão reversa seria observado um pico de N 1s em 400,9 eV, o que não ocorre. A adesão pela silanização também pode ser confirmada pelo espectro de O 1s (Figura 20c), a qual mostra cinco diferentes contribuições. As duas primeiras relacionadas ao titânio ligado com oxigênio no TiO₂. Na energia de 531,3 eV é observada a espécie Ti-O-Si, formada após silanização. Já os dois picos em maior energia podem ser atribuídos às espécies O-Si-O (532,7 eV) e Si-OH (534,4 eV). O mecanismo de adesão do APTMS, conforme apresentado na Figura 6, ocorre primeiramente através da hidroxilação dos silanos, depois os grupos Si-OH reagem rapidamente por condensação formando os grupos Si-O-Si com a hidroxila da superfície, bem como com os grupos silanóis vizinhos. Assim, a ligação covalente entre os silanos e o substrato estabiliza a monocamada (PUJARI et al., 2014).

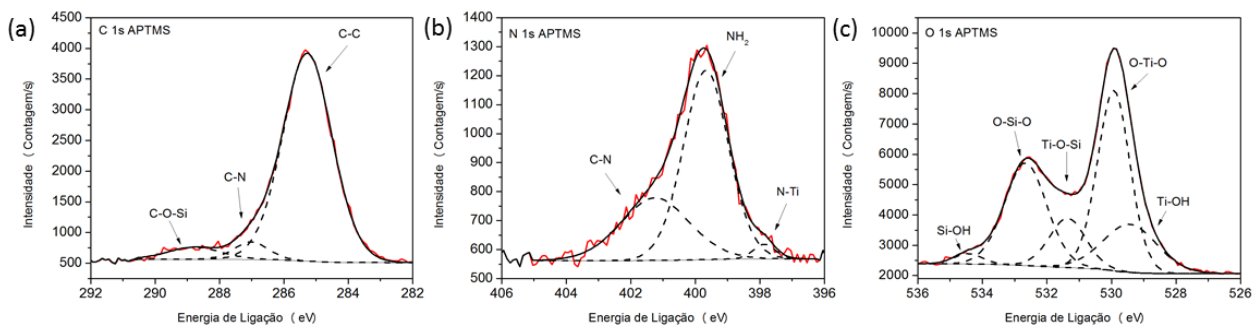


Figura 20. Espectros de XPS de alta resolução para C 1s (a), N 1s (b) e O 1s (c) do APTMS sobre o filme de TiO₂.

A adsorção das moléculas de APPA sobre os óxidos pode ocorrer através de grupos carboxílicos ou amino. A Figura 21a apresenta o espectro de alta resolução para o C 1s, o qual apresentou três componentes em 285,2, 286,9 e 288,9 eV, os quais são atribuídos às ligações C-C, C-N e COO⁻. O espectro de N 1s (Figura 21b) mostra a contribuição das espécies C-N (400,1 eV) e NH₃⁺ (401,2 eV) (MOULDER, 1992). A presença de NH₃⁺ é devido a formação da amina zwitteriônica, a qual favorece a adsorção através dos grupos COOH (ATAMAN et al., 2011; FLEMING et al., 2008; WILSON; DOWLER; IDRIS, 2011). A ausência de ligações N-Ti indica que não há interação entre o dióxido de titânio e o nitrogênio na superfície do óxido. Outro fator que evidencia a adesão do APPA pelo grupo carboxílico é a diminuição da ligação O-Ti-O (529,9 eV), comparando a amostra funcionalizada com o filme de TiO₂, seguida de um aumento da espécie COO⁻ (532,0 eV), após a adesão do APPA (Figura 21c).

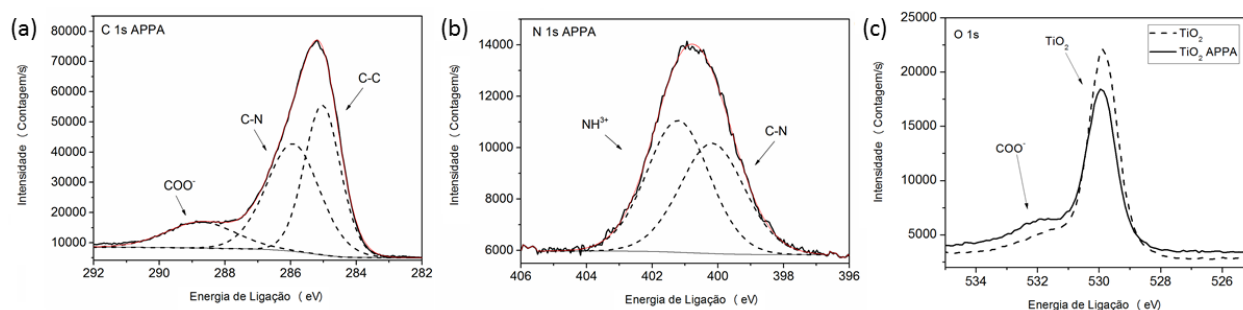


Figura 21. Espectro de XPS de alta resolução para o C 1s (a) e N 1s (b) da molécula APPA sobre TiO₂. Uma comparação dos espectros de O 1s do TiO₂ com e sem funcionalização é mostrada em (c).

O pH da solução e as propriedades ácidas e básicas do óxido influenciam diretamente na ligação com a molécula orgânica. Os filmes de TiO₂ possuem um pH no qual as cargas positivas e negativas resultantes da dissociação dos grupos -OH na solução estão balanceadas, resultando em uma carga total igual a zero (HANAWA,

2011). Este pH, conhecido como ponto de carga zero (pcz), é igual a 5,3 para o TiO₂ rutilo. Isso significa que em soluções de pH maior que 5,3 a superfície do TiO₂ possui característica básica (negativamente carregada).

A adesão das moléculas de MPA na superfície dos óxidos pode ocorrer pelos grupos tiol ou carboxílico. Considerando o pcz do TiO₂ rutilo e o pH da solução de MPA espera-se que a ligação ocorra através dos grupos S-H, pela desprotonação dos grupos tióis. A ligação pelos grupos tióis ocorre pois o pH da solução de MPA é igual a 3 (menor que 5,3), deixando a superfície do TiO₂ com características ácidas (positivamente carregada) e, conseqüentemente, com adesão preferencial através dos grupos S-H. A Figura 22a mostra o espectro do C 1s após a adesão do MPA, no qual três componentes são observados: o primeiro em menor energia está relacionado à ligação C-C na molécula de MPA (284,9 eV); uma contribuição a 285,8 eV está associada à ligação C-S; e a ligação com maior energia (288,6 eV), pode ser atribuída à presença de COOH (TRINO et al., 2018). O espectro de S 2p exibe vários acoplamentos de rotação spin-órbita S 2p (S 2p_{1/2} e S 2p_{3/2}) em aproximadamente 159, 164 e 168 eV. A partir da análise do espectro S 2p, Figura 22b, podemos concluir que o acoplamento ocorre preferencialmente pelo grupo funcional mercapto, devido à presença de um dubleto perto de 164 eV que é comumente atribuído à ligação S-Ti (RAJ et al., 2010), e outro acoplamento de rotação spin-órbita S 2p atribuído à espécies S-Ti⁺³ em 159,7 eV (ZHANG et al., 2014). Além disso, em 168,8 eV observa-se que outro dubleto é atribuído à ligação S-O, a qual está associada aos grupos hidroxila presentes na superfície do TiO₂ (RAJ et al., 2010). Estes resultados corroboram com a relação entre o valor do pH_{pzc} encontrado para os filmes de TiO₂ rutilo com o pH da

solução de MPA, indicando que esta molécula se liga covalentemente com a superfície do TiO₂ através de grupos mercapto.

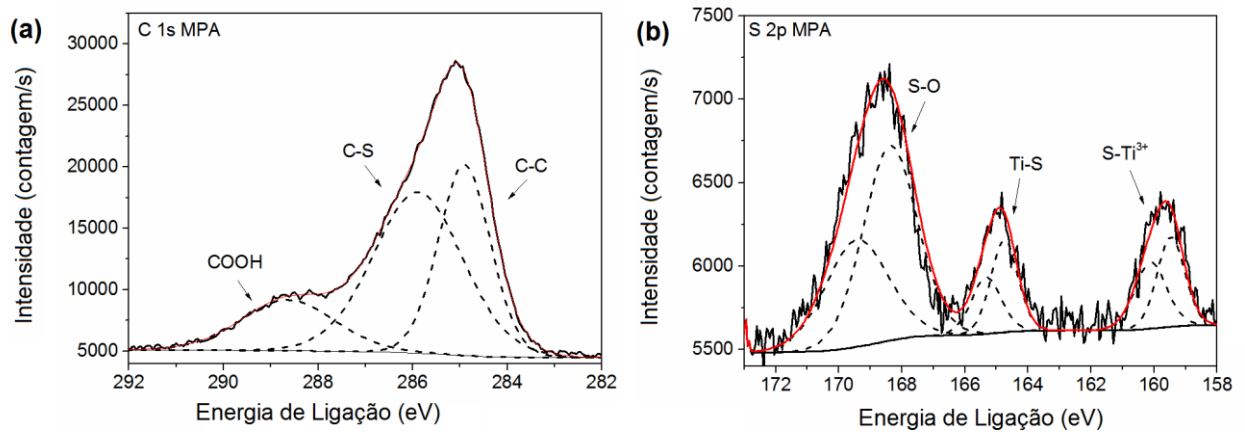


Figura 22. Espectros de XPS de alta resolução para C 1s (a), e S 2p (b) da amostra de TiO₂ funcionalizada com MPA.

O PEG possui vários grupos hidroxila disponível para formação de *crosslinking*. A Figura 23a mostra o espectro de alta resolução do C 1s com três contribuições em 284,9, 286,0 e 286,4 eV, referente às ligações C-C, C-OH e C-O-C. No espectro de O 1s (Figura 23b) é observado picos de baixa intensidade referentes às espécies O-Ti-O e O-H em 529,8 e 531,0 eV, respectivamente. Um pico acentuado e intenso em 532,4 eV, atribuído a -CH₂-CH(OH)-_n indica a formação de uma camada polimérica na superfície do TiO₂. Os grupos hidroxila do PEG formaram *crosslinking* entre si através da polimerização, conforme indicado pelo aumento dos picos de C 1s e O 1s no *survey* da amostra funcionalizada com PEG, seguido da diminuição da intensidade do pico de Ti 2p (Figura 25c) (KETUL C. POPAT; SADHANA SHARMA; TEJAL A. DESAI, 2004).

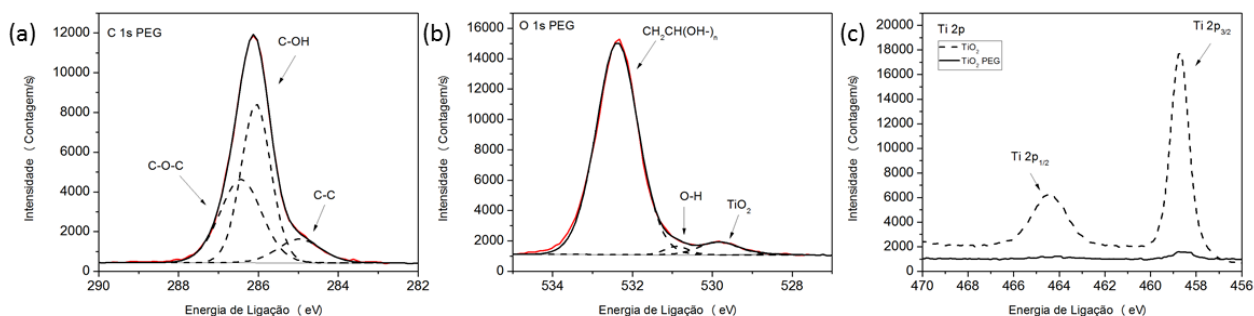


Figura 23. Espectro de XPS de alta resolução para o C 1s (a) e O 1s (b) da molécula PEG sobre TiO_2 . Uma comparação dos espectros de Ti 2p do TiO_2 com e sem funcionalização é mostrada em (c).

6.2.2 XPS dos filmes de ZnO funcionalizados

O espectro de O 1s para ZnO mostra três contribuições diferentes (Figura 24a), o pico em energia mais alta (532,0 eV) está relacionado às ligações O-H. As ligações de óxido metálico (Zn-O) aparecem em 530,5 eV, enquanto em 528,9 observa-se a ocorrência de ligações Ti-O, referente ao óxido nativo do substrato de Ti CP4, corroborando com os dados de DRX que indicaram a presença de TiO_2 rutilo. Os resultados de XPS para TiO_2 e ZnO provaram que a superfície contém grupos hidroxila que atuam como pontos de ancoragem para a formação de mono ou multicamadas com as moléculas orgânicas espaçadoras. A intensidade de grupos hidroxila é maior no ZnO, apresentando uma porcentagem atômica de 50,5% contra 17,1% para o TiO_2 . Essa diferença pode estar associada à fase cristalina dos materiais ou ao tratamento térmico sob altas temperaturas, pois o dióxido de titânio pode remover parcialmente os grupos hidroxila (MITTAL, 2009; NOSAKA; NOSAKA, 2016). Esta variação na intensidade pode ser decorrente da dessorção de água e condensação dos grupos –OH, sendo este processo facilitado em altas temperaturas (LIN et al., 2012).

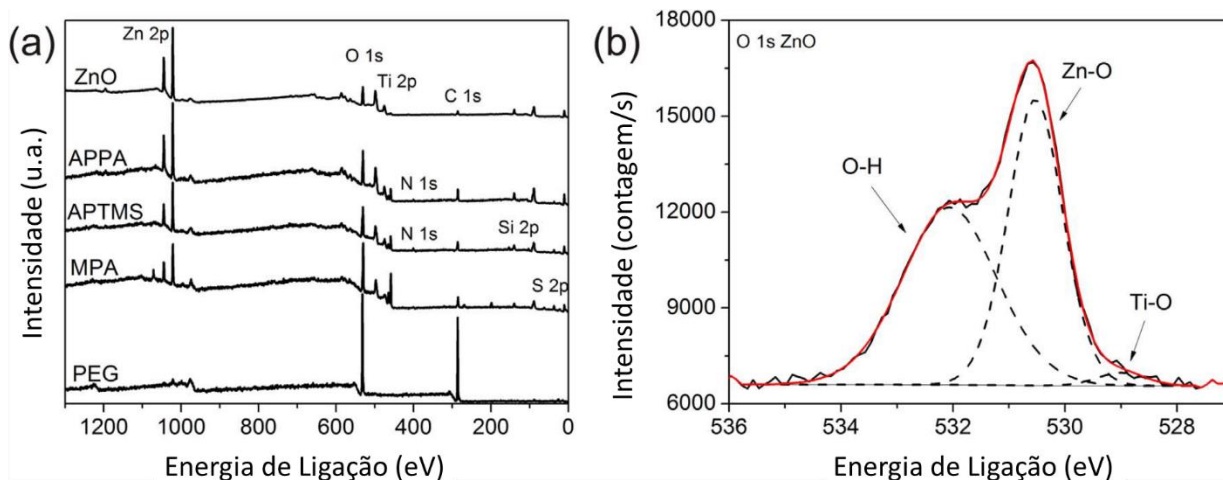


Figura 24. Espectro *survey* de XPS para as amostras de ZnO (a) funcionalizadas, e espectro de alta resolução do O 1s para o filme de ZnO (b).

Analisando os espectros de alta resolução do C 1s, O 1s (Figura 25) e N 1s (Figura 26) para as amostras de ZnO funcionalizadas, é possível avaliar qual grupo funcional de cada molécula orgânica se liga à superfície de ZnO. A molécula de APPA apresentou interações C-C (285,0 eV), C-N (286,7 eV) e COOH (288,9 eV) (MOULDER, 1992). Para o APTMS, é possível observar três contribuições em 285,2, 286,2 e 289,0 eV relacionados com ligações C-C, C-N e C-Si-O, respectivamente. A interação entre MPA e ZnO pode ocorrer através de grupos mercapto, uma vez que grupos ácidos carboxílicos livres foram observados em 288,7 eV no espectro de C 1s. Além disso, contribuições para o C-S (286,5 eV), C-C (284,9 eV) e C-Zn (282,7 eV) foram encontradas, na qual a ligação C-Zn pode aparecer devido a contaminações. O PEG tem vários grupos hidroxila disponíveis que podem se ligar uns com os outros, mostrando maior intensidade para C 1s quando comparado com as demais moléculas bifuncionais. As contribuições encontradas para o C 1s da molécula PEG foram: 284,5

e 286,0 eV, referente a ligações C-C e C-OH, respectivamente (PLYLAHAN et al., 2014).

Na Figura 25b são apresentados os espectros de alta resolução do O 1s para as amostras funcionalizadas. A molécula APPA exibiu a presença de Ti-O, Zn-O e COO⁻ em 529,2, 530,4 e 531,9 eV, respectivamente. Já para a molécula de APTMS quatro contribuições são encontradas: as duas primeiras em 528,5 e 530,2 eV estão relacionadas ao oxigênio ligado aos metais Ti e Zn, respectivamente; e o pico em mais alta energia pode ser atribuído à ligação O-Si-O (532,1 eV) (KHUNG et al., 2015), indicando a adesão de moléculas de APTMS por grupos silano. Para a molécula de MPA são observadas a presença de ligações Ti-O, Zn-O e COOH ou S-O em 528,7, 530,1 e 531,6 eV, respectivamente. Para amostras funcionalizadas com PEG, a presença das ligações Zn-O (530,6 eV) e -CH₂-CH (OH-)_n (532,3 eV) são observadas, sugerindo a formação de uma camada polimérica. A diminuição da intensidade dos picos Zn 2p e Ti 2p seguida por um aumento da intensidade dos picos de O 1s e C 1s, após a deposição do PEG, corrobora com o fato de que o PEG pode polimerizar formando estruturas reticuladas.

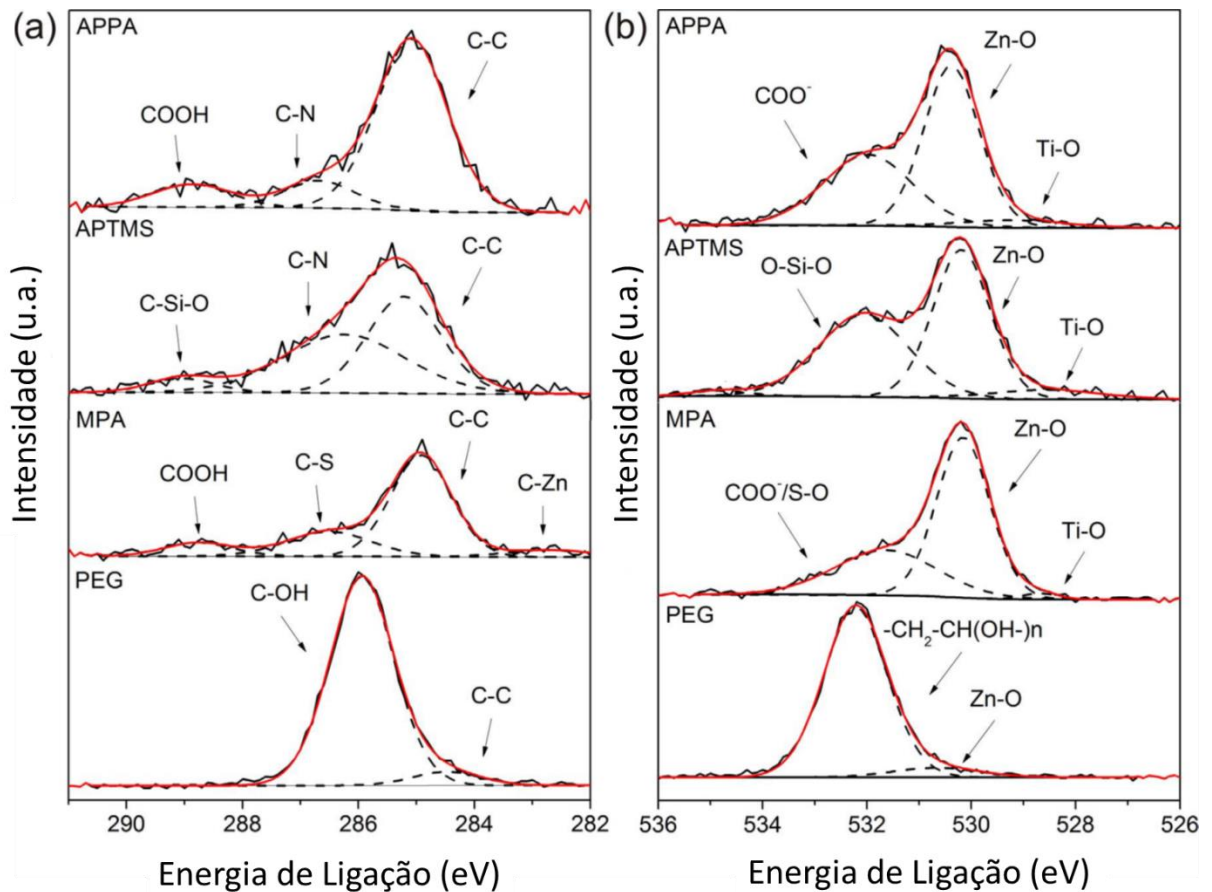


Figura 25. Espectro de XPS de alta resolução do C 1s (a) e O 1s (b) para os filmes de ZnO funcionalizados com APPA, APTMS, MPA e PEG.

Considerando os espectros de alta resolução de N 1s para as moléculas de APPA e APTMS (Figura 26), a adsorção de APPA na superfície de ZnO pode ter uma ligação preferencial através do grupo ácido carboxílico. Nos espectros de N1s, a presença de amina livre (C-NH₂) a 397,2 eV, C-N a 399,9 eV e NH₃⁺ em 403,2 eV foi identificado. A presença de NH₃⁺ é devido à formação da amina zwitteriônica, que associada com a existência de NH₂ livre, favorece a adsorção através dos grupos COOH (ATAMAN et al., 2011; FLEMING et al., 2008). O espectro N1s para APTMS mostra a presença de grupo C-NH₂ livre (400,3 eV). Analisando os dados obtidos dos

espectros de N 1s e O 1s, é evidente que as moléculas de APTMS aderiram à superfície por ligação covalente através de grupos silano (SONG; HILDEBRAND; SCHMUKI, 2010).

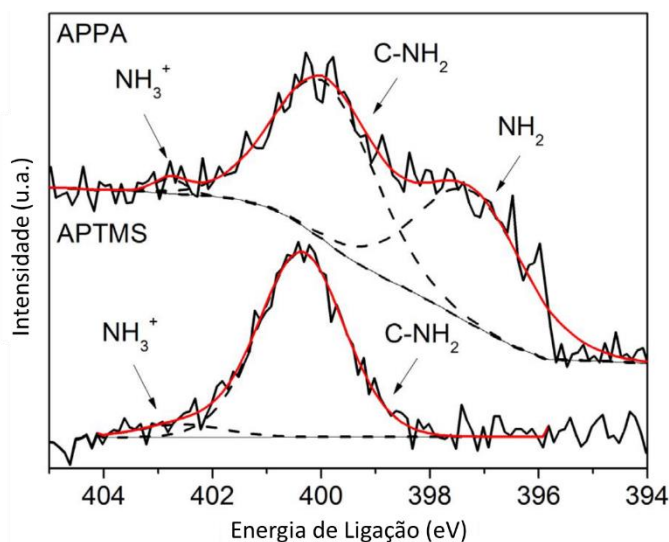


Figura 26. Espectros de alta resolução de N 1s para as superfícies ZnO funcionalizadas com moléculas de APPA e APTMS.

6.2.3 Rugosidade superficial, ângulo de contato e energia de superfície das amostras funcionalizadas de TiO_2

As imagens AFM (Figura 27) mostram uma comparação da topografia de superfície para as várias amostras analisadas. A Figura 27a mostra a superfície de Ti com pequenas partículas e alguns defeitos resultantes do processo de polimento. A superfície do TiO_2 rutilo é caracterizada por grãos maiores dispersos mais homogêaneamente (Figura 27b). As imagens de AFM mostram uma cobertura homogênea da superfície para as moléculas APPA e MPA, as quais aparecem como pequenos pontos brancos nos contornos de grãos do TiO_2 (Figura 27c e 27e). A adesão das moléculas APPA e MPA na superfície do dióxido de titânio podem ocorrer através dos contornos de grãos do TiO_2 devido à maior energia superficial nessas regiões. Em

contrapartida, as moléculas APTMS e PEG mostraram a formação de multicamadas, caracterizada por uma deposição densa na superfície em que as nanopartículas de óxido metálico foram completamente cobertas (Figura 27d e 27f). No caso da molécula de APTMS a formação de multicamadas pode ser explicada em termos da natureza do solvente utilizado durante o processo de funcionalização. A presença de água no etanol não anidro leva a uma reação de condensação muito mais rápida, não apenas com os grupos hidroxila da superfície, mas também com os grupos silanóis vizinhos (JAKŠA; ŠTEFANE; KOVAČ, 2014; PUJARI et al., 2014). Isso pode gerar multicamadas não-homogêneas e sem uma orientação específica. As moléculas de PEG, no entanto, possuem vários grupos hidroxila que podem reticular-se para formar uma multicamada.

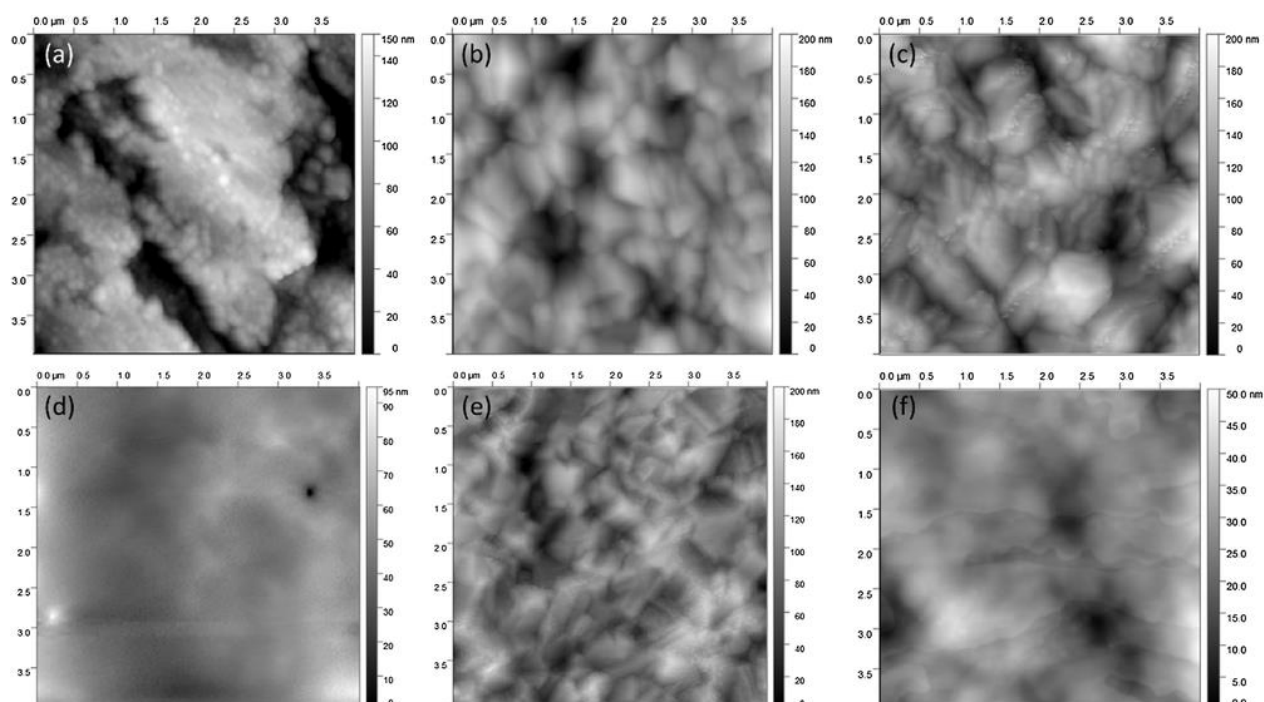


Figura 27. Imagens de AFM para as amostras de Ti (a), TiO₂ (b), TiO₂ APPA (c), TiO₂ APTMS (d), TiO₂ MPA (e) e TiO₂ PEG (f). É possível observar a formação de multicamadas para APTMS e PEG.

A Figura 28 mostra mudanças na rugosidade superficial quadrática média (RMS) do substrato de Ti, filme de TiO₂ e os filmes de TiO₂ funcionalizados. A rugosidade superficial do Ti encontra-se em torno de 180 (± 31) nm. Depois de ser revestido com filmes finos de TiO₂, há um aumento em RMS para 376 (± 32) nm, e alguns picos podem ser observados na imagem de microscopia óptica confocal. Não houve diferença estatística entre as amostras de TiO₂, TiO₂ APTMS (380 \pm 12 nm), TiO₂ MPA (338 \pm 27 nm) e TiO₂ PEG (364 \pm 7 nm). A amostra de TiO₂ APPA indicou uma redução mínima no valor de RMS para 314 (\pm 7) nm. A diferença em rugosidade superficial entre o TiO₂ e as amostras funcionalizadas com todas as moléculas orgânicas analisadas foram inferiores a 50 nm. Assim, podemos assumir que uma camada fina de moléculas orgânicas é formada sobre a superfície TiO₂ mesmo com a formação de multicamadas, no caso de APTMS e PEG, conforme observado pelas imagens de AFM. No caso de TiO₂ APPA, as moléculas orgânicas provavelmente aderiram à superfície nas regiões do vale, mostrando uma ligeira diminuição no valor de RMS.

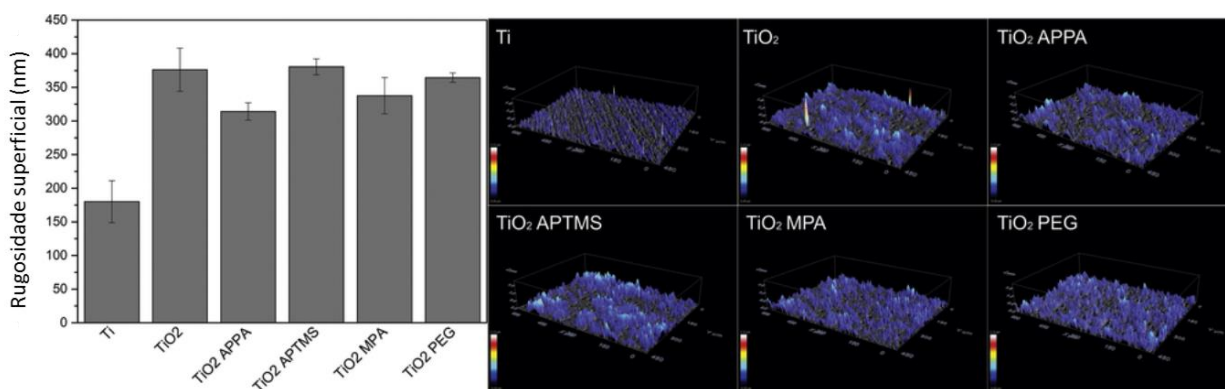


Figura 28. Média da rugosidade superficial para as amostras de TiO₂ analisadas

A rugosidade superficial desempenha um papel importante na aplicação de biomateriais durante a adesão, proliferação e diferenciação celular. Uma melhor resposta celular tem sido encontrada em valores da rugosidade superficial entre 0,3 e 1,5 μm , como as apresentadas (CHEN; MAO, 2007; LOVE et al., 2005).

