

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências/Campus de Bauru
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Bruna Carolina Costa

Efeitos da exposição de produtos de desgaste de
implantes de titânio a células do tecido ósseo

Bauru
2018

BRUNA CAROLINA COSTA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE PRODUTOS DE DESGASTE DE IMPLANTES DE
TITÂNIO A CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

Tese apresentada como requisito à obtenção do
Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de
Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob
orientação do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa-Filho.

Bauru
2018

Costa, Bruna Carolina.

Efeitos da exposição de produtos de desgaste de implantes de titânio a células do tecido ósseo/ Bruna Carolina Costa, 2018.

180 f.: Il.

Orientador: Paulo Noronha Lisboa-Filho

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

1. Biomateriais. 2. Degradação. 3. Efeitos biológicos. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

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

Aos 20 dias do mês de abril do ano de 2018, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro do Departamento de Química, 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, Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA do(a) Faculdade de Engenharia Mecânica / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Prof. Dr. CONRADO RAMOS MOREIRA AFONSO do(a) Departamento de Engenharia de Materiais / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCar, Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de BRUNA CAROLINA COSTA, intitulada **Efeitos da exposição de produto de desgaste de implantes de titânio a células do tecido ósseo..** 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

Profa. Dra. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA

Prof. Dr. CONRADO RAMOS MOREIRA AFONSO

Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA

Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Dedico este trabalho àqueles que são a razão de tudo em minha vida:

Meus pais, João e Maria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, minha saúde e capacidade.

Aos meus pais, meu porto seguro, João e Maria, por todo amor, dedicação e confiança. Por toda inspiração e motivação.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos Marcos, Sueli e Juninho, Marcellus, Leila e Gabriel, mas em especial à minha irmã e companheira Morgana e seu marido Guilherme, por sempre estarem ao meu lado nas decisões tomadas, torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa-Filho, que além de oferecer todo suporte científico para o desenvolvimento deste trabalho, com muito carinho e dedicação, sempre me guiou, orientou e aconselhou. Por, em inúmeras ocasiões, estar ao meu lado de forma incondicional, por me motivar e acreditar no meu potencial.

Aos amigos Marcelo e Sandra e seus familiares, que em inúmeros momentos me acolheram carinhosamente como membro da família, por sempre me receber de braços abertos na vitória ou na derrota, por todos os conselhos e carinho.

Ao Prof. Dr. Américo Tabata, por sua grande amizade e paciência. Por sempre me ajudar, apoiar e aconselhar, profissionalmente ou pessoalmente.

Aos meus primos Durval Machado Brandão e Durval Bueno e Brandão, por todo carinho e apoio prestado ao longo da minha formação acadêmica.

Aos amigos de longa data Gabriel, Luiz Fernando, José Henrique, Guilherme, Nadim e Maurício que, mesmo de longe, acompanharam cada um dos meus passos, torceram e celebraram cada etapa vencida.

Àqueles que se tornaram mais que simples companheiros de laboratório: Orisson, Leonardo, Ana Carolina, Marcela, Carolina, Igor, Odair e, em especial, Érika e Luciana, pela amizade, carinho e apoio. Pelos momentos de discussões científicas e também pelos momentos de descontração ao longo dos últimos quatro anos.

Ao Prof. Dr. Luís Augusto Rocha pelas contribuições científicas, por todo auxílio e por me conceder a oportunidade de desenvolver parte deste trabalho de pesquisa em instituições internacionais.

Aos meus (muito queridos) padrinhos portugueses, Sofia, Teresa, Jacinto Alves e demais familiares, pelo acolhimento, carinho e apoio ao longo do meu período de estágio em Portugal.

Aos colaboradores do Laboratório de Superfícies Funcionais, Profa. Ana Maria Pinto, Dr. Fatih Toptan e principalmente à Dra. Alexandra Alves que me receberam e apoiaram cientificamente e pessoalmente ao longo do desenvolvimento dos trabalhos na Universidade do Minho.

Ao Dr. Dmitri Petrovykh e Dra. Vânia Villas Bôas, pesquisadores do *International Iberian Nanotechnology Laboratory*, INL - Portugal, pelas discussões enriquecedoras, colaboração científica e todo o suporte ao desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. João Costa Pessoa, pela valorosa contribuição ao meu projeto de pesquisa, principalmente nas análises e discussões relacionadas ao elemento vanádio.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP, que subsidiaram financeiramente o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos aqueles que, mesmo de longe, ainda contribuíram à sua para que fosse possível a realização deste trabalho.

A todos, o meu mais sincero...

Muito obrigada!

*A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais retornará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

Costa, B. C. “**Efeitos da exposição de produtos de desgaste de implantes de titânio a células do tecido ósseo**”. 180f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais). UNESP, Bauru, 2018.

RESUMO

Dentre os biomateriais metálicos, largamente empregados pela indústria biomédica, o titânio (Ti) e suas ligas, principalmente o sistema Ti-6Al-4V (responsável por 45% da produção total de titânio como biomaterial) representam a principal escolha para a confecção de implantes ortopédicos e dentários. No entanto, processos de degradação (corrosão, desgaste e tribocorrosão) atuantes sobre estas ligas podem ocasionar a liberação de partículas e íons metálicos (comumente referidos produtos de desgaste ou *debris*), o que pode representar uma situação perigosa *in vivo*.

Neste contexto, as propriedades físico-químicas dos produtos de desgaste irão influenciar fortemente o tipo e intensidade das respostas de um organismo vivo após sua exposição aos mesmos. De forma geral, a interação de tais produtos com as células dos tecidos adjacentes ao implante e do sistema imune pode desencadear processos de sinalização, nomeadamente em termos da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, conduzindo a osteólise (reabsorção óssea) e consequente falha do implante.

Ademais, muitas preocupações têm sido levantadas com relação à liberação de partículas e íons compostos pelos elementos alumínio e vanádio. Alternativamente, novas ligas de titânio isentas da adição destes elementos têm sido propostas nos últimos anos, dentre as quais podemos citar, por exemplo, a liga Ti-15Zr-15Mo.

Neste trabalho, foram avaliados (*in vitro*), a partir de um modelo de células de camundongo, os possíveis efeitos relacionados à exposição de íons vanádio às células dos tecidos ósseo e conjuntivo (fibroblastos e osteoblastos). Ademais, a especiação iônica para determinação dos íons vanádio predominantemente relacionados aos resultados obtidos também foi realizada. Complementarmente, a avaliação do comportamento com relação à tribocorrosão para duas ligas de titânio (Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo), a produção e caracterização de partículas de desgaste a partir destas ligas e avaliação dos efeitos relacionados à exposição de tais partículas às células do tecido ósseo (osteoblastos) humano, nomeadamente em termos de viabilidade celular e produção de citocinas pró-inflamatórias, também foram propostas.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que as espécies iônicas de vanádio predominantemente dissolvidas nos meios de cultura utilizados para os experimentos *in vitro* com os osteoblastos e fibroblastos de camundongo foram essencialmente vanadatos, nomeadamente H_2VO_4^- e HVO_4^{2-} . Verificou-se também que a interação destas espécies iônicas com as células das linhagens celulares testadas, principalmente fibroblastos, pode causar uma diminuição significativa em viabilidade para concentrações próximas aquela possível ser encontrada *in vivo* em pacientes que apresentam mau funcionamento de seu dispositivo médico baseado na liga Ti-6Al-4V.

Para as partículas de desgaste geradas a partir de ensaios de tribocorrosão sobre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram verificadas características semelhantes com relação à morfologia e a capacidade de preservar a composição e estrutura cristalina do material a partir do qual são geradas. No entanto, diferenças significativas em termos de tamanho foram observadas. Por fim, verificou-se também que a interação das partículas de desgaste obtidas (ambas as composições) com células do tecido ósseo humano, *in vitro*, pode provocar a diminuição da viabilidade ou (possivelmente) alterações no metabolismo celular, além de conduzir a um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-6 e prostaglandina E2.

Palavras-chave: *Ti-6Al-4V, produtos de desgaste, vanádio, efeitos biológicos.*

Costa, B. C. “**Exposure effects of titanium implants’ wear products to bone tissue cells**”. 180f. Thesis (Graduate Program in Materials Science and Technology). UNESP, Bauru, 2018.

ABSTRACT

Among the metallic biomaterials, widely used in the biomedical industry, titanium (Ti) and its alloys, mainly the Ti-6Al-4V system (responsible for 45% of the total titanium production as biomaterial) represent the main choice for orthopedic and dental implants’ manufacturing. However, degradation processes (corrosion, wear and tribocorrosion) acting on these alloys may lead the release of metallic particles and/or ions (also referred as wear products or *debris*), and this may represent a dangerous situation *in vivo*.

In this context, the wear products’ physical-chemical properties will strongly influence the type and intensity of the living organism responses after their exposure to them. In general, these products’ interaction with the implants’ surrounding tissues and immune system cells may trigger signaling processes, particularly in terms of the proinflammatory cytokines production and release, leading to osteolysis (bone resorption) and consequent implant loosening.

Additionally, many concerns have been raised regarding the release of particles and ions composed by aluminum and vanadium. Alternatively, new vanadium and aluminum-free titanium alloys have been proposed in recent years, among which it is possible to mention, for example, the Ti-15Zr-15Mo alloy.

In this work, the possible effects related to the vanadium ions exposure to bone and connective tissue cells (fibroblasts and osteoblasts) were evaluated (*in vitro*), from a mouse cells’ model. Also, ionic speciation analyzes were also performed in order to determine the vanadium ions related to the obtained results. Complementarily, the tribocorrosion behavior evaluation of two titanium alloys (Ti-6Al-4V and Ti-15Zr-15Mo), the production and characterization of wear particles generated from these alloys and the evaluation of the possible effects related to these particles exposure to human osteoblasts (particularly in terms of cell viability and proinflammatory cytokines production) were also proposed.

According to the obtained results, it was possible to verify that the vanadium ionic species predominantly dissolved in the culture media used for the *in vitro* experiments with mouse osteoblasts and fibroblasts were essentially vanadates, namely H_2VO_4^- and HVO_4^{2-} . It has also been found that the interaction of such ionic species with the tested cells lines, mainly

fibroblasts, may lead to a significant decrease in cell viability at concentrations close to that possible to be found *in vivo* for patients who present malfunctioning of their medical device based on Ti-6Al-4V alloy.

Regarding the wear particles generated from tribocorrosion assays on Ti-6Al-4V and Ti-15Zr-15Mo alloys, similar characteristics were verified, mainly in morphology and the ability to preserve the chemical composition and crystal structure of the material from which are generated. However, significant differences in size were observed. Finally, it has also been found that the interaction of the obtained wear particles (both compositions) with human bone tissue cells, *in vitro*, may be related to decreased viability or (possibly) changes in cellular metabolism, in addition to leading to an increased production of the interleukin-6 and prostaglandin E2 proinflammatory cytokines.

Keywords: *Ti-6Al-4V, wear products, vanadium, biological effects.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas cristalinas mais comuns para o titânio: à esquerda – cúbica de corpo centrado (CCC) ou fase β , obtida em temperaturas acima de 885°C e à direita – hexagonal compacta (HC) ou fase α , à temperatura ambiente (CALLISTER, 2007).	34
Figura 2: Influência do tipo e concentração de elementos estabilizadores sobre a temperatura de transição de fases para o titânio (Adaptada de (CORDEIRO; BARÃO, 2017)).	36
Figura 3: Prótese utilizada em artroplastias totais de quadril (A) subdividida em seus quatro componentes principais; (B) posicionamento da prótese no quadril de um paciente; (C) acomodação final da prótese. Adaptada de (GRANDJEAN et al., 2012) e (MURR et al., 2012).	38
Figura 4: Principais tipos de superfícies de deslizamento modernamente utilizadas em próteses para substituição total de articulações (TJA). Fonte: <i>Vaidam Health</i>	44
Figura 5: Radiografia do quadril de um paciente submetido a uma artroplastia para substituição total do quadril em que foi utilizada uma prótese de tipo MoM: (A) logo após a cirurgia para a implantação e (B) cinco anos após a cirurgia para a implantação. A seta enfatiza a região que sofreu o processo de osteólise (Adaptada de (AMANATULLAH et al., 2016)).	50
Figura 6: Metalóse em um paciente após quatro anos de uma artroplastia de reposição total de quadril (THR): (A) imagem capturada durante o procedimento cirúrgico para remoção do implante, (B) superfície desgastada da componente acetabular do implante e (C) fluido negro drenado do local através de uma punção (Adaptada de (OLIVEIRA et al., 2015a)).	51
Figura 7: Metodologia utilizada para obtenção dos extratos posteriormente utilizados nos ensaios de viabilidade celular.	60
Figura 8: Esquema para diluição das amostras nas concentrações finais desejadas para os testes <i>in vitro</i>	75
Figura 9: Difratoograma de raios-X para o pentóxido de vanádio comercial (V_2O_5).	78
Figura 10: (A) Histograma para tamanho médio das partículas comerciais de V_2O_5 e (B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para estas partículas.	79

Figura 11: Resultados para o ensaio de viabilidade celular para linhagem MC3T3-E1 após incubação com os extratos de V_2O_5	82
Figura 12: Imagens de microscopia óptica para a linhagem celular MC3T3-E1: (A) Controle positivo após 72h, (B) células expostas ao extrato na diluição D3 após 72h, (C) células expostas ao extrato na diluição D2 após 24h e (D) células expostas ao extrato na diluição D1 após 24h. (Barra de escala de 100 μm).....	83
Figura 13: Resultados para o ensaio de viabilidade celular para linhagem NIH3T3 após incubação com os extratos de V_2O_5	84
Figura 14: Imagens de microscopia óptica para a linhagem celular NIH3T3: (A) Controle positivo após 72h, (B) células expostas ao extrato na diluição D4 após 72h, (C) células expostas ao extrato na diluição D3 após 24h e (D) células expostas ao extrato na diluição D1 após 24h. (Barra de escala de 100 μm).....	85
Figura 15: Especificação iônica para o vanádio em diferentes concentrações para ambos os meios de cultura celular: (A) D1 = 1.5×10^{-3} M em α -MEM, (B) D5 = 1.5×10^{-7} M em α -MEM, (C) D1 = $2,3 \times 10^{-3}$ M em DMEM, (D) D5 = 2.3×10^{-7} M em DMEM.....	86
Figura 16: Quantificação das espécies iônicas (%) em pH~7 para cada meio de cultura celular. Linhas da mesma cor representam a mesma concentração para ambos os meios de cultura, diferindo apenas pelo tipo de traço (sólido para α -MEM e pontilhado para DMEM).	87
Figura 17: Especificação iônica para o vanádio e potenciais ligantes nos meios cultura celular utilizados neste trabalho.	88
Figura 18: Analogia entre vanadatos e fosfatos (Adaptado de PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015).....	90
Figura 19: Difrátogramas de raios-X para as amostras (A) Ti-6Al-4V, (B) Ti-15Zr-15Mo (TZM) e (C) Ti-15Zr-15Mo com modificação superficial (TZM-ST).....	92
Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (elétrons secundários) para as amostras (A) Ti-6Al-4V e (B) TZM, sendo ambas atacadas quimicamente em uma solução $H_2O:HNO_3:HF$, 1:1:1.	93
Figura 21: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a amostra TZM-ST: (A) elétrons secundários e (B) elétrons retroespalhados.....	93

Figura 22: Curvas de potencial de circuito aberto (OCP) registradas antes, durante e após o deslizamento nos testes de tribocorrosão para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.	96
Figura 23: Evolução do coeficiente de fricção ao longo do tempo durante o período de deslizamento nos testes de tribocorrosão para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.	98
Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para as pistas de desgaste geradas durante os testes de tribocorrosão para as amostras: (A) Ti-6Al-4V (SE), (B) Ti-6Al-4V (BSE) (C) TZM (SE), (D) TZM (BSE), (E) TZM-ST (SE) e (F) TZM-ST (BSE).	99
Figura 25: Largura média calculada para as pistas de desgaste de cada grupo de amostras. .	100
Figura 26: Perfis para as pistas de desgaste: (A) 3D (confocal) e (B) 2D (profilometria) para a amostra Ti-6Al-4V, (C) 3D (confocal) e (D) 2D (profilometria) para a amostra TZM, (E) 3D (confocal) e (F) 2D (profilometria) para a amostra TZM-ST.....	101
Figura 27: Volume médio de desgaste para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.	102
Figura 28: Configuração final das amostras (A) Ti-6Al-4V e (B) Ti-15Zr-15Mo após 15h de teste para produção de partículas de desgaste.	103
Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as partículas de desgaste obtidas a partir da liga Ti-6Al-V. (A) análise geral, (B) e (C) pequenos conjuntos de partículas em maior magnificação, (D) área destacada em (C) em detalhes, (E) um conjunto de partículas maiores e (F) área destacada em (E) em detalhes.	104
Figura 30: Histograma para o tamanho médio das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.	106
Figura 31: Espectro de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.	106
Figura 32: Mapeamento químico para os elementos identificados nas partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.	107
Figura 33: Padrão de Difração (A) obtido no eixo de zona $[1\bar{1}\bar{1}]$ para uma única partícula Ti-6Al-4V (B).....	108
Figura 34: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo: (A): análise geral, (B) partículas mais bem dispersas, (C) e (D) conjuntos de partículas em detalhes.....	109

Figura 35: Histograma para o tamanho médio das partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo.....	110
Figura 36: Espectro de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) para as partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.	111
Figura 37: Mapeamento químico para os elementos identificados nas partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.....	111
Figura 38: Padrão de Difração (A) obtido no eixo de zona $[1\bar{1}0]$ para uma única partícula de Ti-15Zr-15Mo (B).	112
Figura 39: (A) e (B): Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.	113
Figura 40: Histograma para o diâmetro médio das partículas comerciais de Ti-6Al-4V.....	114
Figura 41: Espectro de espectroscopia de dispersão de raios-X para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.	114
Figura 42: Difratoograma de raios-X para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.	115
Figura 43: Tubos para os ensaios baseados na reação com LAL para verificação de endotoxinas (A) Controle para sensibilidade 0,125 EU/mL e sua reação positiva e (B) Amostra de Ti-15Zr-15Mo tratada termicamente num tubo de teste com sensibilidade 0,125 EU/mL e sua reação negativa.	118
Figura 44: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.	119
Figura 45: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.	120
Figura 46: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas comerciais de Ti-6Al-4V.	121
Figura 47: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas comerciais de pentóxido de vanádio.	122

Figura 48: Imagens representativas de microscopia de fluorescência para o ensaio <i>Live and Dead</i> com a linhagem celular MG63 e grupos experimentais selecionados. Células viáveis são representadas pela cor verde.....	123
Figura 49: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem HOb com relação às partículas de todos os grupos experimentais livres de endotoxinas.	125
Figura 50: Imagens representativas de microscopia de fluorescência para o ensaio <i>Live and Dead</i> com a linhagem celular HOb e grupos experimentais selecionados. Células viáveis são representadas pela cor verde.....	126
Figura 51: Imagens de microscopia de transmissão (TEM) para as células da linhagem HOb: (A) e (B) células grupo controle, mostrando algumas estruturas celulares básicas, (C) célula interagindo com as partículas de Ti-6Al-4V, (D) partículas de Ti-6Al-4V internalizadas por uma célula, (E) partículas de Ti-15Zr-15Mo interagindo com a membrana celular e (F) partículas de Ti-15Zr-15Mo internalizadas por uma célula e depositadas próximas ao seu núcleo.	127
Figura 52: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOb do grupo controle e (B) Espectro EDS para a região destacada em (A).....	128
Figura 53: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOb interagindo com partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e (B) Espectro EDS para a região contendo as partículas e destacada em (A).....	129
Figura 54: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOb interagindo com partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo e (B) Espectro EDS para a região contendo as partículas e destacada em (A).....	129
Figura 55: Resultados para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com relação à produção de interleucina 6 (IL-6) após a interação das células da linhagem HOb com relação a grupos experimentais selecionados.	131
Figura 56: Resultados para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com relação à produção de prostaglandina E2 (PGE2) após a interação das células da linhagem HOb com relação a grupos experimentais selecionados.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Elementos intersticiais ou substitucionais estabilizadores da fase α ou β para Ti-cp ou ligas de titânio (CHEN; THOUAS, 2015).....	35
Tabela 2: Porcentagem em peso (%p) de elementos intersticiais em Ti-cp e porcentagem em peso (%p) de elementos substitucionais em algumas ligas de titânio (Fonte: ASTM – <i>American Society for Testing Materials</i>).	36
Tabela 3: Algumas das propriedades mecânicas para o titânio e suas ligas em comparação às ligas de cobalto e aço inoxidável (CHEN; THOUAS, 2015).	37
Tabela 4: Concentrações de metais em fluidos corpóreos humanos de pacientes com e sem artroplastias articulares (HALLAB et al., 2001).	46
Tabela 5: Concentrações de metais em tecidos humanos de pacientes com e sem artroplastias articulares (HALLAB et al., 2001).	47
Tabela 6: Descrição das amostras utilizadas nos testes de tribocorrosão.	64
Tabela 7: Condições de cultura para as linhagens MG63 e HOb.	72
Tabela 8: Grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade com a linhagem celular MG63....	74
Tabela 9: Grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade com a linhagem celular HOb.	74
Tabela 10: Valores de pH para a solução <i>stock</i> de V_2O_5 e suas respectivas diluições em ambos os meios de cultura.	80
Tabela 11: Resultados de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) para as concentrações totais reais de vanádio em ambos os meios de cultura utilizados nos experimentos.	81
Tabela 12: Composição química semi-quantitativa (EDS) para as amostras em estudo.....	95
Tabela 13: Composição química média semi-quantitativa para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V.	107

