

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE QUÍMICA

MARIANNA ANDRADE LOPES

“Modificação de superfícies de titânio com o peptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎”

ARARAQUARA
2019

MARIANNA ANDRADE LOPES

“MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM O PEPTÍDEO OGP₍₁₀₋₁₄₎”

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Química do Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

ARARAQUARA
2019

MARIANNA ANDRADE LOPES

“MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM O PEPTÍDEO OGP₍₁₀₋₁₄₎”

Relatório final, apresentado à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Química.

Araraquara, 9 de Dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques
Departamento de Físico-Química, Instituto de Química

Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Departamento de Bioquímica e Tecnologia, Instituto de Química

Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Dedico este trabalho aos meus pais, Anna Paula e Wanderley, por todo o apoio e incentivo desde o início da minha caminhada acadêmica e profissional. E à antiga versão de mim mesma, da época do Ensino Fundamental, que já pensava em ser cientista.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques por me acompanhar durante boa parte da minha jornada acadêmica - desde os tempos do Projeto de Extensão Grupo Alquimia até a orientação da minha Iniciação Científica que originou este trabalho - , por todo o aprendizado, por acreditar em mim e me desafiar a ser melhor.

Aos meus familiares, por todo o apoio durante todos esses anos, tanto financeiro como emocional, apesar da distância.

Às minhas grandes amigas de São Paulo, por todos os desabafos e conselhos sobre a faculdade durante todos esses anos, pela amizade e cumplicidade mesmo que de longe na maior parte do tempo.

Ao meu namorado, por todo carinho, motivação e por não me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pela colaboração e aos colegas do Laboratório de Síntese e Aplicação de Proteínas e Peptídeos, pelos ensinamentos, em especial ao Crusca pela ajuda com as medidas de HPLC-MS.

Aos colegas do Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, em especial ao Caio, Gabriel e Carol, por sempre estarem disponíveis pra me tirar dúvidas, pela paciência, convivência e por todo aprendizado.

À Marina Magnani, pelas medidas de Microscopia de Força Atômica, ao GFQM-IQ pelas medidas de Difração de Raio X e ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e o apoio a pesquisa. E a todos os docentes do Instituto de Química com quem tive contato por todos esses anos, pela formação e contribuição para a pessoa que sou hoje.

“Quem me acompanha que me acompanhe: a caminhada é longa, é sofrida mas é vivida.”

— *Clarice Lispector, em Água Viva*

Resumo

Os ossos, ou tecido ósseo, são tecidos dinâmicos que são repostos naturalmente conforme envelhecem ou são danificados, e que possuem diversas funções mecânicas e biológicas essenciais não apenas para os seres humanos, mas para vertebrados em geral. Entretanto, há casos onde implantes são necessários. Diversos trabalhos na literatura mostram que o titânio (Ti) é um dos metais mais empregados em implantes ortopédicos e dentais devido a sua excelente biocompatibilidade, entre outras propriedades mecânicas e físico-químicas, em relação a outros implantes metálicos. Nos últimos anos, estudos realizados nestas áreas tem evidenciado a utilização de cadeias peptídicas pequenas no desenvolvimento de novos agentes indutores de crescimento de tecido ósseo. Contudo, implantes metálicos não se ligam diretamente ao tecido vivo, o que tem impulsionado cada vez mais estudos que envolvem modificar a superfície desses metais para que se tornem mais compatíveis com o meio fisiológico. Neste contexto, o projeto proposto visa melhorar o entendimento sobre o modo com o qual o pentapeptídeo OGP(10-14) pode ser incorporado na superfície pré-modificada com 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) e hidroxiapatita (HA) de discos de titânio, de forma a otimizar ainda mais a biocompatibilidade da prótese com o meio fisiológico. A obtenção de um novo biomaterial híbrido que contenha as propriedades de resistência mecânica do Ti, a alta compatibilidade com o meio fisiológico da HA, a osseointegração da superfície recoberta com APTES somado ao peptídeo indutor de fator de crescimento (OGP) pode propiciar o sucesso da regeneração de tecidos e fixação de próteses.

Abstract

The bones are composed of a dynamic tissue that naturally replaces itself as it gets older or suffers damage, and they have multiple mechanical and biological functions that are essential not only to human beings but also to vertebrates in general. However, there are cases where implants are needed. Several papers in the literature show that titanium (Ti) is one of the most utilised metals in orthopedic and dental implants due to its excellent biocompatibility, amongst other mechanical and physicochemical properties, when compared to other metallic implants. In the past years, studies conducted in this field of research have displayed the utilisation of small peptide chains in the development of new bone anabolic agents. Yet, metallic implants do not bond directly to the live tissue, and this fact has stimulated the search for surface modifications on said metals, in the pursuit of a higher compatibility with the physiological environment. In this context, the project here proposed aims to improve the understanding of how the pentapeptide OGP(10-14) can be incorporated in the pre modified surface of titanium disks with 3-aminopropil-trietoxisilane (APTES) and hydroxiapatite (HA) in order to optimize even more the biocompatibility of the prosthesis with the physiological environment. The obtaining of a new hybrid biomaterial with the mechanical properties of titanium, added to the solubility in the physiological medium of the HA, combined to the osseointegration of the surface covered with the OGP functionalized onto the APTES can provide the success of tissue regeneration research and prosthesis fixation.

Lista de ilustrações

| | |
|---|----|
| Figura 1: Funcionalização de superfície de titânio com APTES..... | 18 |
| Figura 2: Estrutura 2D do pentapeptídeo OGP ₍₁₀₋₁₄₎ | 21 |
| Figura 3: Resultado da extração, após liofilização do conteúdo do balão..... | 28 |
| Figura 4: Relação carga/massa obtida no detector do CLAE..... | 9 |
| Figura 5: Espectro de infravermelho do OGP(10-14) puro..... | 30 |
| Figura 6: Adição dos reagentes A, B e C à amostra..... | 31 |
| Figura 7: Resultado obtido do teste de Kaiser..... | 31 |
| Figura 8: Resultado obtido do infravermelho..... | 32 |
| Figura 9: Micrografias de força atômica - representação 3D, sendo (a) Ti, (b) Ti+APTES e (c) Ti+APTES+OGP..... | 33 |
| Figura 10: Micrografias de força atômica – topografia..... | 33 |
| Figura 11: Resultado obtido do teste de Kaiser (método 2)..... | 34 |
| Figura 12: Micrografias de força atômica - representação 3D, sendo (a) Ti+APTES e (b) Ti+APTES+OGP..... | 35 |
| Figura 13: Micrografias de força atômica – topografia..... | 35 |
| Figura 14: Resultado obtido do infravermelho para amostras de HA..... | 37 |
| Figura 15: Explicação da Lei de Bragg..... | 39 |
| Figura 16: Resultados da técnica de DRX..... | 39 |
| Figura 17: Sobreposição das referencias a amostra 1..... | 40 |
| Figura 18: Sobreposição das referencias a amostra 2..... | 40 |
| Figura 19: Sobreposição das referencias a amostra 3..... | 41 |
| Figura 20: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-A puro..... | 42 |
| Figura 21: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-B puro..... | 42 |
| Figura 22: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-A + Ti..... | 43 |
| Figura 23: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-B+SBF-A+ Ti..... | 43 |
| Figura 24: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – OGP(10-14)+HA+Ti..... | 43 |
| Figura 25: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-A puro..... | 44 |
| Figura 26: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-A+Ti..... | 44 |
| Figura 27: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-B puro..... | 44 |
| Figura 28: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-B+SBF-A+Ti..... | 45 |
| Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – OGP(10-14)+HA+Ti..... | 45 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Cálculo das quantidades em massa/volume dos reagentes da síntese..... | 25 |
| Tabela 2: Composição dos reagentes do Teste de Kaiser..... | 25 |
| Tabela 3: Descrição da etapa de acoplamento de cada AA..... | 26 |
| Tabela 4: Massa obtida ao fim da síntese..... | 26 |
| Tabela 5: Coquetel de clivagem..... | 27 |
| Tabela 6: Composição da solução SBF-A..... | 36 |
| Tabela 7: Composição da solução SBF-B..... | 36 |

Lista de abreviaturas e siglas

Ti – Titânio metálico

OGP – Osteogenic Growth Peptide

OGP(10-14) – Fragmento do OGP, dos resíduos de número 10 a 14 da cadeia peptídica.

AA - Aminoácido

Y – Tyr – Aminoácido Tirosina

G – Gly – Aminoácido Glicina

F – Phe – Aminoácido Fenilalanina

H₂N. – Extremidade da cadeia peptídica que contém grupo funcional amina

OH. - Extremidade da cadeia peptídica que contém grupo funcional ácido carboxílico

APTES – 3-aminopropiltriétoxissilano

HA – Hidroxiapatita

AC – Agentes de condensação

HOAt - 1-hydroxy-7-azabenzotriazol

DIC - diisopropilcarbodiimida

DCM - Diclorometano

DMF - Dimetilformamida

TFA – Ácido trifluoracético

TIS – Triisopropilsilano

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

SBF – Simulated Body Fluid

FTIR-ATR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio, com o acessório de reflexão total atenuada

MFA – Microscopia de Força Atômica

DRX – Difractometria de raios x

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS – Espectroscopia de energia difusa

Sumário

| | |
|--|----|
| 1.1. Implantes metálicos na regeneração de tecidos | 14 |
| 1.2 Peptídeo OGP na regeneração de tecidos | 16 |
| 1.3 Modificação de superfícies de Ti com OGP(10-14) | 17 |
| 1.3.1 Modificação de superfícies de Ti via silanização | 18 |
| 1.3.2 Modificação de superfície de Ti via Hidroxiapatita | 19 |
| 1.4 Justificativa | 20 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 20 |
| 2.2. Objetivos específicos | 20 |
| 3.1 Métodos experimentais..... | 21 |
| 3.1.1 Síntese do peptídeo..... | 21 |
| 3.1.2 Modificação de superfície com agente silano | 22 |
| 3.1.3 Modificação de superfície com hidroxiapatita | 23 |
| 3.1.4 Modificação de superfícies com OGP | 23 |
| 3.2 Técnicas de caracterização | 23 |
| 3.2.1 Peptídeo OGP(10-14) | 23 |
| 3.2.2 Superfície de titânio funcionalizada com APTES | 24 |
| 3.2.3 Superfície de titânio funcionalizada com APTES + OGP(10-14) | 24 |
| 3.2.4 Superfície de titânio funcionalizada com HA..... | 24 |
| 3.2.5 Superfície de titânio funcionalizada com HA + APTES + OGP(10-14) | 25 |
| 4.1 Síntese do peptídeo..... | 25 |
| 4.2 Modificação de superfície com agente silano e OGP(10-14)..... | 30 |
| 4.2.1 Método 1 | 30 |
| 4.2.2 Método 2..... | 34 |
| 4.3 Modificação de superfície com hidroxiapatita e OGP(10-14)..... | 36 |

1. Introdução

1.1. Implantes metálicos na regeneração de tecidos

Os ossos, ou tecido ósseo, são tecidos dinâmicos que são repostos conforme envelhecem ou são danificados, e que possuem diversas funções mecânicas e biológicas essenciais não apenas para os seres humanos, mas para vertebrados em geral. Do ponto de vista histológico, existem dois tipos de tecido ósseo: denso ou cortical, e esponjoso ou trabecular; sendo o primeiro, componente da parte externa do osso, e o segundo da parte interna. Ambos consistem em matrizes de sólidos mineralizados contendo pequenos canais (*canaliculi*), lacunas (*lacunae*) e células atuantes na manutenção da saúde do tecido ósseo, através do mecanismo conhecido por modelagem e remodelagem, no qual os osteoblastos são responsáveis principalmente pela formação de tecido novo, e os osteoclastos, pela reabsorção do tecido velho. [1]

Apesar do tecido ósseo ser conhecido por ser auto regenerativo, não apresenta a mesma capacidade de cicatrização se ocorrerem traumas de larga escala, ou seja, fraturas devido a traumas físicos ou doenças degenerativas. Nesse contexto, há a necessidade da utilização de enxertos (*autografts* cujo doador é o próprio paciente, e *allografts* nos quais o tecido provém de doador falecido [2], implantes metálicos ou próteses impressas em três dimensões (*3D printing*).

Williams, D. propôs um conceito unificado de biocompatibilidade, como sendo a “capacidade de um biomaterial de desempenhar sua função desejada com relação a terapia médica, sem provocar efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no destinatário ou beneficiário dessa terapia, mas gerando a resposta celular ou tecidual benéfica mais apropriada nesta situação específica e otimizando o desempenho clinicamente relevante dessa terapia”[3].

Diversos trabalhos na literatura mostram que o titânio (Ti) é um dos metais mais empregados em implantes ortopédicos e dentais devido a sua excelente resistência a corrosão, biocompatibilidade, durabilidade, osseointegração, entre outras propriedades, em relação a outros implantes metálicos. Entretanto, seu módulo elástico é cerca de seis vezes maior que o do tecido cortical (7 a 30 GPa), o que pode levar a uma incompatibilidade devido ao diferente módulo de Young, causando o efeito de *stress shielding*. [4]

Tanto a compatibilidade sangüínea quanto a osseointegração são fatores cruciais a serem considerados no desenvolvimento de dispositivos biomédicos relacionados a implantes. Em ambos os casos, a resposta do hospedeiro (paciente) e sua severidade estão relacionados às propriedades de superfície do biomaterial. Este não deve ativar o processo de coagulação ao entrar em contato com o sangue, nem alterar a composição de plaquetas e leucócitos, fatores estes que são indicativos da dificuldade em alcançar a biocompatibilidade [5]. Quanto a osseointegração, o objetivo principal é estabelecer uma conexão forte e duradoura entre a superfície do implante e o osso peri-implantar, de forma que se alcance uma fixação mecânica estável no local implantado [6].

No osso, o implante de titânio deve ser cuidadosamente posicionado em relação aos tecidos mineralizados locais, nas condições adequadas. Contudo, metal e osso são geralmente separados por uma camada fina de tecido mole cartilaginoso, resultante de uma fraca reação ao corpo estranho, que impede o contato direto do titânio com o osso [7]. Assim que o processo de implantação acontece, são desencadeadas uma série de reações biológicas em uma determinada ordem. Inicialmente o implante é umedecido e moléculas biologicamente ativas, como proteínas, são rapidamente adsorvidas ao material, seguidas pelo recrutamento de células osteoprogenitoras, que são as responsáveis por regenerar o tecido [8]. Portanto, além das propriedades mecânicas do implante, as interações biológicas com a superfície do metal são extremamente importantes e contribuem significativamente para a osseointegração.

Estas interações podem levar a uma série de consequências:

- I. Osseointegração bem sucedida, quando o osso recém formado tem contato direto com a superfície do implante como resultado da proliferação e diferenciação das células ósseas;
- II. Rejeição, causada pela reação inflamatória do corpo ao implante;
- III. Micromovimentação devido a falta de estabilidade entre o tecido e a superfície do implante, favorecendo a formação de tecido fibroso ao invés de uma interface óssea;
- IV. Infecção bacteriana na superfície do implante, podendo acarretar na formação de biofilme e a falha de curto ou longo prazo do dispositivo. [9]

Neste contexto, estudos envolvendo a modificação da superfície desses materiais metálicos se fazem necessários, para que se tornem mais porosos e compatíveis com o meio fisiológico.^[10-13]

1.2 Peptídeo OGP na regeneração de tecidos

As proteínas são moléculas biológicas tridimensionais de estrutura altamente estável compostas de numerosas cadeias de aminoácidos, que por sua vez estão conectados por ligações peptídicas. Fragmentos destas moléculas, ou pequenas cadeias de aminoácidos compõem o que chamamos de peptídeos, cujos efeitos são exercidos por uma alta afinidade de ligação com os receptores específicos das células alvo.