Para avaliar mais profundamente as mudanças nas propriedades físico-químicas após o processo de adesão das moléculas bifuncionais nas superfícies TiO_2 , a molhabilidade superficial e a energia de superfície foram analisadas. É esperado que haja uma diferença nas propriedades de molhabilidade dos filmes de TiO_2 funcionalizados com relação aos filmes de TiO_2 e ao substrato de Ti devido à presença dos diferentes grupos funcionais terminais presentes nas suas superfícies. A Figura 29 mostra o ângulo de contato da água e a energia de superfície para as amostras controle (Ti e TiO_2) e para as amostras funcionalizadas. O Ti apresentou um valor de ângulo de contato igual a 72° . A modificação da superfície com o filme de TiO_2 aumentou a molhabilidade do material devido à presença de grupos hidroxila terminais, mostrando um ângulo de contato de 67° . Em geral, a funcionalização do TiO_2 levou a um aumento da hidrofiliabilidade do material. A amostra de APPA TiO_2 mostrou um ligeiro aumento na hidrofiliabilidade, com um ângulo de contato de 61° . A molhabilidade da superfície para a amostra de TiO_2 MPA aumentou, o que pode ser verificado pelo valor de 53° para o ângulo de contato. A maior diferença encontrada para o ângulo de contato foi observada para a amostra TiO_2 PEG (18°), a qual apresentou uma superfície com propriedades mais hidrofílicas. Esse comportamento pode ser atribuído à existência de grupos OH na estrutura $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_n$ e à longa cadeia carbônica, a qual pode interagir aleatoriamente na superfície gerando uma superfície homogênea e altamente hidrofílica (PAPRA; GADEGAARD; LARSEN, 2001). A única exceção foi a amostra TiO_2

APTMS. Esta amostra apresentou um ângulo de contato moderado de 73° e um comportamento mais hidrofóbico com relação às outras amostras funcionalizadas.

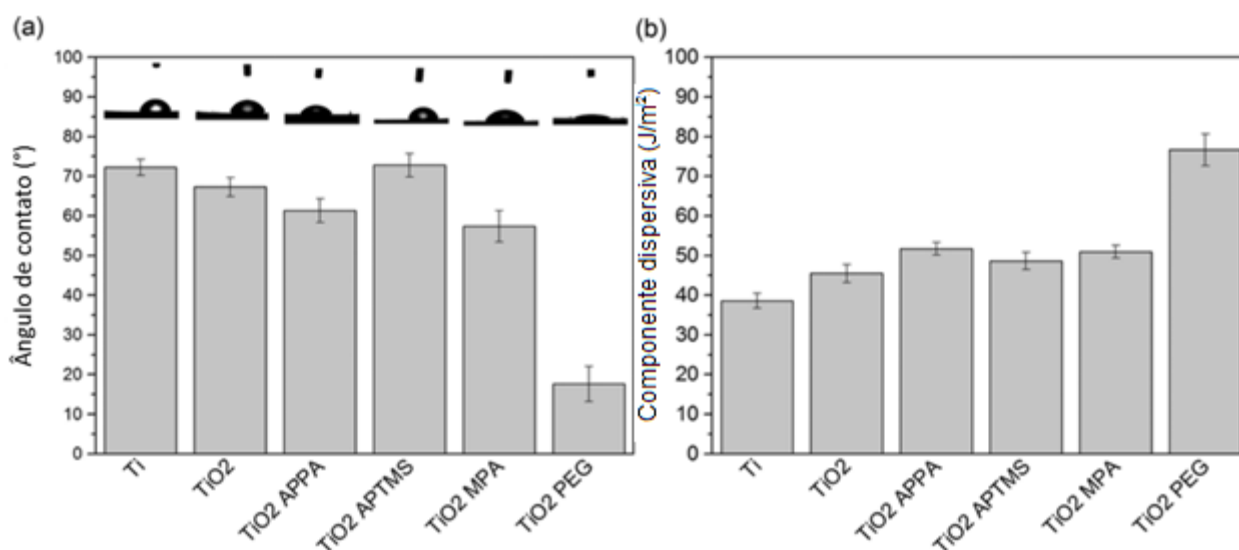


Figura 29. Medidas de ângulo de contato (a) e energia da superfície (b) para as amostras controle (Ti e TiO₂) e para as amostras funcionalizadas, indicando uma maior molhabilidade, exceto para a amostra APTMS, e um aumento da componente dispersiva para as superfícies funcionalizadas.

A camada mais externa controla predominantemente a molhabilidade da superfície dos filmes de TiO₂ funcionalizados (CAI et al., 2006), sugerindo que a modificação da superfície com as moléculas orgânicas foi alcançada. Além disso, a funcionalização da superfície levou a um aumento da energia de superfície. As superfícies de titânio tendem a ter baixa energia superficial ($39 \pm 2,9 \text{ J/m}^2$) (ZHAO et al., 2005). No entanto, com a deposição de filme de TiO₂, um ligeiro aumento para $45 (\pm 2,3) \text{ J/m}^2$ foi observado. Observou-se uma diferença considerável na energia de superfície para as amostras funcionalizadas, devido à presença dos grupos terminais reativos. As amostras de TiO₂ APPA e TiO₂ MPA mostraram um valor similar de $52 (\pm$

1,6) J/m^2 e $51 (\pm 1,7) \text{ J/m}^2$ para a energia de superfície, que pode ser atribuído aos grupos amina ($-\text{NH}_2$) e ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) livres, respectivamente. A amostra TiO_2 APTMS exibiu uma maior energia superficial ($49 \pm 2,2 \text{ J/m}^2$) devido ao aumento da componente dispersiva, quando comparada às amostras controle. Esta observação está relacionada à presença de grupos $-\text{NH}_2$ na superfície. A maior energia superficial foi observada para a amostra TiO_2 PEG ($77 \pm 4,0 \text{ J/m}^2$). A presença de vários grupos hidroxila aumenta a polaridade da amostra TiO_2 PEG e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de interação com as moléculas de água que se aproximam.

Tanto a rugosidade superficial na escala micro e nanométrica, quanto os grupos funcionais químicos, desempenham um papel importante na molhabilidade dos materiais, principalmente nos campos de biomateriais e engenharia de superfícies (KUBIAK et al., 2011; SHIN et al., 2016). Embora as amostras funcionalizadas tenham valores de RMS semelhantes, mesmo pequenos incrementos na rugosidade superficial podem levar a uma maior molhabilidade causada pela química da superfície (WENZEL, 1936). Desta forma, a rugosidade superficial contribuiu para o comportamento hidrofílico da amostra de TiO_2 PEG, bem como ao desempenho mais hidrofóbico observado para a amostra TiO_2 APTMS. Considerando que os valores de RMS, ângulo de contato e energia de superfície foram semelhantes para as amostras de TiO_2 APPA e TiO_2 MPA, presume-se que a principal influência na molhabilidade foi causada pelos grupos funcionais terminais das moléculas orgânicas. Além disso, esses resultados mostram que a natureza físico-química das superfícies de TiO_2 pode ser facilmente controladas através da funcionalização.

6.2.4 Rugosidade superficial, ângulo de contato e energia de superfície das amostras funcionalizadas de ZnO

As imagens AFM (Figura 30) mostram a topografia de superfície para as amostras de Ti, ZnO e ZnO funcionalizadas. A Figura 30a mostra a superfície de Ti, a qual encontra-se parecida com as superfícies utilizadas para deposição do TiO₂, uma vez que os mesmos procedimentos de polimento, limpeza e hidroxilação foram utilizados. A superfície do ZnO wurtzita é caracterizada por grãos pequenos, homogeneamente distribuídos (Figura 30b). As imagens de AFM mostram uma cobertura homogênea da superfície para as moléculas APPA e MPA. Pelo fato das partículas de ZnO serem menores, a deposição destas moléculas, sob as mesmas condições empregadas no TiO₂, forma uma fina camada na qual as partículas de ZnO não ficam mais tão definidas na imagem (Figura 30c e 30e). Por outro lado, as moléculas APTMS e PEG mostraram a formação de multicamadas, caracterizada por uma deposição densa na superfície em que as nanopartículas de ZnO foram completamente recobertas (Figura 30d e 30f). Estas observações estão de acordo com as análises realizadas para as amostras de TiO₂, de modo que as moléculas se comportam de maneira semelhante em ambos os óxidos. Assim, a formação de multicamadas da molécula APTMS é também devido à natureza do solvente utilizado durante o processo de funcionalização. As moléculas de PEG se polimerizam através dos diversos grupos hidroxila, formando multicamadas.

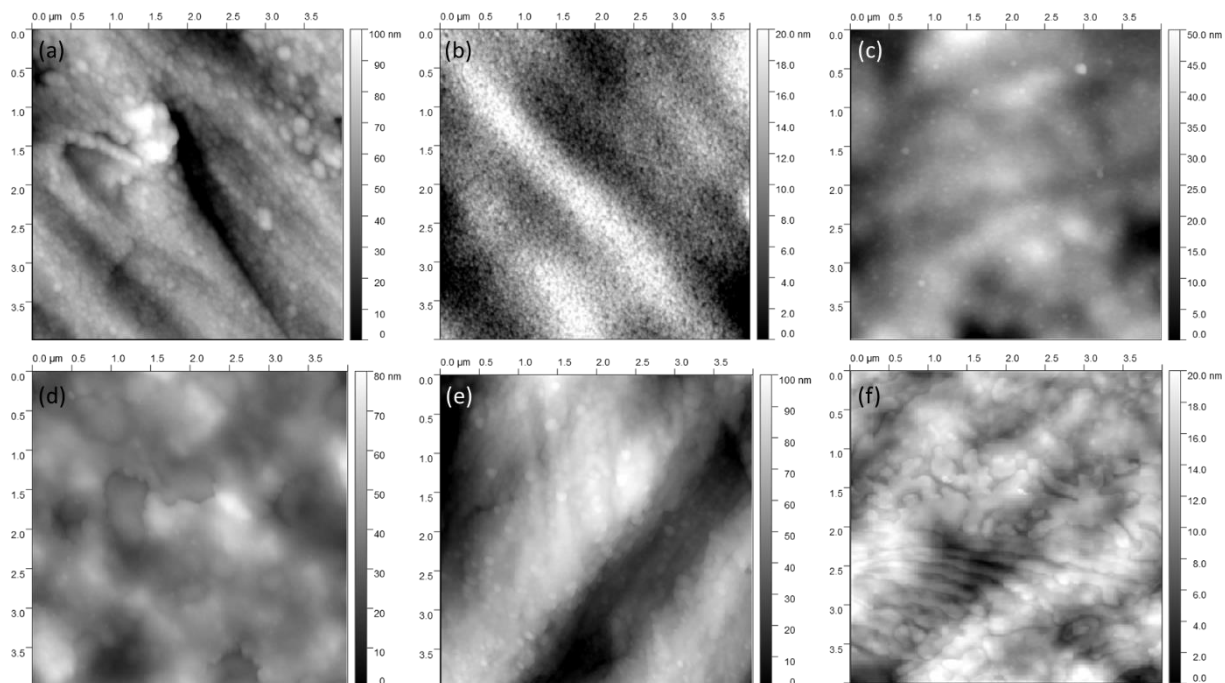


Figura 30. Imagens de AFM para as amostras de Ti (a), ZnO (b), ZnO APPA (c), ZnO APTMS (d), ZnO MPA (e) e ZnO PEG (f).

A rugosidade superficial foi analisada para as amostras controle (Ti e ZnO) e para as amostras de ZnO funcionalizadas (Figura 31). Os valores de RMS indicam que a rugosidade da superfície aumentou de $180 (\pm 31)$ nm para $245 (\pm 3)$ nm com a deposição do filme de ZnO sobre o substrato de Ti. Após a deposição de APPA e MPA, não houve mudanças significativas na rugosidade da superfície, e os valores observados correspondem a $253 (\pm 22)$ nm e $240 (\pm 15)$ nm, respectivamente. No entanto, o valor de RMS aumentou para $294 (\pm 19)$ nm e $271 (\pm 4)$ nm para as amostras contendo APTMS e PEG, respectivamente.

A diferença em rugosidade superficial entre o filme de ZnO e as amostras funcionalizadas com todas as moléculas orgânicas analisadas foram inferiores a 50 nm, comportamento também observado para as amostras de TiO_2 . Portanto, a

funcionalização com as moléculas orgânicas bifuncionais leva à formação de uma fina camada sobre a superfície do óxido.

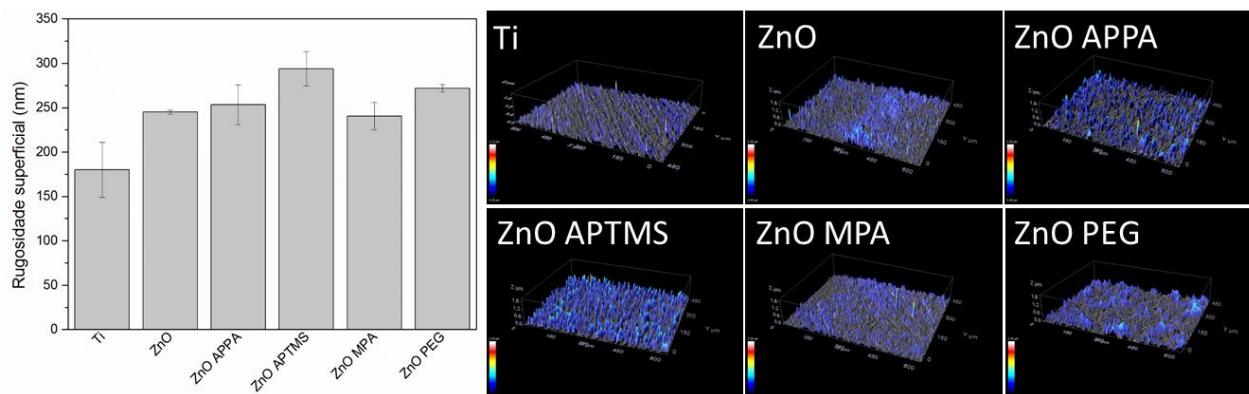


Figura 31. Média da rugosidade superficial para as amostras de ZnO analisadas

Normalmente, a energia de superfície e ângulo de contato são inversamente proporcionais entre si e por natureza as superfícies do óxido de zinco são hidrofóbicas (DAVE et al., 2016). Os resultados para as medidas do ângulo de contato do filme de ZnO puro e dos filmes de ZnO funcionalizados estão resumidos na Figura 32a. O filme fino ZnO tem um caráter mais hidrofóbico, como esperado, apresentando um ângulo de contato para a água de 81°. A funcionalização com APPA levou a um pequeno aumento na hidrofobicidade da superfície, com relação a amostra de ZnO, mostrando um ângulo de contato de 83°. A funcionalização da superfície com APTMS diminuiu a molhabilidade do ZnO, mostrando um ângulo de contato de 89°. A funcionalização com MPA preservou o ângulo de contato em 81°. O PEG foi a única molécula que modificou a superfície com propriedades hidrofílicas, exibindo um ângulo de contato de 18°. À medida que a relação C-O/CH₂ aumenta para a molécula de PEG, o ângulo de contato diminui (TRINO et al., 2018), desta forma, a existência de OH na estrutura - (CH₂CH₂OH)_n é responsável por esse comportamento. Além disso, em moléculas com

mais de 10 átomos de carbono, como PEG, as cadeias de carbono interagem aleatoriamente na superfície, contribuindo para obter uma camada fina de superfície altamente hidrofílica (PAPRA; GADEGAARD; LARSEN, 2001).

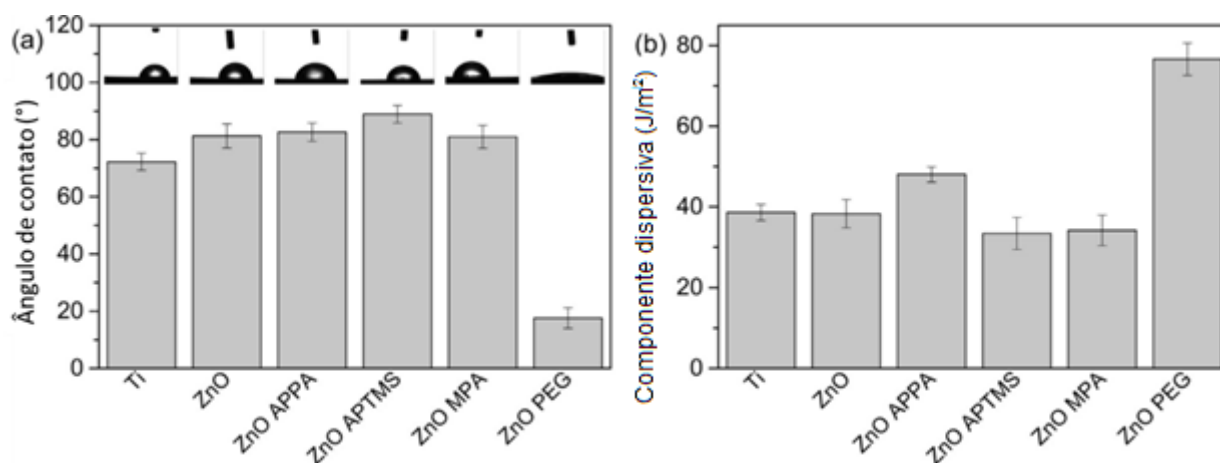


Figura 32. Ângulo de contato da água (a) e energia de superfície (b) medidas para as amostras controle (Ti e ZnO) e as amostras de ZnO funcionalizadas.

Portanto, a molhabilidade da superfície pode ser controlada pela adição das moléculas bifuncionais orgânicas e as características específicas da superfície será definida pela bio-aplicação. As moléculas de APPA, APTMS e MPA apresentaram menor molhabilidade, podendo melhorar a eficácia dos materiais como agentes bactericidas (SHARMA; AGARWAL; BALANI, 2016), enquanto o PEG pode influenciar positivamente as interações célula-superfície por deixar a superfície mais hidrofílica (ERIKSSON; NYGREN; OHLSON, 2004).

A adesão da molécula orgânica induziu mudanças relevantes nas propriedades físico-químicas da superfície do ZnO. A molhabilidade das superfícies sólidas é uma propriedade muito importante e é determinada pela composição química

das superfícies, sendo definida pela componente polar da energia de superfície (PATEL; RAWAL, 2016; RUDAKOVA et al., 2016).

A energia superficial do ZnO funcionalizado com APTMS e MPA é menor que da amostra de ZnO não funcionalizada. No entanto, como mostrado na Figura 32b, as moléculas de APPA e PEG aumentaram a energia da superfície do ZnO. De acordo com dados XPS, esse comportamento está relacionado ao tipo de grupos funcionais disponíveis na superfície. As cargas superficiais dos grupos $-NH_2$ e $-COOH$ presentes nas moléculas APTMS e MPA, respectivamente, são menores quando comparadas com os grupos hidroxila do PEG e os grupos amina ligados à cadeia aromática presente na molécula de APPA. Além disso, a maior quantidade de carbono do APTMS pode levar a um aumento da componente dispersiva. Por outro lado, a presença de grupos amina livre e uma cadeia aromática com elétrons deslocalizados na molécula de APPA aumentaram a carga total desta, aumentando conseqüentemente a energia de superfície. No caso da molécula de PEG, a alta densidade de grupos hidroxila levou a um aumento na energia da superfície, a qual modificou o filme de ZnO de uma superfície não polar para uma polar.

A molhabilidade medida pelo ângulo de contato para APTMS e PEG pode ser relacionada com a maior rugosidade superficial. Wenzel afirmou que mesmo pequenas mudanças na rugosidade da superfície podem melhorar as características de molhabilidade causada pela química da superfície (WENZEL, 1936). No caso do APTMS a maior rugosidade da superfície contribuiu para o aumento do ângulo de contato medido. Por outro lado, o PEG mostrou-se mais hidrofílico, característica que pode ser atribuída a um aumento no valor de RMS. Apesar da diferença na rugosidade superficial para os filmes de ZnO funcionalizados, as rugosidades obtidas estão dentro

dos valores de rugosidade encontrados em implantes dentários disponíveis comercialmente (ALLA et al., 2011; RAMEL et al., 2016; SEZIN; CROHARÉ; IBAÑEZ, 2016).

6.2.5 Modo de adesão das moléculas orgânicas sobre os filmes de TiO_2 e ZnO

Um modelo esquemático baseado na análise de XPS e AFM para o método preferencial de adesão das moléculas bifuncionais com a superfície de TiO_2 é mostrado na Figura 33. Como mostrado pelas imagens de AFM, as moléculas de APTMS e PEG formam multicamadas (Figura 33a e d), que se ligam à superfície TiO_2 por grupos silano e grupos hidroxila, conforme confirmado pelo XPS. As medidas XPS indicaram que as moléculas da APPA e da MPA se ligam à superfície do TiO_2 por grupos ácido carboxílico e mercapto, respectivamente. No entanto, não foi possível identificar por AFM se eles formaram mono- ou multi-camadas, desta maneira, em um modelo real as Figuras 33b e 33c podem ter mais de uma única camada de moléculas.

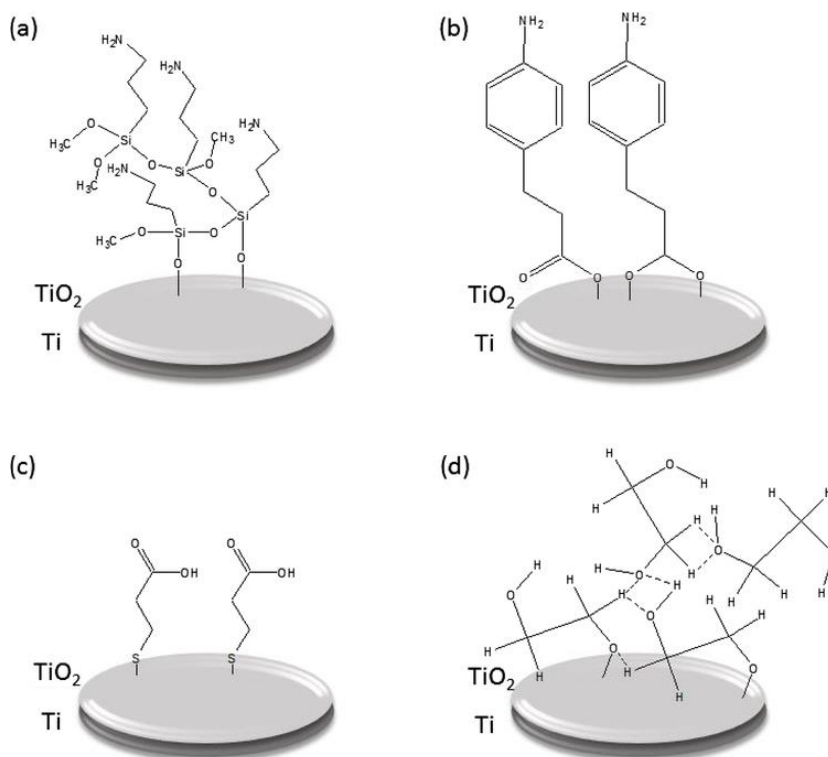


Figura 33. Possível modelo esquemático de adesão para as moléculas bifuncionais APTMS (a), APPA (b), MPA (c) e PEG (d) na superfície TiO_2 . O APTMS aderiu à superfície por grupos silano que reagiram rapidamente por condensação com a superfície e grupos silanóis vizinhos, resultando em multicamadas não homogêneas e desordenadas. As moléculas de APPA se ligaram a superfície preferencialmente através do grupo COOH , de forma mono ou bidentada formando mono- ou multicamadas. A adesão ao MPA ocorre pelo grupo mercapto que pode formar mono- ou multi-camadas. No caso de PEG, estas moléculas formam *crosslinking* entre si por meio de polimerização, formando multicamadas.

De acordo com os dados XPS, um possível modelo de adesão entre a superfície de ZnO e as moléculas bifuncionais orgânicas são mostradas na Figura 34. A presença de COO^- na molécula de APPA indica que este sítio pode interagir com o metal Zn (Figura 34a). O mecanismo de adesão do APTMS ocorre pela hidroxilação dos grupos silanos, e então Si-OH reage rapidamente por condensação formando grupos Si-O-Si com as hidroxilas superficiais, bem como com os grupos silanóis vizinhos. Desta forma, a presença de O-Si-O indicou a adesão de APTMS pelo grupo silano

(Figura 34b). Para a molécula de MPA, a presença de grupos S-O é um indicativo de que os grupos tiol podem ter interagido com os grupos hidroxila presentes na superfície do ZnO (Figura 34c). Após adesão através de grupos hidroxila (Fig. 34d), as cadeias de PEG podem auto-interagir devido à presença de vários grupos -OH que resultam em sua polimerização.

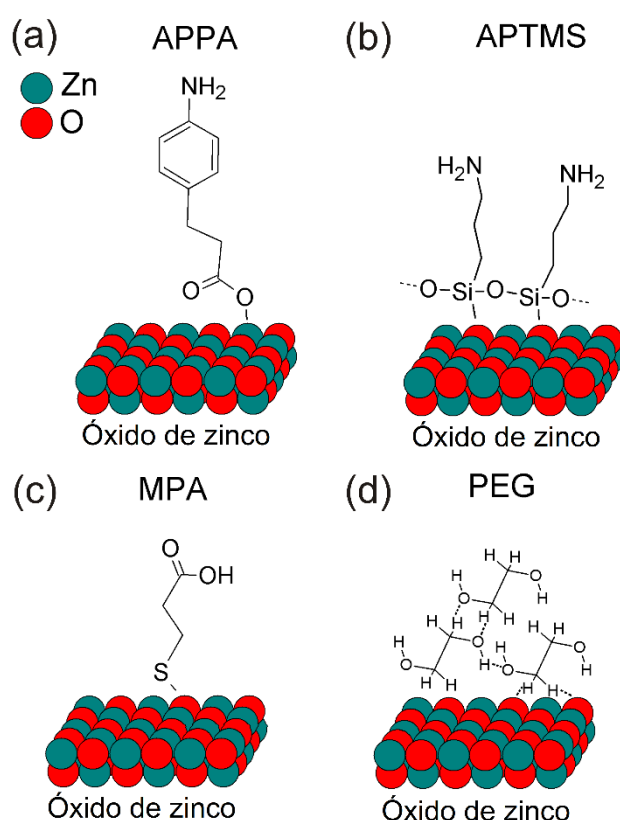


Figura 34. Possível mecanismo de adesão para as moléculas bifuncionais na superfície ZnO. A molécula APPA mostrou uma adesão preferencial pelo sítio ácido carboxílico (a). A molécula de APTMS formou grupos Si-O-Si por condensação com os grupos -OH da superfície, se ligando através de grupos silano (b). A molécula de MPA indicou uma adesão por grupos S-H que reagiram com os grupos -OH da superfície formando ligações S-O (c). A molécula de PEG aderiu à superfície por polimerização dos grupos hidroxila com os grupos -OH da superfície (d).

Além da espessura da camada orgânica, devido à presença de diferentes grupos terminais na superfície, cada molécula bifuncional modifica as propriedades físico-químicas do TiO₂ ou do ZnO de uma maneira característica, que pode ser controlado dependendo da aplicação requerida. As moléculas orgânicas estudadas são exemplos clássicos de agentes de acoplamento que apresentam diversas aplicações, as quais vão desde a cultura celular em *scaffolds* de alto rendimento, dispositivos biomédicos, *lab-on-a-chip*, tecidos auto-limpantes, janelas desembaçantes, até revestimentos anticorrosivos (FALDE et al., 2016; LI et al., 2010, p.; PUJARI et al., 2014; SHIN et al., 2016; SKORB; ANDREEVA, 2013).

6.3 Funcionalização com peptídeos derivados da proteína da matriz dentária 1 (DMP1)

Após a adesão das moléculas orgânicas as amostras foram funcionalizadas com os peptídeos derivados da proteína DMP1. A proteína da matriz dentária 1 é uma fosfoproteína ácida, não colágena que está presente na matriz extracelular e desempenha um papel crucial na diferenciação dos osteoblastos/odontoblastos e eventos de nucleação mineral (BHATIA et al., 2012; HE et al., 2005; RAVINDRAN; GEORGE, 2014). Algumas proteínas específicas da matriz extracelular, como a DMP1, atuam como sítios de nucleação para a formação de hidroxiapatita. He et al (HE et al., 2003), investigou os domínios ácidos presentes na DMP1 descobrindo que os peptídeos ESQES e QESQSEQDS, derivados desta proteína, quando misturados podem formar oligômeros que induzem formação de cristais de apatita. Desse modo, os peptídeos derivados da DMP1 podem promover um efeito osteoindutivo no material

implantado, uma vez que eles podem estimular a produção de matriz extracelular, além de acelerar os processos de diferenciação osteoblástica (FROSCH et al., 2003).

A seguir são descritas as análises físico-químicas realizadas por XPS, AFM e ângulo de contato a fim de identificar as propriedades químicas da superfície dos óxidos funcionalizados com a biomolécula.

6.3.1 XPS dos filmes de TiO₂ bio-funcionalizados

A química de superfície dos grupos controle, das superfícies funcionalizadas com as moléculas espaçadoras e os peptídeos sobre o TiO₂ foram confirmadas por XPS. O pico Ti 2p_{3/2} presente a uma energia de ligação de 458,8 eV correspondente ao Ti (IV) no TiO₂ (MOULDER, 1992), tem sido utilizado para a calibração de energia de todo o espectro. Os espectros das amostras de Ti e TiO₂ nas Figuras 35 e 36, respectivamente, mostraram a presença dos elementos carbono (C) e nitrogênio (N), introduzidos pelos peptídeos DMP1.