Tabela 14: Composição química média semi-quantitativa para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo.....	111
Tabela 15: Composição química média semi-quantitativa para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.....	115
Tabela 16: Resultados para os ensaios baseados na reação com LAL (<i>Limulus Amoebocyte Lysate</i>) para as amostras submetidas ao tratamento térmico para remoção de endotoxinas. .	117

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

%p	Porcentagem em peso
AA	Ácido Araquidônico
Al	Alumínio
Al₂O₃	Dióxido de Alumínio
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
ANOVA	Analysis of Variance
Ar	Argônio
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i>
B	Boro
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSE	<i>Backscattered Electrons</i>
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaA	Acetato de Cálcio
CCC	Estrutura Cristalina Cúbica de Corpo Centrado
Cl⁻	Cloreto
Cl	Cloro
Co	Cobalto
CO₂	Dióxido de Carbono
COF	<i>Coefficient of Friction</i>
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase-2
cPLA2	Fosfolipase citoplasmática A2
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ED	<i>Electron Diffraction</i>
EDS	<i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EU	<i>Endotoxin Unit</i>
FDA	<i>Food and Drugs Association</i>
Fe	Ferro
FEG	<i>Field Emission Gun</i>
Ga	Gálio
Ge	Germânio
H	Hidrogênio
HC	Estrutura Cristalina Hexagonal Compacta
HCl	Ácido clorídrico
Hf	Háfênio
HNO₃	Ácido nítrico
ICP-OES	<i>Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1- β
IL-6	Interleucina-6
KCl	Cloreto de Potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio
LAL	<i>Limulus Amoebocyte Lysate</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAO	<i>Micro-Arc Oxidation</i>
Mg	Magnésio
Mo	Molibdênio
MoC	<i>Metal-on-Ceramic</i>
MoM	<i>Metal-on-Metal</i>
MoP	<i>Metal-on-Polymer</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de di-sódio
NaCl	Cloreto de sódio

Nb	Nióbio
Ni	Níquel
O	Oxigênio
OCP	<i>Open Circuit Potential</i>
OsO₄	Tetróxido de ósmio
P	Fósforo
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGE2	Prostaglandina-E2
PO₄³⁻	Fosfato
Pt	Platina
PTK	<i>Protein Tirosine Kinase</i>
PTP	<i>Protein Tirosine Phosphatase</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por minuto
SCE	<i>Standard Calomel Electrode</i>
SE	<i>Secondary Electrons</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Si	Silício
SiC	Carbeto de silício
Sn	Estanho
Ta	Tântalo
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
THA	<i>Total Hip Arthroplasty</i>
THR	<i>Total Hip Replacement</i>
Ti	Titânio
Ti64	Liga Ti-6Al-4V
Ti-cp	Titânio Comercialmente Puro
TiO	Monóxido de titânio
TiO₂	Dióxido de Titânio
TiO₃	Trióxido de titânio
Ti-α	Titânio na fase cristalina α

Ti-β	Titânio na fase cristalina β
TJA	<i>Total Joint Arthroplasty</i>
TKA	<i>Total Knee Arthroplasty</i>
TKR	<i>Total Knee Replacement</i>
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Vanádio
V₂O₃	Trióxido de Vanádio
V₂O₅	Pentóxido de Vanádio
V^{IV}	Vanádio no estado de oxidação +4
VO₄³⁻	Vanadato
V^V	Vanádio no estado de oxidação +5
XRD	<i>X-ray diffraction</i>
Zr	Zircônio
ZrCl₄	Tetracloreto de zircônio
β-GP	<i>β- Glicerol Phosphate</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	33
2.1	Biomateriais metálicos e ligas de titânio	33
2.2	Degradação: corrosão, desgaste e tribocorrosão	40
2.3	Produtos de desgaste (debris).....	44
2.4	Efeitos biológicos.....	49
2.5	Endotoxinas.....	54
3	OBJETIVOS	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1	Avaliação da citotoxicidade de íons de vanádio e sua especiação iônica em meios de cultivo celular.....	59
4.1.1	Cultura de células	59
4.1.2	Grupos experimentais	59
4.1.3	Viabilidade celular por redução de MTT	60
4.1.4	Avaliação da morfologia celular	61
4.1.5	Caracterização físico-química do V_2O_5	61
4.1.6	Especiação iônica	62
4.2	Avaliação dos aspectos de degradação de ligas de titânio.....	63
4.2.1	Amostras.....	64
4.2.2	Preparação da liga Ti-15Zr-15Mo	64
4.2.3	Modificação superficial da liga Ti-15Zr-15Mo	65
4.2.4	Caracterização das amostras.....	65
4.2.5	Testes de tribocorrosão.....	66
4.3	Produção e caracterização dos produtos de desgaste	67
4.3.1	Produção dos produtos de desgaste.....	68

4.3.2	<i>Caracterização dos produtos de desgaste</i>	68
4.4	<i>Remoção de endotoxinas</i>	69
4.4.1	<i>Tratamentos térmicos para remoção de endotoxinas</i>	69
4.4.2	<i>Ensaio para detecção de endotoxinas</i>	70
4.5	<i>Avaliação dos efeitos biológicos resultantes da interação entre osteoblastos humanos e as partículas de desgaste</i>	71
4.5.1	<i>Cultura de células</i>	72
4.5.2	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	73
4.5.3	<i>Grupos experimentais</i>	73
4.5.4	<i>Viabilidade celular por redução de MTT</i>	75
4.5.5	<i>Ensaio Live and Dead</i>	76
4.5.6	<i>Avaliação da internalização de partículas pelos osteoblastos humanos (HOb)</i>	76
4.5.7	<i>Ensaio ELISA para avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias</i>	77
5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	78
5.1	<i>Avaliação da citotoxicidade de íons de vanádio e sua especiação iônica em meios de cultivo celular</i>	78
5.2	<i>Avaliação dos aspectos de degradação</i>	91
5.3	<i>Produção e caracterização dos produtos de desgaste</i>	103
5.4	<i>Remoção de endotoxinas</i>	116
5.5	<i>Avaliação dos efeitos biológicos resultantes da interação entre osteoblastos humanos e as partículas de desgaste</i>	118
5	<i>CONCLUSÕES GERAIS</i>	135
6	<i>ANEXOS</i>	137
6.1	<i>Protocolo original do fabricante para os ensaios de detecção de endotoxinas</i>	137
6.2	<i>Protocolo original do fabricante para o ensaio ELISA IL-6</i>	142
6.3	<i>Protocolo original do fabricante para o ensaio ELISA Prostaglandina E2</i>	146
	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	158

1 INTRODUÇÃO

Um biomaterial, em sua definição mais aceita, é qualquer substância (ou combinação de substâncias) utilizada por determinado período de tempo como um todo ou parte de um sistema vivo para o tratamento ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função deste organismo sem causar efeitos prejudiciais enquanto em contato íntimo com o mesmo (HOLLINGER, 2012).

Tendo em vista que nenhum material exógeno é completamente inerte em um sistema vivo durante um período razoável de tempo, deve-se ter em mente que a seleção dos elementos constituintes dos biomateriais deve, preferencialmente, considerar elementos que ocorrem naturalmente no corpo humano, ou que apresentem baixa toxicidade nas quantidades passíveis de liberação *in vivo* (CHEN; THOUAS, 2015).

Outro aspecto importante a ser levado em consideração na seleção e aplicação de um biomaterial é a função a ser desempenhada pelo mesmo no organismo vivo em que estará inserido. Neste sentido, características semelhantes às aquelas que ocorrem naturalmente no organismo e uma escolha adequada para a composição do mesmo, não são somente desejadas como representam papéis cruciais (BREME; BIEHL, 2016).

O corpo humano é predominantemente composto em massa pelos elementos carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) (96%), elementos constituintes da água, das proteínas e da maior parte dos componentes celulares. Os 4% restantes correspondem a componentes ósseos (essencialmente cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo(P)), fluidos extracelulares, sangue e outros micronutrientes (WHITNEY; ROLFES, 2012). Assim, utilizando a terminologia da ciência dos materiais, pode-se dizer que o corpo humano é predominantemente composto por água, materiais poliméricos, cerâmicos e híbridos.

Metais são encontrados no corpo humano apenas como micronutrientes, ou seja, elementos necessários em quantidades extremamente pequenas. Apesar disso, materiais metálicos são, há muito tempo, largamente utilizados como elementos estruturais em cirurgias para substituição ou regeneração óssea, principalmente porque, no geral, apresentam propriedades mecânicas adequadas para tal função (CHEN; THOUAS, 2015).

Dentre os materiais metálicos mais comumente utilizados como elementos estruturais em casos de reparação e substituição óssea encontram-se o titânio e suas ligas, as ligas baseadas em cobalto-cromo (Co-Cr) e o aço inoxidável, uma liga constituída por ferro (Fe)

com alta concentração de cromo e quantidades variáveis de níquel (Ni) (HALLAB et al., 2001; GEETHA et al., 2009; GRANDJEAN et al., 2012; GEPREEL; NIINOMI, 2013).

Em comparação aos demais biomateriais metálicos, o titânio e suas ligas são comumente relatados como mais vantajosos para aplicações biomédicas porque apresentam propriedades mecânicas razoavelmente compatíveis com a função, bem como resistência à corrosão e desgaste e biocompatibilidade superiores (VIRTANEN et al., 2008; CORDEIRO; BARÃO, 2017).

Considerando a ampla gama de ligas de titânio disponíveis, os sistemas mais comumente aplicados na confecção de implantes biomédicos são o titânio comercialmente puro (Ti-cp), correspondente a 30% da produção total de titânio como biomaterial e a liga Ti-6Al-4V, uma liga composta por 90% de titânio, 6% de alumínio e 4% de vanádio (% em peso), que corresponde a 45% do total desta produção (BARÃO et al., 2012; BABILAS et al., 2013; CALIN et al., 2013). Neste contexto, tanto o titânio puro quanto as ligas Ti-6Al-4V são largamente utilizadas como implantes dentários, implantes para a reposição da articulação de quadril, joelho, ombro, cotovelo e punho, dispositivos para fixação óssea (parafusos), dentre outras (DONATO et al., 2009; MARTINS JÚNIOR et al., 2011; CHEN; THOUAS, 2014).

Quando implantados, não somente os materiais baseados em titânio como os demais biomateriais metálicos, começam a sofrer processos de degradação. Isto porque, dependendo da região implantada, o interior de um organismo vivo pode representar um ambiente química e mecanicamente agressivo, em que diferentes níveis de pH e esforços mecânicos cíclicos, que conduzem à corrosão e desgaste mecânico, podem estar presentes e influenciar ou até mesmo alterar o comportamento e desempenho do biomaterial, comprometendo não somente a integridade do implante, como também a dos tecidos circundantes (LIBER; DOIG; WHITE-SOBEY, 2011; CHEN; THOUAS, 2015).

De uma forma geral, as características que conferem superioridade às ligas de titânio para aplicações biomédicas com relação aos demais biomateriais metálicos disponíveis no mercado (maior resistência à corrosão e biocompatibilidade), estão diretamente relacionadas às propriedades de sua camada de passivação, ou seja, um filme fino formado espontaneamente sobre sua superfície (SHUKLA; BALASUBRAMANIAM; BHARGAVA, 2005; ANANTH et al., 2015; WANG et al., 2016; CORDEIRO; BARÃO, 2017; SUNDELL et al., 2017).

Além de influenciar o comportamento com relação aos processos de degradação, a composição óxida na superfície dos implantes baseados em titânio também contribui para sua

superioridade com relação à biocompatibilidade, uma vez que a adesão de células do tecido ósseo pode ser influenciada pelas interações entre os grupos funcionais das proteínas da matriz extracelular e o ordenamento atômico da camada superficial presente (BUCHLOH et al., 2003; FAGHIHI et al., 2009; TSOU et al., 2012; VERKET et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Ainda com relação aos biomateriais baseados em titânio e com base na maior parte dos dados reportados na literatura científica até os últimos anos, é possível dizer que estes implantes, em geral, não são rejeitados pelo corpo e, normalmente, fazem interações adequadas com o tecido hospedeiro, conduzindo a uma aceitável integração óssea (osseointegração), quando comparados às demais ligas disponíveis e utilizadas como biomateriais (WANG et al., 2003). Além disso, partículas e íons de titânio são, geralmente, considerados de menor toxicidade quando comparadas a outros materiais metálicos utilizados como elementos de liga em próteses, como por exemplo, o cobalto (Co) e o cromo (Cr) (KWON et al., 2009).

Apesar de possuir uma posição razoavelmente consolidada como segura com relação à aplicação em implantes biomédicos, alguns estudos mais recentes apontam para a possibilidade de alguns efeitos prejudiciais relacionados à liberação de íons, partículas e compostos de titânio a partir de implantes metálicos (GALLO et al., 2008; KONTTINEN; PAJARINEN, 2013; VASCONCELOS et al., 2016).

Íons de titânio, por exemplo, são relatados como propensos a ligação com moléculas de sistemas vivos ricas em fósforo (P), como por exemplo, DNA, RNA e fosfolipídios, induzindo ao dano das mesmas (CHAN et al., 2009; CADOSCH et al., 2010). Além disso, recentemente, Ribeiro e colaboradores (RIBEIRO et al., 2016) demonstraram que nanopartículas de TiO_2 , passíveis de liberação a partir de superfícies de implantes baseados em titânio, são susceptíveis a internalização por células humanas do tecido ósseo e estão relacionadas a processos que conduzem a apoptose (morte celular).

Tendo em vista os possíveis efeitos nocivos relacionados à liberação de partículas e íons, não somente de titânio, mas também dos demais elementos presentes na composição de suas ligas em o organismo vivo, torna-se mandatório uma avaliação profunda do comportamento destes biomateriais com relação aos possíveis processos de degradação *in vivo* (MATHEW et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2017).

Os fluidos corporais podem apresentar diferentes valores de pH, dependendo da região implantada ou em situações de inflamação, o que pode expor o biomaterial metálico a

processos de corrosão resultando no afrouxamento do implante e comprometimento dos tecidos circundantes a partir da liberação dos íons e partículas metálicas (*debris*). Deste modo, o processo de integração óssea (osseointegração) do implante metálico também acaba comprometido (LIBER; DOIG; WHITE-SOBEY, 2011). Além disso, biomateriais metálicos também podem ser submetidos a estímulos mecânicos, tais como carga, esforços cíclicos ou de fricção, como no caso dos implantes metálicos utilizados em substituições totais das articulações do joelho e/ou quadril, o que pode resultar no desgaste mecânico de sua superfície e também conduzir à liberação de *debris* (CHEN; THOUAS, 2015).

Quando consideramos as condições combinadas de corrosão e desgaste de superfície promovido por carga/esforço mecânico e o efeito simultâneo e sinérgico entre estes dois processos, nos referimos a um terceiro fenômeno denominado como tribocorrosão (PONTIAUX et al., 2004; MISCHLER, 2008; PONTIAUX; WENGER; CELIS, 2012; VILLANUEVA et al., 2017). O fenômeno de tribocorrosão em aplicações biomédicas é frequentemente denominado como bio-tribocorrosão e envolve a influência complexa das condições biológicas, tais como as interações proteômicas, bacterianas e celulares com a superfície, junto aos aspectos mecânicos e corrosivos (MATHEW et al., 2009; CRUZ et al., 2011; ROCHA et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

Bem como ocorre para os processos de corrosão e desgaste individualmente, a bio-tribocorrosão também pode conduzir à liberação de *debris* e a presença dos mesmos na região ao redor do implante pode influenciar os efeitos deste último processo, uma vez que estes *debris* podem atuar como pequenos abrasivos, atenuando o desgaste superficial do biomaterial (MATHEW et al., 2009; ROCHA et al., 2013).

A liberação indesejada de produtos de desgaste também pode causar um desequilíbrio no corpo humano, nomeadamente em termos de homeostase (equilíbrio necessário para que os componentes de um sistema vivo desempenhem suas funções adequadamente), afetando o funcionamento dos tecidos e células ao redor do implante (GALLO; SLOUF; GOODMAN, 2010; POURZAL et al., 2011; ZHAO; CASTRANOVA, 2011; BILLI et al., 2012; KONTTINEN; PAJARINEN, 2013; LI et al., 2014a; RIBEIRO et al., 2016). Ademais, sob as condições severas da corrosão e bio-tribocorrosão, a camada superficial de passivação do biomaterial pode ser danificada, ou até mesmo destruída, expondo a superfície metálica bruta a processos de degradação mais ativos, o que pode representar uma situação perigosa *in vivo* (CRUZ et al., 2011; ROCHA et al., 2013; CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2016).

Biomateriais metálicos aplicados como dispositivos ortopédicos para substituição e reparo de articulações, principalmente àqueles baseados em superfícies de deslizamento do tipo metal-metal (MoM, do inglês *Metal-on-Metal*) são potencialmente mais susceptíveis aos processos de degradação superficial mencionados. Tais dispositivos levantam as maiores preocupações relacionadas ao risco potencial de reações biológicas adversas induzidas pela excessiva geração de partículas de desgaste e íons metálicos, no entanto, pelo mesmo motivo, representam um modelo interessante para aprimorar o conhecimento atual sobre o assunto (KONTTINEN; PAJARINEN, 2013).

Tendo em vista a iminente liberação *in vivo* de produtos de desgaste, e não somente a possibilidade de atenuação dos processos de degradação atuantes sobre a superfície dos biomateriais, mas também a interação dos mesmos com os tecidos circundantes ao implante e os riscos relacionados à saúde do paciente implantado, a avaliação dos efeitos biológicos resultantes deste processo, torna-se imprescindível. Neste sentido, as propriedades físico-químicas dos produtos de desgaste representam um fator extremamente importante (NEALE et al., 2000; HALLAB; JACOBS, 2009; GOMES et al., 2011; BITOUNIS et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2016) e, naturalmente, tais características estão intimamente ligadas às características e propriedades dos biomateriais metálicos que sofrem degradação (GALLO; SLOUF; GOODMAN, 2010).

Pesquisas têm demonstrado que diferentes propriedades físico-químicas para os produtos de desgaste resultam em diferentes interações com as células. Diferentes morfologias, cristalinidade e concentração de exposição de partículas aos sistemas biológicos, por exemplo, podem afetar significativamente sua toxicidade (LI et al., 2014a), de modo que crescentes preocupações foram expressas sobre os seus potenciais efeitos adversos à saúde humana (ZHAO; CASTRANOVA, 2011).

Para os íons metálicos, características como tamanho e carga influenciam a forma com que estes agentes químicos interagem com diferentes alvos intracelulares, como por exemplo, o DNA, produzindo efeitos tóxicos de uma maneira diferente àqueles produzidos pelas partículas (HOREV-AZARIA et al., 2011).

Para partículas, aspectos como quantidade, tamanho e composição química dos vão desempenhar um papel crucial sobre seu efeito sobre as células e tecidos com o qual podem interagir, bem como as reações adversas e ativação de mecanismos de defesa por parte de um organismo vivo com relação aos mesmos (NEL, 2007; ZHAO; CASTRANOVA, 2011; SHARIFI et al., 2012).