Até os dias atuais, inúmeros peptídeos tem sido estudados para aplicações ortopédicas e odontológicas, e entre eles está o pentapeptídeo OGP(10-14), derivado do *Osteogenic Growth Peptide* e cuja estrutura primária consiste em H₂N-YGFGG-OH^[14,15]. O OGP é composto de 14 aminoácidos, existe naturalmente e é encontrado tanto no sangue humano como no de outros mamíferos. Como o próprio nome sugere, este peptídeo é conhecido por exercer um efeito anabólico em células de tecido ósseo, resultando em um aumento da formação de tecido e, conseqüentemente, de massa óssea.

Estudos^[15] in vitro sugerem a capacidade do OGP em regular a proliferação de células osteoprogenitoras, a diferenciação celular, a atividade de fosfatase alcalina, a secreção de osteocalcina e a mineralização de colágeno e matriz celular. Além disso, modelos experimentais de cicatrização de fraturas mostraram que o OGP tem o alto potencial de melhorar a resposta de cicatrização óssea.

Ademais, trabalhos feitos em camundongos transgênicos super expressando OGP mostraram um aumento significativo de massa óssea; e pesquisas com coelhos portadores de defeitos segmentares de cerca de 1,5 cm tratados com OGP incorporado a scaffolds de PLGA também mostraram um aumento de volume ósseo e uma aceleração no processo de cicatrização^[15].

Outros estudos realizados por Saska e colaboradores envolvendo impressão 3D de scaffolds de PHB funcionalizados com OGP por adsorção mostraram análises por SEM sugerindo uma aceleração na diferenciação morfológica celular nos scaffolds que possuíam o pentapeptídeo OGP(10-14) incorporado em sua estrutura^[16].

O peptídeo OGP também tem sido estudado no tratamento de fraturas acometidas em condições osteoporóticas [14,17]. A osteoporose é uma doença degenerativa em que ocorre um desequilíbrio do metabolismo ósseo, fazendo com que a quantidade de osteoclastos seja maior que a de osteoblastos, resultando em um tecido ósseo altamente poroso e fraco já que as células que envelhecem vão sendo retiradas sem a reposição correta com tecido novo. Fraturas causadas por esta doença são muito comuns, por isso sua prevenção e tratamento tem se tornado extremamente importantes.

No Brasil, segundo o IBGE, a expectativa de vida média em 2017 era de 76 anos [18]. Estima-se que em 2050, 37% da população (cerca de 96 milhões) terá mais de 50 anos, e 14% (cerca de 36 milhões) terá 70 anos ou mais, enquanto a população total chegará a aproximadamente 260 milhões de pessoas [19].

De acordo com a Abrasso [20] (Associação Brasileira de Avaliação Óssea e Osteometabolismo), cerca de 10 milhões de brasileiros são afetados pela osteoporose. Além disso, a Fundação Internacional de Osteoporose (IOF) calcula que, anualmente, ocorrem cerca de 8,9 milhões de fraturas osteoporóticas, resultando em 1 a cada 3 segundos. A Fundação estima também que o número de fraturas osteoporóticas aumentará em 32% até 2050 mundialmente. No Brasil, em 2030 deverão ser registradas 608 mil, constatando um aumento de 63% em relação a 2015, em que foram registradas 373 mil fraturas deste tipo.

Neste contexto, pequenos peptídeos como o OGP(10-14) tem sido utilizados no desenvolvimento de novos agentes indutores de crescimento ósseo, visto que não existem muitos fármacos no mercado que além de tratar a osteoporose também reponham a massa óssea perdida com alta especificidade de ligação ao alvo [14].

1.3 Modificação de superfícies de Ti com OGP(10-14)

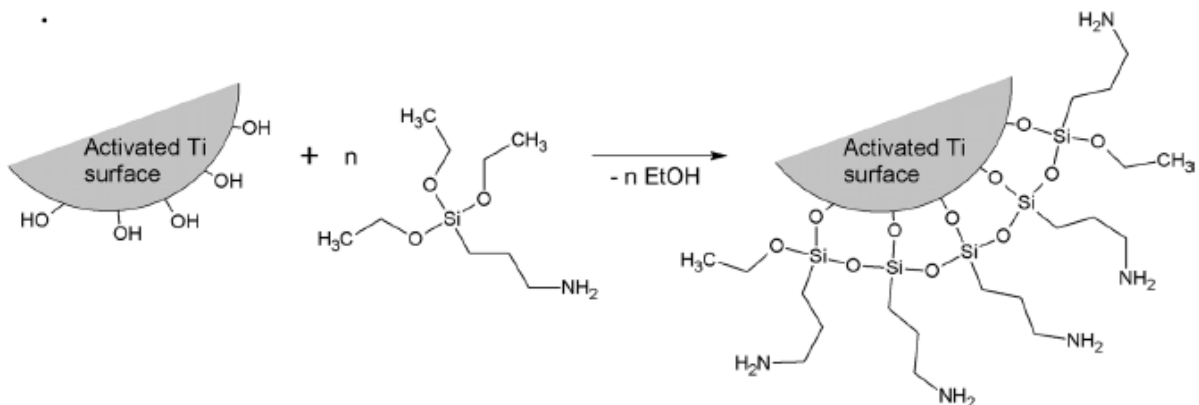
Existem diversas formas de se alterar a composição de superfícies de titânio, dependendo do objetivo que se quer alcançar. Neste trabalho, para atingir a funcionalização da superfície metálica com o peptídeo OGP(10-14) utilizou-se o agente silano, que ao reagir com o Ti deixa um grupo amino livre na superfície, disponível para se ligar ao peptídeo de interesse. Além disso, para atingir uma maior solubilidade em meio fisiológico combinada a uma alta estabilidade mecânica realizou-se uma cobertura da superfície de Ti com hidroxiapatita, antes de adicionar o agente silano e, por sua vez, o peptídeo.

1.3.1 Modificação de superfícies de Ti via silanização

A molécula de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), ou agente silano, é conhecida e muito utilizada como *linker* para funcionalizar peptídeos ou outras moléculas em superfícies metálicas de titânio [21,22] ou outros materiais [23]. Conforme indicado pelo seu nome, esta é uma molécula que contém três grupos funcionais etoxi ligados a um átomo de silício, e fazendo a quarta ligação com este átomo central, está um hidrocarboneto composto de três unidades de carbono e um aminogruppo na extremidade.

A presença dos grupos etoxi tornam esta molécula altamente reativa, por serem bons grupos abandonadores. No processo de silanização, o agente silano inicialmente sofre hidrólise, gerando silanol e etanol. Depois, com o aumento da temperatura, o silanol juntamente com os grupos OH da superfície de titânio pre tratada sofrem condensação, liberando água e formando a ligação Ti-O-Si, conforme indica a figura 2 a seguir.

Figura 1: Funcionalização de superfície de titânio com APTES.



Fonte: Baranowski A, Klein A, Ritz U, Ackermann A, Anthonissen J, Kaufmann KB, et al. (2016).

Nos dois últimos anos, foram feitos estudos sobre como coordenar o peptídeo OGP a superfícies de titânio utilizando moléculas intermediárias complexas [17, 24, 25]. Tendo isto em vista, o APTES entra como uma alternativa mais simples e bastante eficaz para o mesmo propósito possibilitando também a realização de uma ligação peptídica entre seu próprio aminogruppo terminal e o ácido carboxílico presente na extremidade do OGP, de forma que o peptídeo se torne covalentemente ligado à superfície metálica de titânio.

1.3.2 Modificação de superfície de Ti via Hidroxiapatita

Trabalhos abrangendo o recobrimento de superfícies de implantes ortopédicos e odontológicos com hidroxiapatita (HA) tem demonstrado sucesso tanto no aumento desejado da porosidade quanto na solubilidade em meio fisiológico, e portanto na maior biocompatibilidade desses materiais [26-28].

A fase mineral dos ossos, que correspondem a cerca de 60-70% da massa do osso, é composta de um fosfato de cálcio de estrutura apatítica e composição próxima a da hidroxiapatita, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, conhecida por não ser tóxica e mimetizar a composição do osso humano em meio fisiológico, além de ser facilmente depositável tanto em superfícies homogêneas quanto em implantes de geometrias diversas [26,27,29].

A hidroxiapatita é compatível com diversos tipos de tecido e consegue aderir diretamente ao tecido ósseo sem a necessidade de pré modificá-lo com algum material intermediário. Esta molécula (HA) também apresenta propriedades de osteocondutividade, sendo um material que induz o tecido ósseo que está sendo formado a aderir à sua superfície ou se depositar nas suas vizinhanças, o que é extremamente útil na promoção de uma cicatrização rápida.

Apesar de ser um ótimo biomaterial, a HA por si só não possui boas propriedades mecânicas: é frágil e possui baixa resistência à tração e ao impacto. Por isso desenvolveu-se o conceito de utilizar esta molécula para recobrir a superfície de implantes metálicos, e somar sua bioatividade e biocompatibilidade com a resistência mecânica e ductilidade dos implantes.

Desde a década de 1980, quando a HA começou a ser aplicada a implantes metálicos para melhorar a fixação entre a prótese e o osso, vários métodos de deposição foram desenvolvidos. Entre eles estão os métodos de revestimento por imersão-sinterização (*dip coating sintering*), revestimento por imersão, deposição eletroforética, prensagem isostática a quente (HIP), deposição de solução, *ion-beam sputter coating*, técnicas de pulverização térmica como *plasma spray*, etc.

O método mais utilizado para obtenção da cobertura de superfícies metálicas com HA na área de cirurgia ortopédica é a técnica de *plasma spray*. Entre as vantagens estão a capacidade de ligação direta com o osso, promoção de maior fixação, melhoria no crescimento ósseo e proteção ao osso circundante contra a liberação de íons provenientes do implante metálico [29].

Contudo, apesar de seu excelente desempenho clínico, o processo de *plasma spray* é limitado por se dar em temperaturas elevadas. Para a incorporação da HA não há problemas, pois essa molécula forma uma fase termicamente estável, mas em relação a fatores de crescimento que estimulam a cicatrização óssea este processo é inviável, já que essas biomoléculas se degradam em altas temperaturas [27]. Pensando nisso, Habibovic et al. desenvolveram um método biomimético de deposição de camadas uniformes e densas de HA em titânio metálico realizado em algumas horas, sem necessidade de pré tratamento das superfícies metálicas e sem utilização de altas temperaturas; método este que foi escolhido para ser utilizado neste trabalho.

1.4 Justificativa

O trabalho aqui descrito visa melhorar o entendimento sobre o modo com o qual o OGP(10-14) pode ser incorporado na superfície de implantes metálicos de titânio, de forma a otimizar ainda mais a biocompatibilidade da prótese com o tecido hospedeiro, além de melhor compreender e otimizar sua atuação na indução do crescimento celular de tecido ósseo.

A obtenção de um novo material híbrido que contenha a ação combinada de indução de crescimento celular dada pela junção da HA com o peptídeo OGP traria uma otimização da osseointegração de implantes metálicos, enquanto que, simultaneamente, a alta solubilidade em meio fisiológico da HA contribuiria para uma maior adaptação do implante no paciente, diminuindo fatores de rejeição devido a suas características biomiméticas, acarretando em uma menor necessidade de manutenção e assim melhorando ainda mais a qualidade de vida do indivíduo portador da prótese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Modificar a superfície de discos de titânio com dois biomateriais híbridos, sendo um deles composto de 3-aminopropiltriétoxissilano e o pentapeptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎; e o outro composto de hidroxiapatita, APTES e OGP₍₁₀₋₁₄₎.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização do pentapeptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎;
- Modificação e caracterização de discos de titânio com APTES;

- Modificação e caracterização de discos de titânio com HA;
- Modificação e caracterização de discos de titânio pré modificados com HA, com APTES;
- Modificação de superfície com OGP(10-14) e caracterização.

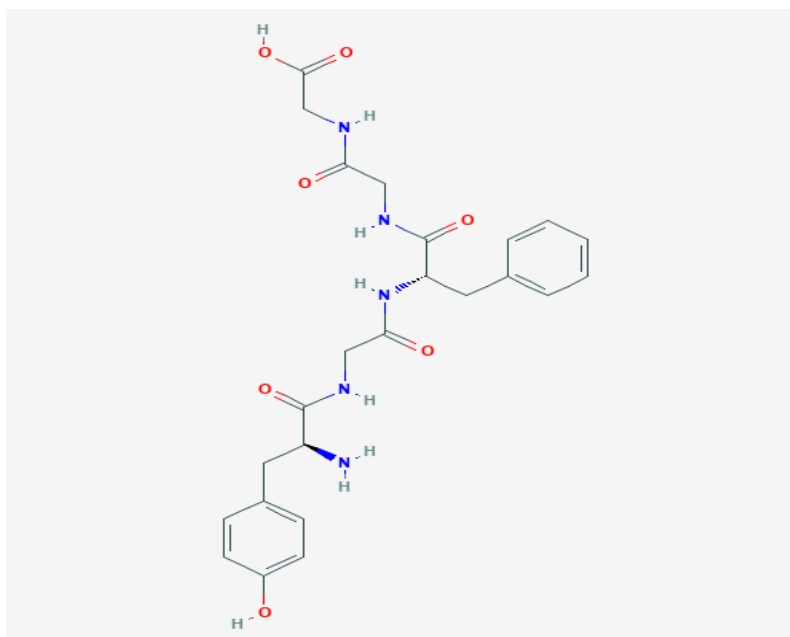
3. Parte Experimental

3.1 Métodos experimentais

3.1.1 Síntese do peptídeo

O peptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎ (figura 3) foi sintetizado manualmente pelo método de síntese em fase sólida ^[30,31] utilizando o protocolo em que os alfa amino grupos são protegidos pelo grupo F-moc, ou 9-fluorenilmetiloxycarbonila, e as cadeias laterais da maioria dos resíduos de aminoácidos são protegidos por derivados t-butílicos (tbu). A resina utilizada foi a F-moc-L-Gly-Wang (Lote nº 30332), de grau de substituição 0,33 mmol/g. Os agentes de condensação (AC) utilizados foram HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazol) e DIC (diisopropilcarbodiimida). Tanto a resina quanto os AC e os fmoc-aminoácidos foram disponibilizados pelo Laboratório de Síntese e Aplicação de Peptídeos e Proteínas do departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Figura 2: Estrutura 2D do pentapeptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=147077, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosyl-glycyl-phenylalanyl-glycyl-glycine> (accessed on Nov. 16, 2019).^[32]

Inicialmente, em uma seringa de polipropileno de 10 mL contendo um filtro, partiu-se de 1g de resina, e para cada acoplamento (condensação) considerou-se um excesso molar de três equivalentes, em relação ao grau de substituição inicial, ao calcular a quantidade necessária de cada reagente, descrito posteriormente na tabela 1.

O meio reacional envolveu também os solventes DCM (diclorometano) e DMF (dimetilformamida) na proporção 2:1 respectivamente. A solução de piridina 20% em DMF foi utilizada para desproteção dos aminogrupos por 15 minutos antes da etapa de acoplamento (2h sob agitação), seguida do teste de Kaiser.