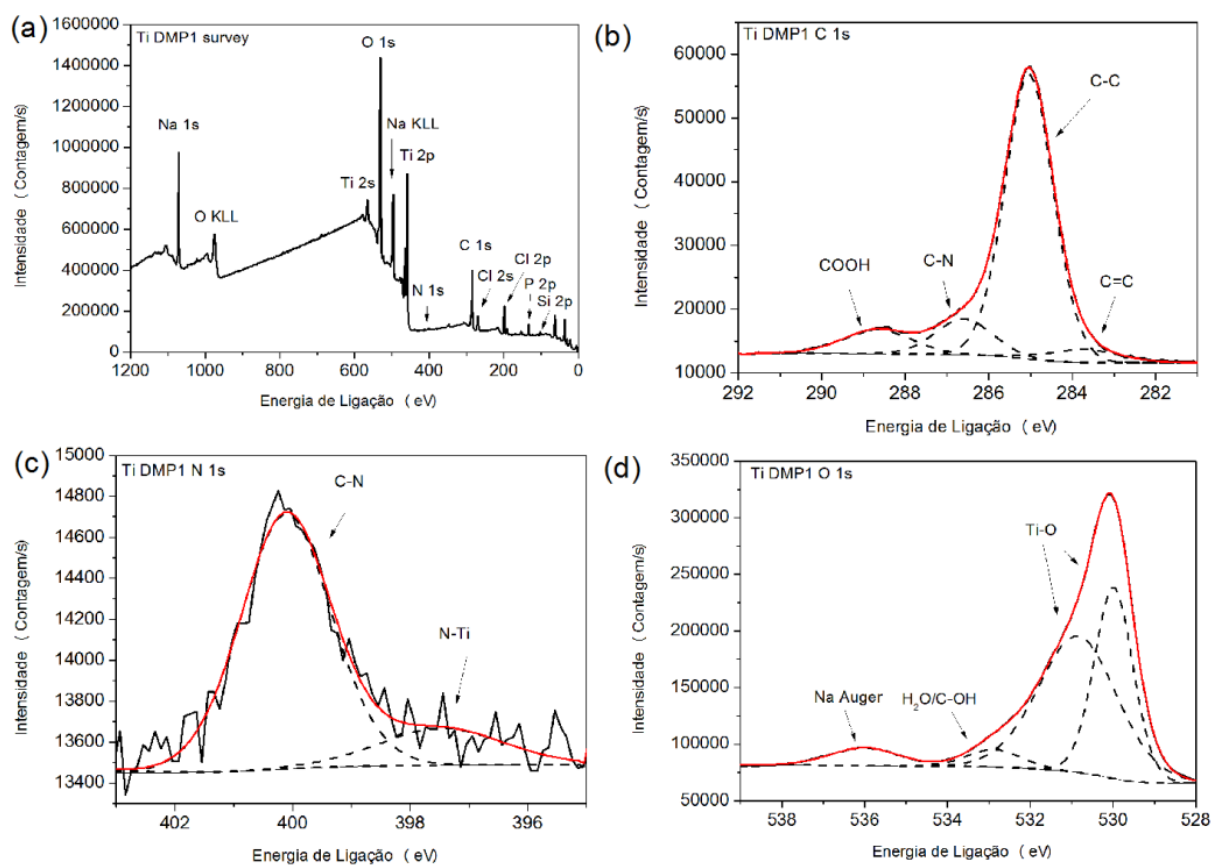


Figura 35. Espectros de XPS para a amostra controle de Ti funcionalizada com peptídeos da DMP1.

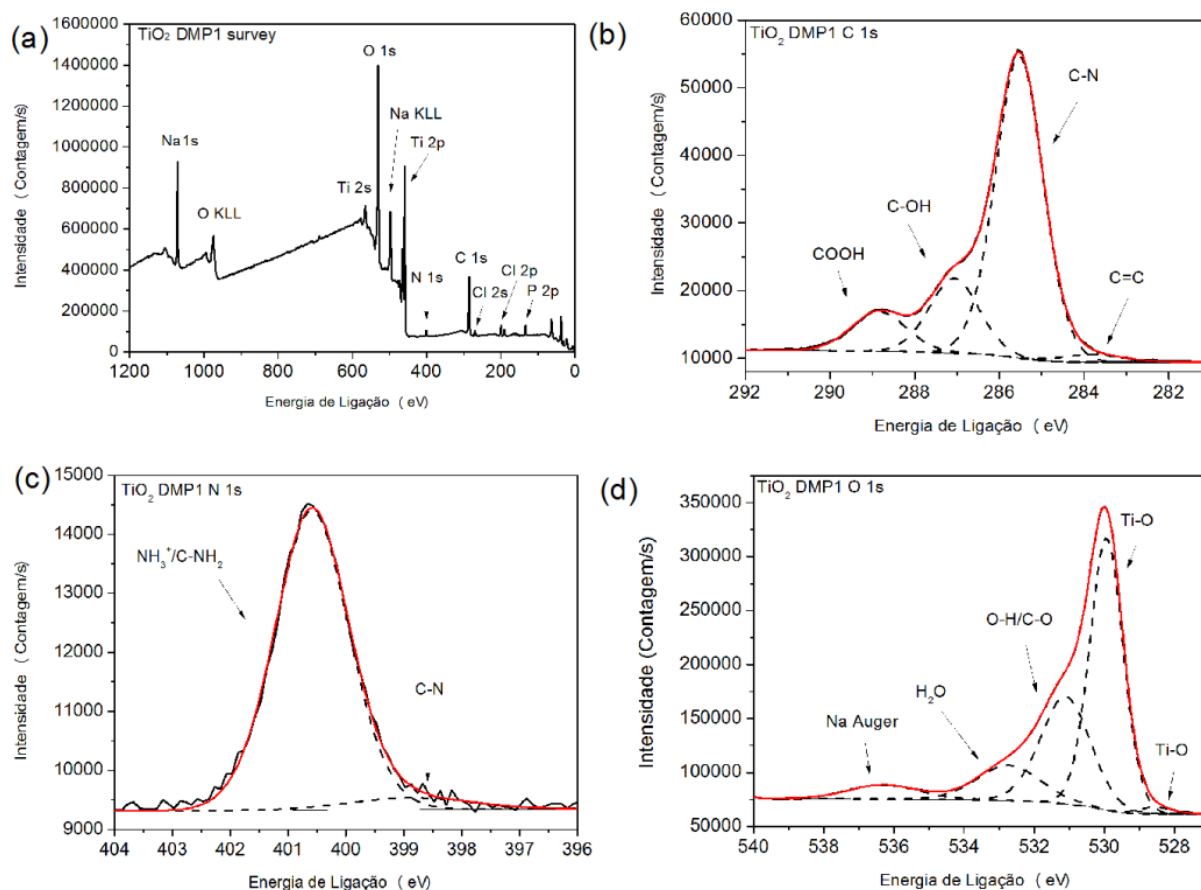


Figura 36. Espectros de XPS para a amostra controle de TiO₂ funcionalizada com peptídeos da DMP1.

As moléculas de APPA e APTMS contêm os elementos C e N na sua estrutura, não sendo possível afirmar que a presença destes elementos é resultado da imobilização dos peptídeos da DMP1 na superfície das amostras. No entanto, não foram evidenciadas alterações significativas comparando o espectro C 1s e N 1s com as outras amostras, conforme apresentado nas Figuras 37 e 38.

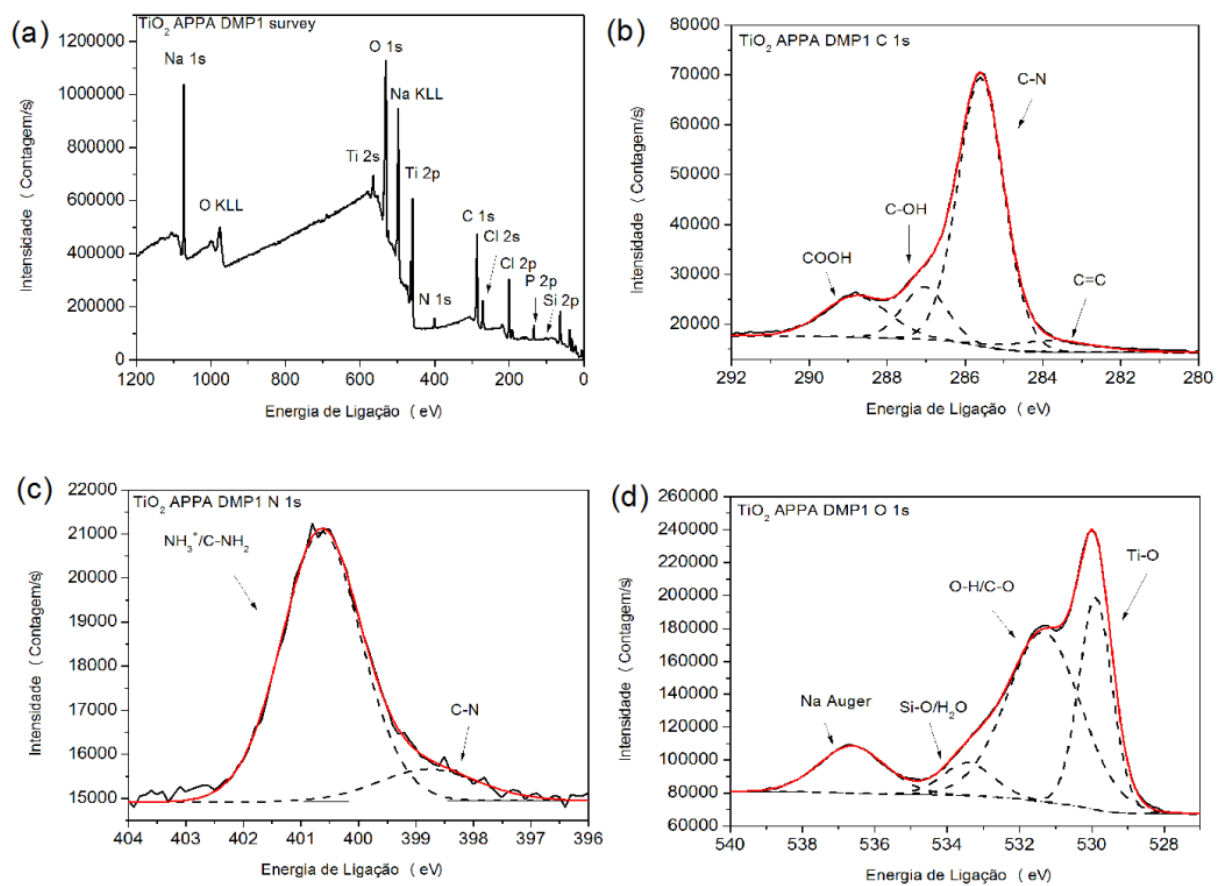


Figura 37. Espectros de XPS para a amostra de TiO₂ funcionalizada com APPA e os peptídeos da DMP1.

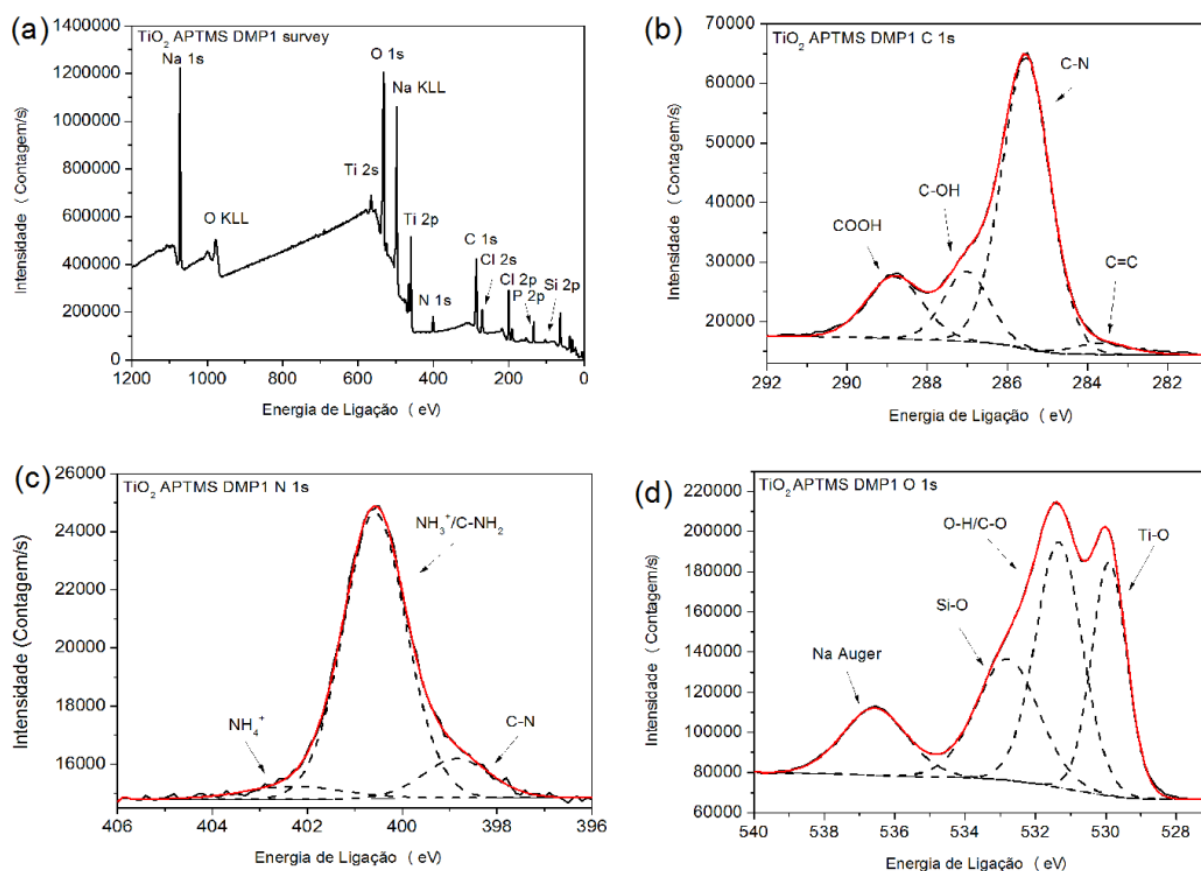


Figura 38. Espectros de XPS para a amostra de TiO₂ funcionalizada com APTMS e os peptídeos da DMP1.

Para as amostras funcionalizadas com MPA (Figura 39) e PEG (Figura 40) a presença de N 1s confirma a adesão dos peptídeos, sugerindo que a quimiossorção ocorre sem modificações substanciais na estrutura dos peptídeos derivados de DMP1 para todas as amostras analisadas. Pôde-se observar que as amostras apresentaram picos de elementos presentes na solução tampão de fosfato (PBS), como Na, Cl e P, e o pico Auger do sódio (Na KLL) apresentou uma sobreposição com o sinal de O 1s ao redor 536 eV. A presença de grupos NH₃⁺ nos espectros de N 1s das amostras pode ser conferido aos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico, presentes nos

peptídeos, uma vez que a presença de grupos ionizáveis na sua cadeia confere a eles maior capacidade de conjugação (HERMANSON, 2013).

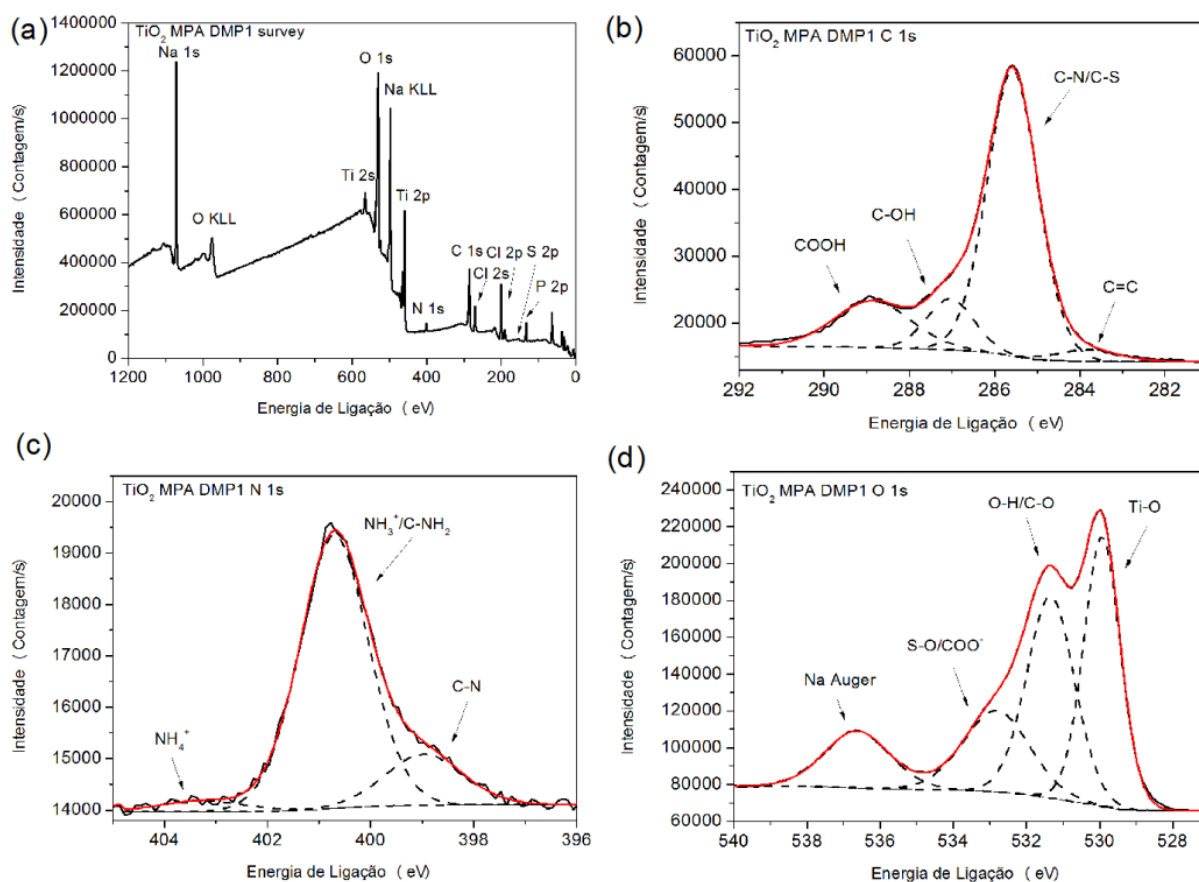


Figura 39. Espectros de XPS para a amostra de TiO₂ funcionalizada com MPA e os peptídeos da DMP1.

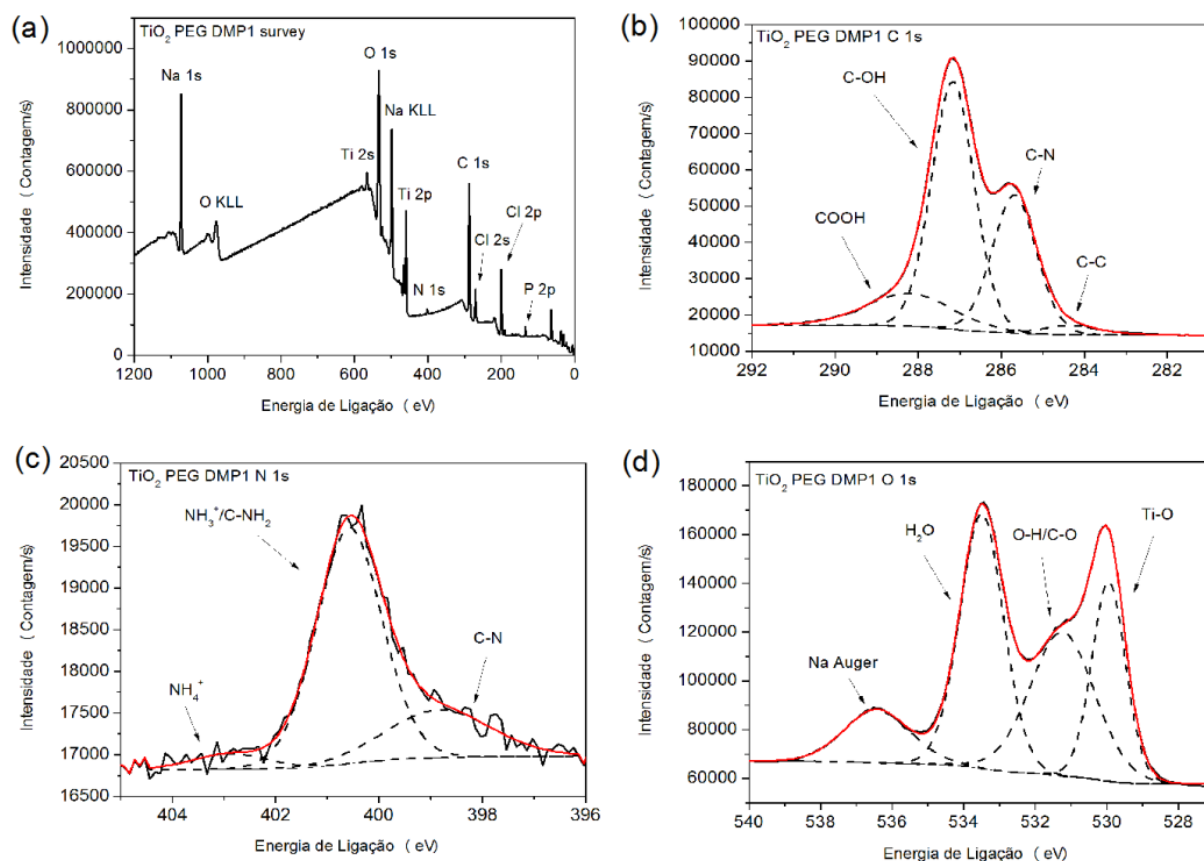


Figura 40. Espectros de XPS para a amostra de TiO₂ funcionalizada com PEG e os peptídeos da DMP1.

A porcentagem atômica do nitrogênio, o qual está presente nos peptídeos da DMP1, pode ser um indicativo da adesão dos mesmos. Entretanto, APPA e APTMS apresentam N em sua estrutura. A porcentagem atômica do N 1s é menor para Ti P (0,33%), TiO₂ PEG P (0,76%) e TiO₂ P (1,24%), mostrando valores maiores para as amostras TiO₂ APPA P (1,56%), TiO₂ MPA P (1,69%) e TiO₂ APTMS P (2,65%). Isso indica que para todas as amostras investigadas, a imobilização do peptídeo na superfície do Ti foi bem sucedida. Considerando que no APPA e no APTMS nem todo nitrogênio é proveniente dos peptídeos, a amostra com MPA apresentou uma maior

imobilização das biomoléculas devido à provável atração entre os grupos carboxílicos livres da molécula de MPA e os grupos NH_2 dos peptídeos.

6.3.2 XPS dos filmes de ZnO bio-funcionalizados

Os espectros das amostras de ZnO e ZnO funcionalizado com APPA, APTMS, MPA ou PEG mostraram a presença dos elementos carbono (C) e nitrogênio (N), introduzidos pelos peptídeos DMP1. Além disso, foi possível observar a presença de elementos como Na, Cl e P no espectro *survey* para todas as amostras. A presença destes elementos provém da solução de PBS na qual os peptídeos foram diluídos.

A Figura 41 apresenta os espectros *survey* e alta resolução do C 1s, N 1s e O 1s para a amostra ZnO P. A presença dos peptídeos derivados da DMP1 é confirmada pelo pico do N 1s. Os peptídeos podem se ligar à superfície do ZnO através da interação dos grupos -OH da superfície com os grupos amino do peptídeo.

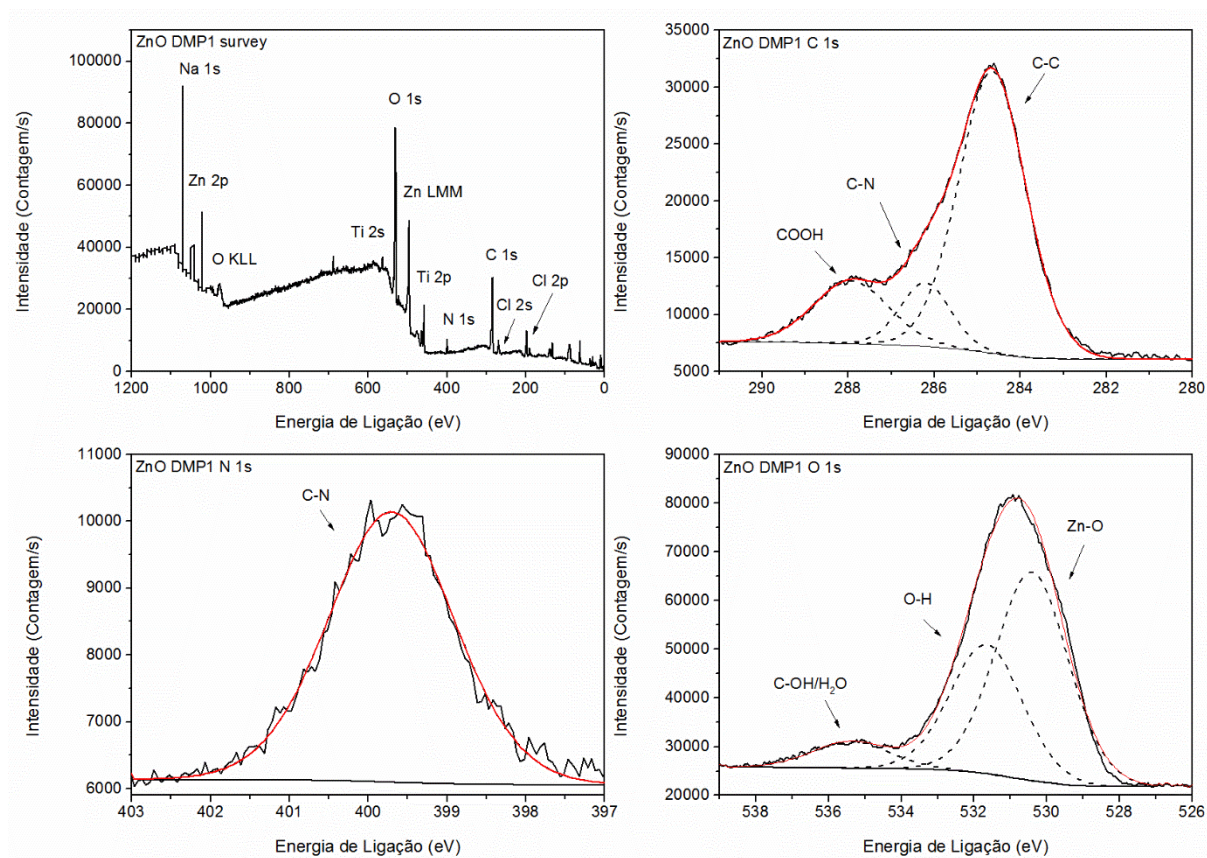


Figura 41. Espectros de XPS para a amostra de ZnO e os peptídeos da DMP1.

As Figuras 42 e 43 apresentam os espectros de XPS para as amostras de ZnO APPA e ZnO APTMS bio-funcionalizadas com os peptídeos da DMP1, respectivamente. A presença de N 1s não comprova a imobilização dos peptídeos na superfície destas amostras, uma vez que as mesmas contêm nitrogênio em sua estrutura. No entanto, comparando a porcentagem de nitrogênio antes e após a bio-funcionalização, observa-se um aumento de 0,96% para 1,32% para a amostra ZnO APPA P, e um aumento de 1,60% para 1,81% para a amostra ZnO APTMS P. Indicando que esta variação pode ser devida à imobilização dos peptídeos sobre a superfície das amostras.

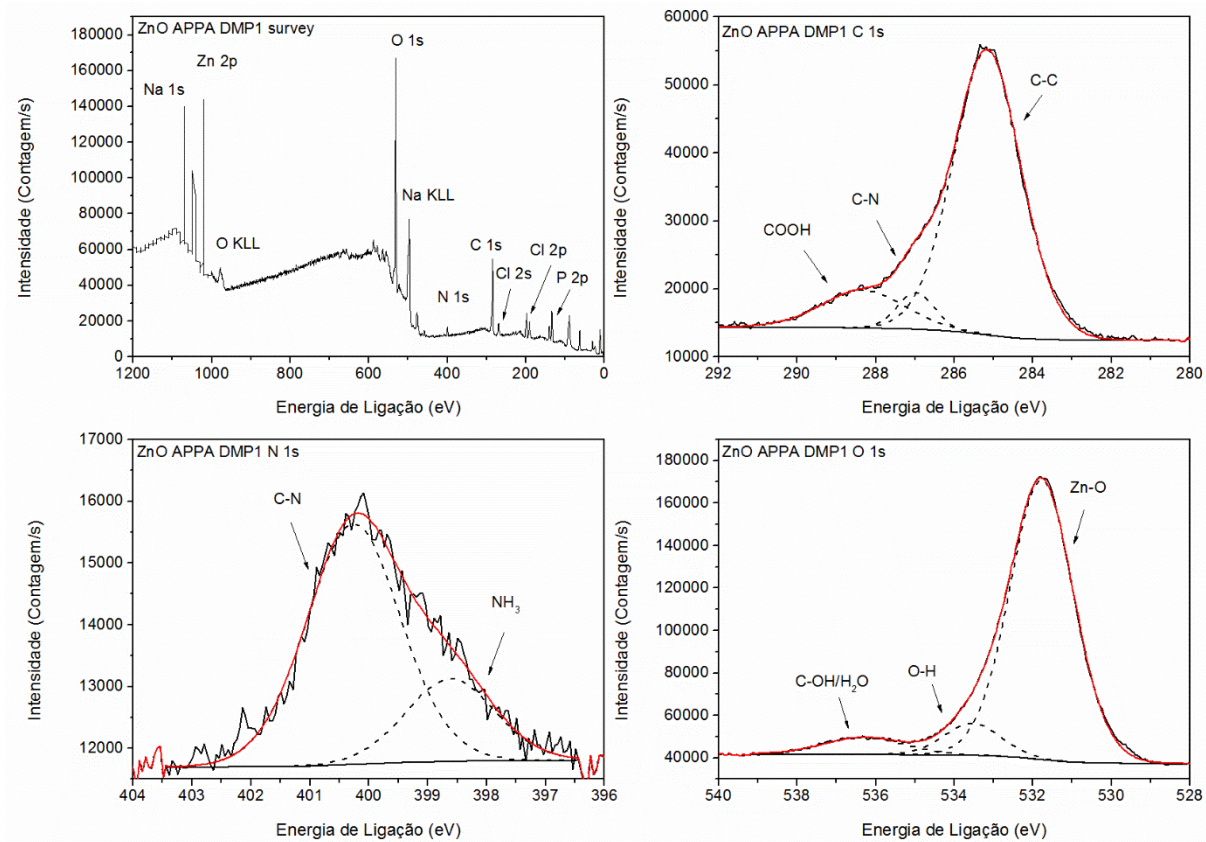


Figura 42. Espectros de XPS para a amostra de ZnO funcionalizada com APPA e os peptídeos da DMP1.