Com relação à quantidade, por exemplo, a presença de um grande número de partículas de desgaste ao redor de um implante pode levar a ativação excessiva de macrófagos (células do sistema imune), o que pode induzir a uma resposta imune congênita, da qual uma das possibilidades resultantes é a falha do implante através de uma patologia referida como “*doença da partícula*” (LANDGRAEBER et al., 2014). Em relação ao tamanho, por outro lado, partículas de desgaste sub-micrométricas podem ser internalizadas por células dos tecidos em contato direto com o implante, alterando seu metabolismo normal (RIBEIRO et al., 2016), enquanto aquelas com diâmetro de alguns poucos micrômetros serão fagocitadas por macrófagos e partículas maiores podem induzir uma resposta alérgica ao corpo estranho (VASCONCELOS et al., 2016).

Além da quantidade e tamanho, a composição das partículas de desgaste é, sem dúvida, a propriedade mais dependente das características do biomaterial metálico a partir do qual as mesmas são originadas. Assim, diferentemente do titânio comercialmente puro (Ti-cp), produtos de desgaste gerados a partir da liga Ti-6Al-4V poderão apresentar, além de titânio, os elementos alumínio (Al) e vanádio (V) em sua composição. (CHEN; THOUAS, 2014; CORDEIRO; BARÃO, 2017). Da mesma forma, diferentes ligas compostas predominantemente por titânio com a adição de elementos como o nióbio (Nb), zircônio (Zr), ferro (Fe), molibdênio (Mo), dentre as quais é possível citar, por exemplo, a liga Ti-15Zr-15Mo, poderão originar produtos de desgaste com variadas composições contendo tais elementos (MELLO, 2000; GEETHA et al., 2009; BABILAS et al., 2013; CHEN; THOUAS, 2015; CORREA, 2015; XAVIER, 2016).

Considerando a influência que a composição do biomaterial metálico apresenta sobre a composição das partículas de desgaste geradas a partir de sua degradação, fica evidente também a necessidade de avaliar a citotoxicidade e possíveis efeitos biológicos associados à exposição de um organismo vivo aos elementos constituintes das ligas que podem ser aplicadas na confecção dos implantes (titânio, alumínio, vanádio, zircônio, molibdênio, entre outros), bem como dos compostos baseados nestes elementos.

O alumínio (Al) possui uma pequena função conhecida no corpo humano, porém em altas doses pode apresentar toxicidade aguda, além de ser reportado como um elemento ligado a distúrbios neurológicos, fator atenuante em doenças do fígado, câncer de mama e doença de Alzheimer (DARBRE, 2006; FERREIRA et al., 2008; VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008). O elemento vanádio (V), por sua vez, não é um elemento naturalmente presente no organismo, e sua interação com sistemas biológicos é tema de grande controvérsia na

literatura científica, na qual podemos encontrar trabalhos e discussões que defendem desde sua essencialidade à sua toxicidade. De acordo com tais trabalhos, compostos de vanádio podem estar associados à manutenção de funções normais do corpo, mas também a várias implicações em doenças humanas (MUKHERJEE et al., 2004), sendo sua toxicidade geralmente associada à dose e geração de seus sub-compostos, tais como os óxidos (NASAB; HASSAN; SAHARI, 2010; GEPREEL; NIINOMI, 2013; GHOSH; SAHA; SAHA, 2015).

Com relação à sua aplicação na confecção de biomateriais metálicos, embora reconhecidos como elementos susceptíveis a apresentar toxicidade, poucos estudos avaliando os riscos potenciais dos elementos alumínio e vanádio (no contexto de sua utilização em implantes) estão disponíveis (VASCONCELOS et al., 2016).

O zircônio (Zr), apesar de não possuir função natural conhecida no corpo humano, apresenta um bom comportamento com relação à biocompatibilidade em comparação aos demais metais utilizados como biomateriais. Além disso, é relatado que compostos de zircônio apresentam baixa toxicidade. No entanto, a exposição em curto prazo ao zircônio e seus compostos na forma de pó pode causar irritação à pele e aos pulmões (CHEN; THOUAS, 2015).

O molibdênio (Mo), por outro lado, possui função conhecida no organismo humano e é essencial para uma série de enzimas importantes no metabolismo celular. A concentração deste elemento no corpo humano é cerca de 70 µg/kg, estando presente, em maiores quantidades, no fígado e nos rins, em menor quantidade, nos ossos e também no esmalte dos dentes. Apesar disso, a inalação direta ou ingestão de molibdênio e seus óxidos deve ser evitada, bem como a exposição crônica de seres humanos às partículas e óxido deste metal. Já, com relação à toxicidade sistêmica de molibdênio aplicado como elemento de liga em próteses metálicas, até o momento, não existem dados (ANKE et al., 2010; LI et al., 2010).

Levando em consideração a utilização a longo prazo de um implante metálico baseado em ligas dos sistemas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, a liberação de produtos de desgaste a partir da degradação *in vivo* destas ligas por processos de bio-tribocorrosão, a necessidade da caracterização físico química e os possíveis efeitos adversos resultantes da exposição a estes produtos de desgaste aos à saúde humana, desenvolveu-se a presente pesquisa.

Assim, no Capítulo 2 deste trabalho são apresentadas as principais informações e conceitos envolvidos no desenvolvimento do mesmo, particularmente com relação às características e propriedades de ligas de titânio utilizadas como biomateriais e às definições e características para os processos de degradação que podem atuar sobre tais ligas *in vivo*.

Também são apresentadas as principais consequências para os processos de degradação, nomeadamente com relação à liberação de produtos de desgaste, as características mais relevantes relacionadas aos mesmos e os possíveis efeitos resultantes da interação de tais produtos com células e tecidos de um organismo vivo. Sequencialmente, o Capítulo 3 apresenta os objetivos gerais e específicos deste trabalho e o Capítulo 4 descreve os materiais, ensaios, processos, condições, protocolos e técnicas empregados para tal. Por fim, os Capítulos 5 e 6 apresentam os resultados obtidos e as conclusões, respectivamente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomateriais metálicos e ligas de titânio

A utilização de materiais metálicos como biomateriais, particularmente como implantes, pode ser remetida ao século XIX, quando a indústria metalúrgica começou a se expandir durante a Revolução Industrial. Neste contexto, o desenvolvimento de implantes metálicos foi impulsionado, principalmente, pelas demandas de reparação óssea, tipicamente a fixação de fratura interna de ossos longos (PARK; LAKES, 2007).

Para que um material seja aplicado como um biomaterial em casos de substituição e regeneração óssea, alguns requisitos são fundamentais. Por exemplo, é desejável que o biomaterial seja: (i) biofuncional, ou seja, que apresente propriedades mecânicas adequadas, especialmente resistência à fadiga e módulo de elasticidade (Young) tão próximo ao do osso quanto possível, (ii) resistente à corrosão e à bio-tribocorrosão, (iii) biocompatível, ou seja, que não cause nenhum tipo de efeito nocivo ao corpo e (iv) osseointegrável, ou capaz de se ligar e promover crescimento e integração óssea. Além disso, processabilidade e disponibilidade, são fatores importantes a se considerar (BREME; BIEHL, 2016).

Neste sentido, biomateriais metálicos têm sido largamente utilizados até os dias de hoje como implantes ortopédicos e dentários porque apresentam uma combinação multifuncional de tais propriedades (ALVES et al., 2015). Ademais, quando comparados aos demais tipos de biomateriais, como cerâmicos e poliméricos, os biomateriais metálicos possuem uma notável propriedade: suportar tensões de tração, que no caso das ligas, podem ser extremamente altas e também de natureza dinâmica. Esta é a razão pela qual as ligas metálicas, principalmente, as que possuem resistência à fadiga de flexão suficiente, são amplamente utilizadas como materiais estruturais para reconstruções ósseas (BREME; BIEHL, 2016).

Dentre os materiais metálicos mais utilizados como implantes, podemos citar o aço inoxidável austenítico (uma liga constituída por ferro (Fe) com alta concentração de cromo (Cr) e quantidades variáveis de níquel (Ni)) e as ligas baseadas em cobalto-cromo (Co-Cr), que foram os primeiros biomateriais metálicos empregados com sucesso na reparação óssea e que foram gradativamente sendo substituídas pelo titânio e suas ligas, por apresentarem resistência à corrosão e biocompatibilidade inferiores (BRAR et al., 2009; GEETHA et al., 2009; JAIMES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Tanto a biocompatibilidade como a resistência à corrosão, na maioria dos metais, está relacionada à formação natural de uma fina camada passiva de óxido sempre presente em sua superfície, que pode ser restaurada praticamente de forma imediata (milissegundos) após o dano. Assim, dentre os materiais metálicos aplicados como biomateriais, devido a propriedades favoráveis desta camada de passivação, o titânio, há vinte cinco anos atrás, tornou-se um dos materiais mais competitivos com relação aos biomateriais existentes (LIU; CHU; DING, 2004; BARRY et al., 2005; BREME; BIEHL, 2016).

O titânio (Ti) é o quarto metal mais abundante crosta terrestre. Apresenta baixa densidade ($4,51 \text{ g/cm}^3$), elevado ponto fusão ($1670 \text{ }^\circ\text{C}$), módulo de elasticidade (Young) de 115 GPa , resistência à tração de 740 Mpa e módulo de cisalhamento igual a 45 GPa (COSTA E SILVA; MEI, 2010). À temperatura ambiente, o titânio apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (HC), denominada fase α , no entanto, em temperaturas acima de 885°C este metal sofre uma transformação alotrópica, mudando sua estrutura cristalina para cúbica de corpo centrado (CCC), denominada fase β (CORDEIRO; BARÃO, 2017). Ambas as estruturas cristalinas mencionadas podem ser visualizadas na Figura 1, em que as esferas representam os átomos de titânio.

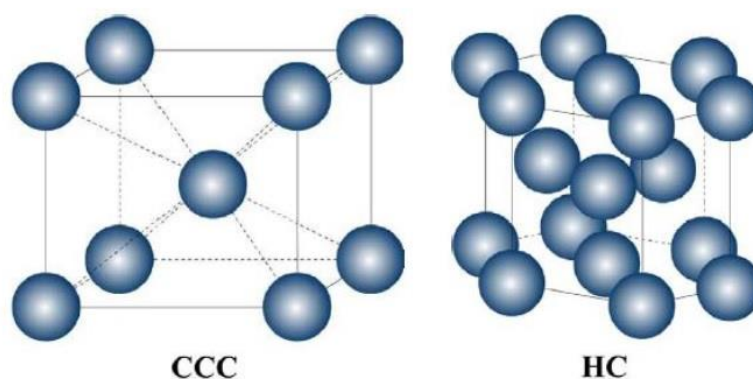


Figura 1: Estruturas cristalinas mais comuns para o titânio: à esquerda – cúbica de corpo centrado (CCC) ou fase β , obtida em temperaturas acima de 885°C e à direita – hexagonal compacta (HC) ou fase α , à temperatura ambiente (CALLISTER, 2007).

Apesar de representar a principal escolha para a confecção de implantes dentários e ortopédicos, a utilização do titânio comercialmente puro (Ti-cp) é limitada quando seu uso requer propriedades como alta resistência à tração e à fadiga, isto porque representa um material relativamente flexível (GOTTLOW et al., 2012; GRANDIN; BERNER; DARD, 2012; MISHNAEVSKY et al., 2014; QIU et al., 2015; QUIRYNEN et al., 2015). Além disso,

seu (ainda) elevado módulo de elasticidade (110-115 GPa) e a dificuldade em melhorar suas propriedades mecânicas sem redução na biocompatibilidade também são fatores limitantes à sua utilização (ELIAS et al., 2015).

A possibilidade de processar ligas de Ti a partir da adição de elementos estabilizadores da fase β (como por exemplo, vanádio (V), molibdênio (Mo), nióbio (Nb), entre outros) em sua estrutura, pode reduzir seu módulo de elasticidade (para valores entre 100-110 GPa para ligas com uma mistura de fases $\alpha + \beta$, e valores entre 46-93 GPa para as ligas puramente do tipo β), o que é vantajoso em se tratando de aplicações em implantes biomédicos, uma vez que o módulo de elasticidade para o osso cortical apresenta um valor entre 10-30 GPa (GEETHA et al., 2009; NASAB; HASSAN; SAHARI, 2010; BANERJEE; WILLIAMS, 2013; CHEN; THOUAS, 2015).

A Tabela 1 apresenta os possíveis elementos intersticiais e substitucionais estabilizadores tanto para a fase α quanto para a fase β para o caso do Ti-cp.

Tabela 1: Elementos intersticiais ou substitucionais estabilizadores da fase α ou β para Ti-cp ou ligas de titânio (CHEN; THOUAS, 2015).

Função	Elemento Intersticial	Elemento Substitucional
α-estabilizador	O, N, C, B	Al, Ga, Ge, terras-raras
β-estabilizador	H	V, Mo, Nb, Cr, Fe, Si, Ta (comumente utilizados)
Elementos neutros em estabilização da fase α ou β	-	Zr, Hf, Sn

A adição de elementos α -estabilizadores, dentre os quais destaca-se o alumínio (Al) (LEYENS; PETERS, 2003), ao Ti-cp pode aumentar a temperatura de transição entre as fases α e β , além de promover um endurecimento da matriz de titânio. Por outro lado, elementos β estabilizadores podem diminuir a temperatura de transição entre α e β e atuam como refinadores dos grãos da liga. Já os elementos neutros, apesar de não apresentar efeitos significativos sobre a temperatura de transição de fases, também podem promover o endurecimento da matriz (CORDEIRO; BARÃO, 2017).

A influência sobre a temperatura de transição entre as fases α e β em função da concentração da adição de elementos neutros ou α/β estabilizadores pode ser mais bem visualizada na Figura 2.

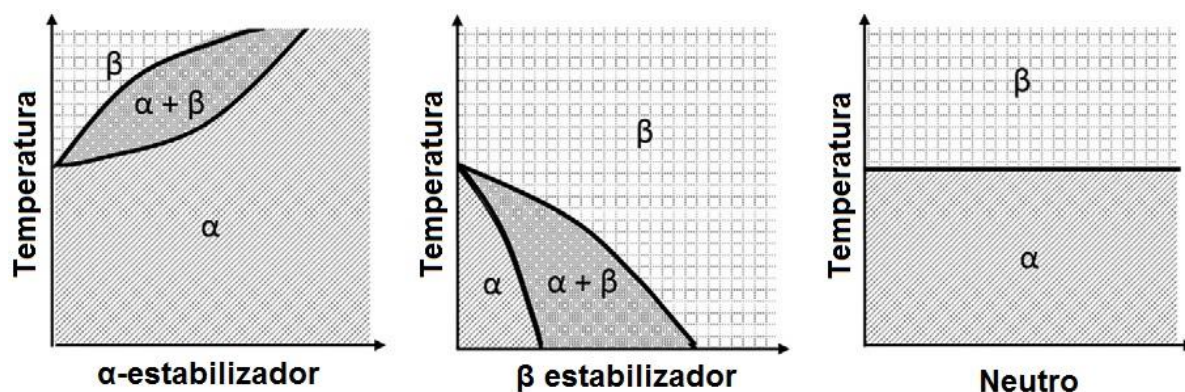


Figura 2: Influência do tipo e concentração de elementos estabilizadores sobre a temperatura de transição de fases para o titânio (Adaptada de (CORDEIRO; BARÃO, 2017)).

Com relação à proporção de elementos intersticiais, o Ti-cp pode apresentar quatro variações, do grau 1 ao grau 4 (LEYENS; PETERS, 2003; CHEN; THOUAS, 2015). Na Tabela 2 são apresentados os limites de elementos intersticiais para as quatro variações de Ti-cp disponíveis no mercado, bem como para os elementos substitucionais em algumas ligas de titânio. Ademais, nesta tabela, todos os valores são apresentados em porcentagem em peso.

Tabela 2: Porcentagem em peso (%p) de elementos intersticiais em Ti-cp e porcentagem em peso (%p) de elementos substitucionais em algumas ligas de titânio (Fonte: ASTM – *American Society for Testing Materials*).

Material	Ti	N	C	H	Fe	O	Al	V	Mo
Ti-cp grau 1	99,5	0,03	0,08	0,015	0,20	0,18	-	-	-
Ti-cp grau 2	99,3	0,03	0,08	0,015	0,30	0,25	-	-	-
Ti-cp grau 3	99,2	0,05	0,08	0,015	0,30	0,35	-	-	-
Ti-cp grau 4	99,0	0,05	0,08	0,015	0,50	0,40	-	-	-
Ti-6Al-4V	88,5–90,4	0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,5 – 6,5	3,5 – 4,5	-
Ti-15Mo	83,5–85,5	0,05	0,10	0,015	0,10	0,20	-	-	14 – 16

Ao contrário do aço inoxidável e ligas baseadas em cobalto-cromo, em que a adição dos elementos de liga tem como função aumentar sua resistência a corrosão, a função primária da adição de elementos de liga ao titânio é aprimorar suas propriedades mecânicas (principalmente a diminuição do seu módulo de elasticidade), uma vez que o titânio por si só, apresenta uma boa resistência à corrosão (DAVIS, 2003). Neste sentido, a Tabela 3, apresenta, em resumo, algumas das propriedades mecânicas para o Ti-cp e algumas ligas de

titânio, suas respectivas estruturas cristalinas e denominações na ASTM (do inglês, *American Society for Testing Materials*) e a comparação de tais propriedades com relação às demais ligas metálicas também utilizadas como biomateriais.

Tabela 3: Algumas das propriedades mecânicas para o titânio e suas ligas em comparação às ligas de cobalto e aço inoxidável (CHEN; THOUAS, 2015).

Material	Estrutura Cristalina	Denominação ASTM	Módulo Young (GPa)	Resistência Deformação (MPa)	Resistência à Tração (MPa)	Alongamento (%)
Ti-cp grau 1	Tipo α	F67	115	170	240	24
Ti-cp grau 2	Tipo α	F67	115	280	340	20
Ti-cp grau 3	Tipo α	F67	115	380	450	18
Ti-cp grau 4	Tipo α	F67	115	480	550	15
Ti-6Al-4V	Tipo $\alpha + \beta$	F136	110	860	930	10-15
Ti-15Mo	Tipo β	F2066	78	655	800	22
Aço Inoxidável	-	Depende da composição	200	200-700	500-1350	10-40
Ligas Cobalto	-	Depende da composição	240	500-1500	900-1800	10-50

Dentre as ligas de titânio comercialmente disponíveis, encontra-se o sistema Ti-6Al-4V, cuja composição em porcentagem em peso está especificada na Tabela 2 e que corresponde a 45% da produção de titânio como biomaterial. A porcentagem restante desta produção está dividida entre o titânio comercialmente puro (30%) e as demais ligas (25%) (BABILAS et al., 2013; CALIN et al., 2013; CHEN; THOUAS, 2014).

Em termos de aplicações biomédicas, tanto o titânio comercialmente puro (Ti-cp), quanto as ligas Ti-6Al-4V são mais comumente utilizadas como parte das próteses aplicadas em artroplastias (cirurgias para reparação ou substituição de articulações) de quadril, joelho, ombro, cotovelo e punho, dispositivos para fixação óssea (parafusos e porcas), dentre outras (DONATO et al., 2009; MARTINS JÚNIOR et al., 2011; CHEN; THOUAS, 2014).

Para uma melhor compreensão das possibilidades de aplicação o titânio e suas ligas em próteses, a Figura 3 apresenta um esquema representativo para uma prótese utilizada em artroplastias para reposição total de quadril (THR, do inglês *Total Hip Repleacement*). Nesta

figura também é possível observar os principais componentes da prótese em questão, bem como seu posicionamento e acomodação final no quadril de um paciente.