Após o acoplamento de todos os aminoácidos, realizou-se uma etapa de acetilação utilizando anidrido acético e DMF. Em seguida, foi feita a clivagem utilizando 95% de TFA, 2,5% de H₂O e 2,5% de TIS, seguida de uma extração líquido-líquido para separar o peptídeo, que é solúvel em meio aquoso, dos solventes orgânicos empregados na etapa anterior. Depois disso, as soluções resultantes, contendo o peptídeo bruto, foram congeladas com o gás nitrogênio líquido e liofilizadas.

A purificação foi feita através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo semi-preparativo, com uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 x 250 mm e 5 µm). A análise qualitativa foi realizada em modo analítico utilizando um sistema de separação Shimadzu LC-10A/C-47A acoplado a um detector de UV/Vis Shimadzu LC-10A/C-47A, com uma coluna Waters Symmetry C18 (2,1 x 150 mm e 5 µm).

As condições cromatográficas no modo semi-preparativo foram: solventes A (0,045% TFA.H₂O) e B (0,036% TFA.ACN); gradiente de 0,33%/min de solvente B durante 90 minutos; fluxo de 5 mL/min; comprimento de onda de detecção em 220 nm. Já para o modo analítico foram: solventes A (0,045% TFA.H₂O) e B (0,036% TFA.ACN); gradiente de 5% a 95% de solvente B em 30 minutos; fluxo de 0,6 mL/min; comprimento de onda de detecção em 220 nm.

3.1.2 Modificação de superfície com agente silano

Para funcionalizar os discos de titânio com APTES, dois métodos foram utilizados. Em um deles ^[21], fez-se um pré tratamento dos discos utilizando solução 1:1 (v/v) de metanol e HCl concentrado, à temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de lavagem com água destilada. Depois, os discos de titânio foram imersos

em ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos, seguido de lavagem com água destilada e acetona; e secagem na capela. Após secos, os discos foram imersos em uma solução 5% (v/v) de APTES em tolueno, e submetidos a um sistema de refluxo, a 120°C por 3 horas. Evaporou-se então o solvente na capela, e lavou-se os discos com clorofórmio, acetona, metanol e por fim água destilada.

Já o segundo método [22,23] consistiu em um pré tratamento dos discos com solução piranha, na proporção de 1:4 de H₂O₂ (30%) e H₂SO₄ concentrado, respectivamente, realizado na capela *overnight*. Os discos foram então lavados abundantemente com água destilada, imersos em solução 5% (v/v) de APTES em etanol destilado por 30 minutos a 60°C, e então lavados novamente com água destilada.

3.1.3 Modificação de superfície com hidroxiapatita

Para um melhor recobrimento, utilizou-se o método de *dip coating* em duas etapas [27]. Preparou-se duas soluções de fluido fisiológico simulado (*simulated body fluid*) 5 vezes mais concentradas que a solução de Kokubo [33], excluindo a presença dos íons potássio, sulfato e do TRIS; denominadas SBF-A e SBF-B e com suas composições descritas posteriormente. Para a confecção da solução SBF-A os reagentes foram adicionados, respectivamente conforme estão listados na tabela 7, a 125 mL de água destilada sob agitação constante. O pH foi ajustado para 7 utilizando uma fita de papel indicador universal, em seguida a solução foi transferida para um balão de 250 mL e completou-se o menisco com água.

A solução SBF-B (tabela 8) foi feita da mesma forma que a SBF-A, apenas diferindo na quantidade dos íons Mg²⁺ e HCO₃⁻. As amostras de titânio foram imersas em cada solução por 24 horas, e secas a temperatura ambiente.

3.1.4 Modificação de superfícies com OGP

O OGP₍₁₀₋₁₄₎ foi incorporado às amostras seguindo a mesma metodologia de acoplamento de aminoácidos descrita anteriormente na seção 3.1.1.

3.2 Técnicas de caracterização

3.2.1 Peptídeo OGP₍₁₀₋₁₄₎

Após o procedimento de purificação do peptídeo, a caracterização da molécula foi feita por meio de espectrometria de massas. A análise foi realizada em modo

eletrospray positivo por injeção direta das amostras dos peptídeos puros em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Bruker® e também por CLAE acoplado a espectrometria de massas com ionização por eletrospray modo positivo (LC/ESI-MS+), permitindo determinar a qualidade e identidade da amostra simultaneamente.

3.2.2 Superfície de titânio funcionalizada com APTES

As amostras foram submetidas ao teste qualitativo de Kaiser para identificação dos aminogrupos da molécula de APTES livres na superfície. Foram empregadas também as técnicas FTIR-ATR e microscopia de força atômica (MFA).

A espectroscopia de absorção realizada na região do infravermelho médio ocorreu no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas, por meio de reflexão total atenuada com cristal de diamante, em um espectrofotômetro com transformada de Fourier modelo VERTEX 70 da marca Bruker®; detector tipo DLaTGS; faixa de leitura de 400 a 4000 cm^{-1} .

Já a microscopia de força atômica foi realizada no laboratório do Grupo de Físico-Química de Materiais, num equipamento da Agilent 5500; modo contato intermitente com ponta de silício (48 N/m e 190 kHz).

3.2.3 Superfície de titânio funcionalizada com APTES + OGP₍₁₀₋₁₄₎

Foram empregadas as técnicas FTIR-ATR e MFA, descritos na seção anterior.

3.2.4 Superfície de titânio funcionalizada com HA

Empregaram-se as técnicas de FTIR-ATR e difração de raios X para identificação do composto formado e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise morfológica.

A espectroscopia de absorção realizada na região do infravermelho médio ocorreu no Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides do departamento de Físico-Química do Instituto de Química, por meio de reflexão total atenuada com cristal de seleneto de zinco, em um espectrofotômetro com transformada de Fourier modelo Frontier da marca Perkin Elmer®; faixa de leitura de 500 a 4000 cm^{-1} .

A difração de raios X foi realizada no equipamento multiusuários de DRX, marca SIEMENS, modelo D5000; DIFFRAC PLUS XRD Commander; de 10° a 90° ; passo 0,01/1s.

O microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) utilizado é da marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2.1.0.3; equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3; localizado no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos em Nanotecnologia do IQ. Foram utilizadas as técnicas de elétrons secundários e análise química, após recobrimento das amostras com carbono via *sputter coating*. O método utilizado para captura de imagem foi o POP-CCDPN-011 - Ajuste e captura de imagens.

3.2.5 Superfície de titânio funcionalizada com HA + APTES + OGP⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

Foram empregadas as técnicas FTIR-ATR, DRX e MEV, descritos na seção anterior.

4. Resultados e discussões

4.1 Síntese do peptídeo

O cálculo das quantidades utilizadas de cada reagente para cada acoplamento está indicado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Cálculo das quantidades em massa/volume dos reagentes da síntese.

| | Fórmula | Quantidade | |
|-------------|-----------------------|---|-----------------------------------|
| HOAt | $m = MM. eq. Gs$ | $m = 136,11 \text{g mol}^{-1} \cdot 3.0,33 \text{mmol}$ | $m = 0,135 \text{g}$ |
| DIC | $V = (m. eq. Gs)/d$ | $V = (126,2 \cdot 3 \cdot 0,33 \text{mmol})/0,815$ | $V = 153 \text{ uL}$ |
| AA | $m = MM. eq. 10^{-3}$ | $m_{\text{GLY}} = 297,3 \cdot 0,99 \cdot 10^{-3}$ | $m_{\text{GLY}} = 0,294 \text{g}$ |

Fonte: Autora.

Partiu-se de 1,061 g de resina, desprotegeu-se a mesma por 15 minutos com solução 20% de piridina na quantidade suficiente para cobrir os grãos, lavou-se 4x com DCM, 4x com DMF e 2x com metanol, e realizou-se o teste de Kaiser em um tubo de ensaio separado; resultando em uma coloração azul (positivo). Este teste consiste na mistura de algumas gotas de três soluções denominadas A, B e C (tabela 2) com alguns grãos da resina em questão em aquecimento na estufa (cerca de 110°C) por cerca de 2 a 3 minutos. Se a cor resultante for azulada (positivo para desproteção),

significa que há aminas livres na solução, disponíveis para reagir, enquanto que se o resultado for uma coloração amarela significa que os aminoácidos colocados foram acoplados com sucesso.

Tabela 2: Composição dos reagentes do Teste de Kaiser.

| Solução | Composição |
|---------|---|
| A | 40 μ L de solução KCN (0,001M) + 2 mL de piridina; *0,1mg de KCN em 1 mL de H ₂ O |
| B | 100 mg de Ninidrina + 2 mL de etanol |
| C | 4g de fenol (liquefeito) + 1 mL de etanol |

Fonte: Autora.

Os acoplamentos dos aminoácidos que compõem o peptídeo OGP(10-14) estão descritos na tabela 3 abaixo, na ordem de síntese do segundo AA em diante, já que o primeiro (GLY) já estava presente na resina. O processo de desproteção foi realizado após cada acoplamento positivo, e as quantidades dos agentes de condensação (indicadas na tabela 2) foram as mesmas para todos os aminoácidos.

Tabela 3: Descrição da etapa de acoplamento de cada AA.

| AA | Massa (g) | HOAt (g) | DIC (μ L) | Solvente | Acoplamento |
|-----|-----------|----------|----------------|---------------|-------------|
| GLY | 0,294 | 0,135 | 153 | 2 DCM : 1 DMF | + |
| PHE | 0,384 | 0,134 | 153 | 2 DCM : 1 DMF | + |
| GLY | 0,295 | 0,136 | 153 | 2 DCM : 1 DMF | + |
| TYR | 0,456 | 0,134 | 153 | 2 DCM : 1 DMF | + |

Fonte: Autora.

Ao fim desta etapa, pesou-se a massa resultante de resina na seringa, e dividiu-se o conteúdo em dois tubos falcon. Os resultados obtidos estão na tabela 4, a seguir; a incerteza da balança era de 0,0003 g.

Tabela 4: Massa obtida ao fim da síntese.

| | Massa (g) |
|------------------------|------------------|
| seringa vazia | 7,5973 |
| seringa + resina final | 9,0899 |
| resina final | 1,4926 |
| tubo falcon 1 | 0,7065 |
| tubo falcon 2 | 0,7759 |

Fonte: Autora.

O tubo falcon 2 foi guardado na geladeira, como reserva, enquanto que o conteúdo do falcon 1 prosseguiu para a etapa seguinte, sendo transferido para a seringa com filtro. Desprotegeu-se a resina antes de acetilar, lavou-se 4x com DCM, 4x com DMF e 2x com metanol, e realizou-se o teste de Kaiser, que deu azul. Adicionou-se então DMF suficiente para cobrir os grãos e 350 μ L de anidrido acético, e deixou-se reagir por 1 hora. A resina foi então lavada e o teste de Kaiser deu amarelo, indicando que não havia mais aminas livres na solução, o que significa que a extremidade do peptídeo que não estava ligada a resina, estava agora com a terminação -acetil.

Em seguida transferiu-se o conteúdo da seringa para um tubo falcon, pesou-se (massa de resina = 0,6354 g) e adicionou-se o coquetel de clivagem à resina, nas proporções descritas anteriormente na seção 3.1.1, sendo 1 mL para cada 100 mg de resina, e deixando reagir por 2 horas. O cálculo da quantidade de cada reagente do coquetel foi feito conforme indicado abaixo, considerando 640 mg de resina, e os valores obtidos estão indicados na tabela 5.

$$\begin{array}{ll}
 1 \text{ mL} - 100 \text{ mg} & 6,4 \text{ mL} - 100\% \\
 x - 640 \text{ mg} & a - 95\% \\
 x = 6,4 \text{ mL} & b, c - 2,5 \%
 \end{array}$$

Tabela 5: Coquetel de clivagem.

| Reagente | Proporção (%) | Volume (μL) |
|------------------|----------------------|-----------------------------------|
| TFA | 95 | 6080 |
| H ₂ O | 2,5 | 160 |
| TIS | 2,5 | 160 |

Fonte: Autora.

A etapa de clivagem consiste em quebrar as ligações que existem entre a resina e o primeiro aminoácido da sequência peptídica, liberando-a em solução. Contudo, deve-se tomar muito cuidado para não passar do tempo de reação, para que não aconteça a quebra de outras ligações, comprometendo a integridade do peptídeo de interesse.

Ao final da reação, dividiu-se o conteúdo em 4 tubos falcon, adicionou-se éter gelado, e repetiu-se o processo de sonicar/passar os tubos no vortex, centrifugar e descartar o sobrenadante no vidro de precaução, 3 vezes. A seguir, fechou-se os tubos com parafilm, furou-se e deixou-se na capela até evaporar o solvente.

Na etapa seguinte, realizou-se uma extração líquido-líquido, adicionando ácido acético 5% em água aos tubos, sonicando, centrifugando e coletando o sobrenadante em um balão de 250 mL, tomando cuidado para não ir grãos de resina para o balão. Repetiu-se o procedimento enquanto havia formação de espuma. Congelou-se então o conteúdo do balão utilizando nitrogênio líquido e liofilizou-se. A figura 3 indica o resultado. A liofilização consiste no congelamento a uma temperatura abaixo de -30°C , e na desidratação da amostra de interesse através do processo de sublimação, em que utilizando vácuo (pressão negativa), o gelo da amostra passa para a fase gasosa, secando-a e resultando em um material poroso livre de umidade. Esta técnica é muito utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, para conservação de produtos biológicos e alimentos em geral [34].

Figura 3: Resultado da extração, após liofilização do conteúdo do balão.



Fonte: Autora.

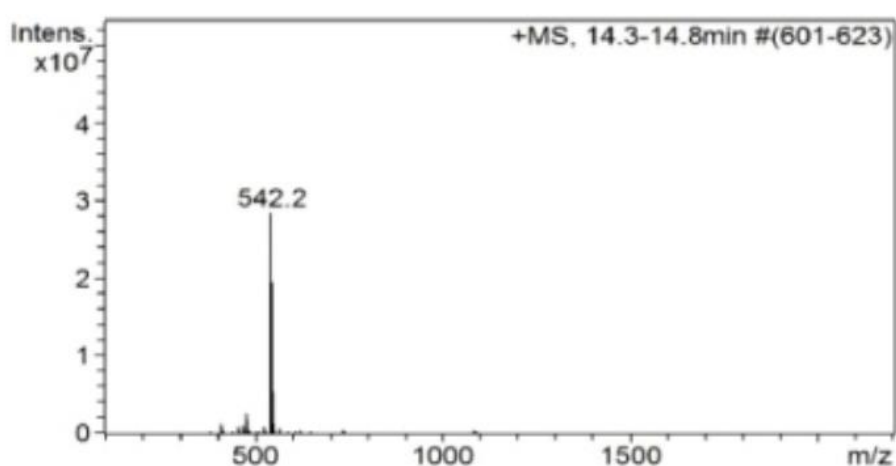
Devido a dificuldade para retirar o que sobrou do balão, como a quantidade obtida foi baixa, solubilizou-se o conteúdo do balão com a mesma solução 5% de HAc em água, e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferiu-se o conteúdo para um

tubo falcon para novamente liofilizar. Além disso, colocou-se todo o conteúdo do vidro de precaução no rotaevaporador para retirar o TFA do meio, e tentar recuperar o peptídeo que possa ter ficado retido no sobrenadante durante o processo de extração. Como a cadeia peptídica é muito pequena, há uma maior dificuldade em precipitá-la durante a extração, por mais gelado que esteja o solvente.