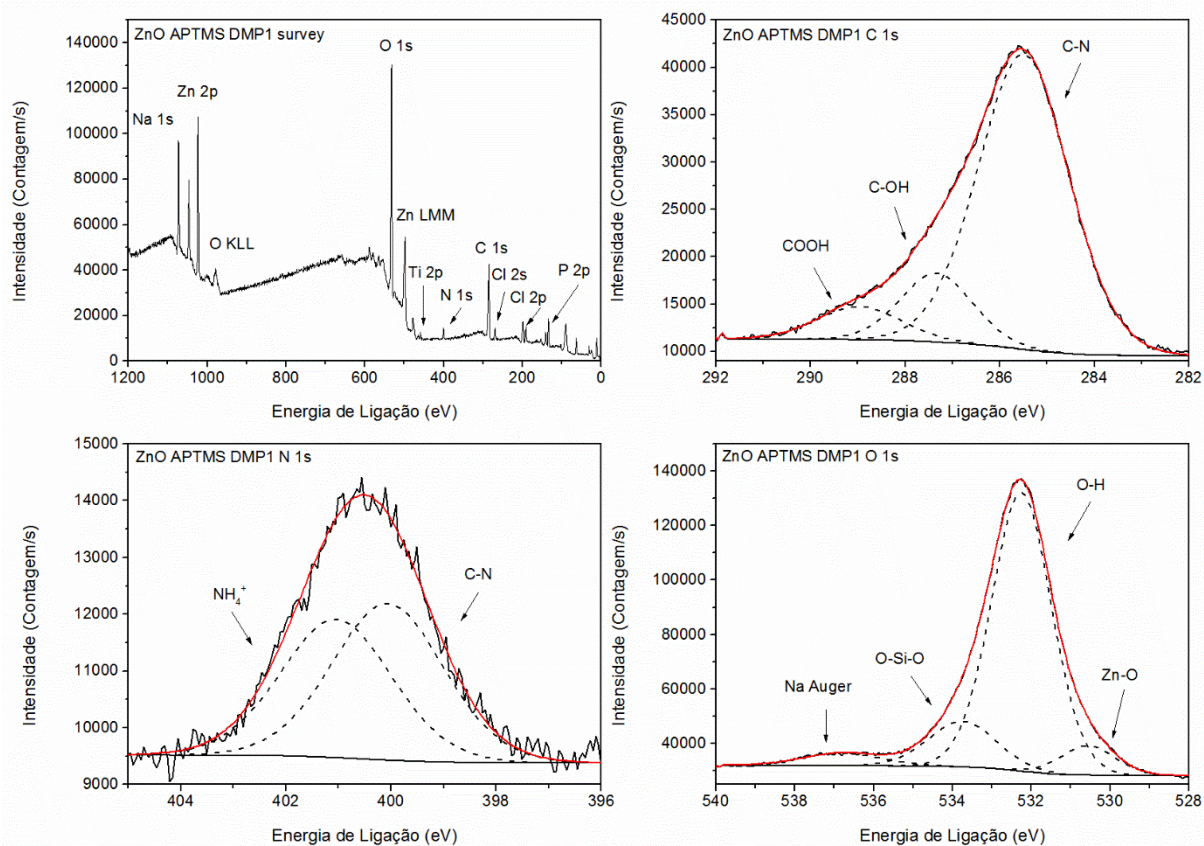


Figura 43. Espectros de XPS para a amostra de ZnO funcionalizada com APTMS e os peptídeos da DMP1.

As Figuras 44 e 45 mostram os espectros de XPS para as amostras ZnO MPA P e ZnO PEG P, respectivamente. A presença de nitrogênio nestas amostras confirma a imobilização dos peptídeos derivados da DMP1. Analisando o espectro de N 1s para as amostras de ZnO, é possível observar que nas amostras ZnO, ZnO MPA P e ZnO PEG P há apenas uma contribuição (C-N), enquanto que para as amostras ZnO APPA P e ZnO APTMS P são observadas duas contribuições. Além da presença da ligação C-N, são observados os grupos NH_3 e NH_4^+ para ZnO APPA P e ZnO APTMS P, respectivamente. Isto ocorre pois há a presença do nitrogênio na estrutura das moléculas de APPA e APTMS, e também na estrutura dos peptídeos.

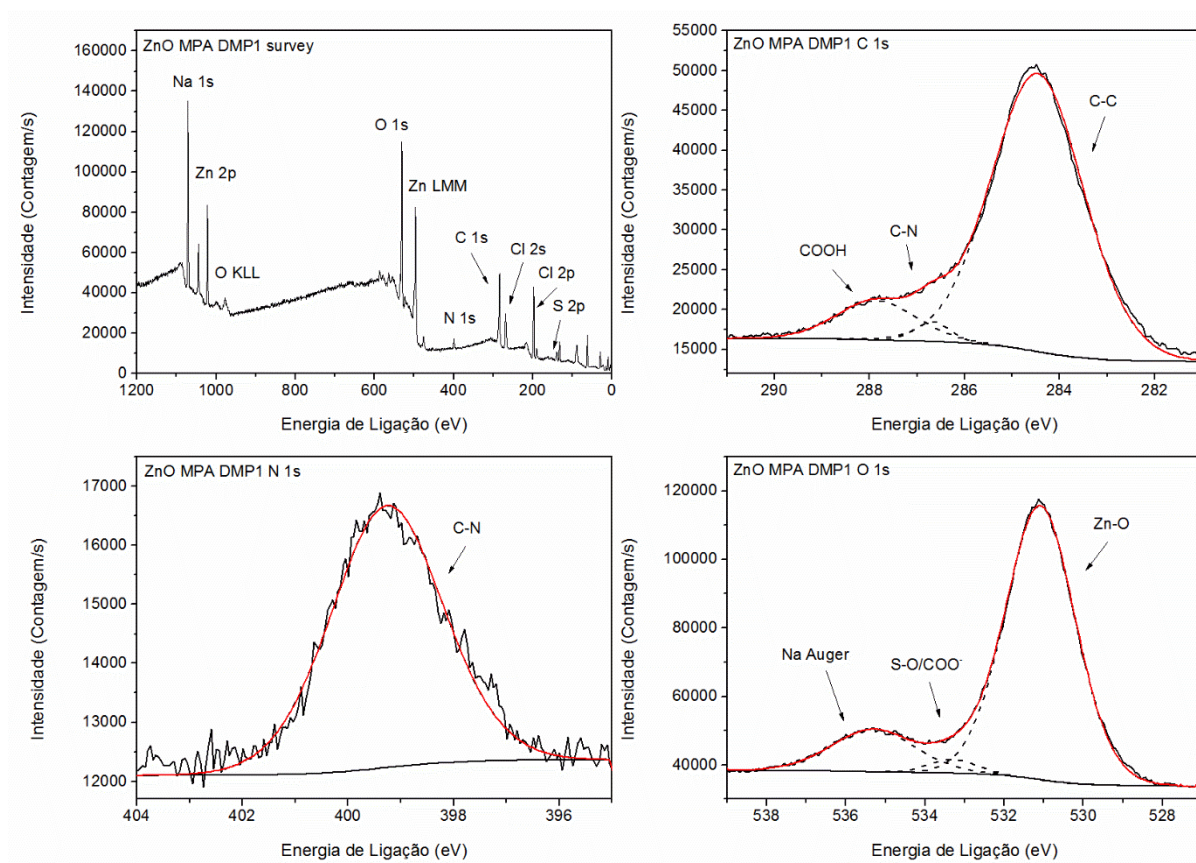


Figura 44. Espectros de XPS para a amostra de ZnO funcionalizada com MPA e os peptídeos da DMP1.

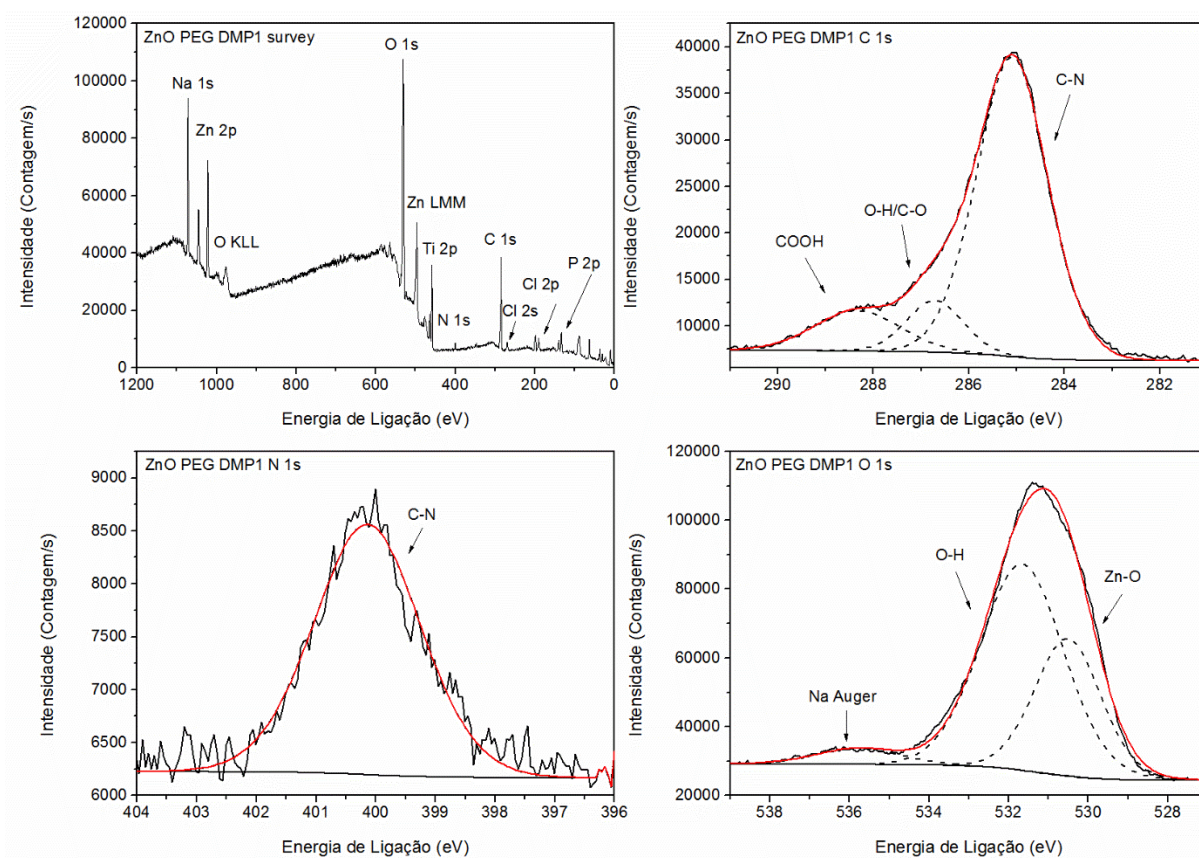


Figura 45. Espectros de XPS para a amostra de ZnO funcionalizada com PEG e os peptídeos da DMP1.

A porcentagem de nitrogênio presente nestas amostras é de 1,62%, 1,32%, 1,81%, 1,36% e 1,05% para as amostras ZnO, ZnO APPA P, ZnO APTMS P, ZnO MPA P e ZnO PEG P. Portanto para os filmes de ZnO, diferentemente do TiO_2 , a amostra que apresentou melhor imobilização dos peptídeos baseado na concentração de nitrogênio, foi a amostra ZnO P.

6.3.3 Topografia e ângulo de contato das amostras bio-funcionalizadas de TiO_2

A topografia superficial das amostras bio-funcionalizadas sobre o TiO_2 foi analisada por AFM com área de $5 \times 5 \mu m$ (Figura 46). Os resultados mostraram que os peptídeos formaram estruturas aglomeradas em algumas regiões para as amostras controle (Figuras 46 a e b), não apresentando uma boa adesão. Uma camada uniforme é formada com a presença dos espaçadores, no entanto para o APPA, APTMS e PEG (Figuras 46 c, d e e), observa-se uma aglomeração superficial. A formação de agregados de peptídeos é fortemente dependente de condições experimentais, tais como pH, concentração e temperatura, podendo ocorrer devido a efeitos cooperativos, forças atrativas que levam à adsorção positiva cooperativa ou mudanças conformacionais que são dependentes da superfície e podem levar a efeitos macroscopicamente observáveis (ENCISO; SCHÜTTE; SITE, 2015; GSPONER; VENDRUSCOLO, 2006). Os efeitos cooperativos aumentam a adsorção de peptídeos mediada por peptídeos já adsorvidos, estando fortemente relacionado à agregação na superfície.

O fenômeno de agregação pode ser explicado pela formação de oligômeros a partir de peptídeos pA e pB (HE et al., 2003, 2005). O ponto isoelétrico (pI) para pA e pB são 3,52 e 3,41, respectivamente. Estes valores são mais baixos do que o pH da solução tampão de carbonato (9,2), no qual os peptídeos foram mantidos para a funcionalização. Quando o pH da solução é mais elevado do que o pI dos peptídeos, os peptídeos tornam-se carregados negativamente e se agregam uns com os outros formando os oligômeros. A densidade de carga calculada para o peptídeo pA é -3 e para o pB é -4 em pH da solução tampão de carbonato (“Peptide Property Calculator”,

2018). No caso das amostras controle, a superfície não é carregada, levando a uma aglomeração preferencial dos oligômeros de peptídeos sem um bom recobrimento superficial ou adesão. Para as amostras funcionalizadas com os espaçadores MPA e APPA, devido à atração entre os grupos funcionais dos espaçadores e os peptídeos, houve um recobrimento mais homogêneo com boa adesão. TiO_2 APPA P e TiO_2 APTMS P apresentaram algumas regiões com estruturas aglomeradas que podem ser devidas à força de atração entre o peptídeo carregado negativamente e o grupo amina livre positivo do espaçador, conduzindo a uma deposição multicamadas em algumas regiões.

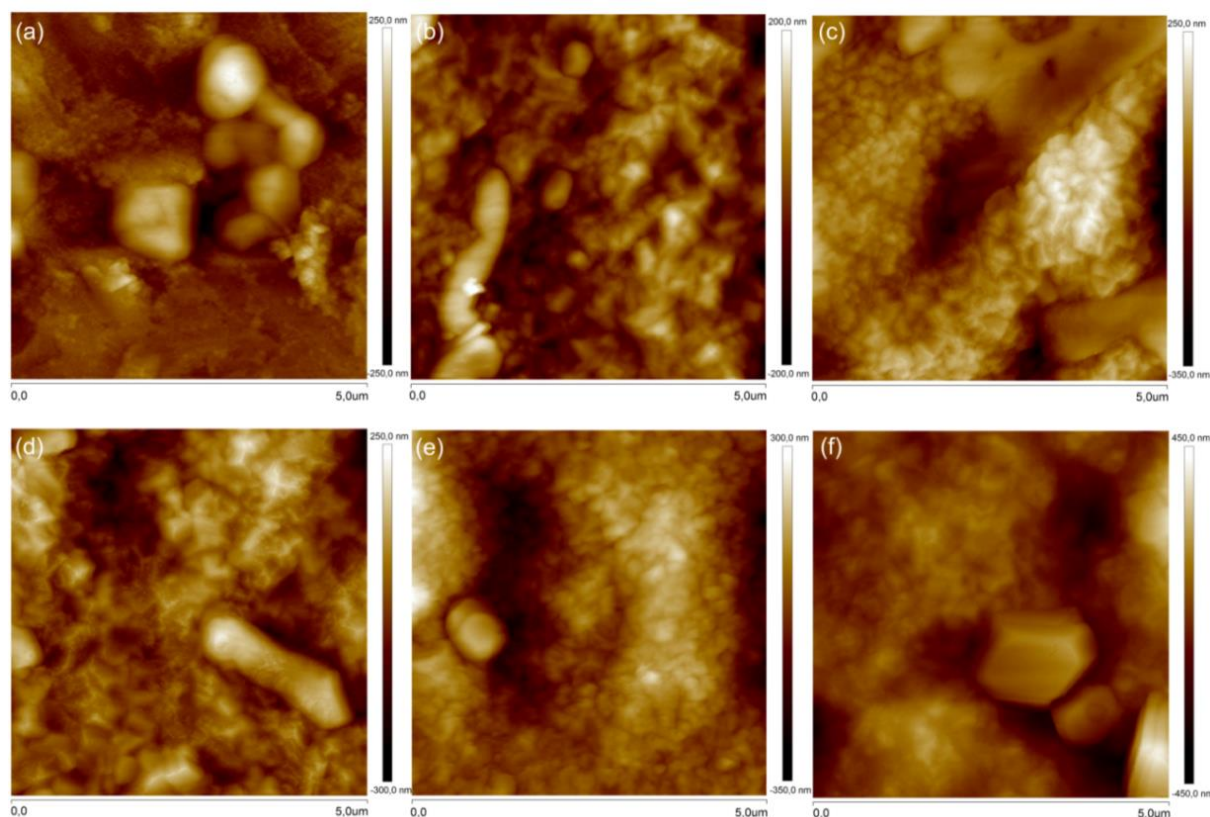


Figura 46. Imagem de AFM para as superfícies de Ti (a), TiO_2 (b), TiO_2 APPA (c), TiO_2 APTMS (d), TiO_2 MPA (e) e TiO_2 PEG (f) funcionalizadas com os peptídeos da proteína DMP1.

A molhabilidade da superfície foi analisada pelo ângulo de contato, porém as superfícies funcionalizadas com os peptídeos da DMP1 foram extremamente hidrofílicas, e não foi possível medir o ângulo de contato da água, como mostrado na Figura 47. A única exceção foi a amostra TiO_2 APTMS P. Apesar da amostra ZnO APTMS P não apresentar características super-hidrofílicas, houve uma diminuição significativa no ângulo de contato da água após a imobilização dos peptídeos, de $73 (\pm 3)^\circ$ para $44 (\pm 2)^\circ$.

O aumento da hidrofilicidade em função da presença dos peptídeos da DMP1 desempenha um papel importante no comportamento das células. As células facilmente aderem e proliferam em superfícies hidrofílicas imediatamente após a semeadura (ISHIZAKI; SAITO; TAKAI, 2010).

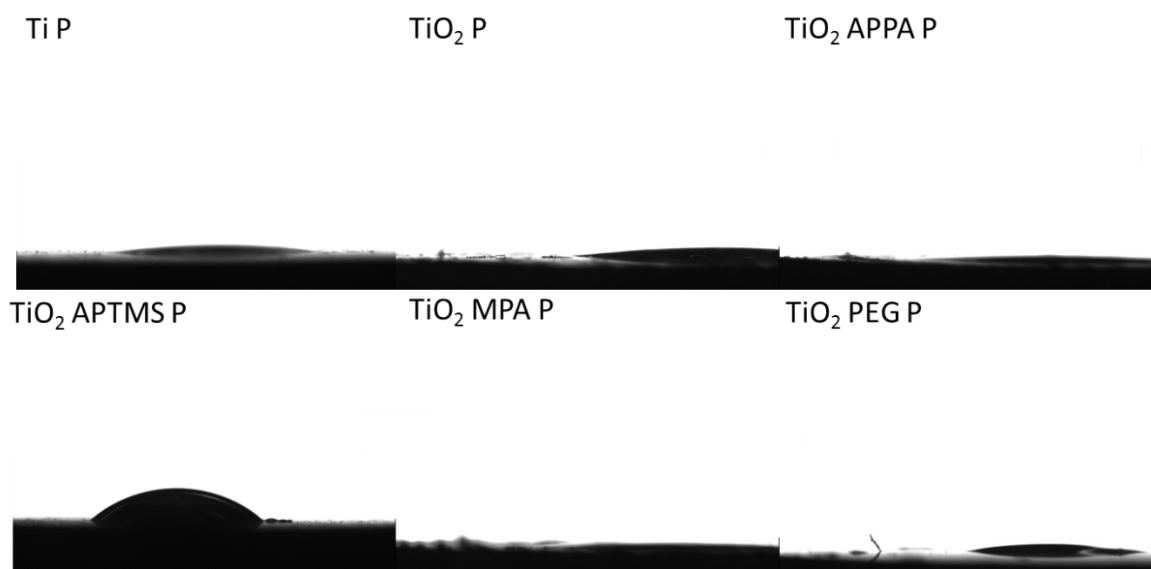


Figura 47. Imagens de ângulo de contato da água para as amostras de TiO_2 biofuncionalizadas

6.3.4 Topografia e ângulo de contato das amostras bio-funcionalizadas de ZnO

As amostras de ZnO bio-funcionalizadas foram analisadas por AFM (Figura 48). Diferentemente das amostras de TiO₂, as amostras de ZnO foram analisadas em áreas de 1x1µm. Por este motivo, não foi possível observar os aglomerados sobre a amostra de Ti P (Figura 48a), apenas os grãos de Ti são visíveis neste aumento empregado. Os resultados mostraram que os peptídeos formaram estruturas densas e aglomeradas para as amostras ZnO P, ZnO APTMS P e ZnO PEG P (Figura 48b, d e f). A formação destas estruturas pode ser devido aos efeitos cooperativos entre os peptídeos, no qual os peptídeos adsorvidos aumentam a adsorção de outros em solução. Por outro lado, uma camada densa mais uniforme é formada com a presença dos espaçadores APPA e MPA (Figura 48c e e). Nas amostras ZnO APPA P e ZnO MPA P os peptídeos aparentam estar homoganeamente distribuídos na superfície devido à presença dos grupos funcionais terminais -NH₂ e -COOH, os quais se ligam respectivamente aos grupos ácido carboxílico e amino dos peptídeos.

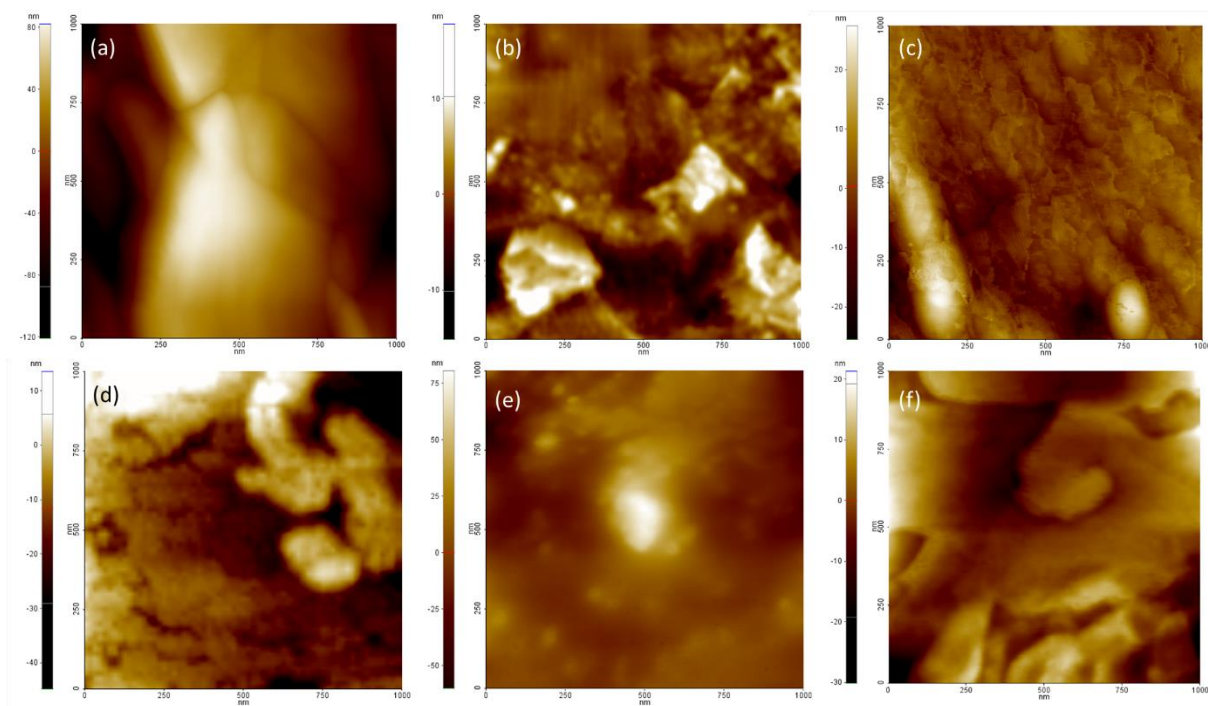


Figura 48. Imagem de AFM para as superfícies de Ti (a), ZnO (b), ZnO APPA (c), ZnO APTMS (d), ZnO MPA (e) e ZnO PEG (f) funcionalizadas com os peptídeos da proteína DMP1.

A molhabilidade da superfície foi analisada pelo ângulo de contato, porém exatamente como observado para as amostras de TiO_2 , as superfícies de ZnO funcionalizadas com os peptídeos da DMP1 foram extremamente hidrofílicas, e não foi possível medir o ângulo de contato da água, como mostrado na Figura 49. Novamente, a única exceção foi a amostra ZnO APTMS P. A imobilização dos peptídeos não deixou a superfície da amostra ZnO APTMS P com característica super-hidrofílica, porém diminuiu significativamente o ângulo de contato de $89 (\pm 4)^\circ$ para $27 (\pm 3)^\circ$.

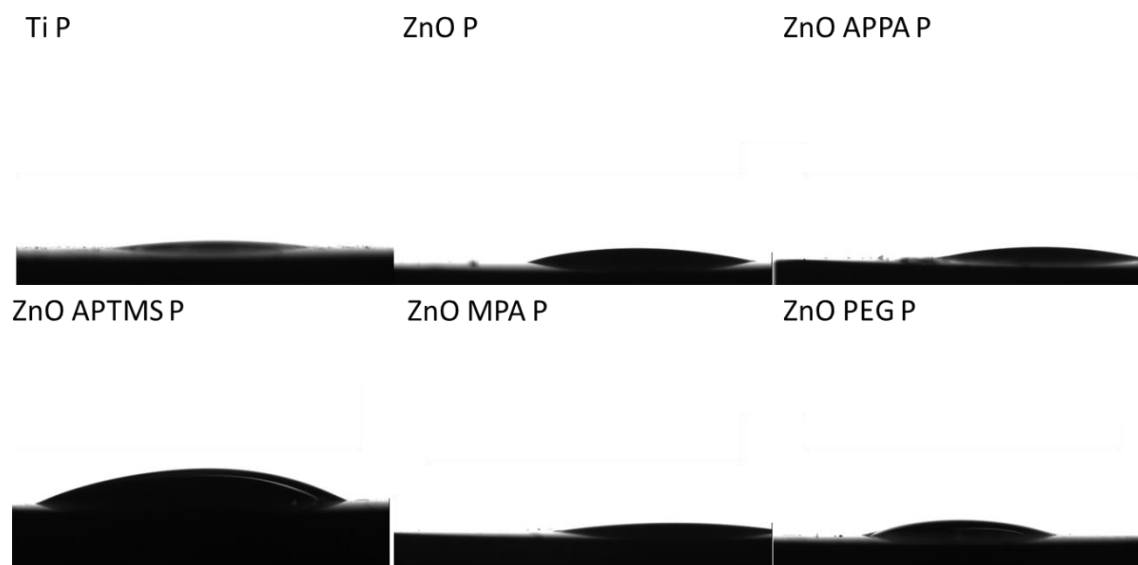


Figura 49. Imagens de ângulo de contato da água para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas

6.4 Adesão e proliferação celular

A adesão celular é um pré-requisito crítico para funções subsequentes tais como proliferação e diferenciação celular. A adesão das células hMSC-GFP caracterizadas por microscopia confocal de fluorescência revelaram um maior crescimento nas amostras revestidas com titânio, APPA, MPA e as biomoléculas para ambos os óxidos, mostrando que os peptídeos podem modular a afinidade celular e possivelmente a diferenciação. Além disso, foi possível observar que as células aderiram, se espalharam e exibiram uma morfologia polarizada para as diferentes amostras (Figura 50). Os filmes de ZnO revestidos com moléculas orgânicas e os peptídeos exibiram uma fluorescência vermelha. O ZnO apresenta uma emissão eficiente na região do azul e do UV próximo, e também pode apresentar luminescência na região verde relacionado com vacâncias de oxigênio. As propriedades ópticas das nanopartículas de ZnO podem

ser modificadas dopando-os com elementos apropriados ou por conjugação de moléculas orgânicas (WANG et al., 2009).

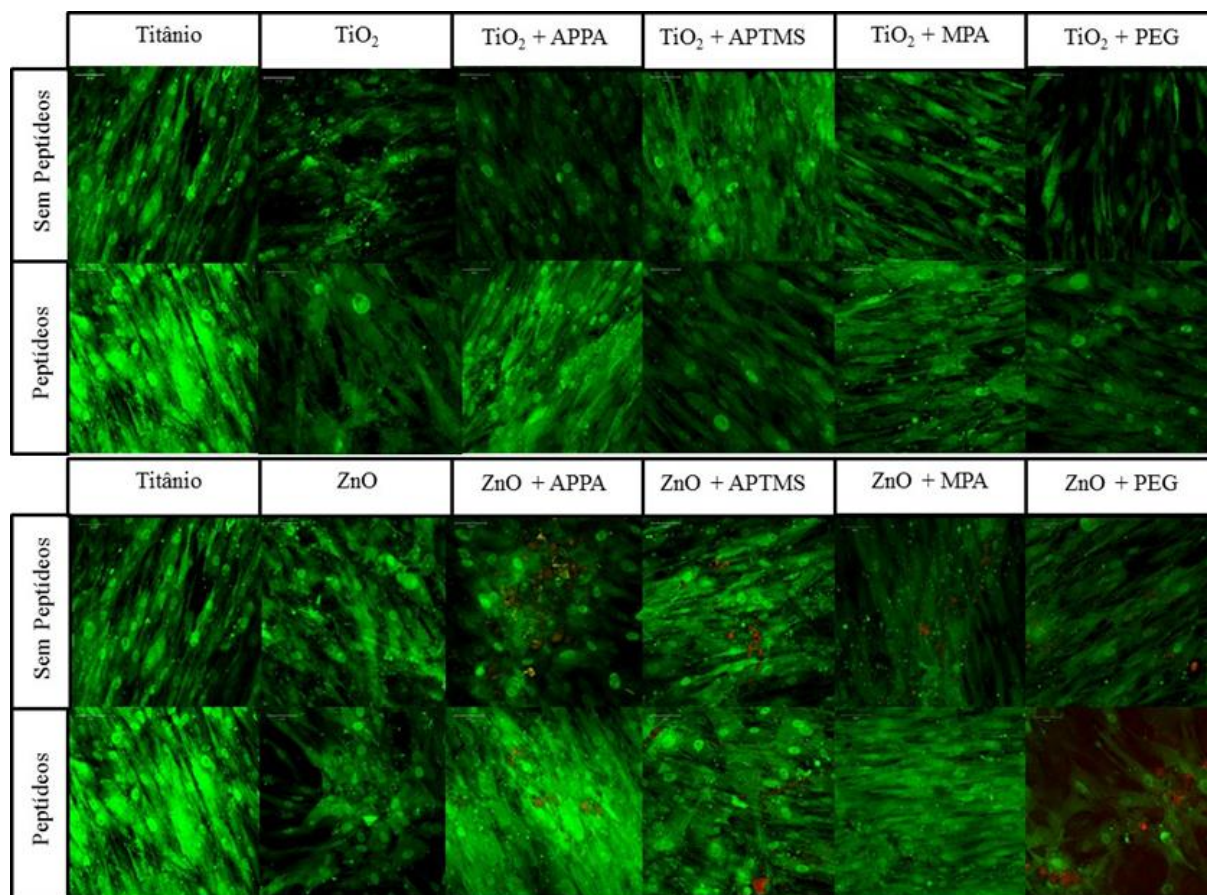


Figura 50. Microscopia de fluorescência confocal para células hMSC-GFP cultivadas sobre as amostras durante sete dias.

Uma vez observado com a microscopia confocal de fluorescência que as amostras funcionalizadas com APPA P e MPA P apresentaram maior adesão celular, realizaram-se os experimentos seguintes com esses grupos e as amostras controle (Ti, TiO₂ e ZnO) com e sem os peptídeos.

O ensaio de proliferação foi realizado durante 1, 3 e 5 dias. Todas as amostras mostraram crescimento celular com o passar do tempo (Figura 51), não foi observada

citotoxicidade significativa para nenhuma amostra. Para a maioria dos grupos, com exceção do TiO_2 , observou-se que a adição de peptídeos DMP1 aumentou o crescimento celular, indicando que os peptídeos modificam a química da superfície modulando a afinidade e a proliferação celular. As amostras TiO_2 , TiO_2 MPA P e ZnO MPA P mostraram um crescimento celular elevado em comparação com os outros grupos. O TiO_2 é reconhecido por aumentar a biocompatibilidade de titânio (LÓPEZ-HUERTA et al., 2014; SANGEETHA et al., 2013), podendo ser a razão para o comportamento das hMSC-GFP. O MPA contém enxofre em um dos grupos funcionais, os grupos sulfônicos podem afetar o comportamento das células, estimulando a adesão, a proliferação celular e influenciando na reorganização do citoesqueleto (KOWALCZYŃSKA; NOWAK-WYRZYKOWSKA, 2003).