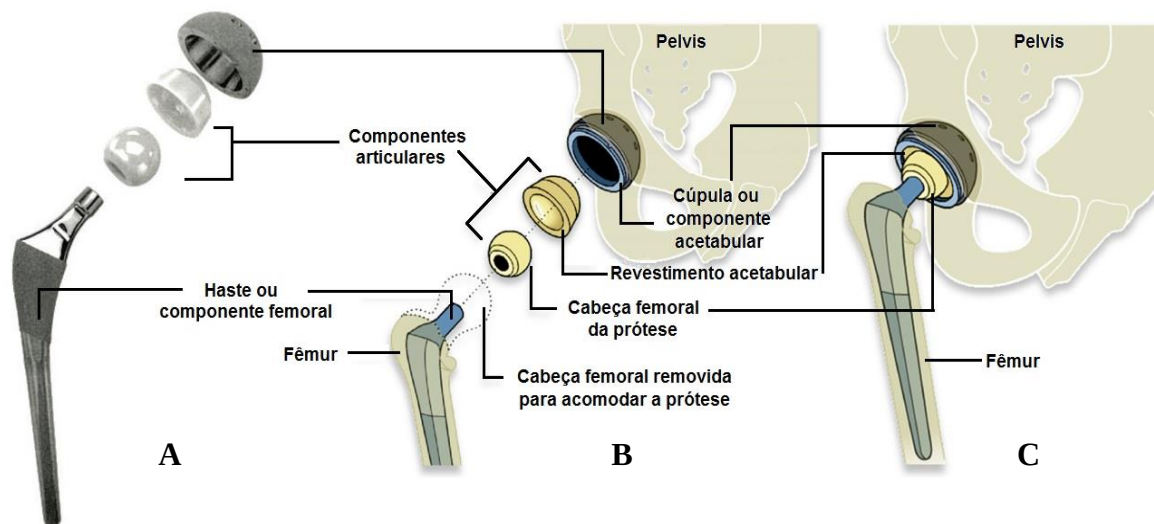


Figura 3: Prótese utilizada em artroplastias totais de quadril (A) subdividida em seus quatro componentes principais; (B) posicionamento da prótese no quadril de um paciente; (C) acomodação final da prótese. Adaptada de (GRANDJEAN et al., 2012) e (MURR et al., 2012).

Apesar de apresentar desempenho mecânico satisfatório (MISHNAEVSKY et al., 2014) e de ser largamente empregada na confecção de implantes biomédicos (BABILAS et al., 2013; CALIN et al., 2013; CHEN; THOUAS, 2014), a liga Ti-6Al-4V tem levantado sérias preocupações acerca de sua utilização, principalmente devido aos efeitos adversos relacionados à liberação de íons alumínio (Al) e vanádio (V) (HALLAB et al., 2002; SILVA; SCHNEIDER; NETO, 2004; SARGEANT; GOSWAMI, 2007; CHEN; THOUAS, 2015; VASCONCELOS et al., 2016).

De fato, o alumínio (Al) foi associado a efeitos tóxicos significativos, especialmente quando se considera relatos de sua associação com a doença de Alzheimer e outras patologias neurológicas, doenças do fígado fragilidade óssea, entre outros (DARBRE, 2006; FERREIRA et al., 2008; VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008; NASAB; HASSAN; SAHARI, 2010).

Por outro lado, o papel biológico do elemento vanádio não foi completamente elucidado e a literatura científica apresenta trabalhos que defendem tanto sua essencialidade como toxicidade (MUKHERJEE et al., 2004). De uma forma geral, a exposição a grandes quantidades deste elemento pode conduzir a mudanças hematológicas (relacionadas ao sangue) e bioquímicas, lesões neurocomportamentais, anormalidades no crescimento e

reprodução e lesões morfológicas e funcionais ao fígado, rins, ossos e baço (GHOSH; SAHA; SAHA, 2015).

Assim, ainda nos dias de hoje, o desenvolvimento de novas ligas de titânio, livres de alumínio e vanádio, e o respectivo aprimoramento de suas propriedades mecânicas, representa um campo de pesquisa em expansão (CORDEIRO; BARÃO, 2017). Na Tabela 3, a liga Ti-15Mo, com estrutura cristalina do tipo β obtida a partir da adição do elemento molibdênio (Mo), apresenta, alternativamente, propriedades mecânicas melhoradas com relação ao Ti-cp e a liga Ti-6Al-4V.

O molibdênio (Mo) é um metal de transição (grupo 6 da tabela periódica), com estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (CCC, β) e a sua utilização como elemento de liga em soluções sólidas com o titânio é responsável por conceder propriedades mecânicas mais vantajosas (CORREA et al., 2015). A adição de molibdênio à liga proporciona, em geral: redução no módulo de elasticidade, resistência à flexão, diminuição da temperatura β -*transus* (temperatura de transição entre a fase α e β), além de promover a supressão da fase ω (indesejável nas aplicações de ligas de titânio como biomaterial por apresentar efeitos negativos em suas propriedades mecânicas, como uma diminuição na dureza e o aumento no módulo de elasticidade) (CHEN et al., 2006; GEETHA et al., 2009; BABILAS et al., 2013).

Com relação à biocompatibilidade e interação com organismos vivos, o molibdênio, possui função conhecida no organismo. A concentração deste elemento no corpo humano é cerca de 70 $\mu\text{g/kg}$ estando presente, em maiores quantidades, no fígado e nos rins, em menor quantidade, nos ossos e também no esmalte dos dentes, protegendo o mesmo contra deterioração. No entanto, a inalação direta ou ingestão de molibdênio e seus óxidos deve ser evitada, bem como a exposição crônica de seres humanos às partículas e óxido deste metal, uma vez que esta pode causar sintomas como fadiga, dores de cabeça e dores nas articulações (LIBER; DOIG; WHITE-SOBEY, 2011).

Apesar disso, com relação à toxicidade sistêmica de molibdênio aplicado como elemento de liga em próteses metálicas, até o momento, existem poucos dados (CHEN; THOUAS, 2015). Li e colaboradores (2010), por exemplo, avaliaram a citotoxicidade de diversos elementos utilizados em ligas de titânio com relação a osteoblastos (células do tecido ósseo), e dentre eles, o molibdênio. Os resultados obtidos por estes autores apontam para uma diminuição de aproximadamente 70% na viabilidade celular para os osteoblastos expostos ao pó metálico comercial de molibdênio, utilizado como meio condicionante ao meio de cultura celular numa quantidade de 200 mg/mL, e uma diminuição de cerca de 55% na viabilidade

celular para os osteoblastos expostos ao meio de cultura condicionado a partir de discos metálicos de molibdênio (*bulk*), numa razão de 3,6 cm²/mL. Adicionalmente, estes autores verificaram que o limite de exposição (sem diminuição significativa da viabilidade) a íons molibdênio para a linhagem celular de osteoblastos utilizada é de 8,5 µg/mL. (LI et al., 2010).

Complementarmente à adição de molibdênio às ligas de titânio como elemento β estabilizador, a adição de outros elementos de liga conhecidos como neutros com relação ao titânio têm sido propostos nos últimos anos, com o intuito de aprimorar as propriedades mecânicas das ligas do sistema Ti-Mo, bem como sua biocompatibilidade, dentre os quais podemos citar especificamente o zircônio (Zr) (ALMEIDA et al., 2012; CALIN et al., 2013; VICENTE, 2014; CORREA et al., 2015, 2016; XAVIER et al., 2017).

O zircônio e titânio possuem características físicas e químicas muito semelhantes, uma vez que o zircônio se encontra no mesmo grupo do titânio (grupo 4) na tabela periódica (NOURI et al., 2007). Ambos os elementos também apresentam semelhanças com relação à estrutura cristalina, o que favorece a formação de solução sólida para toda gama de composições de ligas baseadas nestes elementos. A adição do zircônio também promove o endurecimento por solução sólida com o titânio, aumentando sua resistência à corrosão e uma ligeira redução de seu ponto de fusão, o que diminui os custos de seu forjamento (COSTA E SILVA; MEI, 2010).

Com relação à biocompatibilidade, o zircônio tem bom comportamento quando comparado aos demais metais utilizados como elementos de liga em biomateriais. Além disso, é relatado que compostos de zircônio apresentam baixa toxicidade (GRANDIN; BERNER; DARD, 2012; LI et al., 2014b). No entanto, a exposição a curto prazo ao zircônio e seus compostos, na forma de pó, podem causar irritação à pele e aos pulmões. Também, de acordo com testes *in vivo*, a exposição contínua ao composto tetracloreto de zircônio (ZrCl₄) pode provocar a diminuição de hemoglobina (proteína do plasma sanguíneo) e de eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue) (CHEN; THOUAS, 2015).

Para o desenvolvimento desta tese de doutoramento foram utilizados como objetos de estudo as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo.

2.2 Degradação: corrosão, desgaste e tribocorrosão

O processo de corrosão sobre um metal pode ser definido como a reação eletroquímica do mesmo ao seu ambiente circundante em que íons metálicos são liberados

como produtos desta reação, resultando em uma subsequente deterioração de suas propriedades (SHREIR, 2010).

A reação eletroquímica de corrosão pode ser matematicamente definida como abaixo, em que **Me** representa um metal, **z** é um número inteiro e **e** representa os elétrons.



Assim a corrosão de um metal **Me** conduz a liberação de um número **z** de elétrons (**e**), fazendo com que o metal **Me**, fique com carga positiva de módulo igual ao número **z** de elétrons liberados (WOLYNEC, 2003).

Por outro lado, desgaste pode ser definido como a perda progressiva de substância a partir da superfície de um corpo, que ocorre como resultado de movimento relativo sobre esta superfície. Diferentes tipos de mecanismos de desgaste podem existir, como por exemplo: (i) desgaste por abrasão, relacionado ao deslocamento de um material relativamente macio sobre a superfície de uma contraface mais dura ou rígida, (ii) desgaste adesivo, referente a um processo em que certa quantidade de material é transferida de uma superfície para outra durante movimento relativo, (iii) desgaste de fadiga, que ocorre em condições de estresse de contato repetitivo, e é frequentemente relacionado à formação de fissuras de superfície e, em seguida, liberação de partículas de desgaste, (iv) desgaste por erosão, principalmente descrito pelo dano superficial em sistemas de fluxo líquido-sólido ou gás-sólido, e por fim (v) desgaste corrosivo, que pode ser considerado como a perda de substância superficial por ação química ou eletroquímica (ZHOU et al., 2013).

O comportamento de um material com relação às condições combinadas de corrosão e desgaste de superfície promovido por carga/esforço mecânico, diz respeito a um fenômeno denominado tribocorrosão, que possui como característica principal, a sinergia entre ambos os mecanismos. Em termos mais simplificados, a sinergia dos efeitos de tribocorrosão podem ser descritos pela relação da Equação 2 (CELIS; PONTIAUX; WENGER, 2006; OLIVEIRA, 2015):

$$W_T = W_C + W_D + W_S \quad (\text{Equação 2})$$

Ou seja, degradação superficial de um material submetido a condições de tribocorrosão pode ser representada soma das contribuições da corrosão (na ausência de

desgaste, W_c) e desgaste (na ausência de corrosão, W_D) separadamente, mais uma parcela de sinergia ao efeito combinado de ambos os processos (W_S), uma vez que a presença de um ambiente corrosivo pode ampliar os mecanismos de desgaste, bem como os processos de desgaste podem influenciar a taxa de corrosão de um material, dada a remoção da camada de passivação sobre a superfície provocada pelos mesmos (CRUZ et al., 2011).

Ademais, fatores como a formação de produtos de desgaste (*debris*), o acoplamento galvânico estabelecido entre áreas desgastadas e não desgastadas, o possível acúmulo de espécies dissolvidas no fluido ao redor da zona de contato, dentre outros, também podem contribuir com os mecanismos de sinergia (PONTHIAUX; WENGER; CELIS, 2012).

O fenômeno de tribocorrosão em aplicações biomédicas é frequentemente denominado como bio-tribocorrosão e envolve a influência complexa das condições biológicas, tais como as interações de proteínas, bactérias e células com a superfície, junto aos aspectos mecânicos e corrosivos. Em implantes biomédicos, estes processos também podem conduzir à liberação de partículas de desgaste (*debris*), cuja presença na região ao redor dos mesmos pode alterar os mecanismos de desgaste subsequente, uma vez que estas pequenas partículas passam a atuar como pequenos abrasivos adicionais, promovendo uma maior degradação superficial do biomaterial (ROCHA et al., 2013).

Dentre os fatores que podem influenciar os processos de tribocorrosão e bio-tribocorrosão, as propriedades do material submetido a tais processos são de extrema importância. A dureza do material em questão, por exemplo, pode influenciar fortemente as características de deterioração da superfície, enquanto a topografia superficial pode influenciar a distribuição das cargas aplicadas ao longo da superfície, conduzindo a maiores pressões de contato em regiões mais rugosas (MARTIN et al., 2010; ROCHA et al., 2013).

Outros fatores que podem apresentar influências sobre os processos de tribocorrosão e bio-tribocorrosão, dentre os quais, como fatores mecânicos, é possível citar: a carga aplicada, a geometria de contato entre as duas superfícies em contato, a velocidade e o tipo de movimento relativo. Ademais, o tipo de ambiente ou solução ao que se expõe o material, também pode influenciar os parâmetros eletroquímicos envolvidos, determinando as propriedades corrosivas do sistema em que ocorrem tais processos (MATHEW et al., 2009).

Particularmente com relação aos implantes metálicos de titânio, as propriedades da camada de passivação formada sobre as superfícies dos mesmos é, indubitavelmente, a característica mais importante a ser levada em consideração com relação ao fenômeno de

tribocorrosão (MATHEW et al., 2009; CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016; VILLANUEVA et al., 2017).

Para o titânio comercialmente puro (Ti-cp), a camada de passivação formada sobre sua superfície é composta predominantemente por dióxido de titânio (TiO_2) e pequenas quantidades de outros óxidos de titânio, tais como TiO e Ti_2O_3 , que desempenham papel crucial com relação ao comportamento do biomaterial metálico com relação à corrosão/desgaste e conferem sua maior resistência a estes processos com relação aos demais biomateriais metálicos (MATHEW et al., 2012).

Por outro lado, a camada de passivação sobre a superfície das ligas Ti-6Al-4V possui uma composição mais complexa, em que além da presença dos óxidos de titânio, em uma camada mais interna, com maior resistência à corrosão, estão também presentes os óxidos de alumínio (Al_2O_3) e de vanádio (V_2O_3 e/ou V_2O_5), em uma camada mais externa, com menor resistência a corrosão (KUPHASUK et al., 2001; CVIJOVIC-ALAGIC et al., 2011; GHONEIM et al., 2012; CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016).

Dimah e colaboradores (DIMAH et al., 2012) investigaram comparativamente a resistência à corrosão e à tribocorrosão do Ti-cp e da liga Ti-6Al-4V em solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), utilizando como parâmetros tribológicos para os testes uma carga normal de 5N, um comprimento total para o deslizamento de 6 mm e uma frequência de 1 Hz. Estes autores verificaram que a adição dos elementos de liga alumínio e vanádio reduz a dissolução ativo-passiva do titânio e diminui consideravelmente o desgaste corrosivo sob as condições de tribocorrosão. Também, a resistência ao desgaste da liga de Ti-6Al-4V, com microestrutura de fase $\alpha+\beta$, é substancialmente superior à do Ti-cp com microestrutura α sob as condições de teste utilizadas.

Tendo em vista a importância das propriedades da camada de passivação para os implantes de titânio, muitas pesquisas tem se desenvolvido na tentativa de aplicar técnicas de modificação superficial com o intuito de aprimorar não somente o comportamento com relação à tribocorrosão para estes materiais (KUMAR et al., 2010; RAMOS-SAENZ; SUNDARAM; DIFFOOT-CARLO, 2010; ALVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015b), mas também sua biocompatibilidade, a partir da incorporação de elementos bioativos, como cálcio (Ca) e fósforo (P) (HANAWA, 2010; ALVES et al., 2015; FELGUEIRAS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015).

No entanto, embora a corrosão e bio-tribocorrosão de Ti-cp, das ligas convencionais de titânio (estrutura $\alpha + \beta$, como no caso da liga Ti-6Al-4V) e dos mais variados tipos de modificações superficiais sobre estes materiais tenham sido foco de diversos estudos, ainda existe uma carência de estudos avaliando o comportamento de novas ligas de titânio (com estrutura do tipo β) com relação a estes processos (MORE et al., 2011; RUNA; MATHEW; ROCHA, 2013).

Neste trabalho, os aspectos de degradação das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram estudados a partir de testes de tribocorrosão, apresentados em detalhes na seção 4.2. Os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados na seção 5.2.

2.3 Produtos de desgaste (*debris*)

Materiais metálicos são extensivamente empregados, como um todo ou em partes, em próteses utilizadas para artroplastias – cirurgias para substituição total ou parcial de articulações (TJA, do inglês, *Total Joint Replacement*). Isto porque apresentam propriedades mecânicas adequadas a tal aplicação que, muito frequentemente, implica em perda óssea massiva (TOPOLOVEC; CÖR; MILOŠEV, 2014).

Tendo em vista a funcionalidade da parte do organismo que visam substituir, tais próteses são baseadas em várias partes e em superfícies de deslizamento que, atualmente, podem ser classificadas principalmente em três categorias: MoM (do inglês, *Metal-on-Metal*), MoP (do inglês, *Metal-on-Polymer*) e MoC (do inglês *Metal-on-Ceramic*) (TOPOLOVEC; CÖR; MILOŠEV, 2014; VASCONCELOS et al., 2016). Na Figura 4, é possível observar os três tipos de superfícies de deslizamento, MoM, MoP e MoC.



Figura 4: Principais tipos de superfícies de deslizamento modernamente utilizadas em próteses para substituição total de articulações (TJA). Fonte: *Vaidam Health*.

No entanto, embora largamente utilizados para esta finalidade, implantes projetados a partir de metais e suas ligas, principalmente aqueles baseados em superfícies de deslizamento do tipo metal-metal, ou MoM (do inglês, *Metal-on-Metal*), ainda nos dias de hoje, levantam sérias preocupações. Isto devido ao risco potencial de reações biológicas adversas provocadas pela liberação excessiva de íons e partículas metálicas (*debris*), a partir do desgaste de suas superfícies (SMITH et al., 2012; KONTTINEN; PAJARINEN, 2013; VASCONCELOS et al., 2016).

De acordo com a literatura científica, o desgaste, a corrosão e a bio-tribocorrosão são os principais mecanismos por trás da geração de micro/nanopartículas e íons a partir das superfícies de implantes metálicos, e apesar da falha de tais dispositivos ser um evento multifatorial, ela está muito provavelmente associada às respostas biológicas adversas resultantes da liberação destes subprodutos após implantação. Neste sentido, as dimensões, quantidade e composição química destes subprodutos são fatores de extrema importância na avaliação dos efeitos biológicos possivelmente causados e estão intimamente relacionados ao biomaterial que sofre desgaste e corrosão e/ou bio-tribocorrosão (PAPAGEORGIOU et al., 2008; GALLO; SLOUF; GOODMAN, 2010).

Com relação à quantidade, não é possível apontar um consenso na literatura científica atual, pois como destacado anteriormente, o número (ou massa) de partículas liberadas a partir da superfície de um implante está diretamente relacionada às propriedades do biomaterial submetido aos processos de degradação. No entanto, de acordo com um estudo conduzido por Pourzal e colaboradores (2011), estima-se que no período de um ano, um número de partículas entre $6,7 \times 10^{12}$ e $2,5 \times 10^{14}$ pode ser gerado a partir de implantes utilizados em artroplastias totais de quadril baseadas em superfícies MoM, o que chega a ser até 500 (quinhentas) vezes maior que aquele encontrado para superfícies de deslizamento do tipo MoP (POURZAL et al., 2011).

Considerando superfícies de deslizamento do tipo MoP, diferentes taxas de liberação para os produtos de desgaste liberados a partir dos diferentes materiais metálicos deslizando sobre a superfície do polímero polietileno (comumente utilizado neste tipo de prótese) podem ser encontradas. Por exemplo, de acordo com um estudo realizado por Nine e colaboradores (2014), a taxa linear de desgaste (após aproximadamente um milhão de ciclos de fricção) de uma liga Cobalto-Cromo (Co-Cr) foi em torno de 0,1 microns por ano. Para o aço inoxidável e para a liga Ti-6Al-4V, esta taxa foi da ordem de 0,2 microns e 1 microns por ano, respectivamente (considerando o mesmo número de ciclos de fricção) (NINE et al., 2014).

Em termos de concentrações, a Tabela 4 apresenta os valores normais de metais em fluidos do corpo humano em comparação àqueles encontrados em pacientes que passaram por artroplastias totais de quadril e joelho (com e sem falha). Similarmente, a Tabela 5 apresenta a mesma informação com relação a diferentes tecidos do corpo humano (HALLAB et al., 2001).

Tabela 4: Concentrações de metais em fluidos corpóreos humanos de pacientes com e sem artroplastias articulares (HALLAB et al., 2001).