Após rotaevaporar, extraiu-se novamente com ácido acético 5% em água e éter, para tirar o TIS, no funil de separação. O éter etílico possui densidade igual a $0,71 \text{ g.cm}^{-3}$, enquanto que a água possui $1,0 \text{ g.cm}^{-3}$ e o TIS, $0,77 \text{ g.cm}^{-3}$. Portanto, o TIS fica na fase de cima, solubilizado em éter, e a fase de baixo deve conter o peptídeo em meio aquoso. Coletou-se a porção aquosa, mas como ainda estava presente nela um cheiro forte de éter, submeteu-se a fase coletada ao rotaevaporador por 30 minutos a 35°C antes de congelar o conteúdo e liofilizá-lo novamente, obtendo um material amarelado e floculoso.

A seguir, realizou-se a etapa de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito na seção 3.1.1. A massa molar teórica do OGP(10-14) é de aproximadamente $541,55 \text{ g.mol}^{-1}$ [35]. As frações contendo o peptídeo isolado foram coletadas manualmente, seu conteúdo transferido para um balão e submetido ao rotaevaporador para retirar o solvente (acetonitrila) do meio. Transferiu-se então o conteúdo do balão para um eppendorf de 1 mL, e liofilizou-se pela última vez. A massa de OGP(10-14) puro obtida foi de 6,2 mg.

Figura 4: Relação carga/massa obtida no detector do CLAE.

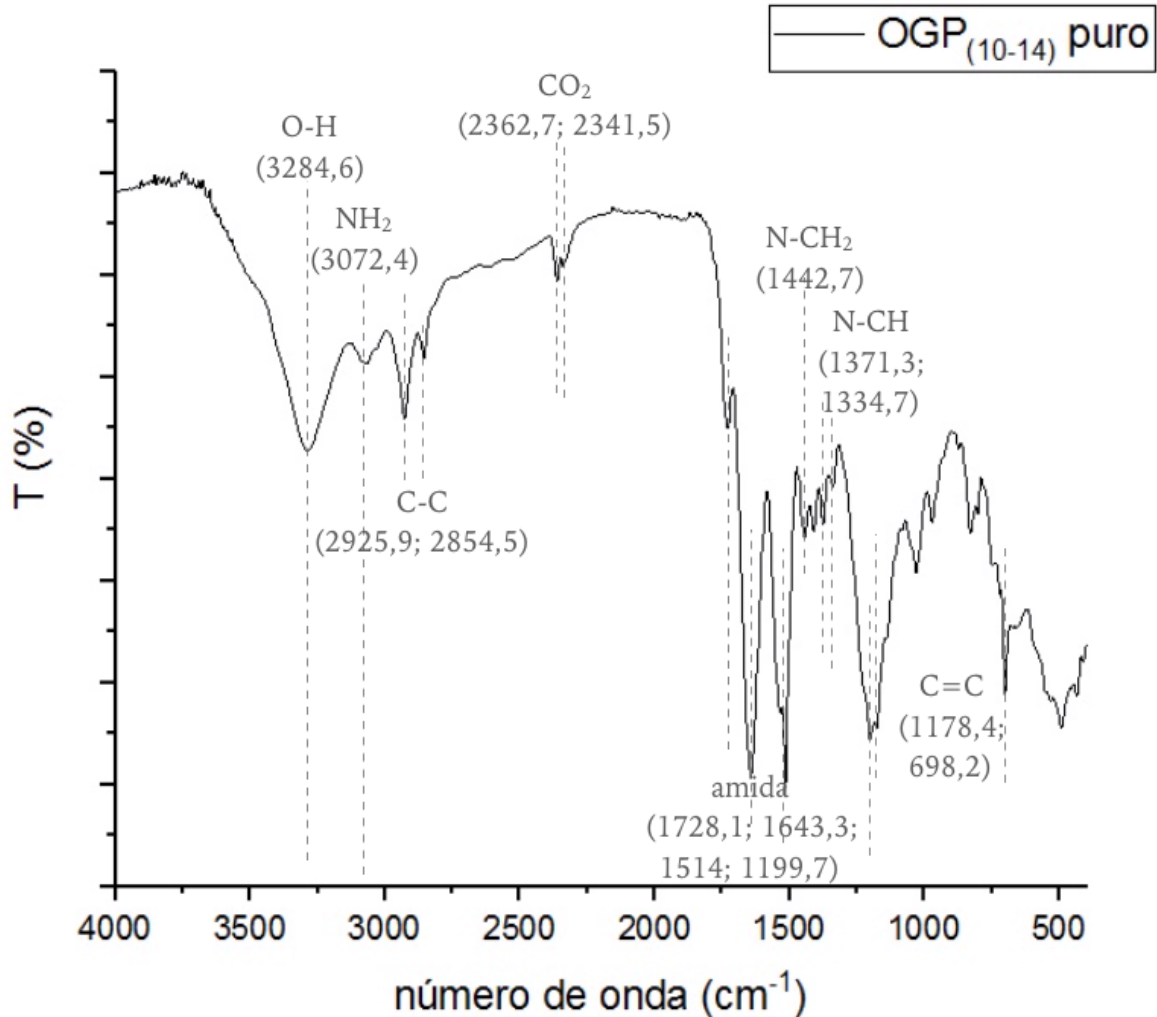


Fonte: Autora.

A figura 4 acima indica a relação massa/carga da fração contendo o peptídeo isolado. O pico de maior intensidade corresponde a um valor de massa molar próximo

ao esperado, comprovando que a síntese deu certo e a purificação foi realizada com sucesso.

Figura 5: Espectro de infravermelho do OGP(10-14) puro.



Fonte: Autora.

A figura 5 acima representa o espectro vibracional na região do infravermelho médio da molécula OGP(10-14) após o processo de purificação. As bandas identificadas que são de grupos funcionais característicos do pentapeptídeo estão indicadas na própria figura 5. Demais bandas não listadas são provavelmente de resíduos de solvente.

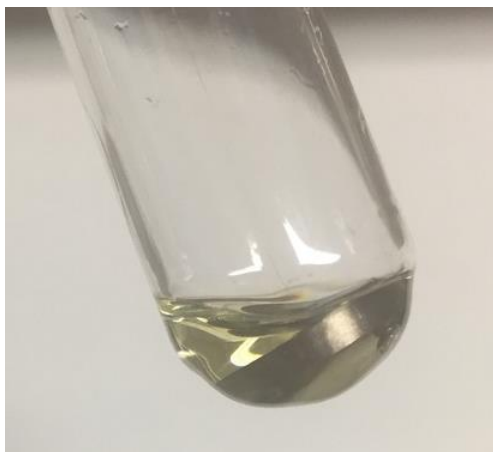
4.2 Modificação de superfície com agente silano e OGP(10-14)

4.2.1 Método 1

Conforme descrito anteriormente, os discos de titânio foram pré tratados com uma mistura 1:1 de metanol e ácido clorídrico concentrado, e depois com ácido

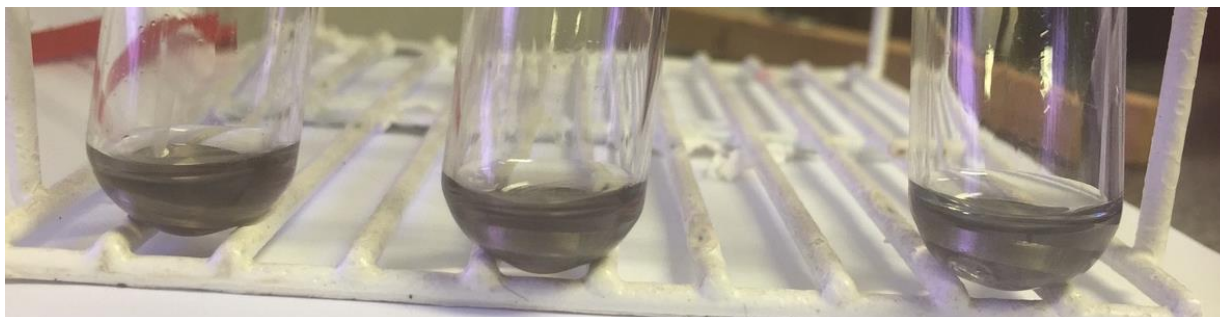
sulfúrico concentrado, para limpar os discos e deixar sua superfície com hidroxilas; e submetidos a um sistema de refluxo a 120°C por 3 horas. Após o fim da reação, foi realizado o teste de Kaiser, que está representado nas figuras 6 e 7 a seguir.

Figura 6: Adição dos reagentes A, B e C à amostra.



Fonte: Autora.

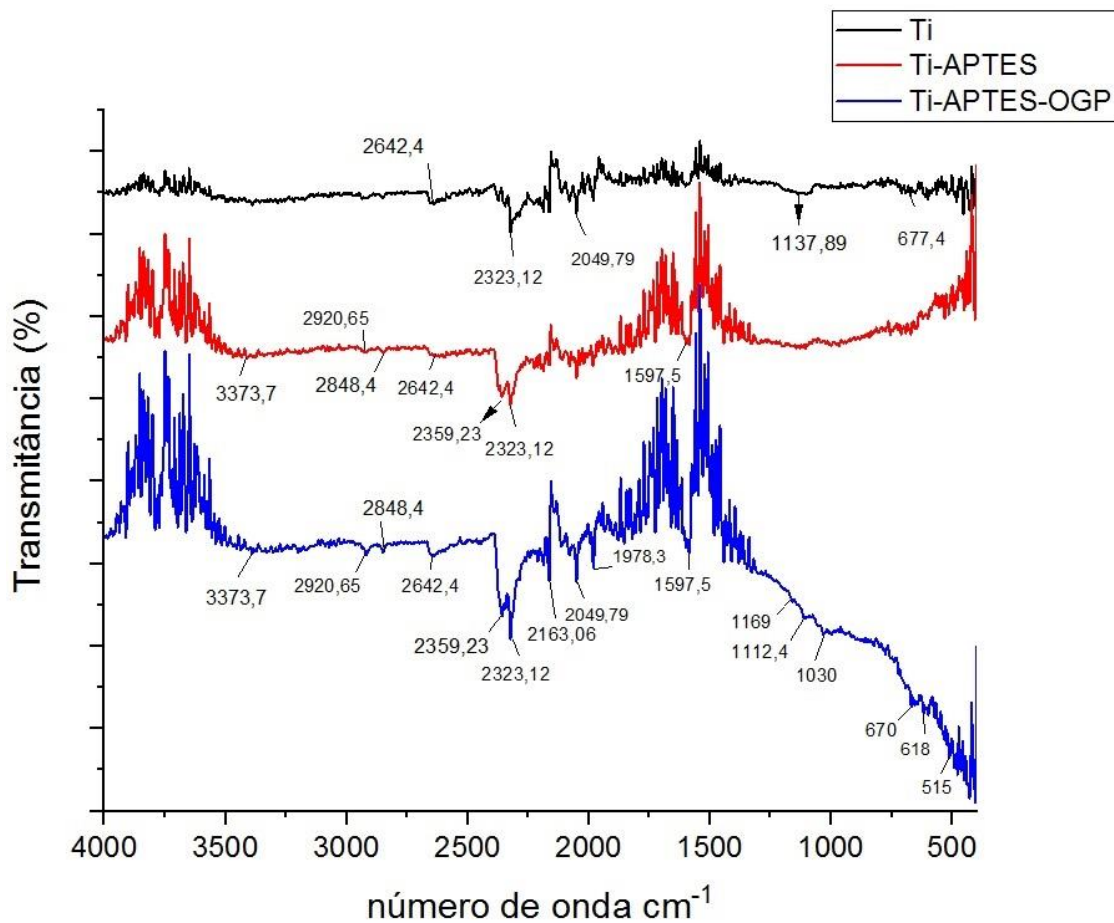
Figura 7: Resultado obtido do teste de Kaiser.



Fonte: Autora.

É possível observar que a solução contendo as amostras resultou em uma coloração levemente azulada, indicando a presença dos aminogrupos livres na superfície decorrentes da funcionalização com o APTES. Como este é apenas um teste qualitativo, empregou-se também as técnicas de FTIR-ATR e MFA, conforme descritas anteriormente na seção 3.2.2.

O peptídeo OGP(10-14) foi incorporado utilizando a mesma metodologia de acoplamento de sua síntese, descrita anteriormente; solução $1 \cdot 10^{-5}$ M do peptídeo, 100 μ L de solução 20% de piperidina, 153 μ L de DIC e 0,134g de HOAt, sob agitação por 2 horas. Após reação, a amostra foi lavada e caracterizada. A faixa de concentração em que o peptídeo apresenta atividade biológica vai da ordem de 10^{-5} a 10^{-9} mol.L⁻¹ [16,36].

Figura 8: Resultado obtido do infravermelho.

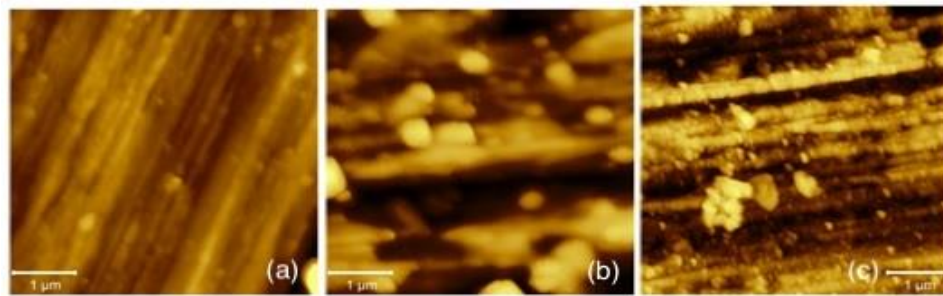
Fonte: Autora.

A figura 8 acima mostra os espectros de infravermelho das amostras contendo apenas titânio, titânio funcionalizado com APTES e titânio funcionalizado com ambos APTES e OGP(10-14). Observa-se um padrão de interferência bem definido nas três amostras, muito provavelmente resultante da interação dos discos de titânio com o suporte do equipamento, que impede a leitura das bandas características do APTES. Entretanto, a amostra contendo OGP apresentou um pequeno ombro, quando comparada com as outras duas, na mesma região em que estão as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula do peptídeo puro, representado pela figura 5, indicando sua presença. Para confirmar a funcionalização de ambos APTES e OGP, realizou-se medidas de MFA, indicadas nas figuras 9 e 10, a seguir.

A Microscopia de Força Atômica ^[37] é uma técnica que consiste em uma sonda, com uma fina ponta presa a sua haste (cantiléver), que interage fisicamente com a superfície da amostra de interesse por força de Van der Waals, durante uma varredura

em X,Y. No caso do modo contato intermitente, utilizado neste trabalho, a força exercida na ponta de silício pela superfície da amostra é atrativa. Nesse modo de análise, a força causa uma alteração no valor da amplitude do cantiléver oscilante, sendo lida também através a reflexão e detecção de um laser. Essas alterações dependem das diferenças de altura na superfície, que o sistema registra para cada X e Y. Uma imagem de MFA é um conjunto de coordenadas espaciais com o qual podem ser produzidas representações tridimensionais, seções de corte para medir alturas e determinações de rugosidade.