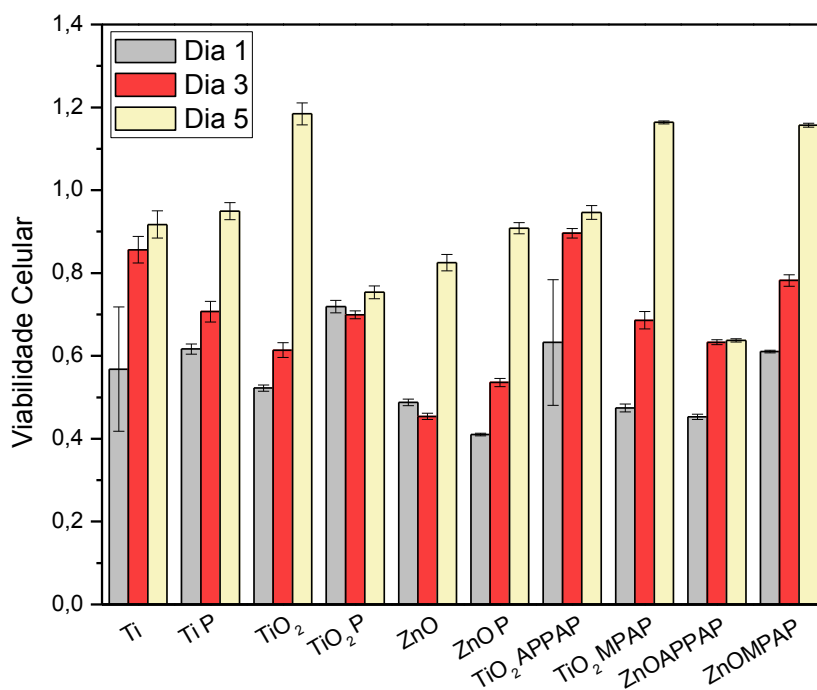


Figura 51. Ensaio de proliferação das células mesenquimais humanas por 1, 3 e 5 dias.

6.5 Resposta osteoindutiva

A resposta osteoindutiva do material foi analisada a partir de testes de nucleação *in vitro* e diferenciação de células mesenquimais humanas, conforme descrito a seguir.

6.5.1 Nucleação *in vitro*

A hidroxiapatita (HA) é reconhecida como um dos constituintes mais importantes dos tecidos mineralizados (DUMONT et al., 2016). Em geral, a formação de HA é um indicador de atividade óssea para um material, melhorando a subsequente osseointegração do mesmo. Os peptídeos da DMP1 possuem sítios ácidos favoráveis à nucleação de HA, tal como ácido glutâmico, ácido aspártico e serina, que estão diretamente relacionados à mineralização controlada pelas células (GAJJERAMAN et al., 2007; GORSKI, 1991; PADOVANO et al., 2015). A fim de determinar a influência dos peptídeos da DMP1 na nucleação e morfologia dos cristais, testes de nucleação *in vitro* foram realizados com alta concentração de cálcio e fosfato.

As amostras analisadas foram os grupos controle e as amostras funcionalizadas com MPA e APPA e os peptídeos, uma vez que apresentaram maior biocompatibilidade com hMSCs-GFP. A análise de MEV mostrou a presença de cristais em todas as amostras analisadas (Figura 52). Para o titânio observou-se um mineral sólido com forma não específica e de tamanho maior. Ao comparar a amostra de titânio com o titânio funcionalizado com peptídeos, observa-se uma diferença tanto no tamanho do mineral como na forma, o mineral é menor e com forma lamelar. Para TiO₂ e ZnO com e sem os peptídeos não são observadas alterações significativas. No entanto, as amostras funcionalizadas apresentaram minerais de tamanho menor com

morfologia do tipo agulha ou no formato de placas. Estes resultados indicam que os peptídeos derivados da DMP1 podem estabilizar os íons fosfato de cálcio induzindo a formação de minerais menores com morfologia definida. Além disso, a razão molar Ca/P calculada para os substratos de Ti CP4 modificados com TiO₂ ou ZnO, as moléculas espaçadoras e os peptídeos foi mais próxima da razão atômica ideal de 1,6 em HA pura conforme apresentado na Tabela 4. Outra forma possível para os cristais de apatita formados seria do fosfato de octacálcio (Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄·5H₂O), que é um intermediário para formação de HÁ e apresenta minerais com formato de placas de razão molar Ca/P de 1,33 (CANILLAS, et al., 2017). Mesmo sob condições ideais de precipitação com HA, os precipitados são geralmente não estequiométricos, sugerindo a formação de apatitas deficientes em cálcio (WANG, NANCOLLAS, 2008). Semelhante à hidroxiapatita, o fosfato de octacálcio tem papel importante na formação *in vivo* de biomateriais apatíticos, participando da fase inicial de formação do esmalte e do osso (ELIAZ, METOKI, 2017).

Tabela 4. Razão atômica de Ca/P analisada por EDS.

Amostra	Ca/P
Ti P	3,70 (±0,01)
TiO ₂ P	2,98 (±0,07)
TiO ₂ APPA P	1,31 (±0,05)
TiO ₂ MPA P	1,43 (±0,06)
ZnO P	1,02 (±0,03)
ZnO APPA P	1,25 (±0,03)
ZnO MPA P	1,30 (±0,02)

Padovano et al. mostra que a proporção 1:4 da mistura de peptídeo pA e pB foi bem sucedida na nucleação de hidroxiapatita (HA) conduzindo a uma relação Ca/P próxima da razão atômica ideal de 1,6 para a hidroxiapatita pura (PADOVANO et al., 2015). Os resíduos ácidos D e E apresentados nos peptídeos podem complexar os íons Ca^{2+} (ALVARES, 2014; GORSKI, 1992). Os minerais de fosfato de cálcio são formados quando expostos aos íons PO_4^{3-} na superfície das amostras, resultando em uma morfologia preferencial.

Um esquema do processo de nucleação da hidroxiapatita ou do fosfato de octacálcio na presença dos peptídeos derivados da proteína DMP1 é apresentado na Figura 53. No estágio inicial formam-se regiões de nucleação de cálcio e fósforo em solução. Como a superfície apresenta uma densidade de carga negativa, ela atrai íons Ca^{2+} dos aglomerados em solução, iniciando a nucleação (passo 2). A deposição de aglomerados pré-nucleados conduz a uma subsequente transformação para fosfato de cálcio amorfo, como mostrado no passo 3. Em seguida, no último passo, o cristal cresce espontaneamente consumindo os íons de cálcio, fosfato e hidróxido da solução circundante cristalizando em forma de hidroxiapatita ou fosfato de octacálcio com uma morfologia preferencial do tipo agulha ou placas (CÖLFEN, 2010; GAJJERAMAN et al., 2007).

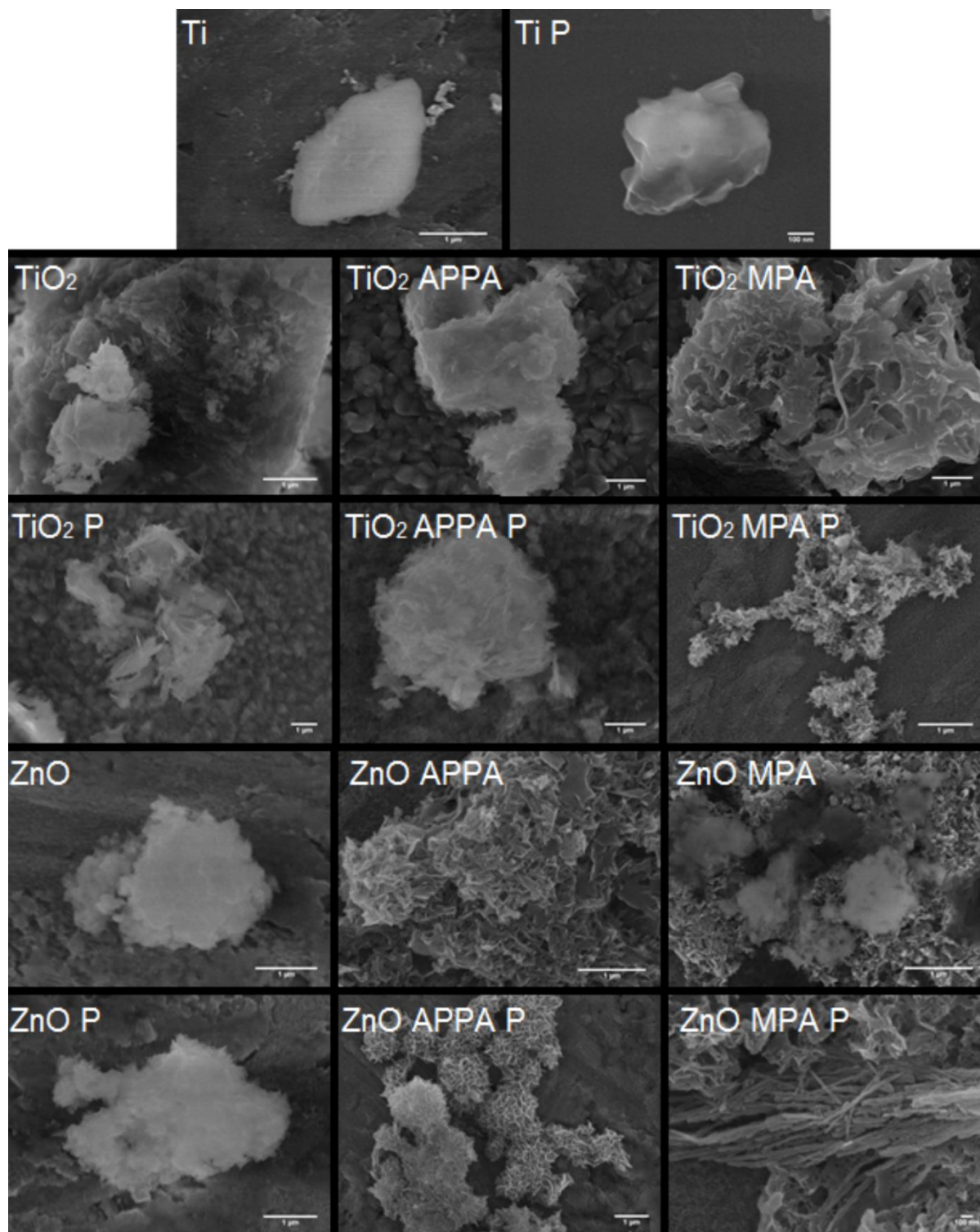


Figura 52. Microscopia eletrônica de varredura dos cristais de fosfato de cálcio formados sobre as diferentes superfícies analisadas.

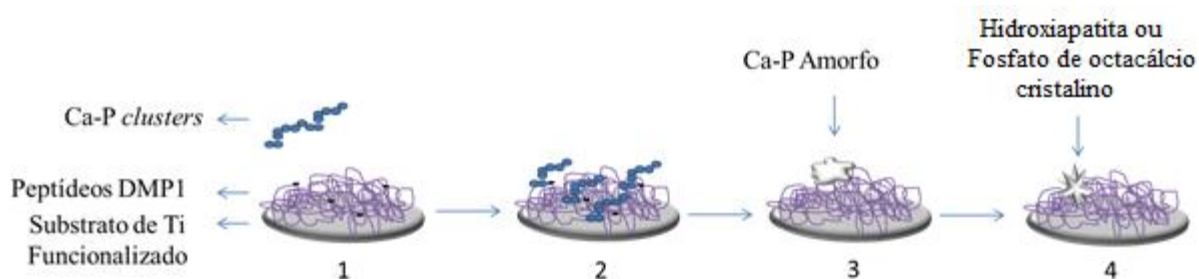


Figura 53. Diagrama esquemático para o mecanismo de crescimento dos cristais de fosfato de cálcio.

6.5.2 Diferenciação osteogênica

Fatores de crescimento como TGF- β 3, proteínas morfogenéticas ósseas, fatores de crescimento de fibroblastos têm sido utilizados para a expressão de hMSCs, a fim de aumentar sua proliferação e diferenciação. No entanto, se a proliferação e diferenciação de hMSC pudesse ser conduzida por modificações de substrato específicas, ao invés de ocorrer pela adição de estímulos biológicos, seria uma escolha mais atraente para aplicações biomédicas. A química superficial é determinante nas interações célula-material e na regulação celular, podendo dominar o processo biológico celular modulando a resposta das células. Alguns trabalhos mostraram maior aderência celular, crescimento e diferenciação dependendo do grupo químico na superfície do biomaterial.

O ensaio de diferenciação das células hMSCs foi analisado por quantificação da expressão gênica de diferentes genes específicos do osso. A análise quantitativa dos níveis de mRNA foi realizada pelo método PCR em tempo real durante o período de sete dias. Os genes marcadores analisados incluem fosfatase alcalina (ALP), colágeno alfa-1 de tipo 1 (Col1a1), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), fator de transcrição relacionado ao *runt 2* (Runx2) e sialoproteína óssea (BSP). Os genes

marcadores para osteoblastos foram regulados positivamente na presença dos peptídeos (Figura 54 e 55), indicando que as biomoléculas apresentaram uma influência positiva sobre a diferenciação osteogênica das hMSCs.

Com base nos resultados de QRT-PCR, a ALP foi regulada positivamente em mais de 10,2 para as amostras funcionalizadas com peptídeos da DMP1. A ALP é uma proteína que se liga ao cálcio e fosfato e uma enzima da osteogênese que muitas vezes se apresenta em níveis elevados de expressão em osteoblastos (RUAN et al., 2016). O gene Col1a1 mostrou um valor aumentado para a amostra de Ti P para ambos os filmes de óxidos analisados. Contudo, nas amostras TiO₂ P, TiO₂ APPA P, TiO₂ MPA P, ZnO P e ZnO APPA P o gene Col1a1 também se mostrou positivamente regulado. O Col1a1 é a proteína mais abundante da matriz óssea extracelular e pode ser considerada como um marcador inicial para a diferenciação osteogênica (SHI et al., 2017).

O OPN é um marcador importante de remodelação óssea, mas não é identificado como uma proteína específica do osso, uma vez que é expresso em outros tipos de tecidos. Em contraste, OCN é o gene mais específico para a mineralização nos estágios posteriores da diferenciação osteogênica (ZHENG et al., 2014). OPN e OCN mostraram um aumento significativo na amostra de TiO₂ MPA P e ZnO APPA P, indicando a indução rápida da diferenciação celular. Runx2 mostrou uma regulação positiva significativa quando as hMSCs foram cultivadas nas amostras TiO₂ P, TiO₂ MPA P e ZnO APPA P. Runx2 é o principal gene de comutação osteogênica para diferenciação osteoblástica (BEDI; ZANELLO; YAN, 2009). A BSP é uma proteína estrutural especificamente expressa por osteoblastos totalmente diferenciados. As amostras TiO₂ P, TiO₂ MPA P, ZnO P e ZnO APPA P mostraram valores de expressão aumentados para o gene BSP, indicando que os peptídeos da DMP1 desempenham

um papel crucial na diferenciação osteogênica das hMSCs. Portanto, os resultados QRT-PCR confirmaram que a diferenciação osteogênica foi significativamente aumentada pelos peptídeos da DMP1.

Em geral, para os filmes de TiO_2 a amostra TiO_2 MPA P apresentou maior diferenciação das células para os genes analisados, porém para os filmes de ZnO este resultado foi observado para a amostra ZnO APPA P, uma vez que a amostra ZnO MPA P apresentou baixos índices de diferenciação. Este fato pode estar relacionado às diferentes propriedades físico-químicas entre os filmes de TiO_2 e ZnO funcionalizados com MPA e peptídeos da DMP1, uma vez que as atividades celulares que são principalmente influenciadas por propriedades do material são adesão, espalhamento, migração, proliferação e diferenciação (VENTRE; CAUSA; NETTI, 2012). Nesse sentido, a diferença observada entre as amostras está centrada no fato das células exibirem comportamentos muito diferentes dependendo da elasticidade, rugosidade e molhabilidade do substrato em que estão ancoradas (SANZ-HERRERA; REINA-ROMO, 2011).

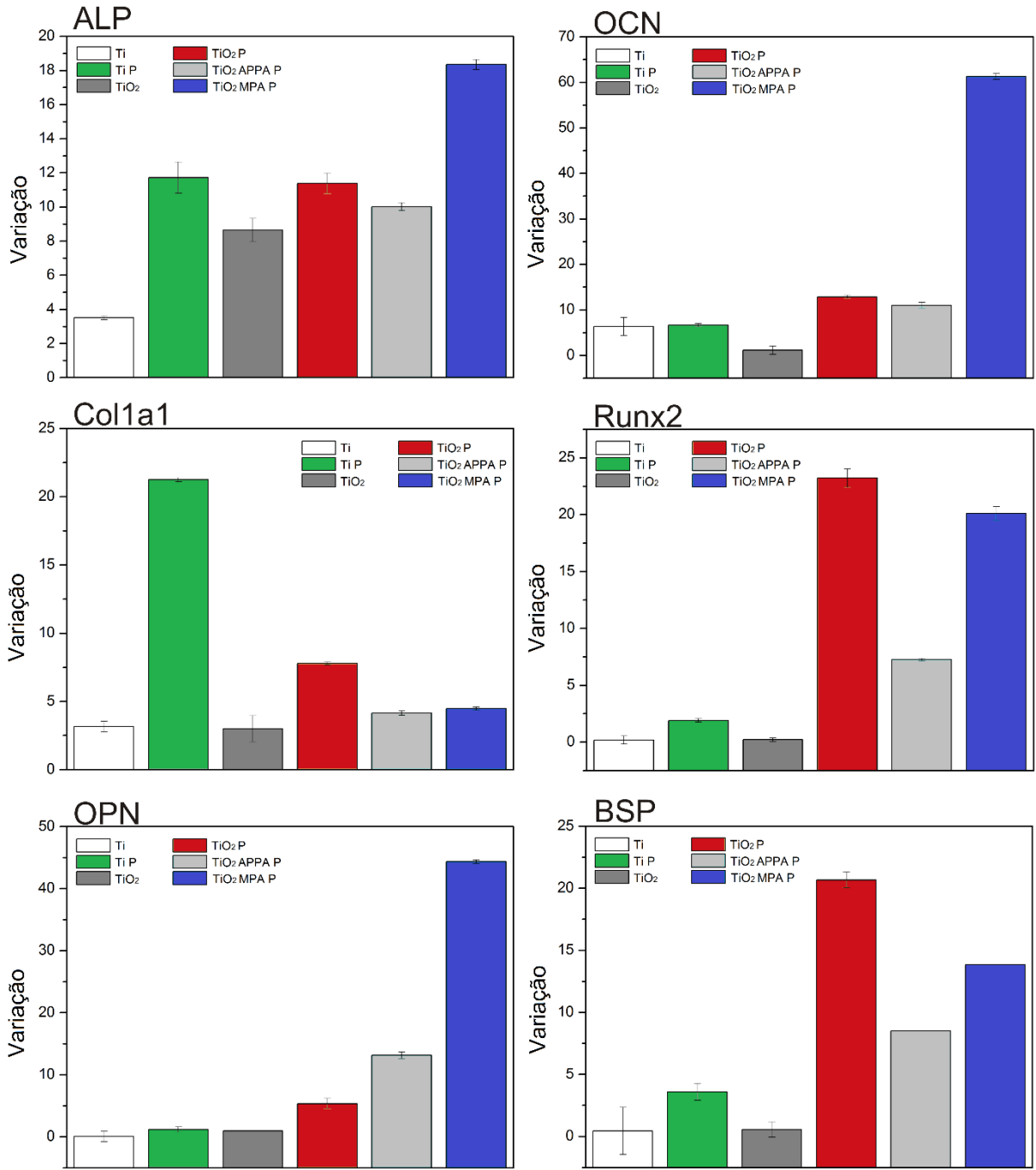


Figura 54. Expressão gênica em meio osteogênico para as amostras de TiO₂ bio-funcionalizadas.

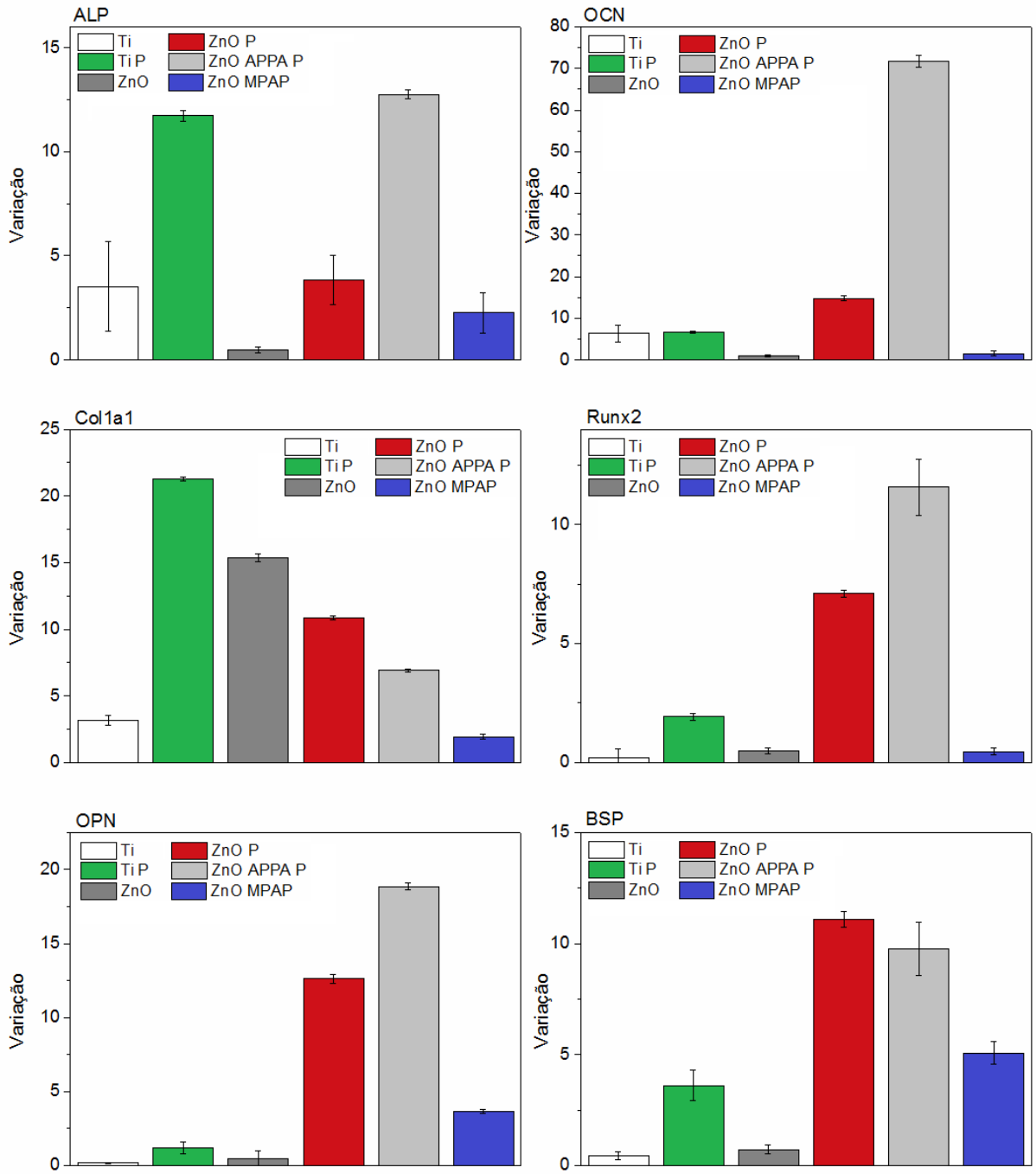


Figura 55. Expressão gênica em meio osteogênico para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas.

6.6 Propriedades eletroquímicas e mecânicas

As amostras com filmes de TiO_2 e ZnO funcionalizadas com APPA, MPA e os peptídeos derivados da proteína DMP1 foram submetidas a testes eletroquímicos de corrosão. Por fim, as amostras Ti P, TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P foram analisadas em ensaios de tribocorrosão, cujos resultados são descritos a seguir.

6.6.1 Ensaios de corrosão para as amostras de TiO_2 bio-funcionalizadas

O titânio e suas ligas são materiais biocompatíveis e resistentes à corrosão devido à formação de uma fina camada de óxido nativo (TiO_2). No entanto, esta camada protetora pode ser destruída na presença de substâncias corrosivas e/ou desgaste da área implantada, uma vez que os implantes, dependendo da aplicação, estão em contato com saliva, fluidos corporais e sujeitos a variações de pH e temperatura, que podem influenciar na degradação do material. Como resultado, a liberação de íons metálicos e partículas de óxido para o ambiente biológico devido à degradação tem um potencial tóxico para os tecidos humanos e, conseqüentemente, pode induzir a inflamações crônicas, perda óssea e até mesmo perda do implante (RUNA et al., 2015).

A eficácia da adesão dos filmes de óxidos metálicos sobre o Ti CP4, das moléculas orgânicas e dos peptídeos, foi investigada a fim de compreender melhor os processos de corrosão e desgaste nos materiais com aplicação em implantes ortopédicos ou dentários.

A fim de analisar as propriedades de resistência à corrosão das interfaces, foram realizados testes nos grupos controle e nas amostras de dióxido de titânio e

óxido de zinco funcionalizadas com os peptídeos, uma vez que estas apresentaram melhores resultados para a proliferação e diferenciação celular.

Para as amostras de TiO_2 , o potencial de circuito aberto (OCP) versus tempo de exposição, é mostrado na Figura 56a. Após um aumento inicial este se torna estável em aproximadamente 1000 s, indicando que nenhuma alteração significativa ocorre na superfície sob estas condições de exposição. O elevado potencial do TiO_2 indica que esta amostra apresenta maior resistência à corrosão quando comparada às demais. No entanto, as amostras funcionalizadas com APPA, MPA e os peptídeos também apresentaram uma boa resistência à corrosão (-0,04V e -0,06V, respectivamente), melhor do que a amostra de titânio não tratada. As biomoléculas fornecem uma barreira de proteção isolando o substrato do ambiente e prevenindo íons de se aproximar da superfície, porém a superfície apresenta imperfeições, defeitos, que podem levar a degradação do material orgânico através da difusão de água pelo filme, determinando os danos subsequentes da corrosão (KELLY et al., 2002; WOOD R. J. K., 2010).

Os resultados da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) são mostrados como um gráfico de Nyquist, que exhibe a impedância imaginária ($-\text{Im}(Z)$, Ohm cm^2) versus a componente impedância real ($\text{Re}(Z)$, Ohm cm^2). A Figura 56b mostra que as amostras Ti e Ti P apresentaram semicírculos incompletos, indicando uma resposta capacitiva e maior tendência à corrosão. Por outro lado, as amostras TiO_2 , TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P apresentam um semicírculo e o diâmetro é mais largo para TiO_2 do que para as outras amostras, indicando que a resistência à corrosão para TiO_2 é superior devido à camada protetora formada.

Os resultados de Bode representado pelo módulo de Z em função da frequência (Figura 56c) mostra que a amostra de Ti atinge $3,1 \times 10^5 \Omega \text{ cm}^2$ em baixa

frequência, enquanto o módulo de Z para as amostras funcionalizadas foi maior, cerca de $6,5 \times 10^5 \Omega \text{ cm}^2$, indicando que as amostras funcionalizadas com os espaçadores e os peptídeos derivados da DMP1 apresentam melhor resistência à corrosão, corroborando com os resultados obtidos na Figura 56b.

Os ângulos de fase observados na Figura 56d mostram regiões de alta e baixa frequência. Essas regiões indicam os processos de cinéticos de corrosão que ocorrem na superfície óxido/eletrólito e na interface das camadas substrato/superfície (SRINIVASAN; SHIN; RAJENDRAN, 2015). Um aumento dos valores de ângulo de fase para a região de maior frequência no caso de TiO_2 , TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P também indica uma maior resistência à corrosão.

As curvas de polarização obtidas para as superfícies bio-funcionalizadas são mostradas na Figura 56e. O comportamento eletroquímico foi analisado pela estimativa dos valores da densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) e do potencial de corrosão (E_{corr}). Estes foram determinados através da extrapolação de Tafel (Figura 56f). Os resultados indicaram que a bio-funcionalização teve uma influência significativa sobre os valores de E_{corr} e I_{corr} , o que resultou na diminuição do I_{corr} e na variação dos valores E_{corr} para potenciais mais nobres. O E_{corr} para a amostra de Ti aumentou de $-0,637 \text{ V}$ para aproximadamente $-0,015 \text{ V}$ para TiO_2 , $-0,050 \text{ V}$ para TiO_2 APPA P e $-0,120 \text{ V}$ para TiO_2 MPA P. Esta variação do E_{corr} para potenciais mais nobres é resultado da presença do filme cristalino de TiO_2 rutilo de aproximadamente 500 nm , que fornece maior estabilidade eletroquímica em relação à fina camada de óxido nativo amorfo formada sobre o Ti puro.

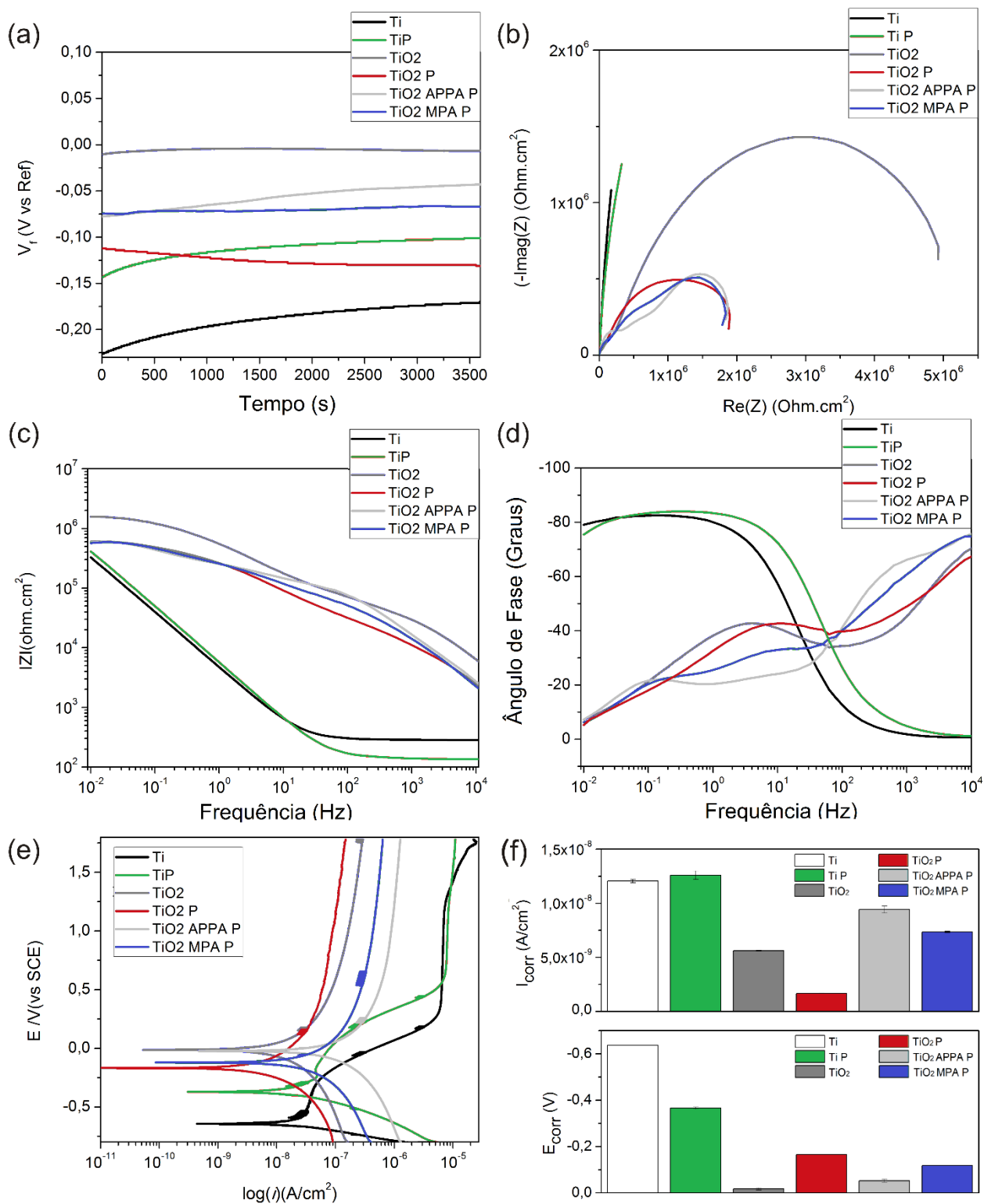


Figura 56. Resultados dos testes de corrosão: OCP (a), EIS Nyquist (b), EIS Bode (c), ângulo de fase (d), curvas de polarização (e) e valores da densidade de corrente de corrosão (i_{corr}) e do potencial de corrosão (E_{corr}) (f).