Tipo de amostra	Tipode dispositivo	Ti	Al	V	Co	Cr	Mo	Ni
		(ng/ml ou ppb)						
Soro Sanguíneo	Normal	2,7	2,2	≤ 0,8	0,18	0,05	--	0,4 -
	THR	4,4	2,4	1,7	≤ 0,6	0,6	--	≤ 9,1
	THR-F	8,1	2,2	1,3	--	0,2	--	--
	TKR	3,2	1,9	≤ 0,8	--	--	--	--
	TKR-F	135,6	3,7	0,9	--	--	--	--
Urina	Normal	≤ 1,9	6,4	0,5	--	0,06	--	--
	TJA	3,55	6,53	≤ 0,4	--	0,45	--	--
Fluido Sinovial	Normal	13	109	5	5	3	21	5
	TJA	556	654	62	588	385	58	32
Cápsula Articular	Normal	723	951	122	25	133	17	3996
	TJA	1540	2053	288	1203	651	109	2317
	TJA-F	19173	1277	1514	821	3329	447	5789
Sangue	Normal	17	13	6	≤0,2	≤ 4,0	≤1,8	≤ 7,0
	TJA	67	218	23	20	110	10	29

Conotação utilizada na Tabela 4: Normal – sujeitos sem nenhum tipo de prótese metálica; THR – sujeitos com bom funcionamento da artroplastia total de quadril; THR-F – sujeitos com mau funcionamento da artroplastia total de quadril; TKR – sujeitos com bom funcionamento da artroplastia total de joelho; TKR-F – sujeitos com mau funcionamento da artroplastia total de joelho; TJA – sujeitos com bom funcionamento de artroplastia articular total; TJA-F – sujeitos com mau funcionamento de artroplastia articular total; X – não testado.

Tabela 5: Concentrações de metais em tecidos humanos de pacientes com e sem artroplastias articulares (HALLAB et al., 2001).

Tecido	Tipo de dispositivo	Co	Cr	Ti	Al	V
		(µg/g)				
Fígado	Normal	< 14	120	100	890	14
	TJA	1130	15200	560	680	22
Pulmão	Normal	--	--	710	9830	26
	TJA	--	--	980	8740	23
Baço	Normal	10	30	70	800	< 9
	TJA	180	1600	1280	1070	12
Pseudo-cápsula	Normal	150	50	< 65	120	< 9
	TJA	3820	5490	39400	460	121

Conotação utilizada na Tabela 5: TJA – sujeitos com bom funcionamento de artroplastia articular total; X – não testado.

Em se tratando dos efeitos resultantes da interação dos produtos de desgaste com um organismo vivo, outro importante fator a ser considerado é o tamanho de tais produtos, já que esta característica está diretamente relacionada, não somente às respostas deste organismo com relação à sua exposição, mas também aos efeitos biológicos relacionados. Neste sentido, estudos recentes relatam que partículas possuindo diâmetros de até alguns micrômetros são fagocitadas por macrófagos (células do sistema imune), enquanto partículas maiores podem induzir uma resposta alérgica a corpo estranho e partículas menores podem ser internalizadas por células dos tecidos circundantes ao implante. Além disso, tanto íons quanto partículas metálicas ou de óxidos metálicos, podem alcançar a corrente sanguínea e depositar-se em outros órgãos e tecidos, apesar da maioria das partículas ficarem depositadas nos tecidos circundantes ao implante (RIBEIRO et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2016).

Também, alguns estudos relatam que a acumulação de partículas e íons metálicos pode conduzir ao estresse oxidativo, designadamente no fígado, baço e rins. Nestes tecidos, a expressão de enzimas antioxidantes é alterada e pode conduzir ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) e danos ao DNA (AFOLARANMI et al., 2012; MADEJCZYK et al., 2015).

Nine e colaboradores (2014) fizeram um levantamento comparativo com relação ao tamanho, morfologia e método de produção/recuperação (*in vitro/in vivo*) para partículas de

desgaste de diferentes materiais empregados na confecção de próteses para substituição de articulações do quadril e joelho baseados em diferentes superfícies de deslizamento (MoM, MoP e MoC). De acordo com estes autores, tanto morfologia quanto o tamanho serão intimamente dependentes das superfícies de deslizamento analisadas. Além disso, apesar de apresentar características ligeiramente diferentes com relação às partículas de desgaste recuperadas de tecidos adjacentes aos implantes (*in vivo*), partículas produzidas a partir de simuladores (*in vitro*) ainda representam um modelo válido para o estudo e caracterização dos produtos de desgaste (NINE et al., 2014).

Ainda neste contexto, Hongtao e colaboradores (2011) fizeram um estudo comparativo entre tamanho e morfologia para partículas de desgaste derivadas do polímero polietileno UHMWPE (do inglês *Ultra High Molecular Weight Polyethylene*) em uma prótese do tipo *Metal-on-Polymer* (MoP), em que a superfície de deslizamento consistia de uma liga cobalto-cromo (Co-Cr). Dois métodos para obtenção destas partículas foram utilizados: *in vitro* (a partir de simuladores de articulações) e *in vivo* (recuperadas de tecidos adjacentes ao implante em pacientes). De acordo com estes autores, as partículas obtidas para o polímero *in vitro* apresentaram tamanhos entre 4 e 20 μm e morfologias variadas, enquanto àquelas obtidas *in vivo* apresentaram tamanhos entre 0,5 e 5 μm , e morfologias predominantemente esféricas (HONGTAO et al., 2011).

Anteriormente, Brown e colaboradores (2007) já haviam avaliado tamanho e morfologia para partículas de desgaste geradas a partir de superfícies de deslizamento do tipo *Metal-on-Metal* (MoM) baseadas na liga CoCr, *in vitro*, a partir de um simulador de articulação de joelho. Os resultados obtidos por estes autores revelam a obtenção de partículas com morfologias irregulares e arredondadas com tamanhos menores de 50 nm (BROWN et al., 2007). Por outro lado, Koseki e colaboradores (2005), realizaram um estudo em que as mesmas características (tamanho e morfologia) foram avaliadas *in vivo*, a partir da recuperação dos *debris* nos tecidos adjacentes a uma prótese de tipo MoM baseada na liga CoCr. Estes autores observaram tanto partículas com morfologia de agulhas, com tamanhos variando entre 40 e 120 nm, quanto partículas com morfologia globular com tamanhos menores ou iguais a 90 nm (KOSEKI et al., 2005).

Por fim, Wang e colaboradores (2010) avaliaram, *in vitro*, a partir de simuladores de articulações do quadril, o tamanho e morfologia para partículas obtidas a partir do deslizamento do polímero polietileno UHMWPE sobre diferentes materiais (Al_2O_3 , CoCr, Ti-6Al-4V e outros). Com relação ao óxido de alumínio (Al_2O_3), partículas de polietileno com

tamanhos variando entre 0,3 e 175 μm foram observadas, no entanto, partículas entre 1 e 30 μm apareceram com maior frequência. De forma semelhante, partículas com tamanhos variando entre 0,1 e 142 μm foram observadas para este polímero com relação ao deslizamento sobre a liga CoCr, porém neste caso, a maior frequência de partículas foi observada para o tamanho de 20 μm . Por fim, para as partículas do polímero geradas a partir do deslizamento com relação à liga Ti-6Al-4V, tamanhos entre 0,1 e 270 μm foram detectadas e 25 μm foi o tamanho com maior frequência de aparecimento. Para este último caso, partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V também foram detectadas no fluido de lubrificação utilizado nos testes e a caracterização das mesmas revelou tamanhos menores que 10 μm (WANG et al., 2010).

De uma forma geral, os processos de degradação atuantes sobre próteses baseadas em superfícies de deslizamento do tipo MoM aparentam produzir partículas de desgaste menores quando comparadas àquelas do tipo MoP. Também, embora seja possível encontrar, ainda que em pequenas quantidades, estudos com relação à caracterização para partículas de desgaste geradas a partir da liga CoCr, praticamente não existem estudos publicados sobre a caracterização de partículas de desgaste derivadas da liga Ti-6Al-4V.

Para esta pesquisa, partículas de desgaste das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo produzidas a partir de testes de tribocorrosão tiveram suas características físico-químicas (tamanho, morfologia e composição) analisadas. Os detalhes para os testes, caracterizações relacionadas e resultados obtidos são apresentados nas seções 4.3 e 5.3, respectivamente.

2.4 Efeitos biológicos

A osteólise, ou reabsorção/erosão destrutiva do osso, há muitos anos é apontada como o principal fator envolvido na falha e consequente perda de implantes ortopédicos e dentários (STOJILOVIC et al., 2006; GALLO et al., 2008; WEI; SIEGAL, 2008; BITAR; PARVIZI, 2015; VERONESI; TSCHON; FINI, 2017). Neste sentido, o desencadeamento de tal processo tem sido atribuído às respostas inflamatórias locais provocadas pela presença de partículas de desgaste nos tecidos ao redor de um implante (HALLAB; JACOBS, 2009, 2017; RAO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2016).

A Figura 5 apresenta a visão radiográfica do quadril de um paciente com uma prótese do tipo MoM logo após a cirurgia de implantação e após cinco anos de implantação, em que é

possível ver claramente o processo osteólise, que neste caso foi atribuído à presença de partículas de desgaste na região ao redor do implante (AMANATULLAH et al., 2016).

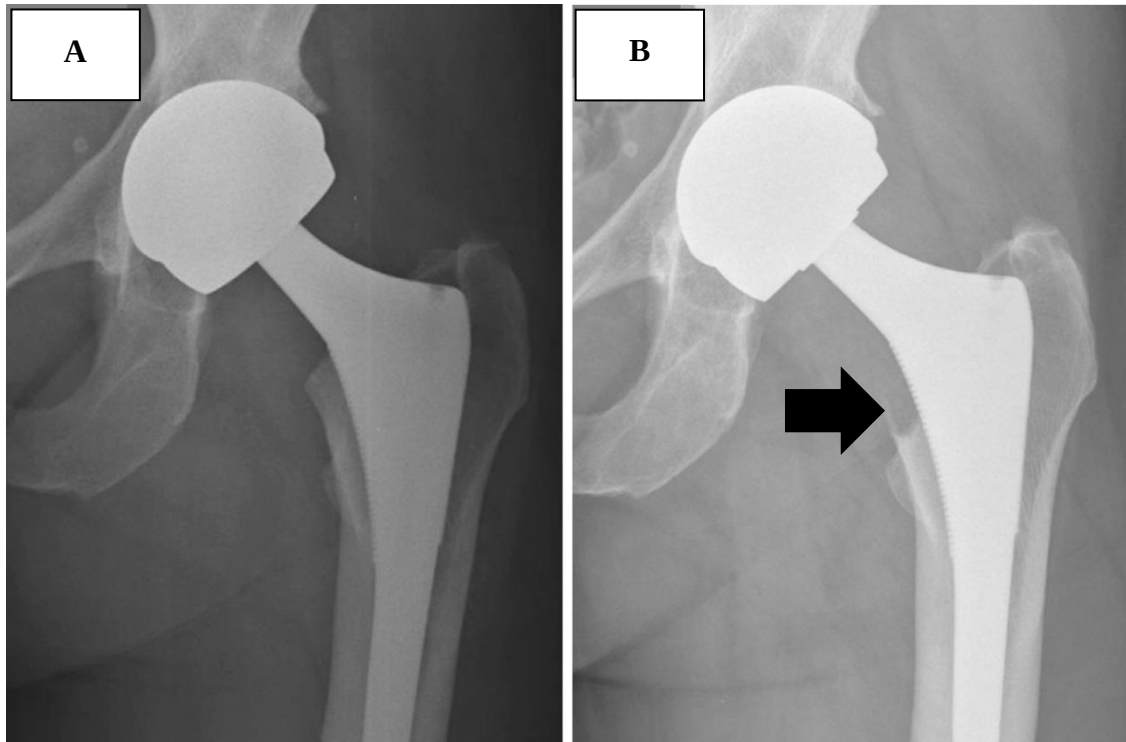


Figura 5: Radiografia do quadril de um paciente submetido a uma artroplastia para substituição total do quadril em que foi utilizada uma prótese de tipo MoM: (A) logo após a cirurgia para a implantação e (B) cinco anos após a cirurgia para a implantação. A seta enfatiza a região que sofreu o processo de osteólise (Adaptada de (AMANATULLAH et al., 2016)).

Além disso, quando liberadas, as partículas de desgaste metálicas podem ser depositadas nos tecidos ao redor de um implante conduzindo à fibrose/necrose locais e conferindo ao mesmo uma aparência acinzentada, comumente referida como metalóse. No entanto, os mecanismos moleculares que influenciam a intensidade das características fisiológicas observadas nestes tecidos ainda estão por ser reveladas (DALEY et al., 2004; WATTERS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015a).

A Figura 6 (a) apresenta a aparência acinzentada dos tecidos de um paciente com um caso extremo de metalóse quatro anos após uma artroplastia para reposição total de quadril (THR, do inglês *Total Hip Replacement*), cuja prótese utilizada era do tipo MoP, mas possuía os componentes femoral e acetabular constituídos pela liga Ti-6Al-4V. A Figura 6 (b) apresenta o desgaste da superfície da componente acetabular do implante e a Figura 6 (c) a aparência negra do fluido drenado do local através de uma punção.

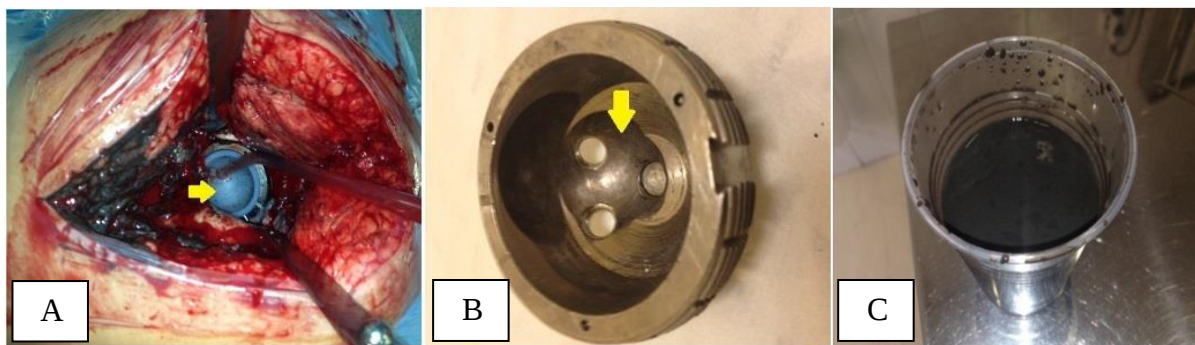


Figura 6: Metalóse em um paciente após quatro anos de uma artroplastia de reposição total de quadril (THR): (A) imagem capturada durante o procedimento cirúrgico para remoção do implante, (B) superfície desgastada da componente acetabular do implante e (C) fluido negro drenado do local através de uma punção (Adaptada de (OLIVEIRA et al., 2015a)).

Além da metalóse, outro problema pode ser citado como resultado da liberação e acúmulo de produtos de desgaste nos tecidos ao redor do implante. A patologia comumente referida como “*doença da partícula*” é uma resposta imunológica congênita desencadeada pela ativação excessiva de macrófagos (células do sistema imune) para a fagocitose de partículas de desgaste. Brevemente, os macrófagos ativados em excesso podem produzir de citocinas que mediam a ativação de osteoclastos (células do tecido ósseo, responsáveis pela remodelação) que executam a reabsorção óssea, o que também pode comprometer ou até mesmo conduzir até a falha do implante (CHAMPION; WALKER; MITRAGOTRI, 2008; GALLO et al., 2008).

De uma forma geral, a maior parte dos problemas relacionados à presença de partículas de desgaste nos tecidos ao redor de um implante e mencionada nos parágrafos anteriores está ligada à produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células que sofrem o estímulo destas partículas, nomeadamente as células do tecido ósseo (osteoblastos) e do tecido conjuntivo (fibroblastos) e também as células recrutadas pelo sistema defensivo para combatê-las (macrófagos). Resumidamente, a secreção sinérgica destas citocinas pró-inflamatórias, estimula a diferenciação/ativação de osteoclastos responsáveis pela absorção óssea, conduzindo à osteólise, comprometimento e falha do implante (GREENFIELD et al., 2005; HALLAB; JACOBS, 2017).

Dentre tais citocinas pró-inflamatórias produzidas podemos citar, não somente, mas principalmente, o fator de necrose tumoral α , (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor α*), as interleucinas 1, 1 α , 1 β , 6 e 10 (IL-1, IL-1 β , IL-6 e IL-10), e a prostaglandina E2 (PGE2). Ademais, além de provocar a secreção de citocinas, a presença das partículas de desgaste

também pode induzir efeitos apoptóticos sobre as células mencionadas anteriormente (LANDGRAEBER et al., 2014; BITAR; PARVIZI, 2015; SUKUR et al., 2016; HALLAB; JACOBS, 2017).

A relação entre os produtos de desgaste e reabsorção óssea tem sido intensamente estudada, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos de tais produtos sobre o crescimento, proliferação e metabolismo de osteoblastos, mesmo sendo relativamente bem estabelecido que a presença dos mesmos possa afetar as funções deste tipo celular (HALLAB et al., 2002).

Além de exercer efeitos citotóxicos, a exposição de osteoblastos a metais (íons ou partículas) pode conduzir, além de alterações significativas na morfologia celular, a modificação nas funções de proteínas sintetizadas por este tipo de células. Em seu artigo de revisão, Sansone e colaboradores (2013) apontam alguns destes efeitos para osteoblastos expostos a partículas ou íons de cobalto (Co) e cromo (Cr). Por exemplo, de acordo com estes autores, estudos *in vitro* indicam que a viabilidade de osteoblastos expostos aos metais mencionados pode ser reduzida tanto nas formas dose-dependente quanto tempo-dependente. Adicionalmente, mudanças morfológicas podem ser observadas para este tipo de células após sua exposição a partículas de cobalto (Co). Também, a função de algumas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos e fundamentais à manutenção do tecido ósseo, como por exemplo, osteocalcina, fosfatase alcalina (ALP, do inglês *alkaline phosphatase*) e colágeno, podem ser comprometidas (SANSONE; PAGANI; MELATO, 2013).

Com relação à composição das ligas atualmente aplicadas à confecção de implantes, é possível encontrar na literatura atual diversos estudos em que os efeitos da exposição de partículas de desgaste baseadas em cobalto-cromo sobre osteoblastos e macrófagos são avaliados (LOHMANN et al., 2000; NEALE et al., 2000; ANISSIAN et al., 2002; PAPAGEORGIOU et al., 2008; KWON et al., 2009; MOSTARDI et al., 2010; HOREV-AZARIA et al., 2011). Estudos deste tipo para partículas de desgaste baseadas em Ti-6Al-4V são mais escassos, evidenciando sua necessidade de desenvolvimento, uma vez que os elementos constituintes desta liga podem causar efeitos adversos à saúde (VERSTRAETEN; AIMO; OTEIZA, 2008; GHOSH; SAHA; SAHA, 2015)

Dentre os elementos constituintes da liga Ti-6Al-4V, atenção especial deve ser dada ao elemento vanádio, uma vez que este elemento não possui papel biológico consolidado (GOC, 2006).

O elemento vanádio e seus compostos aparentam ter influência sobre alguns fatores relacionados ao processo inflamatório. Por exemplo, de acordo com um estudo conduzido por

Ingram e colaboradores (2007), utilizando um modelo de fibroblastos pulmonares humanos, o pentóxido de vanádio (V_2O_5) pode induzir ou suprimir a expressão de genes relacionados a tal processo (INGRAM et al., 2007).

Em concentrações tão baixas quanto $7,5 \mu M$, compostos de vanádio podem ativar enzima fosfolipase citoplasmática A2 (cPLA2), o que aumenta a síntese de ácido araquidônico (AA) presente nas membranas celulares. Quando oxidado por ciclooxygenases (COX), o ácido araquidônico produz prostanóides, incluindo a principal prostaglandina pró-inflamatória, prostaglandina E2 (PGE-2). Além disso, através de diferentes cascatas de sinalização, compostos de vanádio também podem ativar a produção de diferentes citocinas relacionadas ao processo inflamatório (KORBECKI et al., 2015).

Além disso, em organismos vivos, a presença de espécies iônicas de vanádio, nomeadamente vanadatos (vanádio em seu estado de oxidação +5), possui ação inibitória com relação às fosfatases, o que se deve às semelhanças entre os íons fosfato (PO_4^{3-}) e vanadato (VO_4^{3-}) (CRANS et al., 2004; CRANS; TARLTON; MCLAUCHLAN, 2014; COSTA PESSOA et al., 2015; PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015).