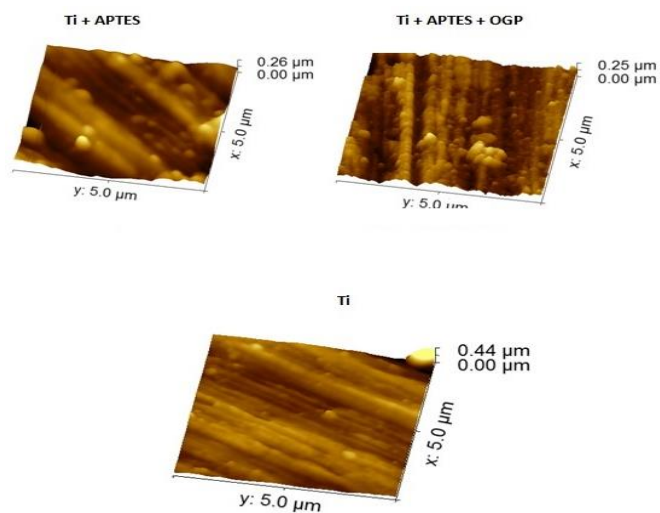
Figura 9: Micrografias de força atômica - representação 3D, sendo (a) Ti, (b) Ti+APTES e (c) Ti+APTES+OGP.



Ti+APTES+OGP.

Fonte: Microscópio do Grupo de Fisico-Química de Materiais, Instituto de Química, UNESP Araraquara. Operado em 01/07/2019.

Figura 10: Micrografias de força atômica - topografia.



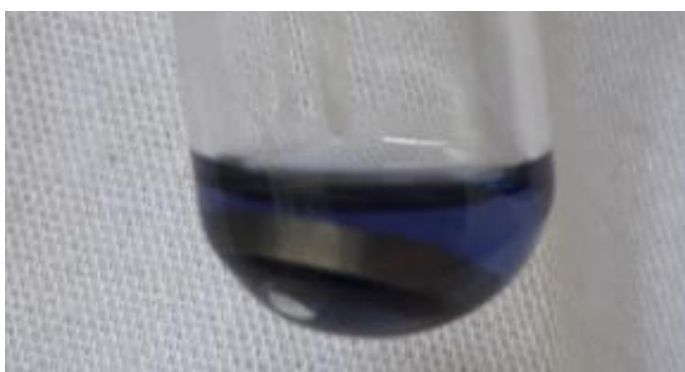
Fonte: Microscópio do Grupo de Fisico-Química de Materiais, Instituto de Química, UNESP Araraquara. Operado em 01/07/2019.

Analisando os resultados obtidos pelo microscópio de força atômica, nota-se que ambas as amostras contendo APTES e OGP apresentam clusters de átomos presentes na superfície de titânio. As micrografias de topografia mostram que a rugosidade da superfície contendo APTES é maior do que a superfície de titânio limpa, mostrando aglomerados pontuais, correspondentes aos aminogrupos presentes na extremidade da molécula de APTES, livres na superfície. Por sua vez, a superfície contendo OGP e APTES apresenta um aglomerado maior de átomos do que a superfície contendo apenas APTES, conforme esperado, confirmando a funcionalização dos discos de titânio.

4.2.2 Método 2

Apesar de ter sido possível funcionalizar os discos de titânio com ambos APTES e o peptídeo através do método 1 de pré tratamento e silanização, notou-se com o decorrer dos experimentos que este método deu certo uma vez, mas não foi reproduzível, além de envolver solvente orgânico (tolueno), ter um longo tempo de reação e condições intensas. Optou-se então por utilizar um método diferente, mais brando e mais rápido, descrito na seção 3.1.2, para realizar a funcionalização das amostras com agente silano. Após pré tratamento e silanização das amostras, realizou-se o teste de Kaiser.

Figura 11: Resultado obtido do teste de Kaiser (método 2).



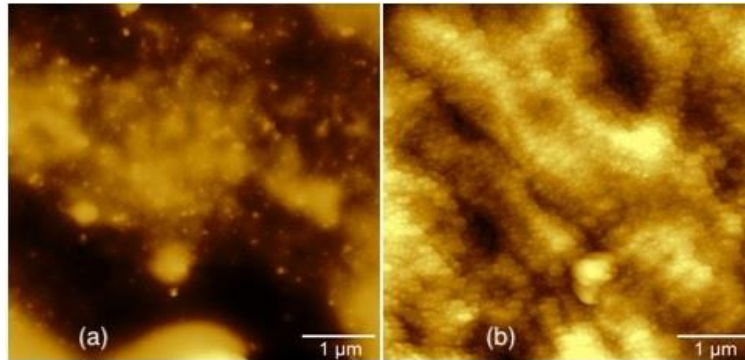
Fonte: Autora.

A figura 11 acima representa o resultado do teste qualitativo de Kaiser. Observa-se que, comparado ao teste realizado após utilização do método 1 de pré tratamento e silanização, este apresentou uma coloração azul mais intensa, sendo indicativa possivelmente de uma maior presença de grupos amina livres na superfície.

Em seguida, o OGP(10-14) foi incorporado utilizando a mesma solução 1.10^{-5} mol.L⁻¹ do peptídeo, 100 µL de solução 20% de piperidina, 153 µL de DIC e 0,132 g

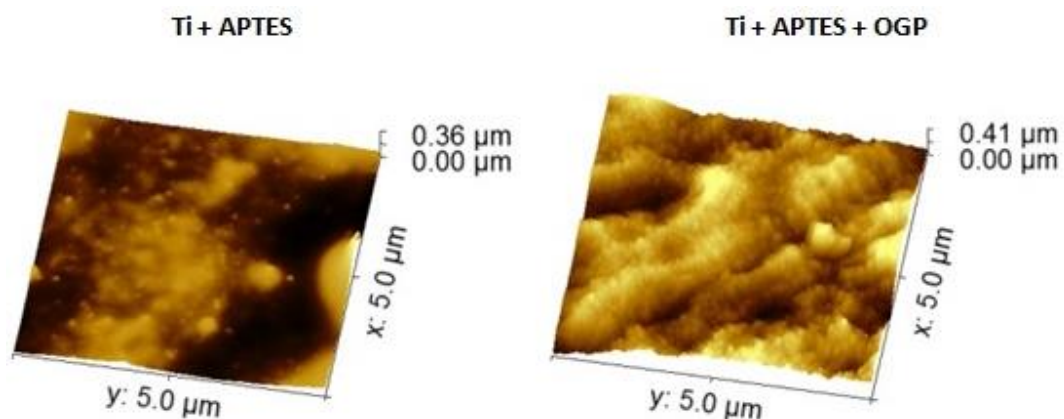
de HOAt, sob agitação por 2 horas. Após reação, a amostra foi lavada, e fizeram-se novas medidas de microscopia de força atômica.

Figura 12: Micrografias de força atômica - representação 3D, sendo (a) Ti+APTES e (b) Ti+APTES+OGP.



Fonte: Microscópio do Grupo de Físico-Química de Materiais, Instituto de Química, UNESP Araraquara. Operado em 12/11/2019.

Figura 13: Micrografias de força atômica - topografia.



Fonte: Microscópio do Grupo de Físico-Química de Materiais, Instituto de Química, UNESP Araraquara. Operado em 12/11/2019.

Analisando as imagens obtidas, representadas pelas figuras 12 e 13, nota-se um aumento significativo da quantidade de átomos na superfície, tanto na amostra contendo APTES quanto na amostra contendo ambos APTES e OGP; em comparação às imagens obtidas para o método 1. Além disso, novamente é possível observar que a rugosidade da superfície contendo o peptídeo é maior que a da contendo apenas o APTES, conforme esperado; comprovando a funcionalização bem sucedida das superfícies.

4.3 Modificação de superfície com hidroxiapatita e OGP(10-14)

O recobrimento dos discos de titânio com HA foi feito em duas etapas, conforme descrito anteriormente na seção 3.1.3. As tabelas 6 e 7 a seguir indicam as composições das soluções utilizadas.

Tabela 6: Composição da solução SBF-A.

| Reagente | Kokubo[34] (mol) | SBF-A (mol) | Massa teórica - para 250 mL de solução (g) | Massa real - para 250 mL de solução (g) |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|--|---|
| NaCl | 0,1368 | 0,6840 | 9,9937 | 9,9984 |
| NaHCO ₃ | 4,166.10 ⁻³ | 0,02083 | 0,4375 | 0,4380 |
| Na ₂ HPO ₄ | 9,990.10 ⁻⁴ | 4,995.10 ⁻³ | 0,1773 | 0,1785 |
| MgCl ₂ | 1,500.10 ⁻³ | 7,501.10 ⁻³ | 0,3812 | 0,3892 |
| CaCl ₂ | 2,505.10 ⁻³ | 0,01252 | 0,3475 | 0,3486 |

Fonte: Autora.

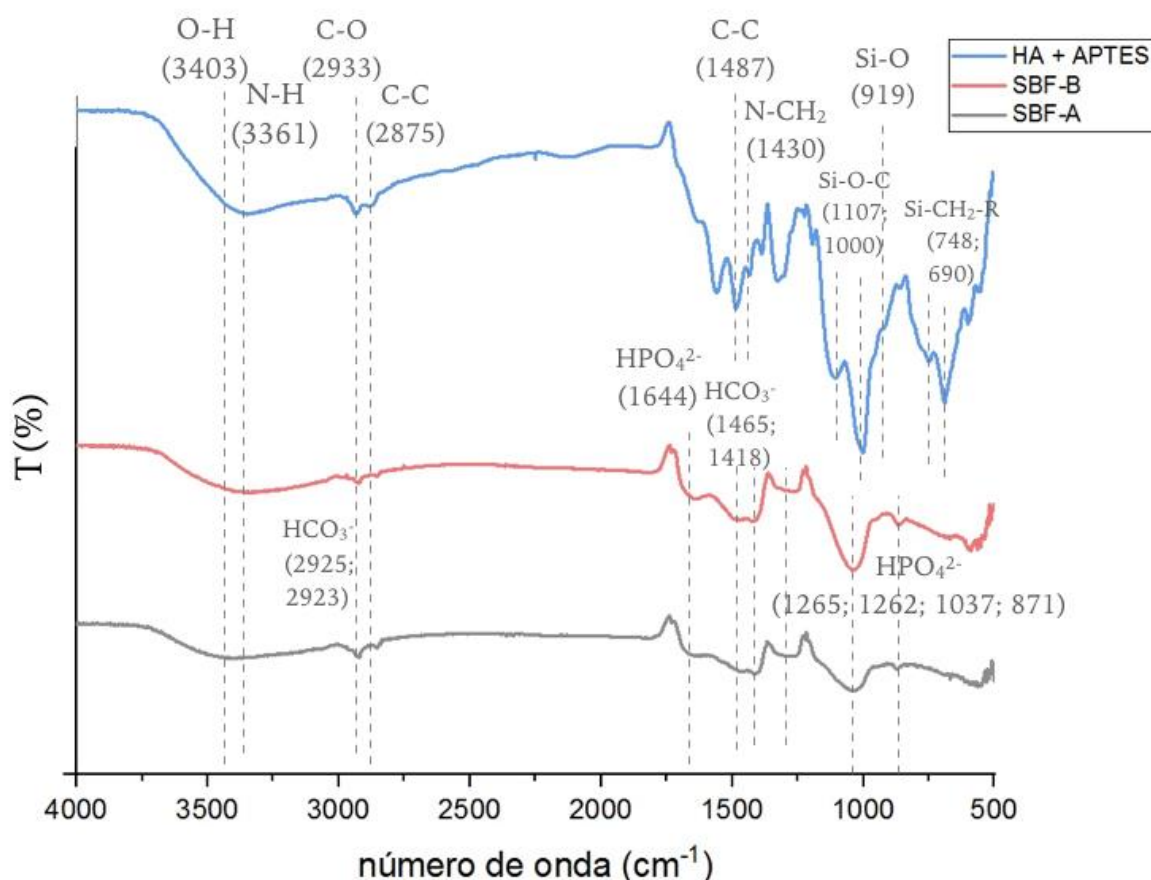
Tabela 7: Composição da solução SBF-B.

| Reagente | Kokubo[34] (mol) | SBF-B (mol) | Massa teórica - para 250 mL de solução (g) | Massa real - para 250 mL de solução (g) |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|--|---|
| NaCl | 0,1368 | 0,6840 | 9,9937 | 9,9934 |
| NaHCO ₃ | 4,166.10 ⁻³ | 0,01050 | 0,2206 | 0,2236 |
| Na ₂ HPO ₄ | 9,990.10 ⁻⁴ | 4,995.10 ⁻³ | 0,1773 | 0,1760 |
| MgCl ₂ | 1,500.10 ⁻³ | 7,501.10 ⁻³ | 0,3812 | 0,3817 |
| CaCl ₂ | 2,505.10 ⁻³ | 0,01252 | 0,3475 | 0,3490 |

Fonte: Autora.

Após 24h de imersão em cada uma das soluções, foi realizada a silanização seguindo o método 2, descrito anteriormente, e a incorporação do peptídeo da mesma forma. As amostras foram então caracterizadas.

Figura 14: Resultado obtido do infravermelho para amostras de HA.



Fonte: Autora.

A figura 14 acima mostra os espectros de infravermelho das amostras contendo apenas SBF-A depositado (linha preta), SBF-A e SBF-B depositados (linha vermelha) e as duas camadas de SBF recobertas com APTES (linha azul). Analisando os três gráficos nota-se que as curvas correspondentes as camadas de SBF são semelhantes entre si, e batem com as encontradas na literatura, conforme esperado; por esta técnica foi possível identificar a presença dos grupos carbonato e difosfato. Observa-se também que a curva contendo as duas camadas de SBF e APTES é semelhante as outras duas, e contém também as bandas características da molécula de APTES; confirmando assim a funcionalização da hidroxiapatita. As bandas identificadas em todas as 3 curvas estão resumidas na própria figura 14.

Após a funcionalização da HA com o APTES, incorporou-se o peptídeo OGP(10-14) seguindo a mesma metodologia anteriormente mencionada, e empregou-se a técnica de caracterização por DRX.

Os raios X ^[39] são ondas eletromagnéticas de comprimento de onda da ordem de 0,1 a 100 Å. O fenômeno de difração de raios x nada mais é do que o espalhamento coerente resultante da interação entre as ondas de radiação eletromagnética, ou raios x, e os elétrons dos átomos do material de interesse. Por sua vez, a técnica de difratometria de raios x consiste em um feixe incidente, que ao interagir com a amostra, gera uma interferência construtiva, devolvendo o feixe difratado para o detector. Para materiais cristalinos, ou seja, materiais cujos átomos estão periodicamente ordenados e arranjados no espaço, a Lei de Bragg, representada

pelas relações matemáticas abaixo, explica a relação entre: a distância percorrida a mais pela onda em interferência construtiva (x), a distância interplanar (d), o comprimento de onda do feixe incidente (λ) e o ângulo de incidência deste mesmo feixe (θ). A figura 15 ilustra uma situação em que se aplica a Lei de Bragg.