O I_{corr} é um parâmetro importante para avaliar a cinética de reação da corrosão, pois indica diretamente a taxa de corrosão através da Lei de Faraday. Assim, uma menor densidade de corrente implica em uma menor taxa de corrosão (FU et al., 2015). Em geral, os dados mostraram que a bio-funcionalização da superfície levou a uma diminuição da densidade de corrente. No entanto, as amostras TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P apresentaram valores elevados de I_{corr} quando comparados ao TiO_2 . Isto é devido à presença de biomoléculas, que podem influenciar a cinética da corrosão. Porém, ainda não está claro se as biomoléculas inibem ou aceleram as reações eletroquímicas. É provável que diferentes combinações entre biomoléculas e metais apresentem diferentes efeitos (ROYHMAN et al., 2014; YAN et al., 2006). No geral, os resultados mostraram um potencial eletroquímico mais nobre e uma menor taxa de corrosão para as amostras de Ti bio-funcionalizadas.

Modelos de circuitos equivalentes foram utilizados para analisar os dados de impedância (EIS), estimando a resistência total do circuito (R_t) e a capacitância total do circuito (C_t) das amostras analisadas. No modelo de circuito, o elemento de fase constante (CPE) foi utilizado ao invés de capacitores ideais, devido ao comportamento não-linear observado nos gráficos de Nyquist e Bode. Os modelos de circuito equivalente para cada amostra são mostrados na Figura 57.

A resistência da solução eletrolítica (R_s) foi considerada para todos os sistemas. Para o titânio puro (Figura 57a), considerou-se a resistência da solução eletrolítica (R_s) e a presença de uma camada de óxido nativo amorfo, ilustrada pela resistência da camada amorfa, R e capacitância C , que atua como uma barreira entre o ambiente e o metal. A adição dos peptídeos na amostra de Ti P levou a uma modelagem de circuito com duas constantes de tempo, além da R_s (Figura 57b): uma

constante de tempo é referente ao filme de óxido nativo amorfo e a segunda constante de tempo está relacionada ao peptídeo no topo da camada passiva, representada pela resistência à camada porosa, R_1 e capacitância C_1 . A modelagem dos circuitos para o filme cristalino de TiO_2 rutilo considerou duas interfaces no filme de TiO_2 devido ao método de deposição, que consistiu na deposição de três camadas com um pré-tratamento térmico entre elas. Portanto, a camada de TiO_2 rutilo foi representada pelas resistências, R_s , R , R_3 e R_4 ; e capacitâncias C , C_3 e C_4 (Figura 57c). O modelo de circuito para a amostra de TiO_2 P consistiu na adição de um elemento no topo da camada de rutilo, referente aos peptídeos. Assim, a amostra TiO_2 P foi representada pelas resistências, R_s , R_1 , R , R_3 e R_4 ; e capacitâncias C_1 , C , C_3 e C_4 (Figura 57d). A adição das moléculas orgânicas APPA ou MPA levou à inserção de outro elemento, entre a camada de óxido rutilo e os peptídeos. Desta forma, as amostras de TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P foram representadas pelas resistências, R_s , R_1 , R_2 , R , R_3 e R_4 e capacitâncias C_1 , C_2 , C , C_3 e C_4 (Figura 57e).

A Tabela 5 exibe os valores da resistência total, capacitância total e do ajuste χ^2 . Os parâmetros indicam que a resistência total para as amostras bio-funcionalizadas é maior quando comparada ao Ti puro. Isso denota a presença de uma camada mais protetora para as amostras bio-funcionalizadas. Além disso, existe uma diminuição significativa nos valores de capacitância para as amostras TiO_2 , TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P. Isso pode ser atribuído à presença do filme de dióxido de titânio rutilo, indicando uma estabilidade a longo prazo para este filme (DOLATA; KEDZIERZAWSKI; AUGUSTYNSKI, 1996).

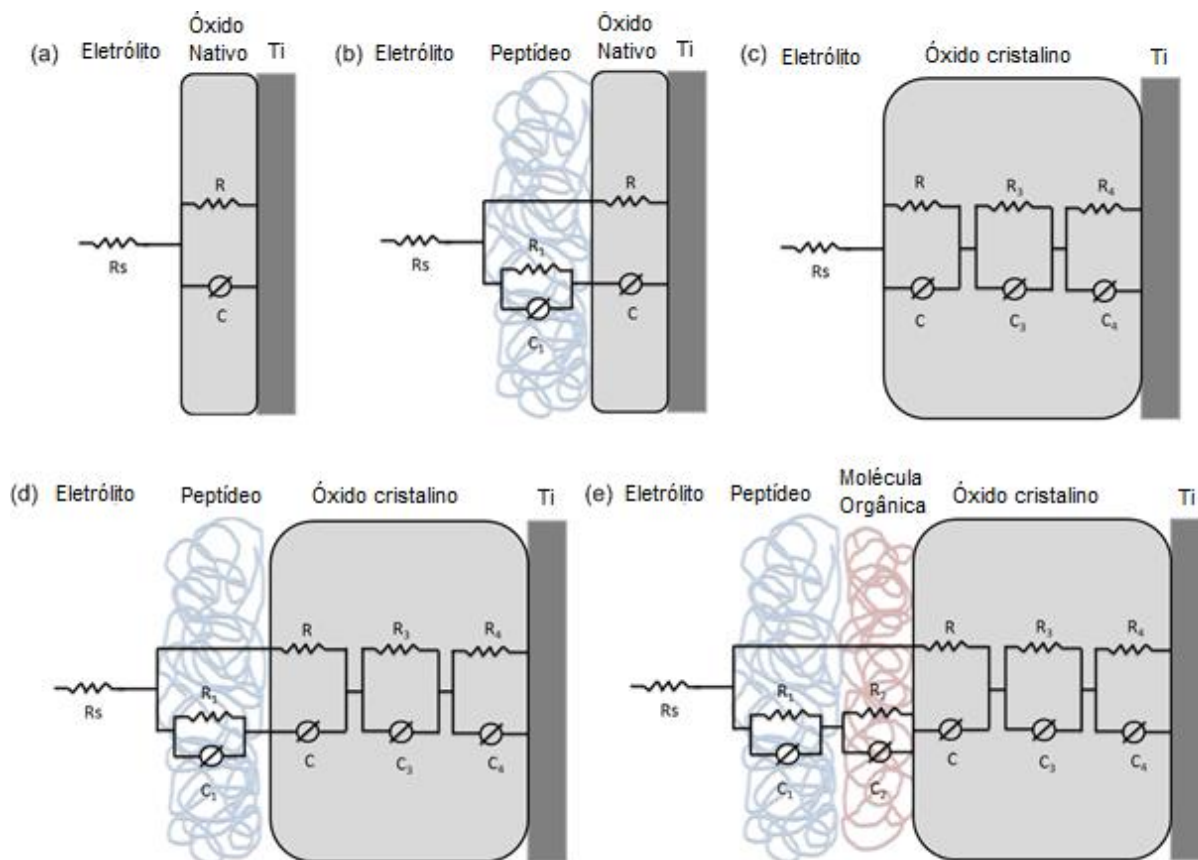


Figura 57. Circuitos equivalentes para as amostras Ti (a), Ti P (b), TiO₂ (c), TiO₂ P (d) e TiO₂ APPA P ou TiO₂ MPA P (e) utilizados para estimar a capacitância total e a resistência total de cada sistema.

Tabela 5. Parâmetros obtidos a partir da modelagem dos circuitos equivalentes dos dados de EIS para resistência total (R_t), capacitância total (C_t) e valor de χ^2 referente ao melhor ajuste alcançado.

Amostra	R _t (Ω)	C _t (F)	χ^2
Ti	5,25 x 10 ⁴ (±8,53 x 10 ⁴)	8,19 x 10 ⁻⁵ (±5,05 x 10 ⁻⁶)	6,99 x 10 ⁻⁴ (±1,29 x 10 ⁻⁴)
Ti P	3,83 x 10 ⁴ (±1,49 x 10 ⁴)	1,08 x 10 ⁻⁴ (±2,19 x 10 ⁻⁵)	8,44 x 10 ⁻⁴ (± 3,57 x 10 ⁻⁴)
TiO ₂	3,16 x 10 ⁶ (±7,05 x 10 ⁵)	1,42 x 10 ⁻⁸ (±8,47 x 10 ⁻⁹)	1,42 x 10 ⁻³ (± 5,50 x 10 ⁻⁴)
TiO ₂ P	3,56 x 10 ⁶ (±2,61 x 10 ⁶)	6,66 x 10 ⁻⁸ (±3,22 x 10 ⁻⁸)	9,49 x 10 ⁻³ (±6.90 x 10 ⁻³)
TiO ₂ APPA P	7,00 x 10 ⁵ (±1,92 x 10 ⁵)	7,95 x 10 ⁻⁸ (±6,63 x 10 ⁻⁹)	6,54 x 10 ⁻⁴ (±1,86 x 10 ⁻⁴)
TiO ₂ MPA P	9,03 x 10 ⁵ (±8,67 x 10 ³)	4,46 x 10 ⁻⁸ (±9,87 x 10 ⁻⁹)	9,34 x 10 ⁻⁴ (±1,45 x 10 ⁻⁴)

5.6.2 *Ensaio de corrosão para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas*

Avaliar o comportamento eletroquímico das amostras bio-funcionalizadas de ZnO em ambiente que se assemelhe ao biológico é de extrema importância para uma melhor compreensão do desempenho do implante. A Figura 58 mostra o potencial de circuito aberto (E_{OCP}) em função do tempo para as amostras de Ti, Ti P, ZnO, ZnO P, ZnO APPA P e ZnO MPA P em eletrólito PBS. A estabilidade do E_{OCP} com o tempo é uma indicação de que não há mudança significativa na superfície das amostras sob estas condições de exposição. Em geral, quanto maior o E_{OCP} , menor é a tendência à corrosão (CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2011). Verifica-se claramente que os filmes de ZnO aumentaram significativamente o valor de E_{OCP} , sugerindo uma maior resistência à corrosão quando comparado ao Ti puro (-0,567 V). Em particular, as amostras de ZnO bio-funcionalizadas ZnO P e ZnO MPA P apresentaram maior E_{OCP} (-0,119 V e -0,130 V) com relação ao ZnO (-0,225 V). A amostra ZnO APPA P, por sua vez, apresentou um pequeno aumento para -0,216 V no valor do E_{OCP} com relação a amostra ZnO. Por outro lado, a deposição dos peptídeos sobre a amostra de Ti elevou consideravelmente o E_{OCP} para -0,174 V, indicando que os peptídeos contribuem efetivamente para uma melhora na resistência à corrosão.

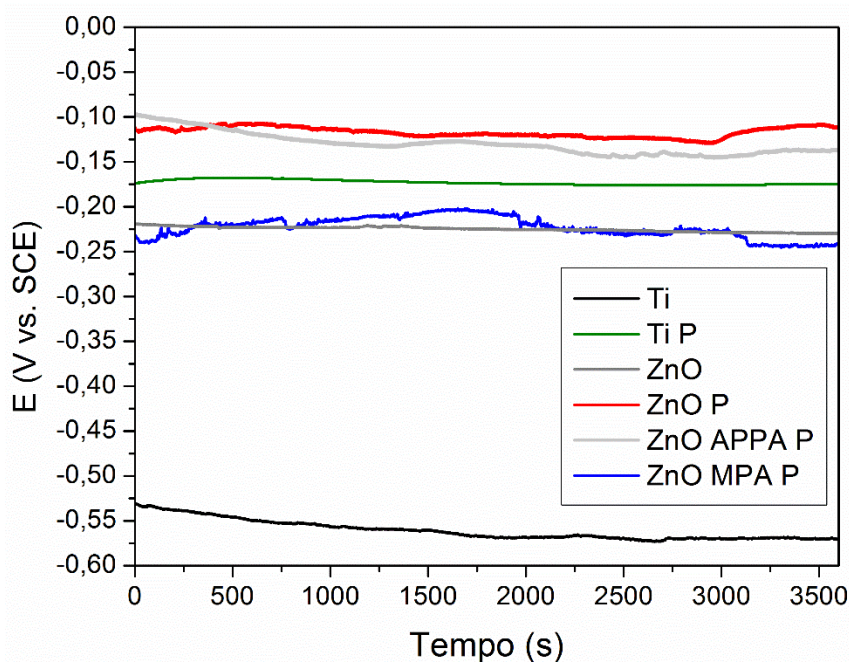


Figura 58. Potencial de circuito aberto (OCP) para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas.

O gráfico Bode representado pelo módulo da impedância (Z) em função da frequência na Figura 59a mostra que a amostra de Ti apresenta um valor de $Z < 10^4 \Omega \text{ cm}^2$ em baixas frequências, enquanto que para outras amostras o valor é $> 10^5 \Omega \text{ cm}^2$ nas mesmas frequências, indicando que as amostras contendo ZnO e as amostras bio-funcionalizadas apresentam maior resistência à corrosão (SRINIVASAN; SHIN; RAJENDRAN, 2015). No entanto, em frequências mais altas para a amostra ZnO, a resposta indica uma possível quebra da camada de óxido (KELLY et al., 2002), a qual pode ser relacionada a defeitos superficiais, como regiões não revestidas ou rachaduras. Por outro lado, as amostras de ZnO bio-funcionalizadas exibem um comportamento associado a uma camada intacta (HACK; SCULLY, 1991). Além disso, a presença dos peptídeos pode evitar a penetração de íons do eletrólito PBS,

diminuindo a transferência de carga na interface ZnO/substrato e reduzindo assim a cinética de reação para $Ti^{4+}(aq)$ ou $Ti^{3+}(aq)$.

A Figura 59b apresenta os dados do ângulo de fase para as amostras controle e de ZnO bio-funcionalizadas. Como dito anteriormente, o ângulo de fase pode ser classificado em regiões de alta e baixa frequência, as quais indicam os processos cinéticos de corrosão que ocorrem na superfície óxido/eletrólito e na interface das camadas substrato/superfície. Na região de média frequência o ângulo de fase e a frequência mostram uma resposta linear para o Ti, com ângulo de fase próximo de 60° , o que corresponde ao comportamento capacitivo da interface eletrodo/eletrólito (ZHANG et al., 2016). A diminuição do ângulo de fase e a mudança na posição do pico em torno de 10^1 Hz confirma a quebra da camada ZnO. Porém, as amostras de ZnO bio-funcionalizadas mostram um ponto de ruptura em frequências mais altas ($>10^2$ Hz) quando comparado à amostra ZnO, indicando aumento resistência à ruptura do óxido.

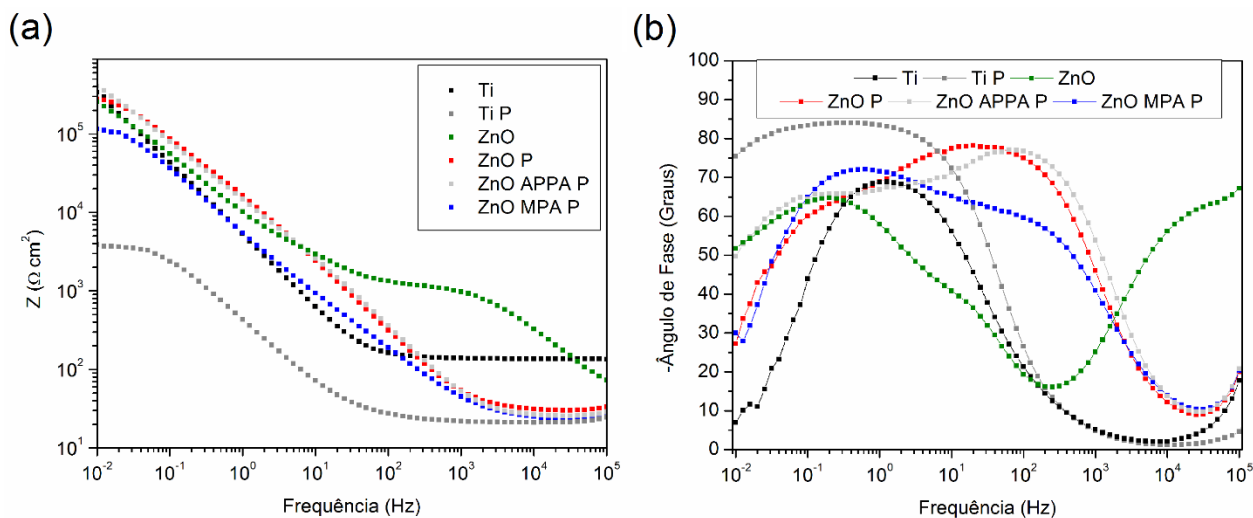


Figura 59. Gráficos de impedância por Bode (a) e ângulo de fase (b) para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas.

Com base no comportamento da impedância (EIS), circuitos equivalentes foram propostos, como mostrado na Figura 60. Um elemento de fase constante (CPE) foi usado ao invés de um capacitor puro devido ao comportamento não ideal associado às condições experimentais. A impedância do CPE (Z_{CPE}) é definida como $Z_{CPE} = [Z_o (j\omega)^n]^{-1}$, onde Z_o é a constante do CPE ($\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^n$), ω é a frequência angular (rad s^{-1}), j é o número imaginário e n é o expoente de CPE (ZHANG et al., 2016). A resistência da solução eletrolítica é representada por R_s , que apresenta um valor pequeno e semelhante em todos os testes de EIS. O circuito equivalente das amostras Ti e Ti P (Figura 60a) são representados por um modelo de Randle com CPE (DUCHEYNE et al., 2011). O arranjo de dois CPE em cascata para as amostras ZnO, ZnO P, ZnO APPA P e ZnO MPA P (Figura 60b) são representados por uma camada interna (R_p e CPE_1) e uma camada porosa externa (R_{pore} e CPE_2). As notações R_p e R_{pore} são referentes às resistências da barreira interna e camadas externas porosas, respectivamente.

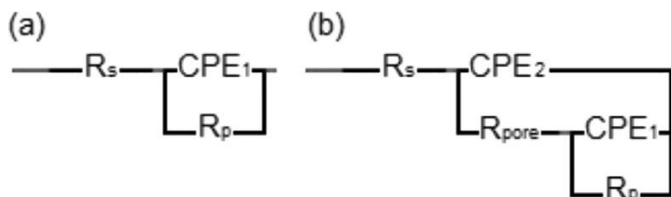


Figura 60. Circuito equivalente com uma constante de tempo para Ti e Ti P (a). Um circuito equivalente com duas constantes de tempo é apresentado para ZnO, ZnO P, ZnO APPA P e ZnO MPA P (b).

A Tabela 6 mostra os parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos modelos de circuito equivalente para os dados de EIS. O parâmetro R_p é frequentemente usado para avaliar a resistência à corrosão do eletrodo de trabalho, uma vez que inclui as

contribuições das resistências de transferência de carga, resistência ao filme fino do óxido e a migração de defeitos pontuais mediada pela dissolução do metal (KRAWIEC et al., 2013). Comparando os valores de R_{pore} e R_p , observa-se que a resistência da camada porosa externa (R_{pore}) é menor que a resistência da camada de barreira interna (R_p). Isso indica uma maior resistência à corrosão fornecida pela R_p . Para as amostras bio-funcionalizadas os valores de R_p encontrados são aproximadamente três ordens de grandeza superiores quando comparados com a amostra de Ti. Portanto, a bio-funcionalização da superfície pode inibir a transferência de carga na interface substrato/eletrólito e reduzir a liberação de íons metálicos, consequentemente aumentando a resistência à corrosão (ZHANG et al., 2016). O ajuste encontrado (χ^2) foi da ordem de 10^{-3} corroborando com a qualidade do circuito equivalente proposto.

Tabela 6. Parâmetros eletroquímicos extraídos dos dados de impedância para as amostras de controle e de ZnO bio-funcionalizadas.

Amostra	Parâmetros							
	R_s (Ω/cm^2)	R_p (Ω/cm^2)	CPE_1 ($\Omega^{-1} S^n cm^{-2}$)	n_1	R_{pore} (Ω/cm^2)	CPE_2 ($\Omega^{-1} S^n cm^{-2}$)	n_2	χ^2
Ti	21.9 (± 2.64)	4.14×10^3 (± 54.0)	4.64×10^{-4} (± 0.32)	0.848 (± 0.05)	-	-	-	5.79×10^{-3} (± 0.06)
Ti P	20.4 (± 5.78)	1.00×10^4 (± 184)	3.11×10^{-4} (± 0.25)	0.944 (± 0.07)	-	-	-	3.16×10^{-3} (± 0.79)
ZnO	20.5 (± 8.33)	1.01×10^6 (± 124)	2.48×10^{-5} (± 0.49)	0.724 (± 0.24)	1.26×10^3 (± 5.06)	5.43×10^{-7} (± 0.54)	0.767 (± 0.20)	7.90×10^{-3} (± 0.15)
ZnO P	30.1 (± 4.31)	4.05×10^5 (± 147)	1.19×10^{-5} (± 0.16)	0.757 (± 0.09)	1.56×10^1 (± 2.43)	2.66×10^{-6} (± 0.31)	0.990 (± 0.06)	6.62×10^{-3} (± 0.14)
ZnO APPA P	25.2 (± 4.44)	1.00×10^6 (± 43.9)	1.40×10^{-5} (± 0.80)	0.703 (± 0.04)	2.01×10^1 (± 2.91)	2.63×10^{-6} (± 0.33)	0.995 (± 0.03)	7.46×10^{-3} (± 0.65)
ZnO MPA P	23.0 (± 4.89)	1.64×10^5 (± 20.9)	8.74×10^{-4} (± 0.17)	0.926 (± 0.05)	1.59×10^3 (± 4.78)	2.93×10^{-5} (± 0.66)	0.800 (± 0.08)	5.88×10^{-3} (± 0.07)

A corrosão foi analisada pela densidade da corrente de corrosão (I_{corr}) e potencial de corrosão (E_{corr}), que foram estimados usando a extrapolação Tafel a partir de dados de polarização potenciodinâmica. Os parâmetros eletroquímicos correspondentes estão resumidos na Figura 61. Comparado ao Ti puro, os potenciais de corrosão das amostras bio-funcionalizadas apresentaram um valor mais positivo, indicando uma diminuição da dissolução de Ti causada pela natureza protetora do filme fino de ZnO e dos peptídeos da DMP1. O potencial E_{corr} diminuiu de -0,63 V para Ti puro, para -0,50 V, -0,44 V, -0,49 V, -0,47 V, -0,46 V, para Ti P, ZnO, ZnO P, ZnO MPA P, e ZnO APPA P, respectivamente.

Além disso, valores mais baixos são observados para a densidade da corrente de corrosão (I_{corr}) nas amostras bio-funcionalizadas, com exceção da amostra ZnO MPA P. A bio-funcionalização diminuiu os valores de I_{corr} de $2,0 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$ para o Ti, para $1,8 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$, $2,2 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$, $2,0 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$, $9,0 \times 10^{-7} \text{ A/cm}^2$ para as amostras Ti P, ZnO, ZnO P e ZnO APPA P, respectivamente. Isto pode ocorrer pois os peptídeos proporcionam uma melhor proteção de barreira, evitando a corrosão. No entanto, o valor I_{corr} para a amostra de ZnO MPA P ($3,0 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$) é superior à do Ti puro. O valor encontrado pode estar relacionado com a maior molhabilidade da amostra ZnO MPA P. Para valores de ângulo de contato mais baixo, o material pode absorver mais moléculas de água aumentando as taxas de corrosão e degradação (Liu. et al, 2014).

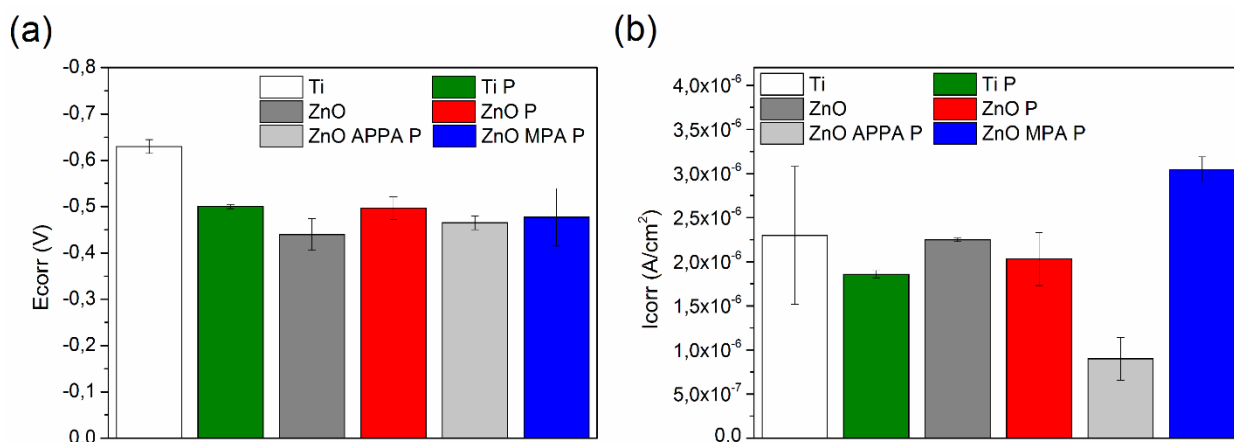


Figura 61. Potencial de corrosão (E_{corr}) e taxa de corrosão (I_{corr}) para as amostras de ZnO bio-funcionalizadas.

Portanto, os resultados eletroquímicos indicaram que as amostras de Ti modificadas com ZnO e os peptídeos da DMP1 mudaram, em sua maioria, o valor de E_{OCP} para potenciais mais nobres, diminuíram a densidade da corrente de corrosão e melhoraram a resistência do material, aumentando significativamente a resistência à corrosão do Ti puro.

6.6.3 Tribocorrosão

Os testes de tribocorrosão foram realizados em condições de potencial aberto em função do tempo, Figura 62a. Para as amostras Ti e TiP, uma queda no potencial de aproximadamente 0,8 V em 1220 s pode ser observada quando a bola de alumina (contra corpo) inicia o deslizamento sobre a superfície. Isso indica que a natureza eletroquímica das amostras Ti e Ti P sob estímulos mecânicos é inferior, e pode estar relacionada ao maior nível de degradação em suas superfícies. O potencial permanece baixo durante todo o processo de deslizamento, entre -0,9 V a -0,7 V, com

algumas oscilações que são normalmente atribuídas aos eventos de despassivação/repassivação.

A amostra de TiO₂ apresentou algumas interferências de campo magnético, como mostrado nos espectros. No entanto, é claro que o potencial foi maior para TiO₂ P. Além disso, a funcionalização com o óxido, a molécula orgânica e a biomolécula nas amostras TiO₂ APPA P e TiO₂ MPA P melhorou significativamente o desempenho do metal. O potencial é muito maior para essas amostras, apresentando uma queda de potencial em torno de 0,05V, indicando uma proteção da superfície fornecida pelos materiais orgânicos.

No interior do corpo humano, as reações triboquímicas nas junções de metal sobre metal (MoM) resultam na formação de uma tribocamada nas ligas de CoCrMo. Esta tribocamada é composta por produtos triboquímicos e proteínas provenientes do líquido sinovial (MATHEW et al., 2014). Esta tribocamada natural é capaz de melhorar o desempenho do implante MoM diminuindo a perda de massa total e reduzindo a corrosão. As amostras contendo os grupos orgânicos e os peptídeos (TiO₂ APPA P e TiO₂ MPA P) podem mimetizar a formação de uma tribocamada, aumentando a resistência à corrosão com menor perda de massa. Desta forma, a presença de peptídeos DMP1 afeta a estabilidade do material durante a tribocorrosão. Os peptídeos aderidos à superfície podem apresentar características lubrificantes, protegendo a superfície do biomaterial (MATHEW; JACOBS; WIMMER, 2012; QUIRAM et al., 2016). Além disso, os peptídeos podem aumentar a dureza e a força da superfície, resultando em uma diminuição da taxa de desgaste (WANG et al., 2016a, 2016c).

O coeficiente de atrito (COF) foi outro fator analisado durante o deslizamento. Cada uma das curvas, Figura 62b, mostra que ao iniciar o deslizamento o coeficiente

de atrito aumentou. Isto ocorre porque neste momento a força do atrito estático é superada entre as duas superfícies de contato, iniciando novamente o movimento relativo do contra-corpo (esfera de alumina) na superfície. Conforme as superfícies de contato são deformadas o coeficiente de atrito diminui à medida que alcança um ponto em que é aproximadamente constante e estável. A presença de moléculas orgânicas e peptídeos na superfície resultou em uma diminuição significativa do COF, com exceção da amostra de TiO_2 MPA P. A diminuição do COF em torno de 12 min, para a amostra de MPA P, pode sugerir que o COF depende das condições de contato e da natureza da molécula orgânica que forma o complexo lubrificante. Desta forma, uma queda no COF pode ocorrer por variações na distribuição da tensão de cisalhamento e na microestrutura da superfície (WANG et al., 2016c).