Desta forma, estas espécies iônicas de vanádio também estão ligadas à regulação de processos dependentes de fosfato, tais como processos metabólicos envolvendo fosfatases (proteína tirosina fosfatase, PTP) e quinases (proteína tirosina quinase, PTK). Esses processos, como controle do ciclo celular e expressão gênica, são modulados por vias de sinalização, envolvendo fosforilação e desfosforilação das proteínas/enzimas, e podem ser alteradas pela presença de vanádio de maneiras dependentes do tipo de célula envolvida (FERRER et al., 2006; MCLAUCHLAN et al., 2010, 2015; SRIVASTAVA; KUMAR; ROY, 2014).

Outros autores também já investigaram a influência de íons e compostos de vanádio sobre diferentes linhas celulares. Por exemplo, Cortizo e colaboradores (1997) avaliaram a proliferação celular e alterações morfológicas em fibroblastos de camundongo Swiss-3T3 expostos a três diferentes espécies iônicas de vanádio: vanadato (V^{5+}) pervanadato (V^{5+}) e vanadil (V^{4+}), em concentrações variando de $2,5 \mu M$ a $100 \mu M$. De acordo com os resultados obtidos por estes autores, efeitos citotóxicos, bem como alterações morfológicas significativas, foram observados em concentrações superiores a $50 \mu M$, principalmente para as espécies iônicas com vanádio no seu maior estado de oxidação (vanadato e pervanadato) (CORTIZO et al., 1997). Estes resultados estão globalmente de acordo com os dados obtidos

por Rehder e colaboradores (2002) a partir de um estudo envolvendo mais de 40 complexos de vanádio com relação a fibroblastos de camundongo (REHDER et al., 2002).

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, inicialmente foram avaliados, *in vitro*, os efeitos citotóxicos relacionados à exposição de íons de vanádio (possivelmente liberados a partir da degradação da liga Ti-6Al-4V) às células do tecido ósseo (osteoblastos) e conjuntivo (fibroblastos) de camundongos. Ademais, considerando a complexidade química do elemento vanádio em solução, a especiação iônica e a identificação das diferentes espécies de íons de vanádio presentes em meio de cultura (e seus possíveis ligantes) também foram realizadas. Maiores detalhes sobre os ensaios realizados e resultados obtidos são dados na seção 4.1 e 5.1.

Complementarmente, partículas de desgaste produzidas a partir de testes de tribocorrosão sobre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram utilizadas para avaliação de alguns efeitos biológicos (*in vitro*) com relação duas linhagens celulares derivadas do tecido ósseo humano. Características como a viabilidade celular, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e PGE2), e a possível internalização destas partículas pelas células foram avaliadas. Com relação a este aspecto, métodos e resultados são apresentados nas seções 4.5 e 5.5.

2.5 Endotoxinas

Lipopolissacarídeos (LPS), comumente referidos como endotoxinas, são macromoléculas (peso molecular 200-1000 kDa) presentes na membrana externa de bactérias do tipo *Gram negativa*. Estas macromoléculas, compostas por lipídeos (lipídeo A) e polissacarídeos, geralmente estão associadas à indução de efeitos tóxicos e inflamatórios em organismos vivos (LI; BORASCHI, 2016).

Endotoxinas podem ser liberadas a partir das membranas bacterianas durante seus processos de proliferação e/ou morte. Além disso, uma única célula da bactéria *E. Coli* pode, por exemplo, conter até 1.000.000 (um milhão) de unidades de endotoxinas (EU, do inglês *endotoxin units*) (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Quando presentes na corrente sanguínea de seres humanos e animais, as endotoxinas podem induzir uma série de efeitos adversos, sendo o mais comum entre eles, a febre, o que faz com que sejam também comumente referidos como pirógenos. Outros efeitos relacionados à presença de endotoxinas na corrente sanguínea são: tremores, hipotensão (pressão baixa),

difficuldade respiratória, coagulação intravascular e outros. Além disso, endotoxinas também são capazes de ativar macrófagos e monócitos do sistema imune e estimular a produção celular de citocinas pró-inflamatórias *in vivo*, nomeadamente as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (RAETZ; WHITFIELD, 2002; GORBET; SEFTON, 2005; MARUYAMA; SANO; MATSUO, 2006).

A injeção intravenosa de concentrações tão baixas quanto 1 ng/mL de endotoxinas (o que corresponde a aproximadamente 10 unidades de endotoxina por mL, 10 EU/mL) pode causar reações como as descritas no parágrafo anterior. Por esta razão, de acordo a recomendação geral baseada nas normas da FDA (*Food and Drugs Association*, USA) e USP (*United States Pharmacopeia*), os limites de endotoxinas em dispositivos médicos não podem exceder 0,5 EU/mL (CATHERINE A MCINTYRE; REININ, 2009; MAGALHÃES et al., 2011).

Por causa de um de seus efeitos *in vivo*, nomeadamente a ativação de células do sistema defensivo e a produção de citocinas pró-inflamatórias, que pode desencadear a diferenciação e ativação de osteoclastos, e conseqüentemente, a osteólise, endotoxinas também podem estar relacionadas à falha de implantes biomédicos. Para as endotoxinas relacionadas a este processo, três fontes potenciais podem ser citadas: (i) a presença de endotoxinas sobre as superfícies dos implantes antes mesmo da implantação, (ii) a formação de um biofilme bacteriano sobre a superfície destes materiais após a implantação e (iii) a alta afinidade que possuem as partículas de desgaste, geradas a partir da degradação dos implantes *in vivo*, por endotoxinas que podem derivar da flora intestinal, pequenas infecções e/ou procedimentos dentários (GREENFIELD et al., 2005).

Se levarmos em consideração que a tanto a presença de partículas de desgaste quanto de endotoxinas podem conduzir à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, a associação deste efeito para estes dois agentes pode acelerar os processos que conduzem à falha de um implante (BI et al., 2001; RAETZ; WHITFIELD, 2002; LANDGRAEBER et al., 2014; HALLAB; JACOBS, 2017).

A influência relacionada à presença de endotoxinas (exclusivamente) sobre os processos que conduzem a falha de implantes biomédicos é geralmente citada nos estudos científicos publicados na literatura. Para aqueles que avaliam os efeitos biológicos que podem conduzir a esta falha e relacionados à interação de partículas de desgaste, no entanto, a associação entre os efeitos produzidos por estas partículas e endotoxinas não é frequentemente levada em consideração. Neste sentido, não é possível dizer se os resultados

observados nestes estudos estão diretamente relacionados às partículas ou sofrem influência das endotoxinas (BI et al., 2001; HALLAB; JACOBS, 2009, 2017; LI; BORASCHI, 2016).

Por exemplo, Bi e colaboradores (2001) avaliaram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) por células mesenquimais de medula óssea de camundongos após sua interação com partículas de titânio comercialmente puro (Ti-cp) livres e com a adsorção de endotoxinas. De acordo com estes autores, a produção de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas é maior para as células que interagem com partículas de Ti-cp com a adsorção de endotoxinas quando comparadas àquelas que interagem com este mesmo tipo de partícula livre de endotoxinas (BI et al., 2001).

Assim, para que os efeitos biológicos resultantes da interação de partículas de desgaste produzidas *in vivo* ou *in vitro* com relação às células do tecido ósseo, conjuntivo e defensivo sejam corretamente avaliados, é extremamente importante promover a remoção das endotoxinas adsorvidas em sua superfície.

De forma geral, endotoxinas são altamente resistentes ao calor e não podem ser eliminadas sob condições regulares de esterilização. Na realidade, os processos convencionais de esterilização por temperatura (responsáveis por livrar de contaminação por bactérias grande parte dos materiais) podem causar um efeito contrário com relação às endotoxinas, uma vez que a quebra da membrana celular bacteriana pode resultar na liberação de um grande número de endotoxinas (RAETZ; WHITFIELD, 2002; MAGALHÃES et al., 2011).

Muitos métodos têm sido empregados para a remoção de endotoxinas da superfície de materiais, dentre os quais podemos citar, ultra filtração, cromatografia de filtração em gel, extração por duas fases, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade de adsorção, descarga de plasma, entre outros. No entanto, o método mais eficiente para a destruição de endotoxinas é a sua queima a partir de tratamentos térmicos específicos (LI; BORASCHI, 2016).

Como são resistentes ao calor, temperaturas mais altas ou períodos de tempo mais longos com relação àquelas empregadas aos processos de esterilização convencionais são indicados. De acordo com uma recomendação da USP (*United States Pharmacopeia*), por exemplo, endotoxinas podem ser removidas a partir do tratamento térmico a 180 °C durante 3 horas ou 250 °C durante 30 minutos (GORBET; SEFTON, 2005; WILLIAMS, 2007).

Um dos métodos mais comuns utilizados para detecção e quantificação de endotoxinas é o ensaio baseado em na reação com LAL (do inglês, *Limulus Amoebocyte Lysate*). Nestes ensaios, uma enzima presente nas células do sangue (amebócitos) de uma

espécie específica de caranguejo (caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*) pode ser ativada pela presença de endotoxinas presentes em uma solução provocando coagulação (LI; BORASCHI, 2016).

Para assegurar que os efeitos desencadeados nas células do tecido ósseo humano utilizadas neste trabalho estavam relacionados apenas ao estímulo provocado pela sua interação com as partículas de desgaste das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, estas partículas, depois de produzidas, coletadas e caracterizadas, foram submetidas a um tratamento térmico para a remoção de endotoxinas. Os níveis de endotoxinas foram avaliados semi-quantitativamente através de ensaios LAL do tipo gel-clot. Os detalhes experimentais e os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados nas seções 4.4 e 5.4.

3 OBJETIVOS

Definiu-se como objetivo inicial do trabalho a avaliação dos efeitos citotóxicos (*in vitro*) relacionados à exposição de células do tecido ósseo (osteoblastos) e conjuntivo (fibroblastos) de camundongo a espécies iônicas de vanádio.

Complementarmente, análises de aspectos relacionados à degradação superficial, a produção de produtos de desgaste pela liga Ti-6Al-4V e (alternativamente) por uma liga sem a adição de vanádio, Ti-15Zr-15Mo, também foram propostos.

Para esta etapa, definiram-se como objetivos específicos: (i) a avaliação do comportamento com relação à tribocorrosão para estas duas ligas específicas, (ii) a produção e completa caracterização físico-química para as partículas de desgaste geradas a partir das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo nos ensaios de tribocorrosão, (iii) a avaliação (*in vitro*) da citotoxicidade destes produtos de desgaste após seu contato direto com células do tecido ósseo humano (osteoblastos) e (iv) a análise (*in vitro*) de possíveis consequências relacionadas à interação entre as partículas de desgaste e os osteoblastos humanos, especificamente em termos da possível internalização destas partículas pelas células e da produção de citocinas pró-inflamatórias (interleucina 6, IL-6 e prostaglandina E2, PGE2).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação da citotoxicidade de íons de vanádio e sua especiação iônica em meios de cultivo celular

Os possíveis efeitos citotóxicos relacionados à exposição de íons de vanádio às células do tecido ósseo (osteoblastos) e conjuntivo (fibroblastos) de camundongo foram avaliados *in vitro*, a partir de ensaios de viabilidade celular por redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e análises de morfologia celular (microscopia óptica).

Complementarmente, considerando a complexidade química do elemento vanádio em solução, a especiação iônica para este elemento foi realizada, a partir do software Hyss com a utilização de dados experimentais de pH e concentração total em meio de cultura. A partir deste software e informações sobre a composição do meio de cultura, foram determinados os possíveis ligantes para os íons de vanádio em meio de cultura.

Os materiais e métodos utilizados para as análises mencionadas acima são apresentados a seguir.

4.1.1 Cultura de células

Pré-osteoblastos MC3T3-E1 (ATCC) e fibroblastos NIH3T3 (ATCC) de camundongo foram cultivados em α -MEM e DMEM (Gibco), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37°C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Posteriormente, antes de atingir confluência, as células foram destacadas da superfície dos frascos de cultura por tripsinização (0,04% de tripsina em uma solução 0,25% de EDTA, por 5 minutos) tratadas com azul de tripano e contadas em um hemocítômetro.

4.1.2 Grupos experimentais

O pó comercial de pentóxido de vanádio, V₂O₅ (Sigma Aldrich, 99,99%), sem nenhum tipo de tratamento adicional, foi utilizado para estudar e simular as possíveis espécies iônicas de vanádio liberadas pela camada superficial de óxido V₂O₅ nas superfícies de um

implante Ti-6Al-4V em soluções fisiológicas (meio de cultura celular) e os efeitos citotóxicos resultantes da interação destes agentes químicos com as células das linhagens MC3T3-E1 e NIH3T3.

Para isso, seguindo as recomendações da ISO para testes biológicos (ISO 10993-5:2009 e ISO 10993-12:2012), o pó comercial de V_2O_5 foi misturado aos meios de cultura de células na proporção D0 = 20 mg/mL (*stock*). Esta mistura foi então incubada a 37 °C e 5% de CO_2 durante 24h.

Após este período, a quantidade total de pó de V_2O_5 não dissolvido em meio de cultura (precipitado) foi separada, por aspiração, do sobrenadante (meio de cultura enriquecido com os íons de vanádio dissolvidos). Para garantir apenas a presença de íons nos meios de cultura condicionados, este sobrenadante foi filtrado (membrana de 0,22 μ m). Por fim, os meios de cultura condicionados passaram por diluições seriadas, variando de D1= 10^1 a D5 = 10^5 (fator de diluição de 10x) para obtenção dos extratos finais a serem utilizados para os ensaios de viabilidade celular. A metodologia mencionada para obtenção dos extratos pode ser visualizada na Figura 7.

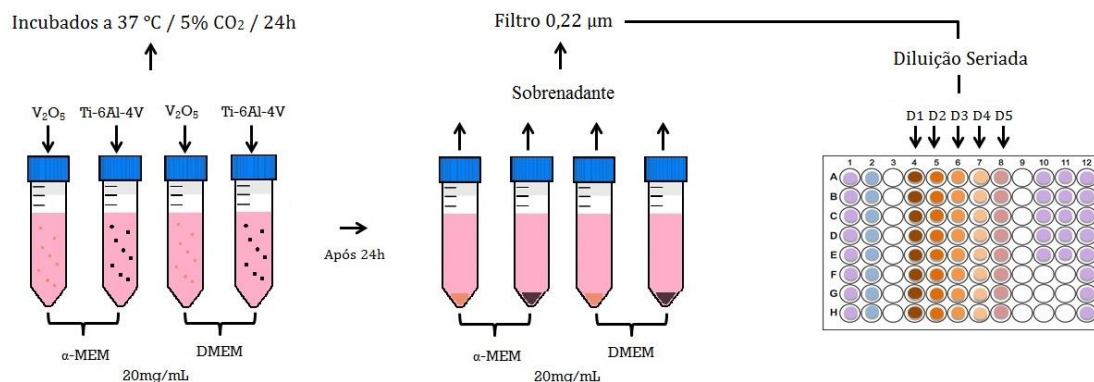


Figura 7: Metodologia utilizada para obtenção dos extratos posteriormente utilizados nos ensaios de viabilidade celular.

4.1.3 Viabilidade celular por redução de MTT

Para os ensaios de viabilidade, 3×10^3 células foram cultivadas nos poços de placas de 96 poços, as quais foram mantidas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO_2 .

Após 24 h, o meio de cultura dos poços foi substituído pelos extratos obtidos a partir da diluição em série da mistura *stock* de V_2O_5 (em α -MEM para os osteoblastos MC3T3-E1 e DMEM para os fibroblastos NH3T3) para cinco diluições finais variando de D1 = 10^1 a D5 =

10⁵. Além disso, como grupo controle positivo, utilizou-se apenas o meio de cultura celular para cada uma das linhagens, suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. Como grupo controle negativo, o meio de cultura de células foi substituído por água estéril.

A viabilidade celular foi avaliada em três períodos experimentais - 24 h, 48 h e 72 h, e os experimentos foram realizadas pelo menos em triplicata. Após cada período, os extratos foram removidos e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de meio fresco contendo 10% de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço e as placas de cultura foram novamente incubadas a 37 °C durante 4 h. Após este intervalo de tempo, o meio foi removido e 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. Por fim, após 30 min, a densidade óptica foi medida a 550 nm com um leitor de microplacas multi-modo Synergy H1 baseado em monocromador (Bio-Tek).

O software Origin 7.0 foi utilizado para calcular as diferenças entre conjuntos de dados com base na análise de variância (ANOVA), teste Tukey. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.1.4 *Avaliação da morfologia celular*

Os efeitos relacionados à interação com os íons de vanádio em meio de cultura também foram avaliados com relação à morfologia celular das linhagens MC3T3-E1 e NIH3T3.

Para isso, foram cultivadas 2×10^4 células em placas de Petri, as quais foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. O mesmo método para a substituição do meio de cultura por extratos e períodos experimentais (24 h, 48 h e 72 h) mencionados na seção 4.1.3 foram utilizados neste experimento. Após cada período experimental, a morfologia celular foi avaliada usando um microscópio óptico (Olympus, CKX41, Tóquio, Japão). As imagens obtidas foram analisadas com relação à morfologia celular de acordo com sua forma, extensões de citoplasma e contato físico entre si.

4.1.5 *Caracterização físico-química do V₂O₅*

Para melhor compreensão dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e avaliação de morfologia celular, o pó comercial de pentóxido de vanádio foi caracterizado de acordo com suas características físico-químicas.

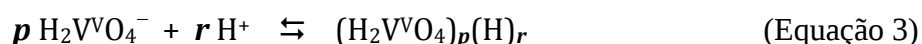
Assim, para investigar as composições químicas e estruturais deste pó, análises de difração de raios-X (XRD, do inglês *X-ray diffraction*) foram realizadas utilizando um difratômetro da marca Rigaku, modelo D / MAX 2100 PC, com radiação CuK α , uma tensão de 40 kV, uma corrente de 20 mA, uma fenda de divergência de 1°, uma fenda receptora de 0,3 mm e um filtro de níquel. Utilizou-se uma faixa de varredura angular de 20-100°, com passos de 0,02° e um tempo fixo de 1,6 s/ passo.

Com o intuito de obter informações sobre a morfologia e dimensão das partículas de pentóxido de vanádio, análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) foram realizadas em um microscópio equipado com canhão emissão de campo (FEG, do inglês *field emission gun*), da marca JEOL, modelo 7500F (1 nm de resolução teórica), operando a uma tensão de 5 kV para aquisição de imagens.

Além disso, após a mistura do pentóxido de vanádio em pó com o meio de cultura de células, medidas de pH da mistura resultante, bem como de todas as diluições posteriores, foram realizadas usando um medidor de pH (Eutech Instruments, pH700). Por fim, análises por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foram realizadas (equipamento Jobin Yvon Activa M), para determinar a quantidade real de vanádio dissolvida nos meios de cultura de células.

4.1.6 Especificação iônica

Utilizando os dados fornecidos pelas medidas de pH e a concentração total de vanádio ([V] total) nos meios de cultura de células, determinada pelo ICP-OES, foi possível realizar a simulação das espécies iônicas de vanádio presentes em ambos os meios de cultura de células a partir do software HySS (ALDERIGHI et al., 1999). Complementarmente, também foram utilizadas as constantes hidrolíticas para as espécies iônicas de V^V (vanádio em seu estado de oxidação +5) definidas pela Equação 3, em que **p** e **r** representam números inteiros positivos (ELVINGSON; GONZÁLES BARÓ; PETTERSSON, 1996; PETTERSSON; ANDERSSON; GORZSÁS, 2003; CRANS et al., 2004):



Também, considerando as composições dos meios de cultura α -MEM e DMEM (LEVINA; CRANS; LAY, 2017), foram identificados como ligantes em concentrações

relevantes: glicose, com até 25 mM em DMEM e piruvato, com até 1 mM em DMEM e albumina de soro bovino (representada por BSA, do inglês *bovine serum albumin*) com até 6 μ M em DMEM. No entanto, com a suplementação em 10% dos meios de cultura com soro fetal bovino (SFB), rico em albumina (380 μ M), a concentração final média de BSA considerada para as especiações foi de 40 μ M. Isto porque o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino pode conter uma concentração total de 44 μ M de albumina (6 μ M em DMEM + 38 μ M em 10% de soro fetal bovino) e o meio de cultura α -MEM suplementado com o soro fetal bovino apresentará 38 μ M de albumina em sua composição (presente apenas no SFB).