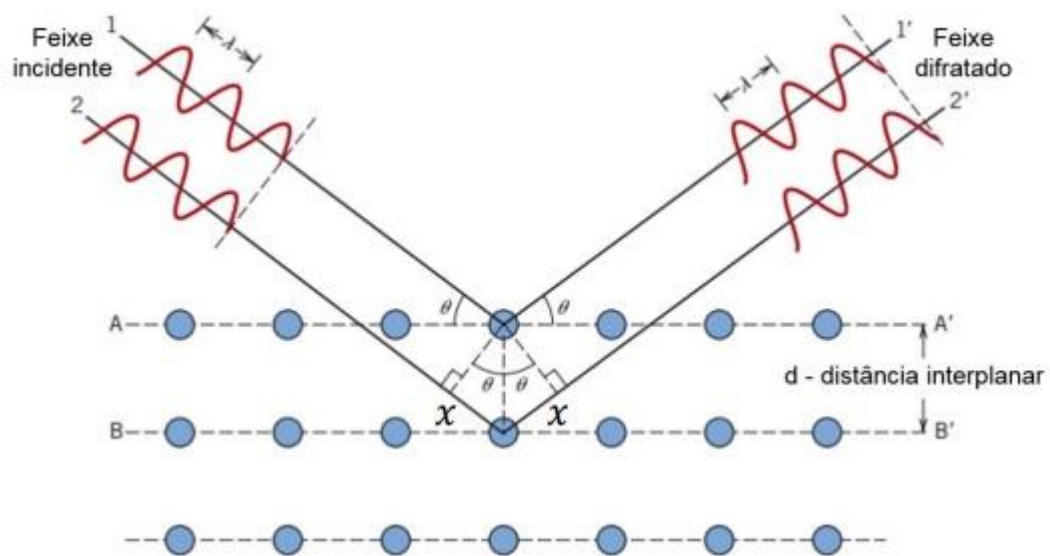
$$N\lambda = x + x \quad (\text{Eq. 1})$$

$$x = d \cdot \sin \theta \quad (\text{Eq. 2})$$

Somando as duas equações temos a **Lei de Bragg**:

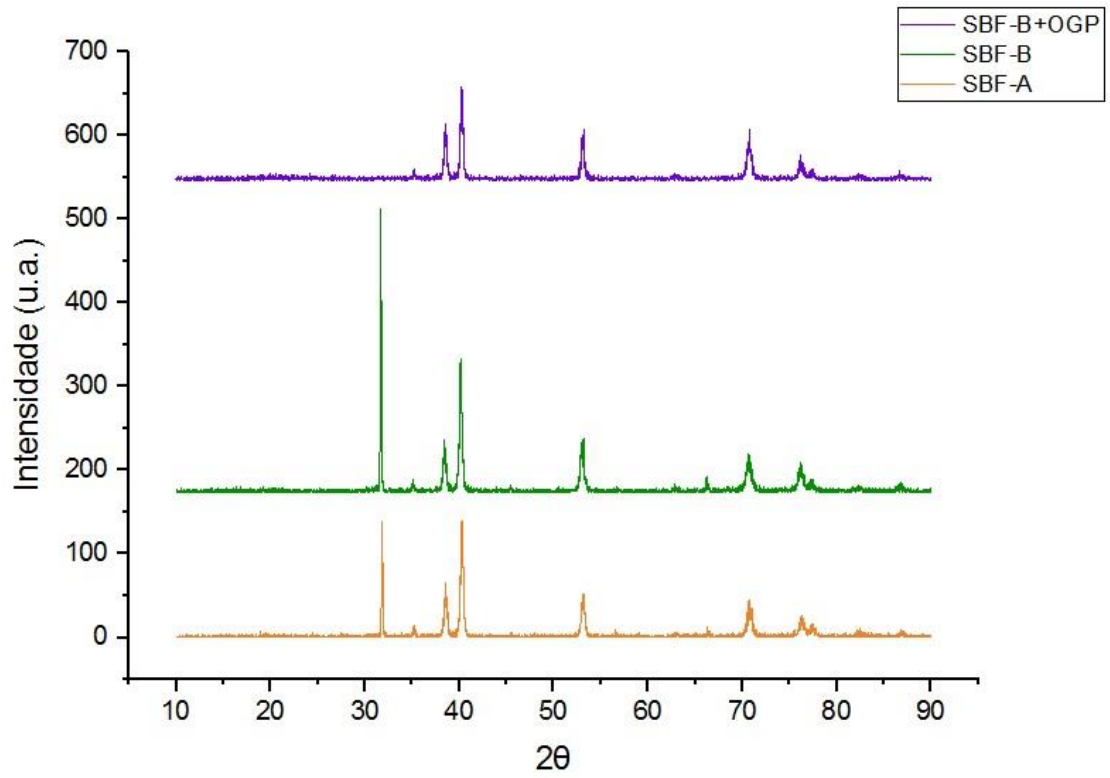
$$N\lambda = 2d \cdot \sin \theta; \text{ sendo } N = 1, 2, 3, \dots, N$$

Figura 15: Explicação da Lei de Bragg.

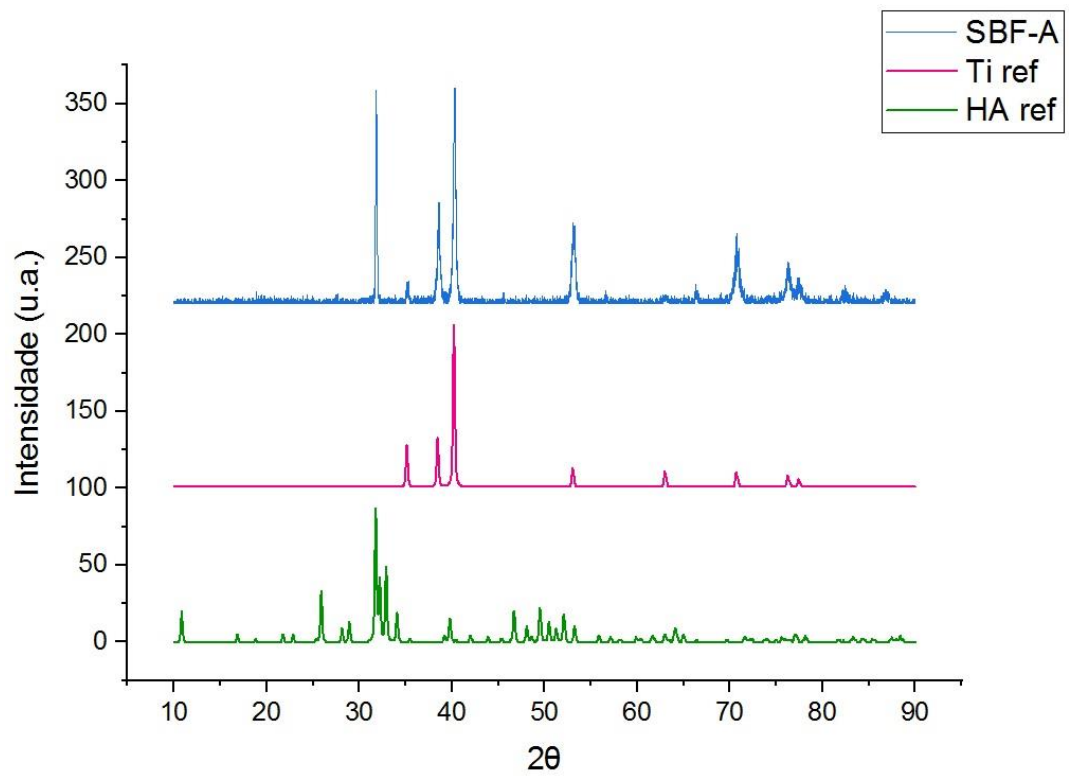


Fonte: EEL USP. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4139679/mod_resource/content/1/Aula%204_Difra%C3%A7%C3%A3o%20de%20Raios%20X.pdf. Acesso em 21/11/2019.^[39]

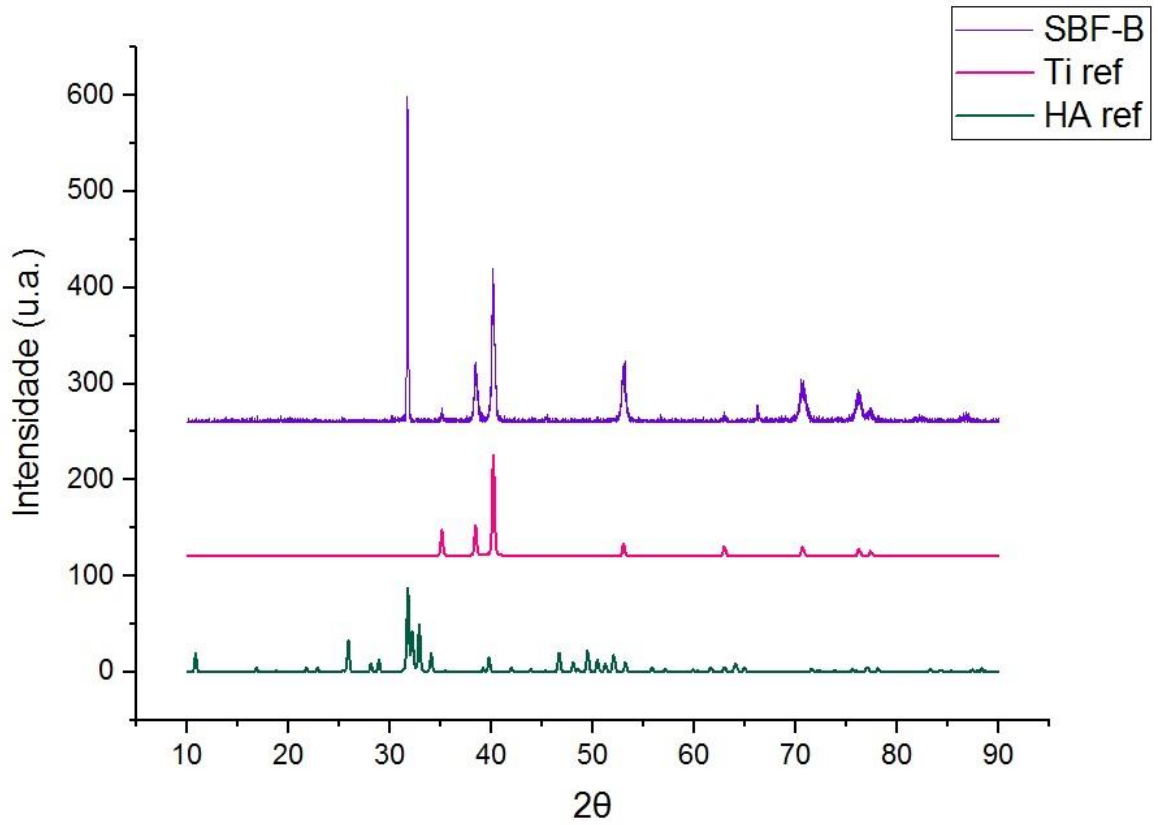
Utilizou-se a base de dados *Crystallographic Search Match* para encontrar os difratogramas de referência para o titânio e para a HA. A figura 16 indica um comparativo entre os difratogramas resultantes das amostras, enquanto que as figuras 17, 18 e 19, a seguir, comparam individualmente as amostras com os difratogramas de referência.

Figura 16: Resultados da técnica de DRX.

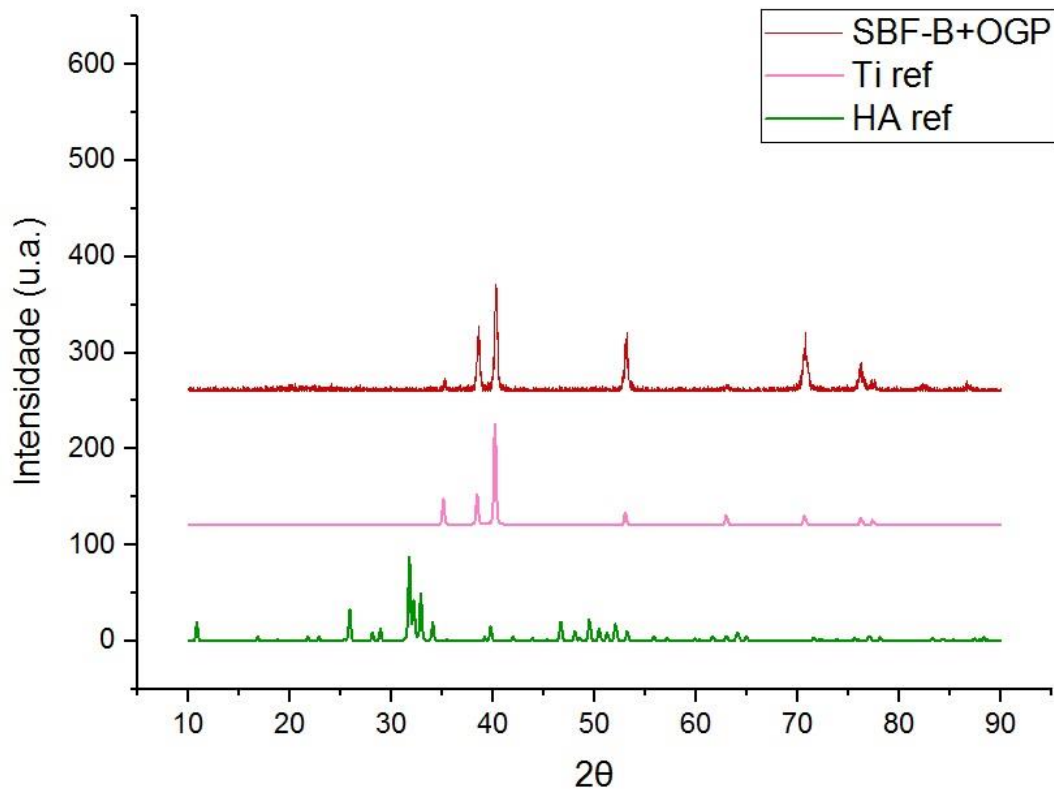
Fonte: Autora.

Figura 17: Sobreposição das referências a amostra 1.

Fonte: Autora.

Figura 18: Sobreposição das referências a amostra 2.

Fonte: Autora.

Figura 19: Sobreposição das referências a amostra 3.

Fonte: Autora.

Observando a figura 16, nota-se que todas as amostras possuem um perfil cristalino, e as amostras contendo apenas as camadas de SBF resultaram em difratogramas semelhantes, conforme esperado, com o pico mais intenso em aproximadamente $31,9^\circ$; enquanto que a amostra contendo APTES e o peptídeo incorporado, além das camadas de HA, não apresenta este pico.

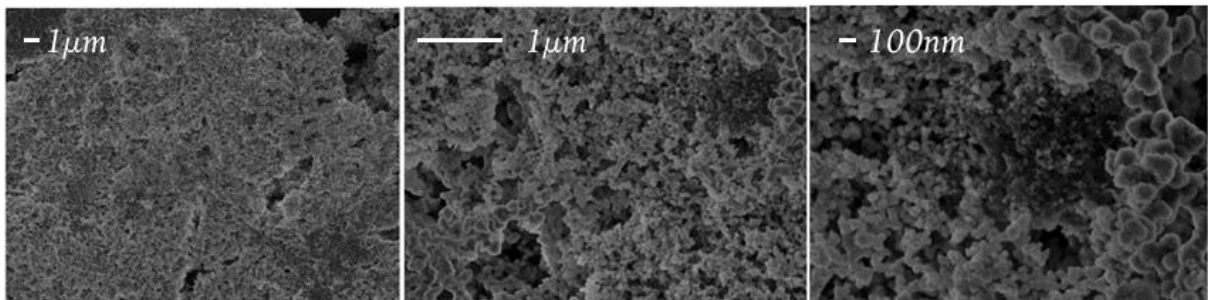
Na figura 17 está representada a amostra que contém apenas a camada SBF-A em sua superfície. Comparando com os difratogramas de referência, observa-se que a amostra apresenta todos os picos característicos do titânio metálico, e apenas o pico mais intenso característico da HA. Provavelmente, este pico mais intenso em $31,9^\circ$ é devido à conformação de maior ocorrência dos cristais, na porção do material em que foi incidido o feixe de raios x; fazendo com que os outros picos característicos, quando comparados à intensidade deste maior, não tenham sido identificados pelo detector do equipamento com intensidade suficiente para aparecerem no difratograma final.