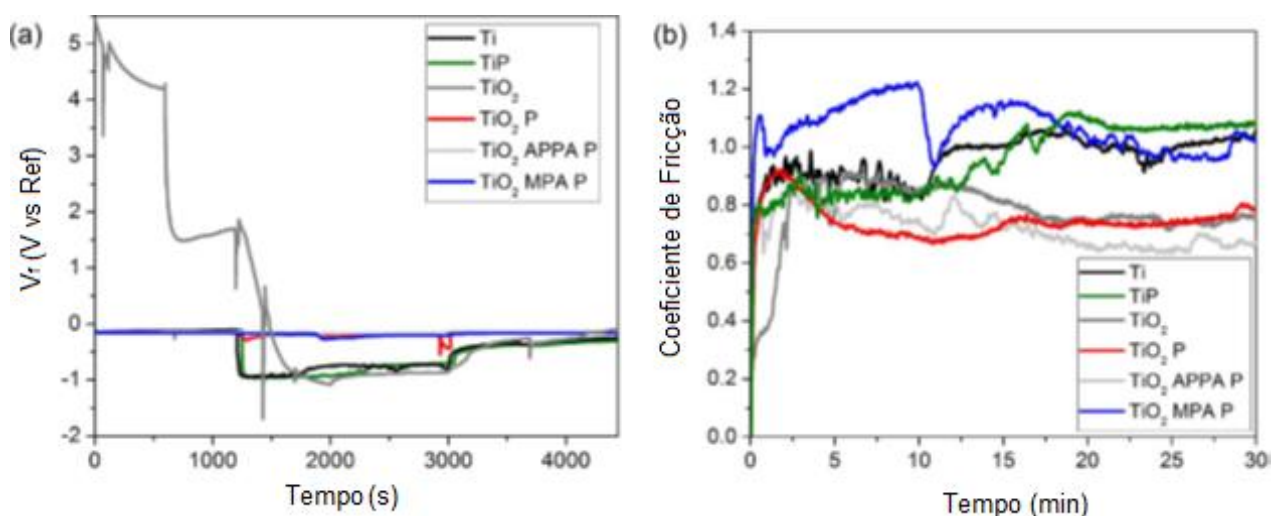


Figura 62. Evolução do potencial de circuito aberto com o tempo (a) e coeficiente de atrito (b) medidos durante ensaios de tribocorrosão para as amostras analisadas.

As amostras contendo a marca de desgaste foram analisadas por microscopia óptica confocal (Figura 63). É possível verificar que os grupos Ti e Ti P

foram os que apresentaram maior perda de massa, exibindo um desgaste no formato circular compatível com a esfera de alumina. As amostras revestidas com TiO_2 não apresentaram um desgaste de formato circular (pouco dano na superfície), indicando uma maior proteção. As diferenças entre o óxido nativo amorfo das amostras de Ti e o óxido de rutilo cristalino é uma possível explicação para essa diferença de comportamento entre as amostras. A fase cristalina rutilo está associada a um aumento na dureza do material de até 17 GPa (ALVES et al., 2013).

A presença dos peptídeos da DMP1 não apresentou diferenças significativas com relação à perda de massa nas amostras de TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P, fornecendo uma boa proteção à superfície. Porém no caso da amostra Ti P, houve um aumento do desgaste quando comparado com a amostra Ti. Isso pode ser devido ao fato das biomoléculas, no pH 7,4 do eletrólito, apresentarem cargas negativas. Neste pH a densidade da carga para o peptídeo pA é -2 e para o peptídeo pB é -3 ("Peptide Property Calculator", 2018). A densidade de carga negativa dos peptídeos atrai os íons metálicos positivos e os transporta longe da superfície do implante. Desse modo, pode ocorrer uma interação entre os peptídeos e os íons metálicos, aumentando a taxa de dissolução e evitando a formação da tribofilme (SIN; HU; EMAMI, 2013). No caso das amostras modificadas com o óxido, além da taxa de corrosão ser menor para a camada passiva, pode ocorrer a formação de complexos entre os peptídeos e os íons, os quais se depositam na superfície, protegendo a mesma.

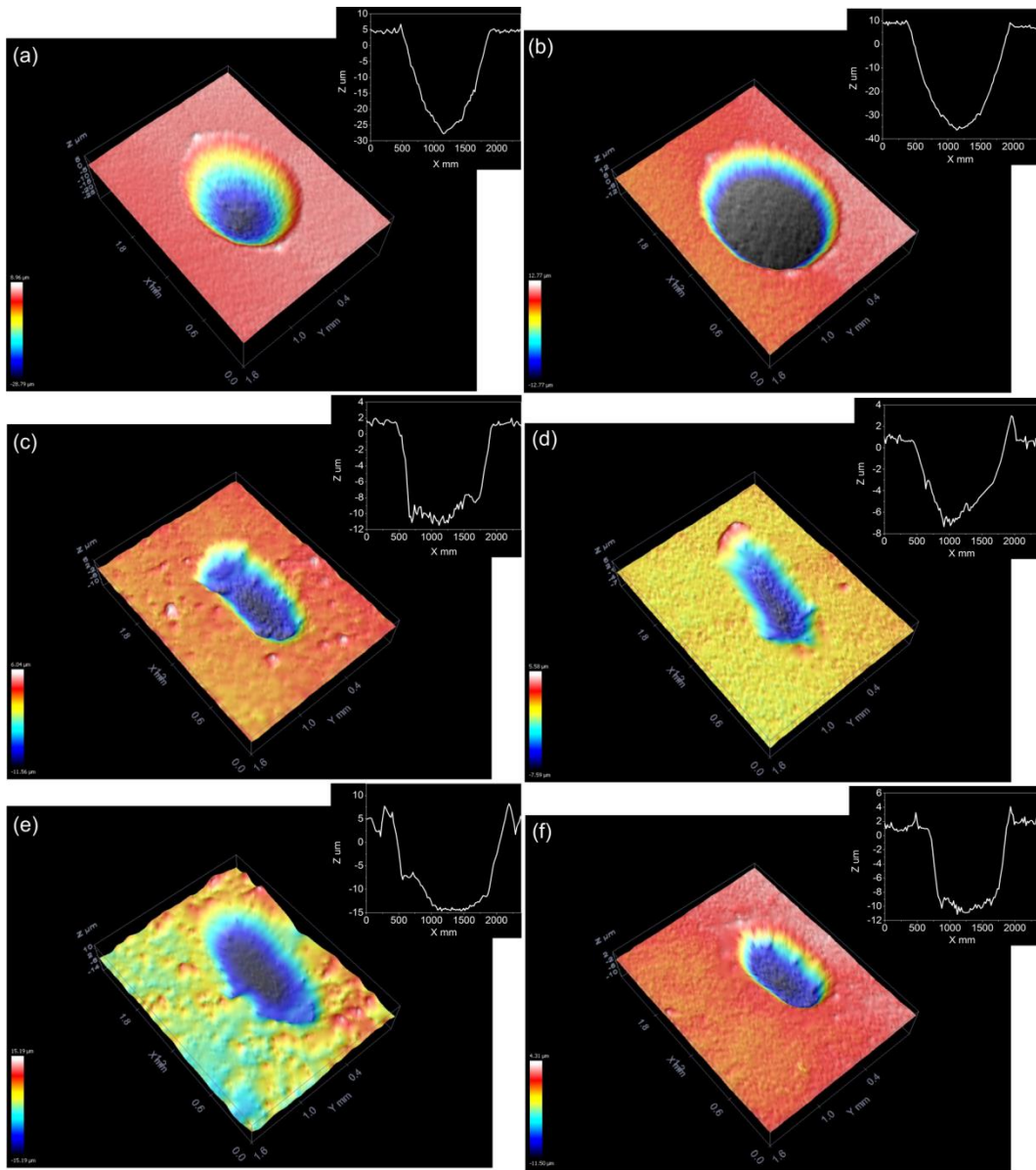


Figura 63. Análise da marca de desgaste após tribocorrosão das amostras de Ti (a), Ti P (b), TiO₂ (c), TiO₂ P (d), TiO₂ APPA P (e) e TiO₂ MPA P (f).

Os possíveis mecanismos de tribocorrosão que ocorrem nas superfícies das amostras não funcionalizados e naquelas bio-funcionalizadas são mostrados na Figura 65. As amostras de titânio possuem uma camada de óxido amorfo nativo. No entanto, durante a tribocorrosão, esta camada de óxido é desgastada devido à sua baixa espessura (menos de 12-15 nm) e ausência de cristalinidade (TRINO et al., 2018). Sem a camada de óxido, a superfície do metal é exposta. O resultado é um maior grau de perda de massa (Figura 64a).

Por outro lado, quando a superfície é revestida com TiO_2 rutilo, a camada de rutilo retarda a taxa de degradação do filme. Isso contribui para o nivelamento dos perfis da marca de desgaste (OLIVEIRA et al., 2015) e resulta em uma camada de óxido mais protetora (Figura 64b).

Os peptídeos da DMP1 podem atuar como uma camada protetora ou podem aumentar a perda de massa, dependendo das características físico-químicas da superfície. Para a amostra de titânio funcionalizada com peptídeos da DMP1 (Ti P), as médias de corrosão e perda de massa são parecidas com as da amostra de titânio puro. Isso indica um comportamento de elevada taxa de tribocorrosão. Esta degradação aumentada do material pode ser atribuída ao ponto isoelétrico dos peptídeos no pH testado. Os peptídeos da DMP1 formam regiões aglomeradas sobre a superfície de titânio, e uma vez que o pH do eletrólito PBS atinge 7,4, os peptídeos com carga negativa se agrupam como oligômeros. Os peptídeos carregados negativamente atraem íons de titânio do metal, aumentando assim a taxa de difusão e consequentemente a degradação do material (Figura 64c) (SIN; HU; EMAMI, 2013).

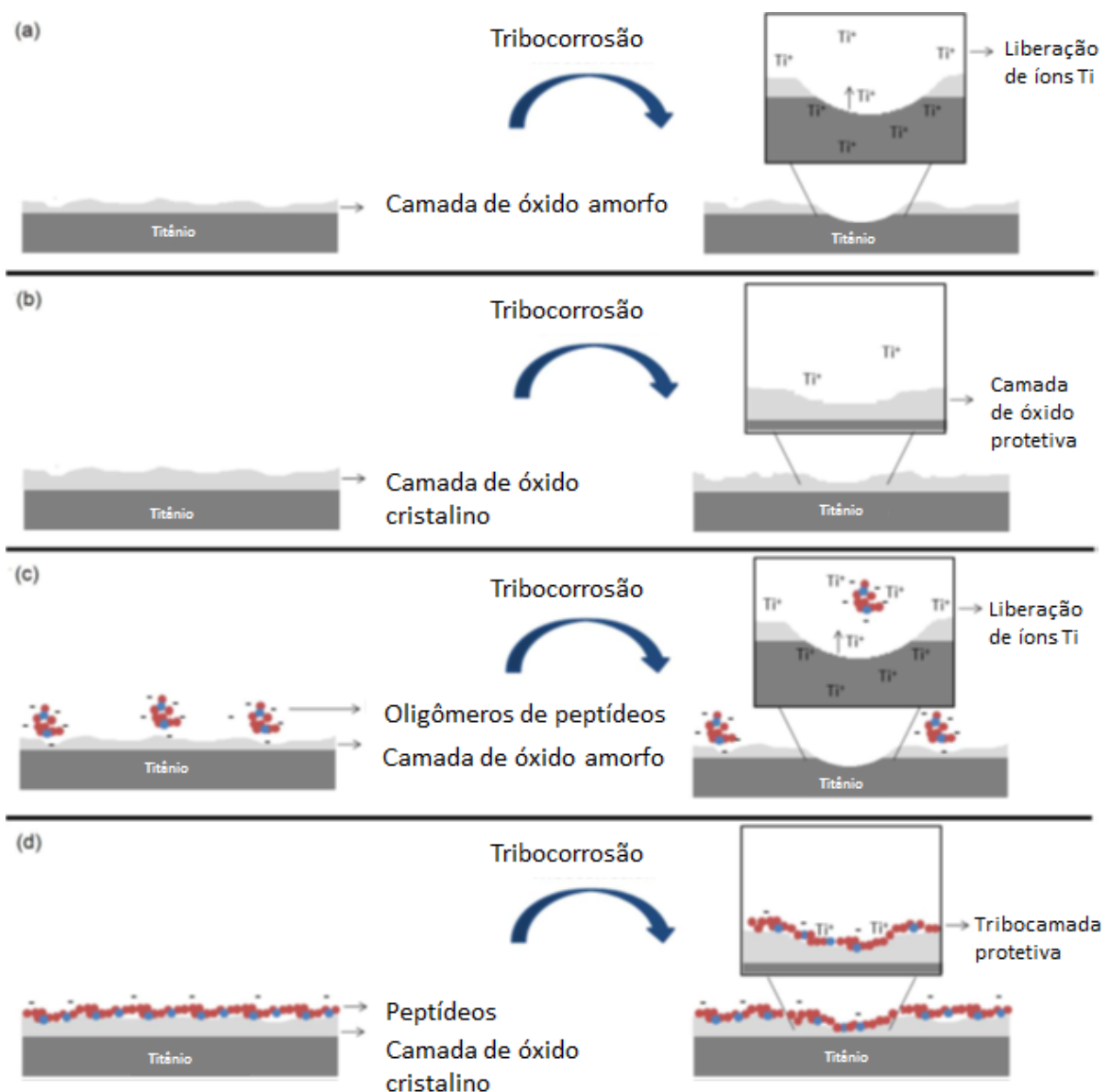


Figura 64. Diagrama esquemático de possíveis mecanismos de tribocorrosão que ocorrem nas superfícies testadas não funcionalizadas e bio-funcionalizadas: Ti (a), TiO_2 (b), Ti P (c), TiO_2 P, TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P (d).

Quando os peptídeos da DMP1 se aderem nas amostras TiO_2 , TiO_2 APPA P e TiO_2 MPA P a taxa de corrosão e a marca do desgaste diminuem. Isso indica a formação de um tribofilme protetor. Os peptídeos da DMP1 aderem com maior eficácia nas superfícies das amostras de TiO_2 , TiO_2 MPA e TiO_2 APPA através de ligações

covalentes entre os grupos amino ou ácidos. Esses grupos estão presentes nos peptídeos e se aderem à superfície através dos grupos terminais -OH, -COOH ou -NH₂ das respectivas amostras. Isso leva à formação de uma camada estável, que pode se combinar com os íons liberados durante a tribocorrosão. Esta camada é capaz de manter sua estabilidade e atua como uma tribocamada lubrificante que protege a superfície (Figura 64d).

7. Implicações Clínicas

Embora ainda seja necessário realizar os testes *in vivo*, o emprego dessas descobertas em ensaios clínicos é promissor. Os materiais bio-funcionalizados podem fornecer uma superfície osteogênica que é capaz de nuclear cristais de apatita de interesse biológico (hidroxiapatita ou fosfato de octacálcio) e remineralizar o tecido ósseo. Além disso, os peptídeos derivados da DMP1 podem induzir a formação de células osteoblásticas, o que pode levar à regeneração tecidual. A biofuncionalização também tem uma influência positiva na resistência à corrosão e à degradação do material, reduzindo a liberação de íons metálicos e detritos, e assim prolongando a vida útil do implante e diminuindo o risco de infecção.

8. Conclusões

Os óxidos foram sintetizados pelo método sol-gel e, após tratamento térmico, os filmes finos TiO_2 e ZnO apresentaram as fases cristalinas desejadas, rutilo e wurtzita, respectivamente. A espessura dos filmes apresentou-se em torno de 500 nm para o TiO_2 e 100 nm para o ZnO . Apesar do procedimento de deposição empregado ter sido o mesmo para ambos os óxidos, esta variação na espessura se refere ao tratamento térmico em que os óxidos foram submetidos, de modo que o TiO_2 apresentou partículas com tamanhos maiores, influenciando na sua espessura.

Os filmes de TiO_2 e ZnO foram funcionalizados com quatro diferentes moléculas orgânicas bifuncionais: APTMS, APPA, MPA e PEG. Após a funcionalização, resultados de XPS confirmaram a presença de C 1s, N 1s, S 2p e Si 2p presentes nos grupos espaçadores. A partir desses resultados foi possível propor um modelo de deposição preferencial das moléculas orgânicas sobre os óxidos, de modo que o APTMS teve uma adesão preferencial pelos grupos silano, o APPA pelo grupo carboxílico, o MPA pelo tiol e o PEG polimerizou devido à alta concentração de grupos hidroxila. Além disso, a presença dos grupos espaçadores aumentou a rugosidade superficial das amostras, conferindo uma topografia preferencial para a adesão celular.

A deposição dos peptídeos derivados da DMP1 sobre TiO_2 e ZnO foi verificada por XPS, mostrando a presença de C 1s e N 1s provenientes das biomoléculas. Análises de AFM mostraram regiões de aglomeração dos peptídeos sobre as amostras Ti P, TiO_2 P, ZnO P, ZnO APTMS P e ZnO PEG P, e uma adesão homogênea, preferencial, sobre as amostras funcionalizadas com APPA e MPA. Análises por ângulo de contato mostraram que todas as amostras, com exceção

daquelas bio-funcionalizadas contendo APTMS, apresentaram superfícies extremamente hidrofílicas, devido à presença dos peptídeos derivados da DMP1.

A adesão de células mesenquimais humanas mostrou-se mais efetiva sobre as superfícies funcionalizadas com os espaçadores MPA e APPA na presença de peptídeos. Além disso, testes de viabilidade celular demonstraram que os peptídeos derivados da DMP1 são capazes de modular a afinidade e a proliferação de células mesenquimais humanas. A presença dos peptídeos desencadeou a diferenciação osteoblástica das células, gerando superfícies osteogênicas. Testes de mineralização indicaram que os peptídeos derivados da DMP1 são capazes de estabilizar minerais de fosfato de cálcio com uma razão Ca/P e morfologia semelhantes à encontrada no osso.

Os resultados eletroquímicos e mecânicos evidenciaram um aumento na resistência à corrosão e à tribocorrosão do material funcionalizado. As amostras contendo os grupos orgânicos e os peptídeos são capazes de mimetizar a formação de uma tribocamada, protegendo a superfície do biomaterial e aumentando a resistência à corrosão com menor perda de massa.

Em geral, a amostra que apresentou melhores resultados quando às características de biocompatibilidade, diferenciação osteoblástica, mineralização, resistência à corrosão e à tribocorrosão foi a TiO₂ MPA P.

Portanto, a funcionalização de óxidos metálicos com biomoléculas através de grupos espaçadores é dependente do grupo funcional presente na molécula orgânica espaçadora. As amostras contendo os peptídeos da DMP1 resultaram em boa adesão, proliferação e diferenciação das células mesenquimais. Além disso, os peptídeos mostraram-se capazes de atuar na nucleação de cristais de apatita. A bio-funcionalização também demonstrou uma melhora na resistência à corrosão do

material. Dessa maneira, pode-se afirmar que a funcionalização dos óxidos metálicos com biomoléculas pode melhorar a biocompatibilidade, bioatividade, resistência à corrosão e osseointegração do titânio metálico apresentando potencial aplicação clínica.

9. Lista de Publicações

A seguir são apresentados os artigos publicados no período, relacionados direta e indiretamente ao trabalho aqui apresentado.

1. TRINO, L. D.; BRONZE-UHLE, E. S.; GEORGE, A.; MATHEW, M. T.; LISBOA-FILHO, P. N. Surface Physicochemical and Structural Analysis of Functionalized Titanium Dioxide Films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 546C, p. 168-178, 2018.

2. TRINO, L. D.; BRONZE-UHLE, E. S.; RAMACHANDRAN, A.; LISBOA-FILHO, P. N.; MATHEW, M. T.; GEORGE, A.; Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 81, p. 26–38, 2018.

3. TRINO, LUCIANA D.; DIAS, LEONARDO F.G.; ALBANO, LUIZ G.S.; BRONZE-UHLE, ERIKA S.; RANGEL, ELIDIANE C.; GRAEFF, CARLOS F.O.; LISBOA-FILHO, PAULO N. Zinc Oxide Surface Functionalization and Related Effects on Corrosion Resistance of Titanium Implants. **Ceramics International**. v.44, p.4000 - 4008, 2018.

4. VILLANUEVA, J.; TRINO, L.; THOMAS, J.; BIJUKUMAR, D.; ROYHMAN, D.; STACK, M. M.; MATHEW, M. T. Corrosion, Tribology, and Tribocorrosion Research in Biomedical Implants: Progressive Trend in the Published Literature. **Journal of Bio-and Tribo-Corrosion**, v.3, p.1, 2017.

5. BORTOLETO, J.R.R.; CHAVES, M.; ROSA, A.M.; DA SILVA, E.P.; DURRANT, S.F.; TRINO, L.D.; LISBOA-FILHO, P.N. Growth evolution of self-textured ZnO films deposited by magnetron sputtering at low temperatures. **Applied Surface Science**. v.334, p.210 - 2015, 2014.

10. Bibliografia

ABDOLMALEKI, A.; MALLAKPOUR, S.; BORANDEH, S. Preparation, characterization and surface morphology of novel optically active poly(ester-amide)/functionalized ZnO bionanocomposites via ultrasonication assisted process. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 15, p. 6725–6733, 15 maio 2011.

ALCANTAR, N. A.; AYDIL, E. S.; ISRAELACHVILI, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 343–351, 5 set. 2000.

ALEXANDER, S. Carboxylation and Decarboxylation of Aluminum Oxide Nanoparticles Using Bifunctional Carboxylic Acids and Octylamine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1, 2016.

ALLA, A. P. R. K. et al. Surface Roughness of Implants: A Review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 25, p. 112–118, 29 maio 2011.

ALVARES, K. The role of acidic phosphoproteins in biomineralization. **Connective Tissue Research**, v. 55, n. 1, p. 34–40, fev. 2014.

ALVES, A. C. et al. Tribocorrosion behaviour of anodic treated titanium surfaces intended for dental implants. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 40, p. 404001, 2013.

ALVES, S. A. et al. Tribocorrosion Behavior of Calcium- and Phosphorous-Enriched Titanium Oxide Films and Study of Osteoblast Interactions for Dental Implants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 1, n. 3, p. 1–21, 6 ago. 2015.

ALVES, S. A. et al. Synthesis of calcium-phosphorous doped TiO₂ nanotubes by anodization and reverse polarization: A promising strategy for an efficient biofunctional implant surface. **Applied Surface Science**, v. 399, p. 682–701, mar. 2017.

AMUTHA, C. et al. Synthesis, characterization and antibacterial efficiency of ZnO nanoparticles using rice as soft bio-template. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 127, n. 10, p. 4281–4286, maio 2016.

ANANTH, H. et al. A Review on Biomaterials in Dental Implantology. **International Journal of Biomedical Science: IJBS**, v. 11, n. 3, p. 113–120, set. 2015.

ANBAZHAGAN, E. et al. Divalent ion encapsulated nano titania on Ti metal as a bioactive surface with enhanced protein adsorption. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 143, p. 213–223, 1 jul. 2016.

ASTM F67. Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications. Disponível em: <<http://wenku.baidu.com/view/2ab38b8bd0d233d4b14e692f.html>>. Acesso em: 28 jan. 2017.

ATAMAN, E. et al. Adsorption of L-cysteine on rutile TiO₂(110). **Surface Science**, v. 605, n. 1–2, p. 179–186, jan. 2011.

AWSIUUK, K. et al. Protein adsorption and covalent bonding to silicon nitride surfaces modified with organo-silanes: Comparison using AFM, angle-resolved XPS and multivariate ToF-SIMS analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 217–224, 1 out. 2013.

BAHADAR, H. et al. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iranian Biomedical Journal**, v.20, p. 1-11, jan. 2016.

BAKRUDEEN, H. B.; SUGUNALAKSHMI, M.; REDDY, B. S. R. Auto-fluorescent mesoporous ZnO nanospheres for drug delivery carrier application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 335–340, 1 nov. 2015.

BARTOLO, L. D.; BADER, A. **Biomaterials for Stem Cell Therapy: State of Art and Vision for the Future**. CRC Press, 2010.

BEDI, R. S.; ZANELLO, L. P.; YAN, Y. Osteoconductive and Osteoinductive Properties of Zeolite MFI Coatings on Titanium Alloys. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 24, p. 3856–3861, 23 dez. 2009.

BHATIA, A. et al. Overexpression of DMP1 accelerates mineralization and alters cortical bone biomechanical properties in vivo. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 5, n. 1, p. 1–8, jan. 2012.

BINAULD, S.; STENZEL, M. H. Acid-degradable polymers for drug delivery: a decade of innovation. v. 49, n. 21, p. 2082–2102, 14 fev. 2013.

BRANEMARK, P.-I. Osseointegration and its experimental background. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399–410, 1 set. 1983.

BRUNETTE, D. M. et al. **Titanium in Medicine - Material Science, Surface Science**. Springer, 2010.

BUCKHOLTZ, G. A. et al. Reducing Escherichia coli growth on a composite biomaterial by a surface immobilized antimicrobial peptide. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 65, p. 126–134, 1 ago. 2016.

BYSTROV, V. S. et al. Piezoelectricity and Ferroelectricity in Biomaterials: From Proteins to Self-assembled Peptide Nanotubes. In: CIOFANI, G.; MENCIASSI, A. (Eds.). . **Piezoelectric Nanomaterials for Biomedical Applications**. Nanomedicine and Nanotoxicology. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 187–211.

CACCIAFESTA, P. et al. Human Plasma Fibrinogen Adsorption on Ultraflat Titanium Oxide Surfaces Studied with Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 21, p. 8167–8175, 1 out. 2000.

CAI, K. et al. Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 1 jun. 2006.

CALLOW, J. A. et al. The influence of surface energy on the wetting behaviour of the spore adhesive of the marine alga *Ulva linza* (synonym *Enteromorpha linza*). **Journal of The Royal Society Interface**, v. 2, n. 4, p. 319–325, 22 set. 2005.

CANILLAS, M.; et al. Calcium phosphates for biomedical applications. **Boletín de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio**, v. 56, n. 3, p. 91-112, mai. 2017.

CHAMJANGALI, M. A.; BOROUMAND, S. Synthesis of flower-like Ag-ZnO nanostructure and its application in the photodegradation of methyl orange. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1329–1338, ago. 2013.

CHEN, R. et al. Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its in vivo antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models. **Biomaterials**, v. 85, p. 142–151, abr. 2016.

CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 7, p. 2891–2959, jul. 2007.

CHENG, C. I.; CHANG, Y.-P.; CHU, Y.-H. Biomolecular interactions and tools for their recognition: focus on the quartz crystal microbalance and its diverse surface chemistries and applications. v. 41, n. 5, p. 1947–1971, 13 fev. 2012.

CHU, C. L. et al. Micro-nano hierarchical porous titania modified with ZnO nanorods for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 232, p. 68–74, 15 out. 2013.

CÖLFEN, H. Biomineralization: A crystal-clear view. **Nature Materials**, v. 9, n. 12, p. 960–961, dez. 2010.

CORDEIRO, J. M.; BARÃO, V. A. R. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1201–1215, 1 fev. 2017.

COSTA, D.; SAVIO, L.; PRADIER, C.-M. Adsorption of Amino Acids and Peptides on Metal and Oxide Surfaces in Water Environment: A Synthetic and Prospective Review. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 29, p. 7039–7052, 28 jul. 2016.

CVIJOVIĆ-ALAGIĆ, I. et al. Wear and corrosion behaviour of Ti–13Nb–13Zr and Ti–6Al–4V alloys in simulated physiological solution. **Corrosion Science**, v. 53, n. 2, p. 796–808, 1 fev. 2011.

DAVE, P.Y. et al. Examination of Zinc Oxide Films Prepared by Magnetron Sputtering. **Procedia Technology**, v. 23, p. 328-335, jan. 2016.

DEE, K. C. Engineering Materials for Biomedical Applications. v. 3, n. 1, p. 7–10, 2000.

DELAITRE, G. et al. Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. **Soft Matter** v. 8, n. 28, p. 7323–7347, 27 jun. 2012.

D'ELIA, N. L. et al. Albumin-mediated deposition of bone-like apatite onto nano-sized surfaces: Effect of surface reactivity and interfacial hydration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 494, p. 345–354, 15 maio 2017.

DENNING, D. et al. Piezoelectric properties of aligned collagen membranes. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 2, p. 284–292, 1 fev. 2014.

DOLATA, M.; KEDZIERZAWSKI, P.; AUGUSTYNSKI, J. Comparative impedance spectroscopy study of rutile and anatase TiO₂ film electrodes. **Electrochimica Acta**, Electrochemical Impedance Spectroscopy. v. 41, n. 7, p. 1287–1293, 1 maio 1996.

DRNOVŠEK, N. et al. The properties of bioactive TiO₂ coatings on Ti-based implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 209, p. 177–183, 25 set. 2012.

DUCHEYNE, P. et al. **Comprehensive Biomaterials**. Elsevier, 2011.

DUMONT, V. C. et al. Chitosan and carboxymethyl-chitosan capping ligands: Effects on the nucleation and growth of hydroxyapatite nanoparticles for producing biocomposite membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 265–277, 1 fev. 2016.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 4, mar. 2017.

ELLINGSEN, J. E.; LYNGSTADAAS, S. P. **Bio-Implant Interface: Improving Biomaterials and Tissue Reactions**. J. E. Ellingsen, 2003.

ENCISO, M.; SCHÜTTE, C.; SITE, L. D. Influence of pH and sequence in peptide aggregation via molecular simulation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 143, n. 24, p. 243130, 28 dez. 2015.

ERIKSSON, C.; NYGREN, H.; OHLSON, K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. **Biomaterials**, v. 25, n. 19, p. 4759–4766, ago. 2004.

FALDE, E. J. et al. Superhydrophobic materials for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 104, p. 87–103, out. 2016.

FANG, F.; SZLEIFER, I. Kinetics and Thermodynamics of Protein Adsorption: A Generalized Molecular Theoretical Approach. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, p. 2568–2589, jun. 2001.

FARIAS, R. F. DE. **Chemistry on Modified Oxide and Phosphate Surfaces: Fundamentals and Applications**. Academic Press, 2009.

FLEMING, G. J. et al. The adsorption and reactions of the amino acid proline on rutile TiO₂(110) surfaces. **Surface Science**, v. 602, n. 12, p. 2029–2038, jun. 2008.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, maio 2003.

FROSCH, K.-H. et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 21, n. 2, p. 213–223, mar. 2003.

FU, T. et al. Effect of surface mechanical attrition treatment on corrosion resistance of commercial pure titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 280, p. 129–135, 25 out. 2015.

GAJJERAMAN, S. et al. Matrix Macromolecules in Hard Tissues Control the Nucleation and Hierarchical Assembly of Hydroxyapatite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1193–1204, 12 jan. 2007.

GANTAR, A. et al. Injectable and self-healing dynamic hydrogel containing bioactive glass nanoparticles as a potential biomaterial for bone regeneration. **RSC Adv.** v. 6, n. 73, p. 69156–69166, 19 jul. 2016.

GARLAND, E. R. et al. Structure of submonolayer oleic acid coverages on inorganic aerosol particles: evidence of island formation. **Phys.Chem. Chem. Phys.** v. 10, n. 21, p. 3156–3161, 21 maio 2008.

GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, maio 2009.

GEFEN, A. **Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials**. Springer, 2006.

GITELMAN, A.; RAPAPORT, H. Bifunctional Designed Peptides Induce Mineralization and Binding to TiO₂. **Langmuir**, v. 30, n. 16, p. 4716–4724, 29 abr. 2014.