Assim, considerando as concentrações supracitadas, utilizando uma aproximação baseada em trabalhos anteriores de especiação que fornecem valores da constante K (necessária para a especiação) a pH 7,3 como $K = 10^{3,3}$ para $(\text{H}_2\text{VO}_4)(\text{BSA})$, $K = 1$ para $(\text{H}_2\text{VO}_4)(\text{glicose})$ e $K = 20$ para $(\text{H}_2\text{VO}_4)(\text{piruvato})$ (CRANS; BUNCH; THEISEN, 1989; FERRER et al., 2008; JAKUSCH et al., 2010; DIAS et al., 2013) e uma faixa de concentrações de 1 a 100 μ M para a quantidade total de vanádio dissolvida ($[\text{V}]_{\text{total}}$), a especiação em função dos possíveis ligantes para os íons de vanádio em meio de cultura também foi realizada.

4.2 Avaliação dos aspectos de degradação de ligas de titânio

De forma complementar a avaliação dos efeitos citotóxicos relacionados à exposição de íons de vanádio às células dos tecidos ósseo (osteoblastos) e conjuntivo (fibroblastos) de camundongo, optou-se por avaliar também, neste trabalho, alguns aspectos relacionados à degradação superficial de materiais metálicos baseados em titânio utilizados (ou em estudo e desenvolvimento para utilização) como implantes pela indústria biomédica.

Especificamente, avaliou-se o comportamento com relação à tribocorrosão para a liga Ti-6Al-4V e, alternativamente, para uma liga sem a adição de vanádio, atualmente estudada por um grupo de pesquisas da Unesp de Bauru, a liga Ti-15Zr-15Mo. Complementarmente, as influências exercidas pela modificação superficial (por micro-arco oxidação) da liga Ti-15Zr-15Mo sobre seu comportamento com relação à tribocorrosão também foram estudadas.

A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados para obtenção/preparação das amostras, para a modificação superficial da liga Ti-15Zr-15Mo e para os ensaios de

tribocorrosão, bem como as caracterizações realizadas para todas as amostras antes e depois dos ensaios.

4.2.1 Amostras

A Tabela 6 apresenta a descrição das amostras utilizadas nesta etapa do trabalho, bem como suas respectivas nomenclaturas. Cabe aqui ressaltar que as amostras de Ti-6Al-4V utilizadas têm origem comercial (VSMPO TIRUS, Estados Unidos) e as ligas de Ti-15Zr-15Mo, com e sem modificação superficial, foram processadas e cedidas pelo Laboratório de Biomateriais e Anelasticidade da Unesp de Bauru (CORREA, 2015; XAVIER, 2016).

Tabela 6: Descrição das amostras utilizadas nos testes de tribocorrosão.

Descrição da amostra	Nomenclatura
Ti-6Al-4V	Ti-64
Ti-15Zr-15Mo	TZM
Ti-15Zr-15Mo (Anodizada)	TZM-ST

4.2.2 Preparação da liga Ti-15Zr-15Mo

As amostras de Ti-15Zr-15Mo foram sintetizadas a partir da fusão por arco voltaico dos precursores metálicos de cada elemento na proporção adequada (determinada a partir de uma balança analítica) para obtenção da composição desejada.

Assim, foram utilizados como precursores: (i) titânio, da marca Sandinox, na forma de barras cilíndricas com 3,18 mm de diâmetro, classificado como ASTM F67 (grau 2), (ii) zircônio, da marca Goodfellow, na forma de folhas com 0,25 mm de espessura e 99,2% de pureza e (iii) molibdênio, também da marca Goodfellow, na forma de fios com 1 mm de diâmetro e 99,95% de pureza. Antes da fusão, processos de decapagem química e lavagem ultrassônica foram adotados como forma de limpeza e remoção de impurezas e óxidos das superfícies dos materiais precursores.

Após a preparação dos metais precursores e determinação das proporções adequadas, os mesmos foram colocados em um cadinho de cobre e posicionados dentro da câmara de um forno a arco-voltaico e então foi iniciado um processo alternado de vácuo (10^{-2} Torr) e purga com gás argônio para limpeza do interior da câmara. Após este processo, realizou-se a fusão

da liga Ti-15Zr-15Mo. A liga final obtida apresentou um módulo de elasticidade de 74 ± 4 GPa e dureza (Vickers) de 398 ± 3 HV. (CORREA, 2015; XAVIER, 2016).

4.2.3 *Modificação superficial da liga Ti-15Zr-15Mo*

A modificação superficial da liga Ti-15Zr-15Mo foi realizada por anodização por micro-arco oxidação (MAO), de acordo com o método utilizado por Alves e colaboradores (ALVES et al., 2013), para obtenção de uma superfície porosa e incorporação de elementos bioativos, nomeadamente cálcio (Ca) e fósforo (P), elementos naturalmente presentes nos ossos. A incorporação de tais elementos, de acordo com alguns estudos, pode aprimorar a biocompatibilidade e osseointegração de um implante metálico (ALVES et al., 2013, 2015; OLIVEIRA et al., 2015b; RIBEIRO et al., 2015).

A anodização das ligas Ti-15Zr-15Mo foi realizada em uma solução aquosa contendo 0,02M de β -glicerol fosfato de di-sódio penta-hidratado (β -GP, $C_3H_7Na_2O_6P \cdot 5H_2O$) e 0,35M de acetato de cálcio monohidratado (CaA, $Ca(CH_3CO_2) \cdot 2H_2O$) da Sigma-Aldrich. Para o tratamento MAO, uma fonte de alimentação DC (Agilent N5772A) foi ajustada em 300 V com uma corrente limitante de 2,5 A.

As amostras (ânodo), sem qualquer tipo de tratamento prévio, foram completamente imersas no eletrólito e uma folha de platina foi utilizada como cátodo. A distância entre os eletrodos foi fixada em 8 cm. O tratamento foi realizado durante 1 min a temperatura ambiente e agitação magnética (ALVES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015b).

4.2.4 *Caracterização das amostras*

As ligas metálicas em estudo foram caracterizadas fisico-quimicamente de acordo com a sua estrutura cristalina por difração de raios-X (XRD) em um difratômetro da marca Rigaku, modelo D/MAX 2100 PC, com radiação $CuK\alpha$, uma tensão de 40 kV, uma corrente de 20 mA, uma fenda de divergência de 1° , uma fenda receptora de 0,3 mm e um filtro de níquel. Utilizaram-se varreduras angulares de 10 - 100° para as amostras Ti-6Al-4V e TZM e de 20 - 100° para a amostra TZM-ST, com passos de $0,02^\circ$ e um tempo fixo de 3,2 s/passos. Ademais estas amostras foram caracterizadas com relação a sua microestrutura, morfologia superficial e composição química via microscopia eletrônica de varredura (SEM) em um

microscópio EVO LS15 da Carl Zeiss, com filamento de tungstênio e espectrômetro Oxford Inca X-ACT acoplado para análises de espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS).

4.2.5 Testes de tribocorrosão

Para os testes de tribocorrosão, as amostras metálicas foram preparadas, de acordo com o seguinte protocolo:

1. Todas as amostras foram polidas gradualmente até a lixa #1200 de carbetto de silício (SiC), com exceção das amostras com modificação superficial.
2. Após o polimento, as amostras foram lavadas em banho ultrassônico com etanol e água em ciclos de 10 minutos cada.
3. Para garantir as mesmas condições iniciais de teste, imediatamente após a lavagem, todas as amostras, com exceção daquela modificada superficialmente, foram separadamente atacadas quimicamente em uma solução consistindo de água (H₂O), ácido nítrico (HNO₃) e ácido clorídrico (HCl), 1:1:1 em volume, durante aproximadamente 20 segundos.
4. Após o ataque químico, as amostras foram novamente lavadas em banho ultrassônico com etanol e água em ciclos de 10 minutos cada. Por fim, as amostras foram montadas em uma célula eletroquímica.

Os testes de tribocorrosão foram realizados em um tribômetro de deslizamento alternativo do tipo *pino-em-disco* (CETR – UMT 2, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade do Minho) pelo menos 24 (± 2) h após o ataque químico para cada amostra.

Os parâmetros eletroquímicos dos testes foram monitorados através de medidas de potencial de circuito aberto (OCP) por um potenciostato da marca Gamry Instruments. Para isso, as amostras de Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST atuaram como eletrodos de trabalho em uma configuração de três eletrodos, sendo os eletrodos complementares um eletrodo de referência do tipo calomelano saturado (SCE = +244mV/NHE, Hg/Hg₂Cl₂/solução saturada de KCl) e um eletrodo de platina como contra-eletrodo.

Utilizou-se como eletrólito para os testes de tribocorrosão, uma solução tampão de fosfato salino (PBS) fresca. O eletrólito foi preparado a partir da dissolução de cloreto de sódio (NaCl, 8 g/L), cloreto de potássio (KCl, 0,2 g/L), fosfato de di-sódio (Na₂HPO₄, 1,44

g/L) e fosfato de potássio (KH_2PO_4 , 0,24 g/L) em água deionizada. Além disso, esferas de alumina (10 mm de diâmetro) foram utilizadas como contra-corpo de deslizamento sobre as superfícies das amostras metálicas.

Por fim, foram adotadas como condições de teste uma carga normal de 1N, uma frequência de 1 Hz, um comprimento total para o deslizamento de 600 μm , um tempo de deslizamento de 30 min e uma temperatura de 37 ± 2 °C (temperatura corporal).

É importante ressaltar que antes de dar início ao deslizamento em cada teste, as amostras mantidas no eletrólito e monitoradas de acordo com seu potencial de circuito aberto (OCP) durante duas horas, até obter um potencial estável. Além disso, os testes de tribocorrosão para cada grupo de amostras foram realizados em triplicata.

Após os testes de tribocorrosão, as amostras já desgastadas, foram submetidas a análises por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS, do inglês *energy-dispersive X ray spectroscopy*) em um microscópio FEI Quanta 650 com um espectrômetro Oxford Inca ACT-X acoplado, para o estudo da forma, dimensão e composição química das pistas de desgaste obtidas. A profundidade das pistas de desgaste para cada grupo de amostras também foi estudada a partir de análises de microscopia confocal, em um microscópio Leica, DCM 3D e profilometria 2D em um profilômetro Veeco, Dektak 150.

4.3 Produção e caracterização dos produtos de desgaste

Ensaio de tribocorrosão sobre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo também foram utilizados para a produção de partículas de desgaste. Também, dada a importância relacionada às propriedades físico-químicas, sua relação com as propriedades do material a partir do qual foram geradas e as influências sobre os efeitos desencadeados em um organismo vivo após sua interação com produtos de desgaste, as partículas obtidas a partir dos ensaios de tribocorrosão sobre as ligas em estudo foram extensivamente caracterizadas de acordo com seu tamanho, morfologia, estrutura cristalina e composição química.

Os métodos e condições dos testes utilizados para a produção destas partículas, bem como as caracterizações utilizadas são descritos a seguir.

4.3.1 *Produção dos produtos de desgaste*

Amostras das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo (TZM) foram utilizadas para a produção de partículas de desgaste a partir de ensaios de tribocorrosão. O mesmo protocolo descrito na seção 4.2.5 foi adotado para a preparação destas amostras. Ademais, uma solução tampão de fosfato salino (PBS) fresca, cuja preparação também está descrita na seção 4.2.5, foi utilizada como eletrólito para estes testes.

Diversos testes de tribocorrosão (sem duração de tempo fixa) foram realizados para produção dos produtos de desgaste em um tribômetro de deslizamento alternativo do tipo *pino-em-disco* (PLINT, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade do Minho). Foram adotadas como condições de teste uma carga normal de 3N, uma frequência de 1 Hz, um comprimento total para o deslizamento de 10 mm e uma temperatura de 37 ± 2 °C (temperatura corporal).

4.3.2 *Caracterização dos produtos de desgaste*

Ao final de cada teste, o eletrólito utilizado, em que estavam dispersos os produtos de desgaste gerados ao longo dos ensaios, foi recolhido e armazenado em um tubo Falcon (50 mL). As partículas foram então separadas a partir de centrifugação (7.500 rpm) e o sobrenadante descartado.

Este processo foi repetido para todos os testes realizados sobre o mesmo tipo de amostra e sempre que recolhido, o eletrólito era armazenado no mesmo tubo Falcon, de modo a garantir que o conteúdo total de partículas de desgaste produzidas e suas características fossem a média do total de testes realizados. Ao fim de todos os testes, o conteúdo total de partículas de desgaste produzidas foi dividido entre vários *eppendorfes* (1,5 mL) e após a precipitação total das partículas, o sobrenadante de todos os tudo foi evaporado.

Depois de coletadas, as partículas de desgaste foram caracterizadas de acordo com seu tamanho, morfologia e composição química a partir de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) em um microscópio FEI Quanta 650 com um espectrômetro Oxford Inca ACT-X acoplado. Adicionalmente, estas partículas também foram caracterizadas de acordo com sua estrutura cristalina a partir da difração de elétrons (ED) realizada em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) JEOL JEM-2100, operado a 200 kV. Em todos os

casos de análise via microscopia eletrônica, as amostras foram dispersas em etanol e pingadas sobre o substrato adequado (substratos de silício (Si) para SEM e grade de cobre (Cu) para TEM).

Como padrão de comparação, partículas comerciais de Ti-6Al-4V (Electro Optical Systems) também foram caracterizadas segundo os mesmos critérios que as partículas de desgaste.

4.4 Remoção de endotoxinas

Como descrito nas seções 2.4 e 2.5 deste trabalho, a interação das células dos tecidos ao redor de um implante metálico (osteoblastos e fibroblastos) e células do sistema imune (macrófagos) com partículas de desgaste e/ou endotoxinas pode desencadear algumas reações em comum, como por exemplo, a produção de citocinas pró-inflamatórias por parte destas células. Desta forma, a coexistência de ambos estes agentes pode conduzir a uma má interpretação dos resultados obtidos em ensaios biológicos, uma vez que a presença de endotoxinas adsorvidas nas superfícies das partículas de desgaste pode potencializar a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias específicas.

Para garantir que os resultados obtidos nas avaliações com relação à viabilidade celular e produção das citocinas interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2) deste trabalho estivessem estritamente relacionados à interação das células do tecido ósseo humano com as partículas de desgaste geradas a partir das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, tratamentos térmicos foram aplicados às mesmas para a remoção de endotoxinas.

As condições e equipamentos utilizados para os tratamentos térmicos aplicados às partículas e os materiais e métodos relacionados aos ensaios de detecção de endotoxinas após tais tratamentos são descritos a seguir.

4.4.1 Tratamentos térmicos para remoção de endotoxinas

As partículas de desgaste obtidas a partir dos testes de tribocorrosão descritos na seção 4.3.1 foram submetidas a tratamentos térmicos para a remoção de endotoxinas possivelmente adsorvidas em sua superfície em um calorímetro termogravimétrico de escaneamento diferencial (TGA-DSC1 STAR, Mattler Toledo equipado com um sistema de análise de gases Omini Star GSD320 – Pfeiffer Vacuum acoplado).

Os parâmetros adotados nos tratamentos térmicos para remoção de endotoxinas seguem uma das recomendações da USP (*United States Pharmacopeia*).

As amostras foram colocadas em um cadinho de platina (Pt) e então submetidas a uma temperatura de 180 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C/min, durante 45 min em um fluxo contínuo controlado de argônio (Ar) de 50 mL/min, utilizado para prevenir o efeito de oxidação superficial das partículas (GORBET; SEFTON, 2005; WILLIAMS, 2007; LI; BORASCHI, 2016).

4.4.2 Ensaios para detecção de endotoxinas

A presença de endotoxinas possivelmente adsorvidas na superfície das partículas de desgaste foi verificada através de ensaios baseados na sua reação com o lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL, do inglês *Limulus Amoebocyte Lysate*). Nestes ensaios, uma enzima presente nas células do sangue (amebócitos) de uma espécie específica de caranguejo (caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*) pode ser ativada pela presença de endotoxinas presentes em uma solução provocando coagulação (LI; BORASCHI, 2016). Para este trabalho foram adquiridos kits de testes LAL do tipo *gel-clot* com sensibilidades 0,06 EU/mL e 0,125 EU/mL (Genscript ToxiSensor, Single Test Kits).

De forma simples, após a reação em condições adequadas da solução contendo a amostra com o conteúdo lisado (já previamente determinado para cada sensibilidade) dos tubos fornecidos neste kit, a presença de endotoxinas pôde ser verificada qualitativamente através da gelificação da mistura. A aquisição de duas sensibilidades possibilitou uma análise semi-quantitativa.

A verificação da presença de endotoxinas adsorvidas sobre as superfícies das partículas de desgaste neste trabalho foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir.

1. Em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar), o controle positivo foi preparado a partir da reconstituição do conteúdo total de um *vial* do controle padrão fornecido pela Genscript (15 EU) em 1 mL de água livre de endotoxinas (Lonza, EU/mL < 0,005). A solução resultante (15 EU/mL) foi agitada em *vortex* por 15 minutos para completa homogeneização.

2. O controle positivo foi então seriadamente diluído em água livre de endotoxinas para as concentrações finais iguais ao dobro das sensibilidades dos testes adquiridos, ou seja, C1 = 0,250 EU/mL e C2 = 0,125 EU/mL.
3. Após esta etapa, 0,2 mL da solução C1 foram transferidos para um dos tubos do kit de sensibilidade 0,125 EU/mL e 0,2 mL da solução C2 foram transferidos para um dos tubos do kit de sensibilidade 0,06 EU/mL.
4. Também em ambiente estéril, as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram misturadas a solução tampão de fosfato salino (PBS) livre de endotoxinas (Lonza, EU/mL < 0,01) em concentrações dez vezes maiores do que aquelas que seriam posteriormente utilizadas nos experimentos com células.
5. Depois disso, 0,2 mL de cada mistura (PBS + partículas de Ti-6Al-4V e PBS + Ti-15Zr-15Mo) foram transferidos para tubos dos kits de ambas as sensibilidades.
6. Por fim, todos os tubos foram tampados (controles positivos, amostras) e incubados em banho-maria à 37±1 °C por 1 hora.
7. Ao fim do período de incubação, os tubos foram invertidos (180°) com intuito de verificar uma reação positiva, indicada pela formação de um gel firme no fundo do tubo, ou negativa, indicada pela não formação de gel.

4.5 Avaliação dos efeitos biológicos resultantes da interação entre osteoblastos humanos e as partículas de desgaste

Após a coleta, caracterização e tratamentos térmicos para a remoção de endotoxinas possivelmente adsorvidas em sua superfície, as partículas de desgaste obtidas a partir dos ensaios de tribocorrosão com as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram utilizadas na avaliação (*in vitro*) de alguns efeitos biológicos relacionados à sua interação com células do tecido ósseo (osteoblastos) humanos. Dentre os efeitos avaliados estão: influências sobre a viabilidade celular (ensaios por redução de MTT e *Live and Dead*), avaliação da possível internalização das partículas de desgaste pelas células (TEM) e a avaliação quantitativa da produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2), a partir de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunoabsorbent assay*).

Os detalhes relacionados às linhagens celulares utilizadas, o cultivo celular, bem como os materiais e métodos utilizados nas preparações das células e amostras para os ensaios realizados são descritos a seguir.

4.5.1 Cultura de células

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas para a avaliação *in vitro* dos efeitos biológicos relacionados à sua interação com as partículas de desgaste das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo: osteoblastos humanos derivados de osteosarcoma (MG63, ATCC) e osteoblastos normais de origem fetal (HOb, Sigma-Aldrich).

A Tabela 7 apresenta as condições de cultura para cada uma das linhagens utilizadas.

Tabela 7: Condições de cultura para as linhagens MG63 e HOb.

Linhagem Celular	Meio de Cultura	Suplementos	Condições
MG63	<i>Minimum Essential</i>	Soro fetal bovino (SFB), 10%	37 °C e atmosfera de 5% de CO ₂
	<i>Medium Eagle</i> (α -MEM, Sigma-Aldrich)	Penicilina/estreptomicina, 1%	
		Anfotericina B, 1%	
HOb	<i>Human Osteoblast</i>	Soro fetal bovino (SFB), 10%	37 °C e atmosfera de 5% de CO ₂
	<i>Growth Medium</i> (Sigma-Aldrich)	Penicilina/estreptomicina, 1%	
		Anfotericina B, 1%	

Antes de atingir confluência, ambas as linhagens celulares foram destacadas da superfície do frasco de cultura por tripsinização (0,04% de tripsina em uma solução 0,25% de EDTA, por 5 minutos) e contadas em um hemocitômetro.

Os efeitos biológicos relacionados à interação das partículas de desgaste com estas linhagens celulares foram avaliados de acordo com: (i) as influências sobre a viabilidade celular (ii) a possível internalização destas partículas pelas células e (iii) a produção de citocinas pró-inflamatórias resultantes desta interação.