Já a figura 18, representa a amostra contendo a dupla camada de HA, resultante da deposição das soluções SBF-A e SBF-B. Assim como na figura anterior, comparando-se esta amostra aos difratogramas de referência é possível observar os picos característicos do titânio metálico, e o da conformação de maior ocorrência da HA; sendo este último ainda mais intenso do que o presente na amostra anterior. Com isso, infere-se que esta amostra contém uma quantidade maior de HA depositada em sua superfície.

Por fim, a figura 19 representa a amostra que após ser recoberta com HA, foi modificada com APTES e o peptídeo OGP(10-14). O difratograma resultante, quando comparado aos de referência, mostra apenas os picos característicos do titânio metálico. Com isso, pode-se chegar a duas hipóteses: o processo de incorporação do peptídeo acabou retirando a HA da superfície, e além de não dar certo limpou o disco de titânio; ou o processo de incorporação do peptídeo ocorreu com sucesso recobrando toda a camada de HA, de forma que o detector do DRX não identificou sua presença e também não interagiu com o peptídeo da superfície. Assim, para tirar a dúvida, realizaram-se medidas de microscopia eletrônica de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG).

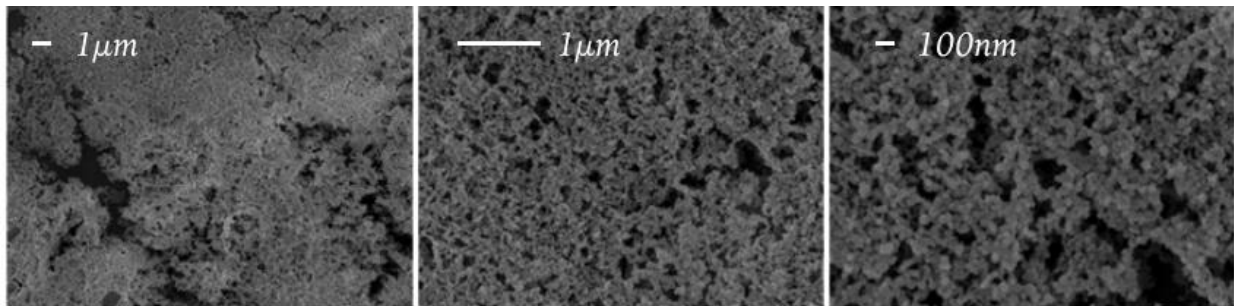
A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura ^[40-42] consiste em um feixe de elétrons primário que é criado, condensado e focalizado através de lentes eletromagnéticas, até chegar a amostra. Este feixe interage com o material da amostra, fazendo uma varredura em X, Y, gerando vários sinais, como por exemplo de elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger e raios X característicos das substâncias que compõem a superfície do material analisado. Contudo, para ser submetida a este tipo de técnica, a amostra deve ter a superfície condutora, para interagir com o feixe de elétrons emitido pelo microscópio de forma que a imagem gerada tenha uma melhor qualidade de definição. Como a HA é conhecida por ser isolante, foi necessário realizar um recobrimento da superfície das amostras com uma camada fina de carbono (cerca de 5 nm), antes da análise. Outra possibilidade de recobrimento para tornar a amostra condutora é com uma camada fina de ouro, mas para o objetivo deste trabalho, o recobrimento de carbono foi suficiente. As figuras 20 a 24 a seguir mostram as imagens resultantes dos sinais de elétrons secundários, enquanto que as figuras 25 a 29 representam a análise química qualitativa da composição da superfície, por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Figura 20: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-A puro.



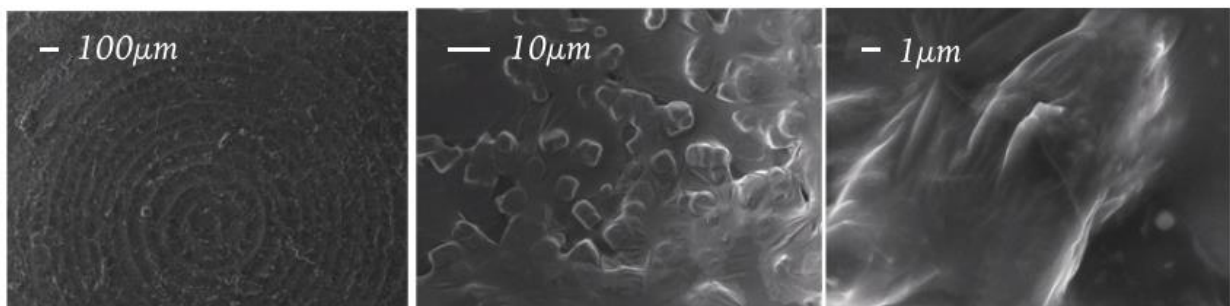
Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 21: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-B puro.



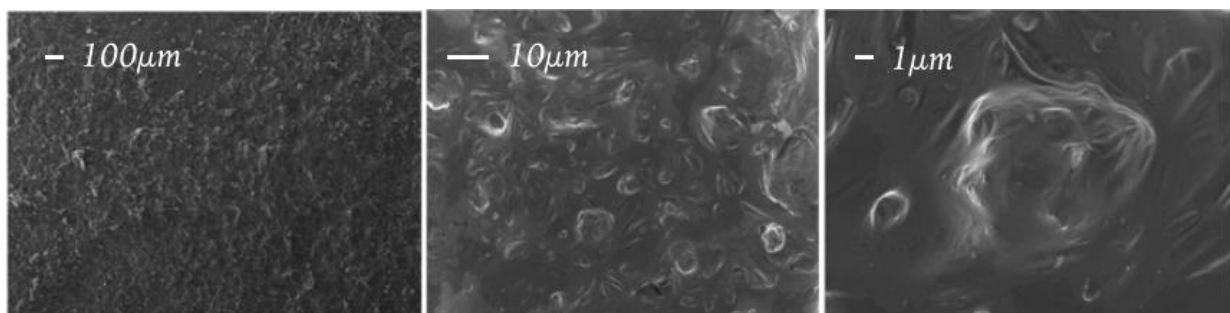
Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 22: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-A + Ti.



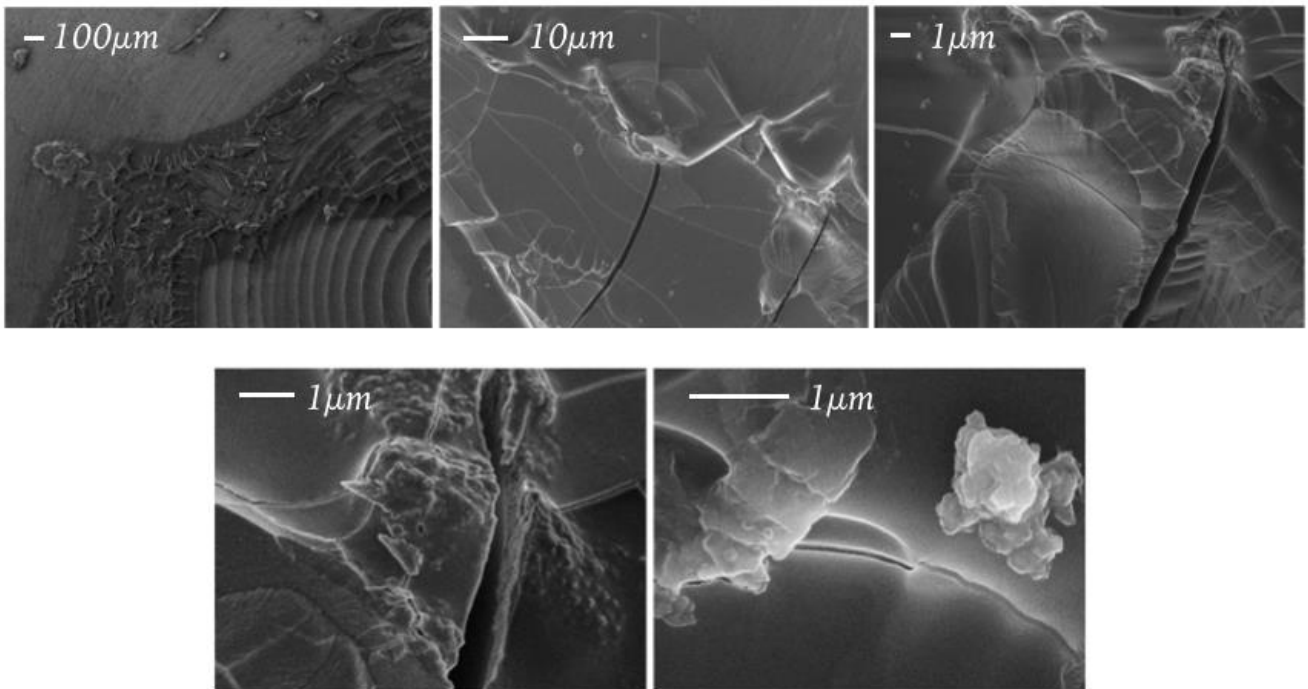
Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 23: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – SBF-B+SBF-A+ Ti.



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

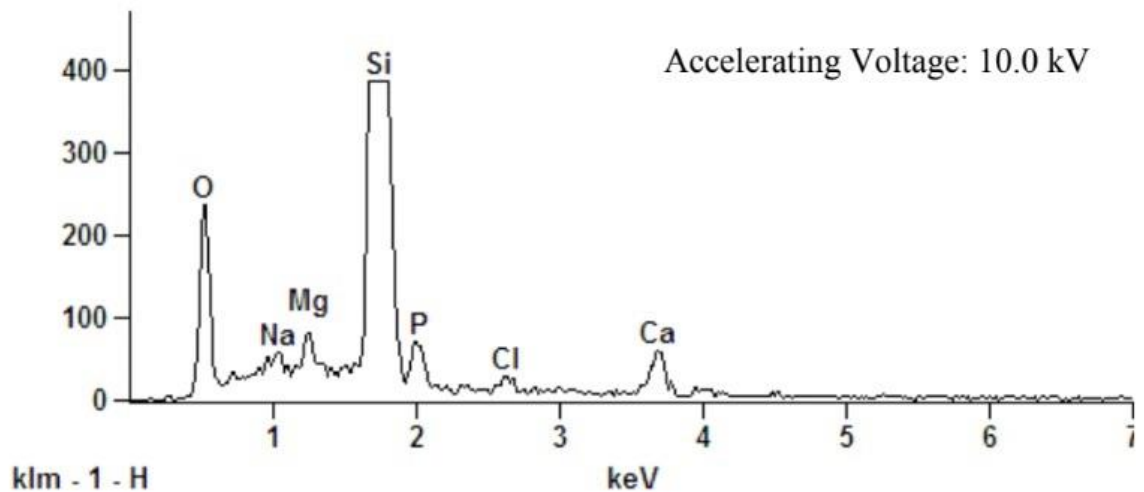
Figura 24: Micrografias eletrônicas de varredura – elétrons secundários – OGP(10-14)+HA+Ti.



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 25: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-A puro.

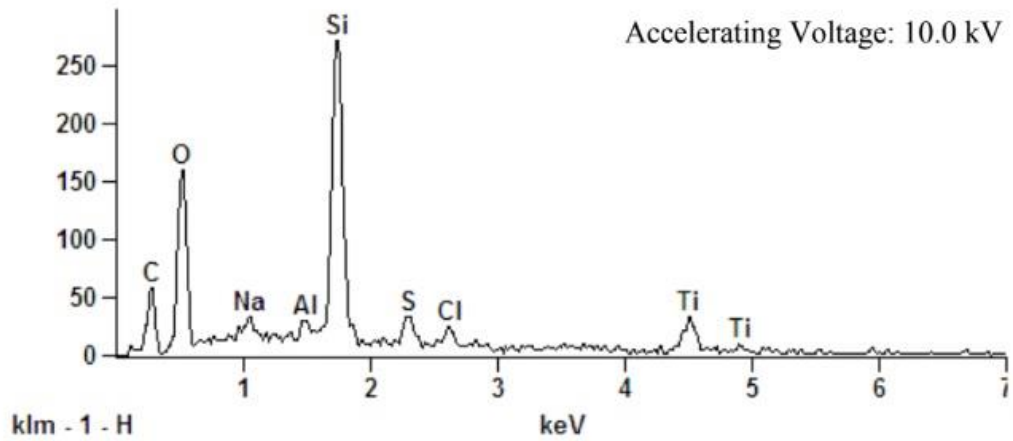
Full scale counts: 387



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 26: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-A+Ti.

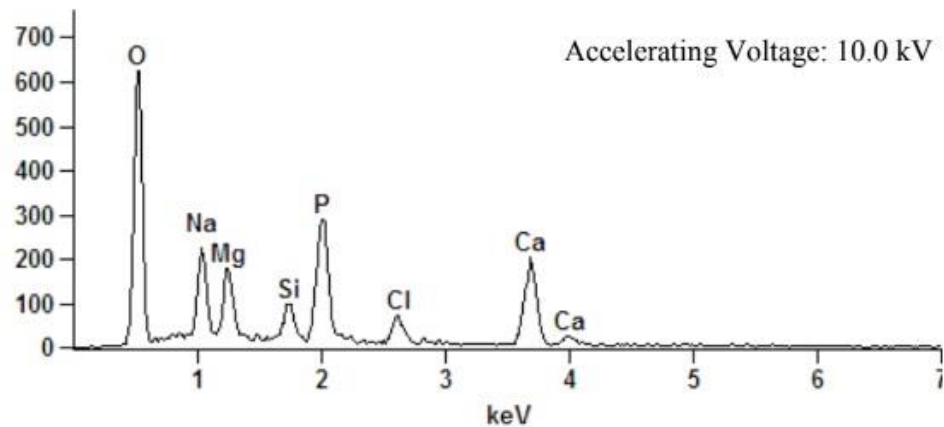
Full scale counts: 272



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 27: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-B puro.

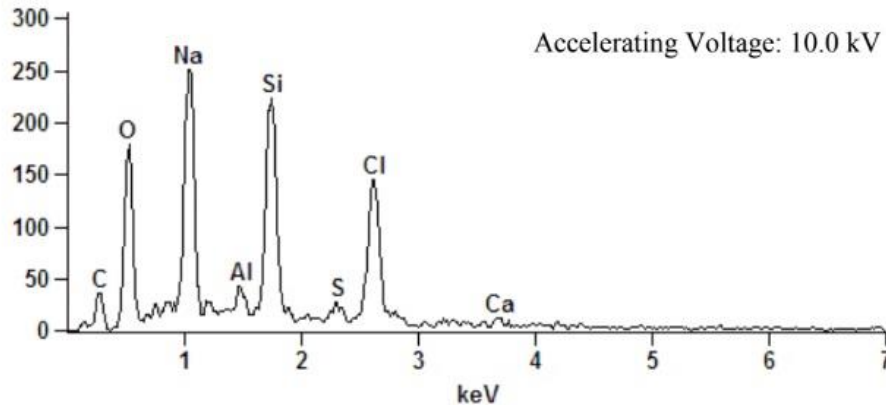
Full scale counts: 624



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 28: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – SBF-B+SBF-A+Ti.