GITTENS, R. A. et al. Implant Osseointegration and the Role of Microroughness and Nanostructures: Lessons for Spine Implants. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 8, p. 3363–3371, ago. 2014.

GORSKI, J. P. Acidic phosphoproteins from bone matrix: A structural rationalization of their role in biomineralization. **Calcified Tissue International**, v. 50, n. 5, p. 391–396, 1992.

GSPONER, J.; VENDRUSCOLO, M. Theoretical approaches to protein aggregation. **Protein and Peptide Letters**, v. 13, n. 3, p. 287–293, 2006.

HACK, H. P.; SCULLY, J. R. Defect Area Determination of Organic Coated Steels in Seawater Using the Breakpoint Frequency Method. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 138, n. 1, p. 33–40, 1 jan. 1991.

HAENSCH, C.; HOEPPENER, S.; SCHUBERT, U. S. Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2323–2334, 25 maio 2010.

HALEVI, B.; VOHS, J. M. Reactions of CH₃SH and (CH₃)₂S₂ on the (0001) and (000 $\bar{1}$) Surfaces of ZnO - **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 23976–23982, 2005.

HANAHA, T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 41, n. 6, p. 263–272, dez. 2011.

HANSEN, F. K.; RØDSRUD, G. Surface tension by pendant drop: I. A fast standard instrument using computer image analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 141, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 1991.

HE, G. et al. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. **Nature Materials**, v. 2, n. 8, p. 552–558, ago. 2003.

HE, G. et al. Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. **Biochemistry**, v. 44, n. 49, p. 16140–16148, 13 dez. 2005.

HELEG-SHABTAI, V. et al. Gossypol-Cross-Linked Boronic Acid-Modified Hydrogels: A Functional Matrix for the Controlled Release of an Anticancer Drug. **Langmuir**, v. 31, n. 7, p. 2237–2242, 24 fev. 2015.

HENNIG, R. G. et al. Classical potential describes martensitic phase transformations between the alpha, beta, and omega titanium phases. **Physical Review B**, v. 78, n. 5, p. 054121, 27 ago. 2008.

HERMANSON, G. T. Chapter 2 - Functional Targets for Bioconjugation. In: **Bioconjugate Techniques (Third edition)**. Boston: Academic Press, 2013. p. 127–228.

HIRSH, S. L. et al. The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 395–404, 1 mar. 2013.

HÖHN, S. et al. Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 73, p. 798–807, 1 abr. 2017.

HONG, H. et al. Red Fluorescent Zinc Oxide Nanoparticle: A Novel Platform for Cancer Targeting. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 5, p. 3373–3381, 11 fev. 2015.

HONG, Y. et al. Surface hydroxyl groups direct cellular response on amorphous and anatase TiO₂ nanodots. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 68–74, 1 nov. 2014.

HORBETT, T. A. Chapter II.1.2 - Adsorbed Proteins on Biomaterials. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). **Biomaterials Science (Third Edition)**. Academic Press, 2013. p. 394–408.

HUANG, C.-J. et al. Developing antifouling biointerfaces based on bioinspired zwitterionic dopamine through pH-modulated assembly. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 30, n. 42, p. 12638–12646, 28 out. 2014.

ISHIZAKI, T.; SAITO, N.; TAKAI, O. Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 26, n. 11, p. 8147–8154, 1 jun. 2010.

JAKŠA, G.; ŠTEFANE, B.; KOVAČ, J. Influence of different solvents on the morphology of APTMS-modified silicon surfaces. **Applied Surface Science**, v. 315, n. Supplement C, p. 516–522, 1 out. 2014.

JAYALAKSHMI, G.; GOPALAKRISHNAN, N.; BALASUBRAMANIAN, T. Activation of room temperature ferromagnetism in ZnO films by surface functionalization with thiol and amine. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 551, p. 667–671, 25 fev. 2013.

JAYALAKSHMI, G.; SARAVANAN, K.; BALASUBRAMANIAN, T. Impact of thiol and amine functionalization on photoluminescence properties of ZnO films. **Journal of Luminescence**, v. 140, p. 21–25, ago. 2013.

JIANG, Y. et al. Role of physical and chemical interactions in the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles against E. coli. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 1361–1366, 1 dez. 2016.

KATE, M.A.; PALASKAR, S.; KAPOOR P. Implant failure: A dentist's nightmare. **Journal of Dental Implants**, v. 6, p. 51-56, 2016.

KAZEMIRAD, S.; HERIS, H. K.; MONGEAU, L. Viscoelasticity of hyaluronic acid-gelatin hydrogels for vocal fold tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 104, n. 2, p. 283–290, fev. 2016.

KELLY, R. G. et al. **Electrochemical Techniques in Corrosion Science and Engineering**. CRC Press, 2002.

KETUL C. POPAT; SADHANA SHARMA; TEJAL A. DESAI. Quantitative XPS Analysis of PEG-Modified Silicon Surfaces. **J. Phys. Chem. B**, v. 108, n. 17, p. 5185–5188, abr. 2004.

KHALIFA, Z. S.; LIN, H.; ISMAT SHAH, S. Structural and electrochromic properties of TiO₂ thin films prepared by metallorganic chemical vapor deposition. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 19, p. 5457–5462, 30 jul. 2010.

KHUNG, Y. L. et al. Thermal and UV Hydrosilylation of Alcohol-Based Bifunctional Alkynes on Si (111) surfaces: How surface radicals influence surface bond formation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11299, 12 jun. 2015.

KILLIAN, M. S. **Organic Modification of TiO₂ and other Metal Oxides with SAMs and Proteins**. Nuremberg: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 20 set. 2013.

KIM, B. et al. Rapid Dye Adsorption via Surface Modification of TiO₂ Photoanodes for Dye-Sensitized Solar Cells. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 11, p. 5201–5207, 12 jun. 2013.

KOWALCZYŃSKA, H. M.; NOWAK-WYRZYKOWSKA, M. Modulation of adhesion, spreading and cytoskeleton organization of 3T3 fibroblasts by sulfonic groups present on polymer surfaces. **Cell Biology International**, v. 27, n. 2, p. 101–114, 1 fev. 2003.

KRAWIEC, H. et al. Role of plastic deformation and microstructure in the micro-electrochemical behaviour of Ti–6Al–4V in sodium chloride solution. **Electrochimica Acta**, v. 104, p. 400–406, 1 ago. 2013.

KUBIAK, K. J. et al. Wettability versus roughness of engineering surfaces. **Wear**, The 12th International Conference on Metrology and Properties of Engineering Surfaces. v. 271, n. 3, p. 523–528, 3 jun. 2011.

KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, p. 062002, 2015.

LANE, W. A. Some Remarks on the Treatment of Fractures. **British Medical Journal**, v. 1, n. 1790, p. 861–863, 20 abr. 1895.

LI, D. et al. Functionalization Strategies for Protease Immobilization on Magnetic Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 11, p. 1767–1777, 9 jun. 2010.

LI, N. et al. Nanocomposite scaffold with enhanced stability by hydrogen bonds between collagen, polyvinyl pyrrolidone and titanium dioxide. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 140, p. 287–296, 1 abr. 2016.

LIN, H. et al. In situ IR study of surface hydroxyl species of dehydrated TiO₂: towards understanding pivotal surface processes of TiO₂ photocatalytic oxidation of toluene. **Phys Chem Chem Phys**. v. 14, n. 26, p. 9468–9474, 13 jun. 2012.

LIRANI, A. P. R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 891–896, dez. 2005.

LIU, J.; SAW, R. E.; KIANG, Y.-H. Calculation of Effective Penetration Depth in X-Ray Diffraction for Pharmaceutical Solids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3807–3814, set. 2010.

LIU, L. et al. Electrochemical behavior of (Ti_{1-x}Nb_x)₅Si₃ nanocrystalline films in simulated physiological media. **Acta Biomaterialia**.v.10, n.2, p. 1005-1013, 2014.

LIU, L. et al. Synthesis of thiol-functionalized TiO₂ nanocomposite and photocatalytic degradation for PAH under visible light irradiation. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, n. 11, p. 1366–1370, nov. 2009.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface nano-functionalization of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 70, n. 3–6, p. 275–302, nov. 2010.

LÓPEZ-HUERTA, F. et al. Biocompatibility and Surface Properties of TiO₂ Thin Films Deposited by DC Magnetron Sputtering. **Materials**, v. 7, n. 6, p. 4105–4117, 27 maio 2014.

LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103–1169, abr. 2005.

LUBART, R. Metal-oxide nanoparticles increase the bactericidal effect of blue light. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 3, p. 115–117, mar. 2012.

LUIZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 174–183, 2008.

LUSCHTINETZ, R. et al. Adsorption of Phosphonic Acid at the TiO₂ Anatase (101) and Rutile (110) Surfaces. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 14, p. 5730–5740, 9 abr. 2009.

MANIVASAGAM, G.; WEBSTER, T. J.; SUBRAMANIAN, B. Summary of the National Conference on Challenges in Biomaterials Research jointly organized by VIT and CSIR-CECRI. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1, out. 2015.

MATHEW, M. T. et al. Tribolayer formation in a metal-on-metal (MoM) hip joint: An electrochemical investigation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 199–212, jan. 2014.

MATHEW, M. T.; JACOBS, J. J.; WIMMER, M. A. Wear-corrosion synergism in a CoCrMo hip bearing alloy is influenced by proteins. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 470, n. 11, p. 3109–3117, nov. 2012.

MATINLINNA, J. P. **Handbook of Oral Biomaterials**. CRC Press, 2014.

MCCRACKEN, M. Dental implant materials: commercially pure titanium and titanium alloys. **Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists**, v. 8, n. 1, p. 40–43, mar. 1999.

MICKSCH, T. et al. Investigation of the peptide adsorption on ZrO₂, TiZr, and TiO₂ surfaces as a method for surface modification. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 10, p. 7408–7416, 28 maio 2014.

MÍNDROIU, M. et al. Corrosion and biocompatibility of PPy/PEG coating electrodeposited on Ti6Al7Nb alloy. **Materials and Corrosion**, v. 64, n. 10, p. 926–931, 1 out. 2013.

MITTAL, K. L. **Silanes and Other Coupling Agents**. CRC Press, 2009.

MOULDER, J. F. **Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data**. [s.l.] Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation, 1992.

MULLINS, D. R.; MCDONALD, T. S. Adsorption and reaction of methanethiol on thin-film cerium oxide. **Surface Science**, v. 602, n. 6, p. 1280–1287, 15 mar. 2008.

NGADIMAN, N. H. A. et al. γ -Fe₂O₃ nanoparticles filled polyvinyl alcohol as potential biomaterial for tissue engineering scaffold. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 49, p. 90–104, set. 2015.

NGUYEN, M. K.; ALSBERG, E. Bioactive factor delivery strategies from engineered polymer hydrogels for therapeutic medicine. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1236–1265, jul. 2014.

NOEI, H. et al. The identification of hydroxyl groups on ZnO nanoparticles by infrared spectroscopy. v. 10, n. 47, p. 7092–7097, 21 dez. 2008.

NOSAKA, Y.; NOSAKA, A. **Introduction to Photocatalysis: From Basic Science to Applications**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2016.

OLIVEIRA, F. G. et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 1–12, 30 jun. 2015.

OOSTERHOF, J. J. H. et al. Effects of Quaternary Ammonium Silane Coatings on Mixed Fungal and Bacterial Biofilms on Tracheoesophageal Shunt Prostheses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3673–3677, maio 2006.

OSHIDA, Y. Chapter 2 - Materials Classification. In: **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials**. Oxford: Elsevier, 2007. p. 9–22.

OSKAM, G. et al. The Growth Kinetics of TiO₂ Nanoparticles from Titanium(IV) Alkoxide at High Water/Titanium Ratio. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 8, p. 1734–1738, fev. 2003.

OZALTIN, K. et al. A novel multistep method for chondroitin sulphate immobilization and its interaction with fibroblast cells. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 70, n. Pt 1, p. 94–100, 1 jan. 2017.

PADOVANO, J. D. et al. DMP1-derived Peptides Promote Remineralization of Human Dentin. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 4, p. 608–614, abr. 2015.

PANDIT, A.; PLANELL, J.; NAVARRO, M. A - Titanium and Nitinol (NiTi) A2 - Ratner, Buddy D. In: HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (Eds.). **Biomaterials Science (Third Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2013. p. 120–124.

PAPRA, A.; GADEGAARD, N.; LARSEN, N. B. Characterization of Ultrathin Poly(ethylene glycol) Monolayers on Silicon Substrates. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1457–1460, 1 mar. 2001.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials - An Introduction**. Springer, 2007.

PATEL, D. K. et al. Graphene as a chain extender of polyurethanes for biomedical applications. **RSC Adv.** v. 6, n. 63, p. 58628–58640, 15 jun. 2016.

PATEL, K. H.; RAWAL, S. K. Exploration of Wettability and Optical Aspects of ZnO Nano Thin Films Synthesized by Radio Frequency Magnetron Sputtering. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 6, p. 22, 1 jan. 2016.

PATTANAİK, B.; PAWAR, S.; PATTANAİK, S. Biocompatible implant surface treatments. **Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 398–406, jun. 2012.

Peptide Property Calculator. Disponível em: <<https://www.genscript.com/tools/peptide-property-calculator>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Methods for the Modification and Characterization of Oxide Surfaces. **Interface Science**, v. 5, n. 2–3, p. 103–117, 1 set. 1997.

PLYLAHAN, N. et al. Enhanced electrochemical performance of Lithium-ion batteries by conformal coating of polymer electrolyte. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 544, 1 dez. 2014.

PUJARI, S. P. et al. Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 25, p. 6322–6356, 16 jun. 2014.

PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses**. Springer Science & Business Media, 2009.

QIU, X.; HU, S. “Smart” Materials Based on Cellulose: A Review of the Preparations, Properties, and Applications. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 738–781, 28 fev. 2013.

QU, Q. et al. Chemically Binding Carboxylic Acids onto TiO₂ Nanoparticles with Adjustable Coverage by Solvothermal Strategy. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9539–9546, 15 jun. 2010.

QUIRAM, G. et al. Nanoscale Mechanical Evaluation of Electrochemically Generated Tribolayer on CoCrMo Alloy for Hip Joint Application. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 2, n. 3, p. 15, 1 set. 2016.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, n. 1–2, p. 87–106, 17 fev. 2011.

RAJ, K. J. A. et al. XPS and IR spectral studies on the structure of phosphate and sulphate modified titania – A combined DFT and experimental study. **IJC-A** Vol.49A(01), 2010.

RAJAN UNNITHAN, A. et al. A unique scaffold for bone tissue engineering: An osteogenic combination of graphene oxide–hyaluronic acid–chitosan with simvastatin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 182–191, 25 fev. 2017.

RAMAN, A. et al. Understanding Organic Film Behavior on Alloy and Metal Oxides. **Langmuir**, v. 26, n. 3, p. 1747–1754, 2 fev. 2010.

RAMAN, A.; GAWALT, E. S. Self-Assembled Monolayers of Alkanoic Acids on the Native Oxide Surface of SS316L by Solution Deposition. **Langmuir**, v. 23, n. 5, p. 2284–2288, 1 fev. 2007.

RAMEL, C. F. et al. Surface roughness of dental implants and treatment time using six different implantoplasty procedures. **Clinical Oral Implants Research**, v. 27, n. 7, p. 776–781, jul. 2016.

RAO, S. S.; WINTER, J. O. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. **Frontiers in Neuroengineering**, v. 2, p. 6, 2009.

RATNER, B. D. et al. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. In: **Biomaterials Science (Third Edition)**. Academic Press, 2013.

RAVINDRAN, S.; GEORGE, A. Multifunctional ECM proteins in bone and teeth. **Experimental Cell Research**, Invited Review - Odontology. v. 325, n. 2, p. 148–154, 15 jul. 2014.

ROSSI, S. et al. Comparison between sol-gel-derived anatase- and rutile-structured TiO₂ coatings in soft-tissue environment. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 82, n. 4, p. 965–974, 15 set. 2007.

ROYHMAN, D. et al. An electrochemical investigation of TMJ implant metal alloys in an artificial joint fluid environment: the influence of pH variation. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 42, n. 7, p. 1052–1061, out. 2014.

RUAN, J. et al. Enhanced Physiochemical and Mechanical Performance of Chitosan-Grafted Graphene Oxide for Superior Osteoinductivity. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 7, p. 1085–1097, 1 fev. 2016.

RUDAKOVA, A. V. et al. Photoinduced hydrophilic conversion of hydrated ZnO surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 466, p. 452–460, 15 mar. 2016.

RUNA, M. J. et al. First insight on the impact of an osteoblastic layer on the bio-tribocorrosion performance of Ti6Al4V hip implants. **Acta Biomaterialia**, v. 12, p. 341–351, jan. 2015.

RYU, D. Y. et al. A generalized approach to the modification of solid surfaces. **Science**, v. 308, n. 5719, p. 236–239, 8 abr. 2005.

SAFONOV, V. et al. Modification of implant material surface properties by means of oxide nano-structured coatings deposition. **Applied Surface Science**, Selected manuscripts arising from the 18th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams (SMMIB-2013). v. 310, p. 174–179, 15 ago. 2014.

SANAEIFAR, N. et al. A novel electrochemical biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose. **Analytical Biochemistry**, v. 519, p. 19–26, 15 fev. 2017.

SANGEETHA, S. et al. **Biocompatibility studies on TiO₂ coated Ti surface**. 2013 International Conference on Advanced Nanomaterials and Emerging Engineering Technologies (ICANMEET). **Anais...** In: 2013 INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED NANOMATERIALS AND EMERGING ENGINEERING TECHNOLOGIES (ICANMEET). jul. 2013

SANTORO, M. et al. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, PLA biodegradable polymers. v. 107, p. 206–212, 15 dez. 2016.

SANZ-HERRERA, J. A.; REINA-ROMO, E. Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 11, p. 8217–8244, 21 nov. 2011.

SENAPATI, V.; KUMAR, A. ZnO nanoparticles dissolution, penetration and toxicity in human epidermal cells. Influence of pH. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-7, abr. 2018.

SEO, J. H. et al. Attachment of hydrogel microstructures and proteins to glass via thiol-terminated silanes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 1–6, 1 out. 2012.

SEZIN, M.; CROHARÉ, L.; IBAÑEZ, J. C. Microscopic Study of Surface Microtopographic Characteristics of Dental Implants. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, p. 139–147, 30 abr. 2016.

SHAHNAS BEEGAM, M.; NARENDRANATH, S. B.; PERIYAT, P. Tuning of selective solar photocatalysis by Mn²⁺ decorated nanocrystalline mesoporous TiO₂. **Solar Energy**, v. 158, n. Supplement C, p. 774–781, 1 dez. 2017.

SHALUMON, K. T. et al. Sodium alginate/poly(vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 3, p. 247–254, 1 out. 2011.

SHANBHAG, A.; RUBASH, H. E.; JACOBS, J. . **Joint Replacement and Bone Resorption: Pathology, Biomaterials and Clinical Practice**. [s.l.] CRC Press, 2005.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, M.; BALANI, K. Effect of ZnO morphology on affecting bactericidal property of ultra high molecular weight polyethylene biocomposite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 843–851, 1 maio 2016.

SHI, L. et al. Self-Healing Silk Fibroin-Based Hydrogel for Bone Regeneration: Dynamic Metal-Ligand Self-Assembly Approach. **Advanced Functional Materials**, p. n/a-n/a, [s.d.].

SHIN, S. et al. Bio-Inspired Extreme Wetting Surfaces for Biomedical Applications. **Materials**, v. 9, n. 2, p. 116, 19 fev. 2016.

SHOTORBANI, B. B. et al. Adhesion of mesenchymal stem cells to biomimetic polymers: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1192–1200, 1 fev. 2017.

SILVA-BERMUDEZ, P.; RODIL, S. E. An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. **Surface and Coatings Technology, Mechanical and Tribological Properties of Biomedical Coatings and Surface-modified Biomaterials**. v. 233, p. 147–158, 25 out. 2013.

SIN, J. R.; HU, X.; EMAMI, N. Tribology, corrosion and tribocorrosion of metal on metal implants. **Tribology - Materials, Surfaces & Interfaces**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2013.

SIN, M.-C. et al. An intuitive thermal-induced surface zwitterionization for versatile, well-controlled haemocompatible organic and inorganic materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 54–64, 1 mar. 2015.

SINGH, J. et al. Encapsulation of Zinc Oxide Nanorods and Nanoparticles. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 9947–9953, 1 set. 2009.

SLOW, K. S. et al. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 3, n. 6–7, p. 392–418, 15 ago. 2006.

SKORB, E. V.; ANDREEVA, D. V. Surface Nanoarchitecture for Bio-Applications: Self-Regulating Intelligent Interfaces. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 36, p. 4483–4506, 25 set. 2013.

SONG, I. T. et al. PEGylation and HAYlation via catechol: α -Amine-specific reaction at N-terminus of peptides and proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 43, p. 50–60, 1 out. 2016.

SONG, Y.-Y.; HILDEBRAND, H.; SCHMUKI, P. Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO₂. **Surface Science**, v. 604, n. 3–4, p. 346–353, fev. 2010.

SRINIVASAN, A.; SHIN, K. S.; RAJENDRAN, N. Applications of dynamic electrochemical impedance spectroscopy (DEIS) to evaluate protective coatings formed on AZ31 magnesium alloy. **Elect.Acta**. v. 5, n. 37, p. 29589–29593, 23 mar. 2015.

SUL, Y.-T. et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 491–501, jan. 2002.

SUNDELL, G. et al. The bone-implant interface of dental implants in humans on the atomic scale. **Acta Biomaterialia**, v. 48, p. 445–450, 15 jan. 2017.

SZILI, E. J. et al. Generation of a stable surface concentration of amino groups on silica coated onto titanium substrates by the plasma enhanced chemical vapour deposition method. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 15, p. 6846–6850, 15 maio 2009.

TAIWAD, M. A.; BODADE, A. B.; CHAUDHARI, G. N. Sol Gel Derived Mn doped TiO₂ PVA nanobiocomposite for Urea Biosensor. v. 5, 2014.

TAN, G. et al. Preparation and characterization of APTES films on modification titanium by SAMs. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 15, p. 4997–5001, maio 2011.

TANAKA, M. et al. Surface Modification of Silicon Oxide with Trialkoxysilanes toward Close-Packed Monolayer Formation. **Langmuir**, v. 29, n. 21, p. 6361–6368, 28 maio 2013.

TANAKA, Y. et al. Determination of the Immobilization Manner of Amine-Terminated Poly(Ethylene Glycol) Electrodeposited on a Titanium Surface with XPS and GD-OES. **Materials Transactions, JIM**, v. 48, n. 3, p. 287–292, 2007.

TAO, F. F.; BERNASEK, S. **Functionalization of Semiconductor Surfaces**. Wiley, 2012.

TEXTOR, M. et al. Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. In: **Titanium in Medicine**. Engineering Materials. Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 171–230.

THAKRAL, G. et al. Nanosurface – The Future of Implants. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v. 8, n. 5, p. 7-10, maio 2014.

THAKURTA, S. G.; SUBRAMANIAN, A. Evaluation of in situ albumin binding surfaces: a study of protein adsorption and platelet adhesion. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 137–149, 1 jan. 2011.

THANH, N. T. K.; GREEN, L. FUNCTIONALIZATION OF NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. **Nano Today**. v. 5, n. 0, p. 213–230, 1 jan. 2010.

TOBIN, E. J. Recent coating developments for combination devices in orthopedic and dental applications: A literature review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.

TRINO, L. D. et al. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 81, p. 26–38, 1 maio 2018.

TRINO, L. D. et al. Surface Physicochemical and Structural Analysis of Functionalized Titanium Dioxide Films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 546C, p. 168-178, 2018.

TRINO, L. D. et al. Zinc oxide surface functionalization and related effects on corrosion resistance of titanium implants. **Ceramics International**, v.44, p.4000 - 4008, 2018.

UCHIDA, M. et al. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 64, n. 1, p. 164–170, 1 jan. 2003.

UHTHOFF, H. K.; POITRAS, P.; BACKMAN, D. S. Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 11, n. 2, p. 118–126, mar. 2006.

VALLITTU, P. **Non-Metallic Biomaterials for Tooth Repair and Replacement**. Elsevier, 2012.

VARAPRASAD, K. et al. Development of biodegradable metaloxide/polymer nanocomposite films based on poly- ϵ -caprolactone and terephthalic acid. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, Part 1, p. 85–93, 1 jan. 2017.

VENTRE, M.; CAUSA, F.; NETTI, P. A. Determinants of cell–material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 74, p. 2017–2032, 7 set. 2012.

VERISSIMO, N. C. et al. In situ characterization of the effects of Nb and Sn on the anatase–rutile transition in TiO₂ nanotubes using high-temperature X-ray diffraction. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 372–381, 15 jul. 2014.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy**, v. 22, n. 5, p. 315–329, 2008.

VILLANUEVA, J. et al. Corrosion, Tribology, and Tribocorrosion Research in Biomedical Implants: Progressive Trend in the Published Literature. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 1, p. 1, 1 mar. 2017.

VISSER, R. et al. Peptides for bone tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 244, Part A, p. 122–135, 28 dez. 2016.

VOGT-EISELE, A. K.; OFFENHÄUSSER, A.; KNOLL, W. 16 - Cell guidance through surface cues. In: VADGAMA, P. (Ed.). **Surfaces and Interfaces for Biomaterials**. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, 2005. p. 447–464.

VORKAPIC, D.; MATSOUKAS, T. Effect of Temperature and Alcohols in the Preparation of Titania Nanoparticles from Alkoxides, **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 11, p. 2815-2820, nov. 1998.

VRANA, N. E. **Cell and Material Interface: Advances in Tissue Engineering, Biosensor, Implant, and Imaging Technologies**. CRC Press, 2015.

VROMAN, L.; ADAMS, A. L. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. **Surface Science**, v. 16, p. 438–446, 1 ago. 1969.

WANG, C. et al. Enhancement of corrosion resistance and bioactivity of titanium by Au nanoparticle-loaded TiO₂ nanotube layer. **Surface and Coatings Technology**, v. 286, p. 327–334, 25 jan. 2016a.

WANG, L.; NANCOLLAS, G. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p. 4628-4699, nov. 2008.

WANG, S. et al. Molecular surface functionalization to enhance the power output of triboelectric nanogenerators. v. 4, n. 10, p. 3728–3734, 1 mar. 2016b.

WANG, X.-X. et al. Improvement of bioactivity of H₂O₂/TaCl₅-treated titanium after subsequent heat treatments. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 1, p. 171–176, 1 out. 2000.

WANG, Y. et al. Ultraviolet-light-induced bactericidal mechanism on ZnO single crystals. n. 44, p. 6783–6785, 2 nov. 2009.

WANG, Y. et al. Research of protein adsorption on the different surface topography of the zinc oxide. **Surface and Interface Analysis**, v. 47, n. 2, p. 245–252, 1 fev. 2015.

WANG, Z. et al. Effect of proteins on the surface microstructure evolution of a CoCrMo alloy in bio-tribocorrosion processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 176–184, 1 set. 2016.

WEN, C. **Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials**. Woodhead Publishing, 2015.

WENG, Y.-X. et al. Surface-Binding Forms of Carboxylic Groups on Nanoparticulate TiO₂ Surface Studied by the Interface-Sensitive Transient Triplet-State Molecular Probe. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 18, p. 4356–4363, 1 maio 2003.

WENZEL, R. N. RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 988–994, 1 ago. 1936.

WILLIAMS, D. F.; WILLIAMS, R. L. Chapter II.4.4 - Degradative Effects of the Biological Environment on Metals and Ceramics. In: RATNER, B. D. et al. (Eds.). . **Biomaterials Science (Third Edition)**. Academic Press, 2013. p. 728–738.

WILLIAMS, R. **Surface Modification of Biomaterials: Methods Analysis and Applications**. Elsevier, 2010.

WILSON, C. J. et al. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1–2, p. 1–18, 1 jan. 2005.

WILSON, J. N.; DOWLER, R. M.; IDRIS, H. Adsorption and reaction of glycine on the rutile TiO₂(011) single crystal surface. **Surface Science**, v. 605, n. 1–2, p. 206–213, jan. 2011.

WOOD R. J. K. 2.15 - **Tribocorrosion In Shreir's Corrosion**. 1. ed. Oxford Elsevier: Tony J. A. Richardson, 2010. p. 1005–1050.

WU, S. et al. Functionalized TiO₂ Based Nanomaterials for Biomedical Applications. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 35, p. 5464–5481, 1 set. 2014.

XIAO, M. et al. Bio-functionalization of biomedical metals. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 70, n. Pt 2, p. 1057–1070, 1 jan. 2017.

XU, Q. et al. Performance of hydroxyapatite coatings electrodeposited on micro-arc oxidized magnesium alloys using a static magnetic field. **RSC. Adv.** v. 5, n. 19, p. 14458–14464, 28 jan. 2015.

YAN, Y. et al. Tribocorrosion in implants—assessing high carbon and low carbon Co–Cr–Mo alloys by in situ electrochemical measurements. **Tribology International**, Interactions of Tribology and the Operating Environment: Proceedings of the 32nd Leeds-Lyon Symposium on Tribology (Lyon, 2005). v. 39, n. 12, p. 1509–1517, 1 dez. 2006.

YANG, M.-H. et al. Assessing the responses of cellular proteins induced by hyaluronic acid-modified surfaces utilizing a mass spectrometry-based profiling system: over-expression of CD36, CD44, CDK9, and PP2A. **The Analyst**, v. 137, n. 21, p. 4921–4933, 7 nov. 2012.

YASZEMSKI, M. J. **Biomaterials in Orthopedics**. CRC Press, 2003.

YOSHINO, N. et al. Synthesis and antimicrobial activity of quaternary ammonium silane coupling agents. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 8, p. 429–438, 2011.

YU, Y.-Y.; GONG, X.-Q. Unique adsorption behaviors of carboxylic acids at rutile TiO₂(110). **Surface Science**, v. 641, p. 82–90, nov. 2015.

ZHANG, H. et al. Photocatalytic effects of wool fibers modified with solely TiO₂ nanoparticles and N-doped TiO₂ nanoparticles by using hydrothermal method. **Chemical Engineering Journal**, v. 254, n. Supplement C, p. 106–114, 15 out. 2014.

ZHANG, X. et al. Corrosion behavior of Zn-incorporated antibacterial TiO₂ porous coating on titanium. **Ceramics International**, v. 42, n. 15, p. 17095–17100, 15 nov. 2016.

ZHANG, Y. et al. Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 10, p. 1633–1645, dez. 2013.

ZHAO, G. et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 74, n. 1, p. 49–58, 1 jul. 2005.

ZHAO, L. et al. Effects of micropitted/nanotubular titania topographies on bone mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. **Biomaterials**, v. 33, n. 9, p. 2629–2641, mar. 2012.

ZHAO, M.-H.; WANG, Z.-L.; MAO, S. X. Piezoelectric Characterization of Individual Zinc Oxide Nanobelt Probed by Piezoresponse Force Microscope. **Nano Letters**, v. 4, n. 4, p. 587–590, 1 abr. 2004.

ZHENG, C. et al. Functional Selenium Nanoparticles Enhanced Stem Cell Osteoblastic Differentiation through BMP Signaling Pathways. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 43, p. 6872–6883, 1 nov. 2014.