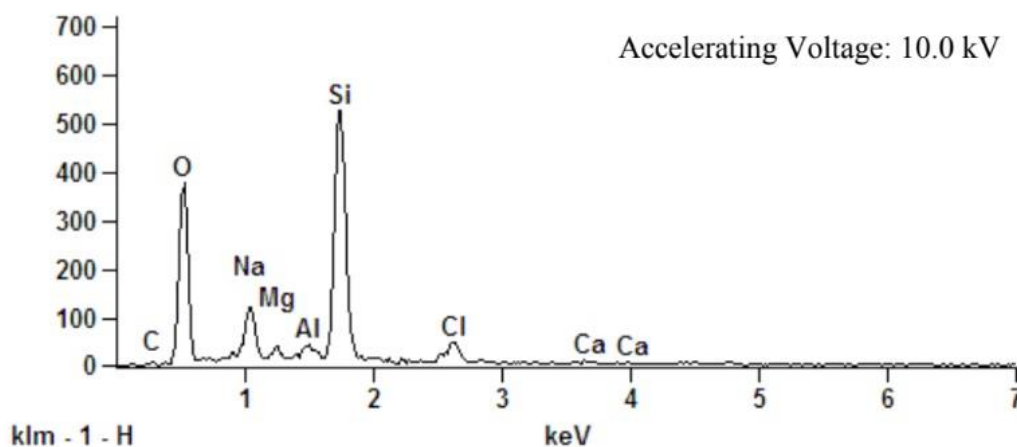
Full scale counts: 251



Fonte: Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura – EDS – OGP(10-14)+HA+Ti.

Full scale counts: 526

**Fonte:** Microscópio do CCDPN, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Comparando as imagens das figuras 20 e 21 é possível observar a morfologia granulosa da hidroxiapatita bem definida; e nota-se também que o SBF-B puro recobriu mais o substrato do que o SBF-A puro. Devido à menor quantidade molar de HCO_3^- presente no SBF-B em relação à composição do SBF-A, o crescimento dos cristais foi favorecido, gerando uma camada mais espessa e uniforme.

Analisando agora as imagens das figuras 20 e 22, observa-se que o recobrimento realizado pelo SBF-A na superfície de Ti foi bem fino, visto que é possível enxergar os sulcos da usinagem do disco de titânio. Além disso, nota-se que os grãos do SBF-A depositados na superfície foram encapsulados por uma camada de filme, provavelmente devido à formação de óxido pelo contato da amostra com o ar; já que a microscopia não foi realizada no mesmo dia de confecção das amostras.

Por sua vez, as imagens da figura 23 mostram que o recobrimento foi mais eficiente com a adição das duas camadas da HA, visto que não se enxerga mais os sulcos da usinagem do disco metálico, mas uma imagem semelhante à ampliação de 25000 vezes da figura 21. Nota-se também a presença do filme encapsulando os grãos de HA, os quais aparecem em maior quantidade do que na amostra contendo apenas uma camada de HA.

A figura 24, por fim, mostra imagens que comprovam a hipótese de que parte do recobrimento duplo de HA foi perdido na tentativa de incorporar o peptídeo OGP(10-14) à superfície; pois novamente enxerga-se os sulcos de usinagem do disco de titânio. Ao mesmo tempo é possível identificar pela amplificação em 15000 vezes, a presença dos grãos característicos da HA, recobertos por uma camada de filme aparentemente mais espesso do que nas outras amostras, a ponto de craquelar. Além disso, observa-se pela amplificação em 25000 vezes, aglomerados de átomos maiores do que os característicos da HA mostrados na figura 21; fato este indicativo da presença do penta peptídeo na superfície.

O espectro de energia dispersiva contido na figura 25 mostra a composição esperada para a camada SBF-A, representando as quantidades dos átomos de maior valor estatístico para a porção de material analisada – O, Na, Mg, P, Cl e Ca - e contendo uma quantidade significativa de bicarbonato de sódio em relação à segunda camada. Comparando com a figura 26, os picos que representam os átomos mais recorrentes na porção analisada agora englobam C, O, Na e Cl referentes à HA; Ti e

Al referentes à composição do disco metálico (substrato), e provavelmente contaminação de S. Em ambas as figuras nota-se também um pico de intensidade elevada referente ao átomo de Si, que no caso da figura 25 é atribuído à composição conhecida do substrato utilizado; e no caso da figura 26 provavelmente não é contaminante pela alta intensidade, mas como esta amostra não foi silanizada e o substrato é o disco de Ti, pode ser que este Si faça parte de uma liga metálica que compõe o disco (substrato).

Já no EDS representado na figura 27, observa-se os mesmos átomos, em quantidade estatisticamente mais relevantes para a porção analisada, que aparecem na representação da figura 25, como esperado, já que a amostra consiste na segunda camada do mesmo material. Além disso observa-se que o espectro da figura 27 contém uma quantidade significativamente mais alta de HPO_4^{2-} , indicada pelo aumento da intensidade dos picos de O e P; evidenciado pelo fato de que esta camada possui uma menor quantidade molar de bicarbonato. Ainda no mesmo espectro é possível identificar o átomo de Si, neste caso proveniente do substrato utilizado. Sua menor intensidade em relação ao Si relativo ao substrato da amostra de SBF-A puro comprova a ocorrência de um recobrimento mais espesso da superfície, devido à dupla camada de HA depositada.

Em seguida, analisando a figura 28 percebe-se a presença dos componentes da HA esperados, além do pico referente ao Si, que neste caso pode ser tanto contaminante, juntamente com o átomo de S, quanto parte da composição do substrato, bem como o átomo de Al; enfatiza-se que esta amostra não foi silanizada. Comparado ao espectro da figura 26, que continha apenas uma camada de HA, este indica uma maior quantidade estatisticamente relevante de C, O, Na, Cl, e também indica a presença de Ca, comprovando novamente a eficiência e homogeneidade do recobrimento duplo presente na superfície metálica.

Por fim, mas não menos importante, está o espectro representado pela figura 29, relativo à amostra à qual foi incorporado o peptídeo. Entre os átomos de maior valor estatístico para a porção analisada se encontram, C e O, podendo ser referentes tanto dos carbonatos e difosfatos da HA quanto do peptídeo nesta região; Na, Mg, Cl e Ca referentes à HA; o Si neste caso sendo referente também ao APTES, que foi funcionalizado nesta amostra; e o Al decorrente da composição do substrato metálico. Infere-se que o pico de alta intensidade de O neste espectro seja referente também à presença do penta peptídeo OGP(10-14), pois comparando-se com o pico de O do espectro da amostra contendo apenas a dupla camada de HA recobrimo o titânio, repara-se que o da amostra que contem o peptídeo possui uma maior intensidade do que o da amostra anterior.

5. Conclusão

Após analisar todos os resultados obtidos pelas medidas de caracterização realizadas neste trabalho, conclui-se que os discos de titânio foram funcionalizados com sucesso, com o biomaterial híbrido de APTES e OGP(10-14), enquanto que com o biomaterial híbrido de HA, APTES e OGP(10-14) houve uma perda significativa do recobrimento de HA, e não foi possível identificar o quanto de peptídeo estava funcionalizado.

Entre as perspectivas futuras de pesquisa estão incorporar o peptídeo ao titânico recoberto de HA de uma outra forma, realizar testes de XPS para identificar e quantificar a presença do peptídeo na superfície; caso dê certo, determinar a intensidade da bioatividade destes biomateriais através de estudos in vitro, com

células pré-osteoblásticas por exemplo; além de testes de compatibilidade sanguínea (hemólise); tudo isso com o objetivo de avaliar qual a viabilidade de aplicação destes biomateriais a próteses e implantes, ortopédicos e dentais, que estão atualmente no mercado.

6. Referências Bibliográficas

1. BOSKEY, A.L.;SEEMAN, E.; LIAN,J.B.& STEIN, G.S. Dynamic of bone and cartilage metabolism. Second ed. Academic Press, 2006, p. 201-258.
2. BOSE, S.; VAHABZADEH, S.;BANDYOPADHYAY,A. Bone tissue engineering using 3D printing (Review). *Materials today Mag.* vol.16, no.12, 2013.
3. WILLIAMS, D. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29: 2941–2953.
4. EL-HAJJE, A.;KOLOS, E.C.;WANG,J.K.;MALEKSAEEDI,S.;HE,Z.;WIRIA, F.E.; CHOONG,C.;RUYS,A.J. A Physical and mechanical characterization of 3D printed porous titanium for biomedical applications (Article). Springer Science+Business Media. New York, 2014.
5. BAKIR, M. Haemocompatibility of titanium and its alloys. *J. Biomater. Appl.* 2012; 27: 3–15.
6. BRANEMARK P, HANSSON B, ADELL R, BREINE U, LINDSTROM J, HALLEN O, OHMAN A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* 1977; 16: 1–132.
7. XIAO S-J, KENAUSSIS G, TEXTOR M. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications (eds. eds. Brunette D M, Tengvall P, Textor M, Thompson P), Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg 2001; 417–455.
8. MAS-MORUNA C, ESPANOL M, MONTUFAR E, MESTRES G, APARICIO C, JAVIER F, GINEBRA M. Biomaterials Surface Science (eds. Taubert A, Mano J F, Rodríguez-Cabello J C), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2013; 337–374.
9. KULKARNI, M.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; IGLIC, A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *Nanomedicine UK Central Press*, p. 111-136.
10. KIM, H.;MIYAJI, F.;KOKUBO, T.;NAKAMURA, T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment (Article). *Journal of Biomedical Materials Research*, vol.32, p. 409-417, 1996.
11. DABROWSKI, B.;SWIESZKOWSKI, W.;GODLINSKI, D.;KURZYDLOWSKI, K.J. Highly porous titanium scaffolds for orthopedic applications (Article). *Wiley Periodicals, Inc.*, 2010.
12. LE GUEHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.;LAROYLLE, P.;AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration (Review). *Academy of Dental Materials*. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. 2007.
13. PATTANAYAK, D.K.; FUKUDA, A.;MATSUSHITA, T.;TAKEMOTO, M.; KOKUBO, T. ;NAKAMURA, T.; NISHIDA, N.;SASAKI, K.;FUJIBAYASHI, S. Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone – Fabrication by selective laser melting and chemical treatments (Article). *Acta Materialia Inc.* Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, 2010.
14. AMSO, Z.; CORNISH, J.; BRIMBLE, M. A. Short Anabolic Peptides for Bone Growth (Review). Published on Wiley online library, 2016.
15. POUNTOS, I.; PANTELI, M.; LAMPROPOULOS, A.; JONES, E.; CALORI, G. M.; GIANNOUDIS, P. V. Open Acces. *BMC Medicine* (2016).
16. SASKA, S.;PIRES, L.C.; COMINOTTE, M.A.; OLIVEIRA, M. F.; MAIA, I.A.;SILVA, J.V.L.; RIBEIRO, S. J. L.; CIRELLI, J.A..Three dimensional printing

- and in vitro evaluation of poly3hydroxybutyrate scaffolds functionalized with osteogenic growth peptide for tissue engineering (Article). *Materials Science and Engineering*. C 89 (2018) 265–273. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
17. ZHAO, H.; HUANG, Y.; ZHANG, W.; GUO, Q.; CUI, W.; SUN, Z.; EGLIN, D.; LIU, L.; PAN, G.; SHI, Q. Mussel-inspired peptide coatings on titanium implant to improve osseointegration in osteoporotic condition. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4, 2505-2515.
 18. Agencia de notícias | IBGE. Disponível em: <agenciadenoticias.ibge.gov.br/Em-2017-expectativa-de-vida-era-de-76-anos>. Acesso em 17/11/2019.
 19. US census bureau 2011.
 20. Osteoporose, a silenciosa doença incapacitante que pode ser fatal. Disponível em:<bbc.com/portuguese/geral-49684343>. Acesso em 04/11/2019.
 21. XIAO, S. J.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; WIELAND, M.; KELLER, B.; SIGRIST, H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8, 867-872, 1997.
 22. BARANOWSKI, A.; KLEIN, A.; RITZ, U.; ACKERMANN, A.; ANTHONISSEN, J.; KAUFMANN, K. B.; BRENDL, C.; GOTZ, H.; ROMMENS, P. M.; HOFMANN, A. Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein. *PLOS one*. Open Access. Ed. Chi Zhang, University of Texas Southwestern Medical Center, UNITED STATES, 2016.
 23. BRAGARU, A.; KUSKO, M.; RADOI, A.; DANILA, M.; SIMION, M.; CRACIUNOIU, F.; PASCU, R.; MIHALACHE, I.; IGNAT, T. Microstructures and growth characteristics of polyelectrolytes on silicon using layer-by-layer assembly. *Cent. Eur. J. Chem.* 11(2), 2013, 205-214.
 24. TANG, W.; POLICASTRO, G.M.; HUA, G.; KAI, G.; ZHOU, J.; WESEMIOTS, C.; DOLL, G.L.; BECKER, M.L.; Bioactive surface modification of metaloxides via catechol bearing modular peptides - Multivalent binding surface retention and peptide bioactivity (Article). *Journal of the American Chemical Society*, 136, 16357–16367, 2014.
 25. LAI, M.; JIN, Z.; SU, Z. Surface modification of TiO₂ nanotubes with osteogenic growth peptide to enhance osteoblast differentiation. *Materials Science and Engineering*, C 73 (2017) 490-497.
 26. CHARLENA, S. G. S. & FAJAR, M. Hidroxyapatite Coating on CoCrMo Alloy Titanium Nitride Coated Using Biomimetic Method (Conference Paper Open Access). *Journal of Physics: Conference Series* 776 (2016) 012056.
 27. HABIBOVIC, P.; BARRERE, F.; BLITTERSWIJK, C. A. V.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Biomimetic hydroxyl apatite coating on metal implants (Article). *Journal of the American Ceramic Society*, vol.85, no.3, 2002.
 28. BERTAZZO, S.; ZAMBUZI, W.F.; CAMPOS, D. D. P.; OGEDA, T.L.; FERRIERA, C.V.; BERTRAN, C.A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion (Article). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Published by Elsevier B.V. All rights reserved, 2010.
 29. SUN, L.; BERNDT, C. C.; GROSS, K. A.; KUCUK, A. Material Fundamentals and Clinical Performance of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings: A Review. *John Wiley & Sons, Inc. J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 58: 570-592, 2001.
 30. AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. *Methods Mol. Biol.*, v. 298, p. 3-24, 2005.
 31. STEWART, J M and YOUNG, J D (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chemical Co, Rockford, IL.
 32. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=147077. Disponível em:

- <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosyl-glycyl-phenylalanyl-glycyl-glycine>>. Acesso em 16/11/2019.
33. T. KOKUBO, H. KUSHITANI, S. SAKKA, T. KITSUGI and T. YAMAMURO, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 721-734 (1990).
 34. O que é liofilização. Disponível em: <<https://liotop.com.br/o-que-e-liofilizacao/>> Acesso em 20/11/2019.
 35. Massa molar do Acetil-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly. Disponível em: <pepcalc.com>. Acesso em 20/11/2019.
 36. SPREAFICO, A.; FREDIANI, B.; CAPPERUCCI, C.; LEONINI, A.; GAMBERA, D.; FERRATA, P.; ROSINI, S.; DI STEFANO, A.; GALEAZZI, M.; MARCOLONGO, R. Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures: potential relevance for the treatment of Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98:1007- 1020 (2006).
 37. Microscopia de Força Atômica. Disponível em: <<http://fap.if.usp.br/~nandast/spm.html>>. Acesso em 20/11/2019.
 38. SOCRATES, G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies – Tables and Charts. Third edition. John Wiley & Sons, LTD. 2001.
 39. DRX e a lei de Bragg. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4139679/mod_resource/content/1/Aula%204_Difra%C3%A7%C3%A3o%20de%20Raios%20X.pdf> Acesso em 21/11/2019.
 40. Joseph I. Goldstein et al, Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists, 2nd ed, 1992, Plenum Press, New York.
 41. Microscopia Eletrônica de Varredura. Disponível em: <<http://fap.if.usp.br/~nandast/mev.html>> Acesso em 21/11/2019.
 42. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. Disponível em: <http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf> Acesso em 21/11/2019.