É importante ressaltar que materiais livres de endotoxinas foram adquiridos separadamente para realização dos experimentos *in vitro* nesta etapa do trabalho, o que inclui: frascos, placas, ponteiras, pipetas serológicas e reagentes.

4.5.2 Ensaios de viabilidade celular

Ensaios de viabilidade celular foram utilizados para avaliar os efeitos citotóxicos resultantes da interação das partículas de desgaste com as linhagens celulares MG63 e HOb.

A primeira etapa para a avaliação de tais efeitos foi o levantamento de uma curva dose-resposta para a viabilidade celular da linhagem MG63. Como esta linhagem possui taxa de crescimento acelerado com relação à linhagem HOb, diversas concentrações para os materiais em estudo foram testadas para posterior seleção e aplicação nos ensaios com os osteoblastos normais (HOb).

A citotoxicidade relacionada à exposição de partículas de desgaste (Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo) foi avaliada a partir de ensaios de viabilidade celular baseados na redução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), nos quais a atividade mitocondrial das células pode ser estimada através da leitura de absorbância da conversão de MTT em seu produto formazan.

Complementarmente, a viabilidade celular também foi avaliada a partir de ensaios *Live and Dead*, em que a discriminação de células vivas e células mortas é feita a partir da coloração fluorescente simultânea com calceína-AM (verde, relacionada à atividade intracelular) e homodímero de etídio (vermelho, relacionado à perda da integridade da membrana citoplasmática).

4.5.3 Grupos experimentais

Além das partículas de desgaste para as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, partículas comerciais para a liga Ti-6Al-4V (Electro Optical Systems) e pentóxido de vanádio (V_2O_5 , Sigma-Aldrich, 99,99%), devidamente caracterizadas com relação aos mesmos parâmetros que as partículas de desgaste, também foram utilizadas. Ademais, as partículas referentes a estes grupos experimentais adicionais também foram submetidas aos mesmos tratamentos térmicos para remoção e testes para detecção de endotoxinas aplicados às partículas de desgaste.

A Tabela 8 apresenta os grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, as concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade celular com relação linhagem celular MG63.

Tabela 8: Grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade com a linhagem celular MG63.

Grupos Experimentais (Nomenclatura)	Concentrações (µg/mL)	Períodos (dias)
Partículas comerciais de Ti-6Al-4V	100	
	50	1
Partículas de desgaste Ti-6Al-4V	10	2
	1	3
Partículas de desgaste Ti-15Zr-15Mo	0,5	7
V ₂ O ₅	0,1	

Cada um dos materiais (livres de endotoxinas) a ser testado foi misturado à solução tampão de fosfato salino (PBS) na proporção de C1 = 1000 µg/mL (solução *stock*). Após esta etapa, as soluções *stock* para cada um dos materiais passou por diluições seriadas (C2 à C6) em PBS para concentrações dez vezes maiores que as concentrações finais a serem testadas, ou seja, C2 = 500 µg/mL, C3 = 100 µg/mL, C4 = 10 µg/mL, C5 = 5 µg/mL e C6 = 1 µg/mL.

As concentrações finais de 50 e 10 µg/mL e períodos experimentais de 1 e 7 dias foram escolhidos para a linhagem HOb a partir dos resultados obtidos para a linhagem MG63. A Tabela 9 apresenta os grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, as concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade celular com relação linhagem celular HOb.

Tabela 9: Grupos experimentais e suas respectivas nomenclaturas, concentrações e períodos experimentais selecionados para os ensaios de viabilidade com a linhagem celular HOb.

Grupos Experimentais (Nomenclatura)	Concentrações (µg/mL)	Períodos (dias)
Partículas comerciais de Ti-6Al-4V		
	50	3
Partículas de desgaste Ti-6Al-4V	10	7
Partículas de desgaste Ti-15Zr-15Mo		
V ₂ O ₅		

4.5.4 Viabilidade celular por redução de MTT

Para os ensaios por redução de MTT, 3×10^3 células foram cultivadas em 100 μL de seus respectivos meios de cultura nos poços de uma placa de 96 poços, as quais foram mantidas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24 h, o meio de cultura dos poços foi substituído por 90 μL de meio fresco com a adição de 10 μL das soluções C1 a C6 (dez vezes mais concentradas), resultando nas concentrações finais a serem testadas. O esquema utilizado para diluição das soluções contendo os materiais de teste para as concentrações finais desejadas nos poços da placa de cultura é ilustrado na Figura 8.

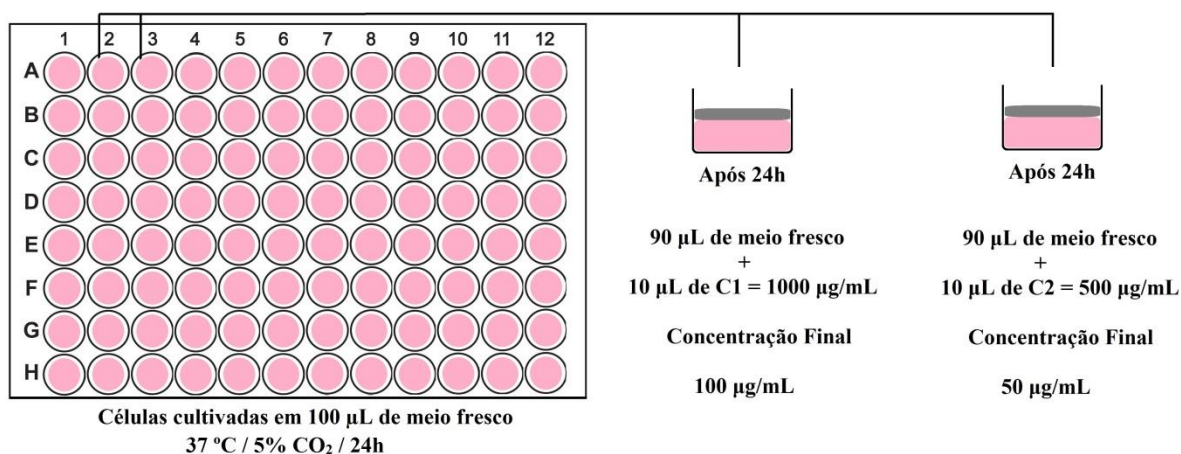


Figura 8: Esquema para diluição das amostras nas concentrações finais desejadas para os testes *in vitro*.

Após cada período experimental, o meio condicionado contendo as partículas para cada grupo experimental foi recolhido. Depois, adicionou-se 100 μL de meio fresco contendo 10% de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço e as placas de cultura foram novamente incubadas a 37 °C durante 4 h. Após este intervalo de tempo, o meio foi removido e 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço. Por fim, após 30 min, a densidade óptica foi medida a 550 nm com um leitor de microplacas multi-modo Synergy H1 baseado em monocromador (Bio-Tek).

Cada grupo experimental foi testado pelo menos em triplicata. Como grupo controle positivo, utilizou-se apenas meio de cultura celular suplementado. Adicionalmente, uma duplicata de poços contendo as partículas em meio de cultura para cada uma das concentrações testadas foi utilizada para determinar possíveis influências das partículas sobre o ensaio colorimétrico de MTT.

O software Origin 7.0 foi utilizado para calcular as diferenças entre conjuntos de dados com base na análise de variância (ANOVA), teste Tukey. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.5.5 *Ensaio Live and Dead*

Este ensaio foi realizado tanto para a linhagem MG63 quanto para a linhagem HOb após 24h do contato direto destas células com os grupos experimentais e concentrações descritas nas Tabelas 8 e 9.

Brevemente, após o período de tempo mencionado (24h), o meio de cultura celular dos poços foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Depois disso, foram adicionados a cada poço 50 µL de calceína-AM (2 µM) e 50 µL de homodímero de etídio. Após 15 minutos, os poços foram analisados em um microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000-CS), usando o filtro a 488 nm para a fluorescência da calceína-AM e 594 nm para a fluorescência do homodímero de etídio.

4.5.6 *Avaliação da internalização de partículas pelos osteoblastos humanos (HOb)*

Para a avaliação da possível internalização das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, osteoblastos humanos da linhagem HOb foram cultivados nos poços de uma placa de 24 poços na densidade de 2×10^4 células/mL e mantidos à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, assim como descrito na seção 4.5.4, o meio de cultura foi substituído pelo meio condicionado contendo as partículas de desgaste na concentração de 50 µg/mL e as células foram novamente incubadas. Para o grupo controle, apenas meio de cultura fresco foi adicionado aos poços.

Após um período de 24h, as células foram destacadas da superfície dos poços desta placa por tripsinização (0,04% de tripsina em uma solução 0,25% de EDTA, por 5 minutos) e centrifugadas a 2000g por 10 minutos. Posteriormente, o *pellet* celular obtido para cada um dos grupos (controle, partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo) foi fixado (2,5% de glutaraldeído por 2h), pós-fixado (2% de tetróxido de ósmio, OsO₄), desidratado gradualmente em etanol e incorporado em Epon, usando procedimentos padrão.

A partir de um ultra-micrótomo, secções transversais ultra-finas (100nm) das amostras foram obtidas e posicionadas sobre grades de cobre padrão para análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Por fim, os cortes obtidos foram contrastados a partir de acetato de urânio ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) e analisados em um microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss EM 10A, operado a uma tensão de 60 kV para obtenção de imagens.

4.5.7 Ensaios ELISA para avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias.

A produção das citocinas interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2) por osteoblastos normais (linhagem celular HOb) foi avaliada (*in vitro*) após a interação destas células pelos períodos de 3 e 7 dias com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo e partículas comerciais de Ti-6Al-4V, sendo todas as partículas livres de endotoxinas.

Para isso, o meio de cultura condicionado, ou seja, o sobrenadante dos poços da placa de cultura utilizada para o ensaio de MTT contendo as partículas destes materiais em meio de cultura nas concentrações de 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$ foi recolhido após os períodos experimentais selecionados (3 e 7 dias) e congelado para posterior utilização em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunoabsorbent assay*). Ademais, dois grupos controle contendo endotoxinas nas concentrações 50 ng/mL e 100 ng/mL também foram considerados.

Kits referentes a cada uma das citocinas a serem analisadas foram adquiridos: IL-6 Human ELISA Kit, Novex e Prostaglandin E2 Human ELISA Kit, Novex. Ambos os ensaios foram realizados de acordo com os procedimentos indicados nos protocolos fornecidos pelo fabricante e anexados ao final deste trabalho (Anexos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da citotoxicidade de íons de vanádio e sua especiação iônica em meios de cultivo celular

O pentóxido de vanádio (V_2O_5) pode ser eventualmente considerado como um produto de desgaste resultante dos processos de degradação sobre a liga Ti-6Al-4V *in vivo* (CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016). Assim, como mencionado na seção 4.1.2, o pó comercial de V_2O_5 foi utilizado para estudar as possíveis espécies iônicas de vanádio liberadas em soluções fisiológicas (meio de cultura celular) e os efeitos citotóxicos resultantes da interação destes agentes químicos com as células das linhagens MC3T3-E1 e NIH3T3.

Para isso, este pó foi inicialmente caracterizado de acordo com algumas de suas propriedades físico-químicas, nomeadamente, tamanho, morfologia e estrutura cristalina. Neste sentido, os resultados obtidos para estas caracterizações são apresentados a seguir.

A Figura 9 apresenta o padrão de difração de raios-X para o pó comercial de V_2O_5 , a partir do qual a identificação dos picos observados permitiu a indexação de sua estrutura cristalina como ortorrômbica *shcherbinaite* (número de PDF 41-1426).

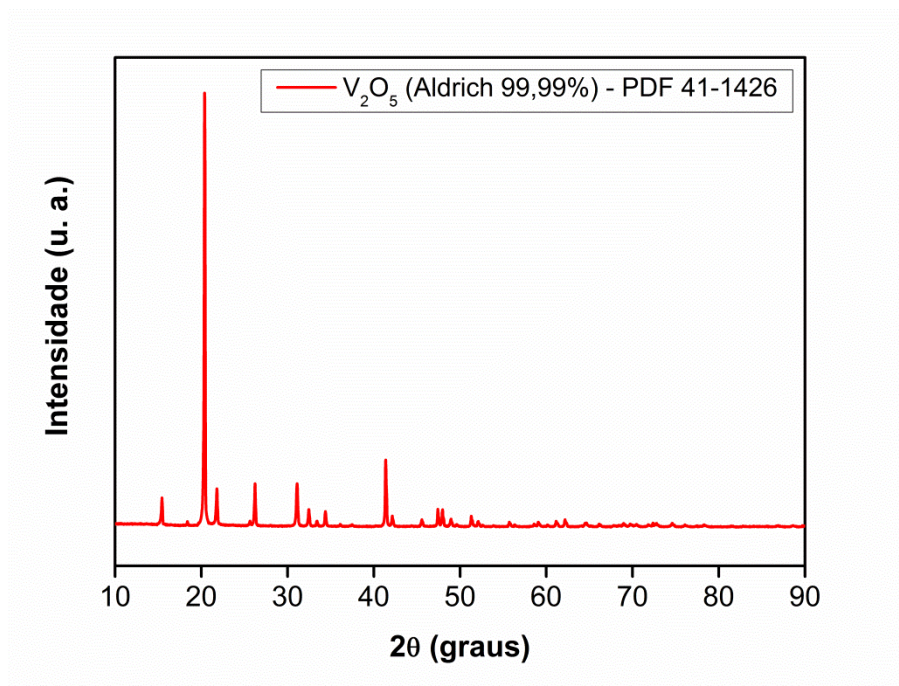


Figura 9: Difratograma de raios-X para o pentóxido de vanádio comercial (V_2O_5).

As análises dimensionais e morfológicas para o pentóxido de vanádio comercial, realizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) são apresentadas nas Figuras 10 A e 10 B, respectivamente.

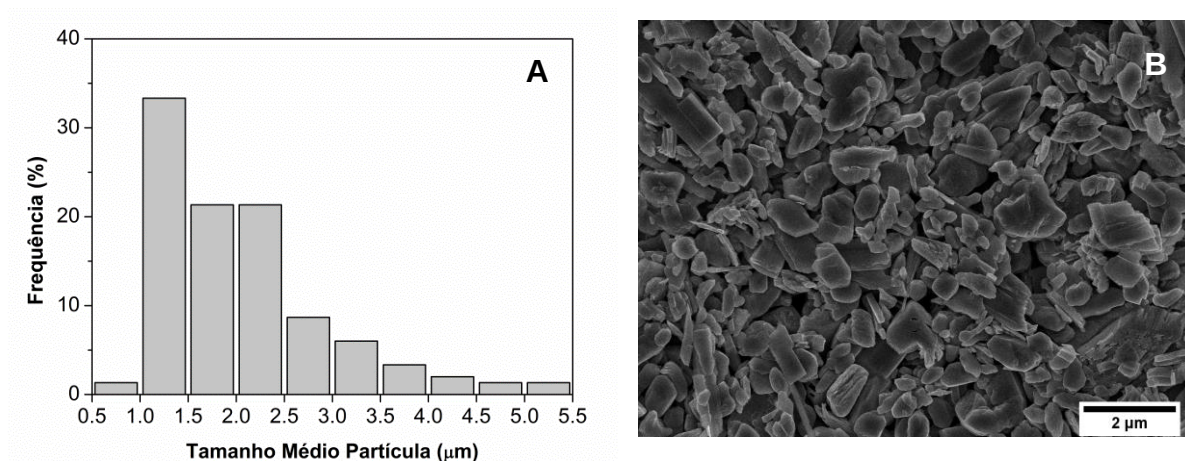


Figura 10: (A) Histograma para tamanho médio das partículas comerciais de V_2O_5 e (B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para estas partículas.

A partir da Figura 10 A, é possível observar que o pó comercial de pentóxido de vanádio apresenta uma ampla distribuição para o tamanho médio de partícula, com tamanhos variando desde escala submicrométrica a alguns micrômetros, embora a maioria das partículas (~75%) apresente tamanho médio entre 1 - 2,5 μm. Além disso, de acordo com a Figura 10 B, pode notar-se que as partículas de V_2O_5 apresentam uma morfologia irregular, muitas vezes com bordas pontiagudas.

Como ilustrado na Figura 7, após a caracterização físico-química inicial, as partículas comerciais de pentóxido de vanádio foram adicionadas a tubos Falcon contendo os meios de cultura α -MEM e DMEM na proporção de 20 mg/mL (*stock*) e então incubadas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO_2 durante 24h. Durante este período, uma parte da quantidade total do pó dissolveu-se nos meios de cultura e o conteúdo restante precipitou-se no fundo dos tubos. Então, uma membrana de 0,22 μm foi utilizada para separação dos meios de cultura contendo os íons de vanádio dissolvidos a partir das partículas (meios de cultura condicionados) do conteúdo precipitado ao fundo dos tubos.

Levando em consideração a caracterização apresentada na Figura 10, acredita-se que a utilização desta membrana de 0,22 μm para filtragem dos meios de cultura condicionados foi suficiente para garantir somente a presença de íons de vanádio dissolvidos nos mesmos, uma vez que não foram observadas partículas menores que 0,5 μm nas análises por microscopia eletrônica de varredura.

Depois de filtrados, os meios de cultura condicionados (contendo espécies iônicas de vanádio dissolvidas) passaram por diluições em série (fator de diluição de 10x), para os valores finais de D1 = 10^1 a D5 = 10^5 . Então, os valores de pH para as soluções *stock* e suas respectivas diluições em cada meio de cultura foram medidos. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de pH para a solução *stock* de V_2O_5 e suas respectivas diluições em ambos os meios de cultura.

	α -MEM	DMEM
Apenas meio de cultura	7.5	7.8
Stock (20mg/mL)	6.7	6.8
D1 = 10^1	7.3	7.4
D2 = 10^2	7.3	7.4
D3 = 10^3	7.3	7.5
D4 = 10^4	7.3	7.4
D5 = 10^5	7.3	7.4

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, é possível notar que a adição do V_2O_5 a ambos os meios de cultura celular nas misturas *stock* promoveu uma diminuição imediata nos seus respectivos valores de pH. As mudanças observadas para os valores de pH destas soluções estão provavelmente relacionadas a um processo de dissolução acelerada do pentóxido de vanádio nas primeiras 24 h, em que um grande número de íons foi liberado para os meios de cultura. No entanto, após as diluições em série, os sistemas foram capazes de se adaptar rapidamente e valores próximos dos valores nominais para cada meio de cultura celular foram novamente estabelecidos.

Ademais, análises de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foram realizadas para as soluções *stock* de V_2O_5 . O intuito de tal análise foi verificar a quantidade total de vanádio [(V)total] efetivamente dissolvida em nesta solução. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11, em que também são apresentadas as concentrações esperadas para as diluições D1 a D5 para cada meio de cultura.

Tabela 11: Resultados de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) para as concentrações totais reais de vanádio em ambos os meios de cultura utilizados nos experimentos.

Concentração molar real de vanádio nos meios de cultura celular (M)		
	α-MEM	DMEM
<i>Stock</i> (20mg/mL)	1.5×10^{-2}	$2,3 \times 10^{-2}$
D1 = 10^1	1.5×10^{-3}	$2,3 \times 10^{-3}$
D2 = 10^2	1.5×10^{-4}	$2,3 \times 10^{-4}$
D3 = 10^3	1.5×10^{-5}	$2,3 \times 10^{-5}$
D4 = 10^4	1.5×10^{-6}	$2,3 \times 10^{-6}$
D5 = 10^5	1.5×10^{-7}	$2,3 \times 10^{-7}$

Conforme pode ser observado a partir da Tabela 11, as concentrações molares esperadas para cada uma das diluições da mistura *stock* de V_2O_5 em DMEM, o meio de cultura para a linhagem NIH3T3, variam entre D1 = $2,3 \times 10^{-3}$ M e D5 = $2,3 \times 10^{-7}$ M, valores ligeiramente maiores que aqueles para as mesmas diluições em α -MEM, o meio de cultura para a linhagem celular MC3T3-E1, que variam entre D1 = $1,5 \times 10^{-3}$ M e D5 = $1,5 \times 10^{-7}$ M.

De acordo com alguns autores (GHONEIM et al., 2012; CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016), quando em contato com soluções fisiológicas, especialmente na presença de íons cloreto (Cl^-), o V_2O_5 é prontamente dissolvido. Assim, a dissolução significativa do pentóxido de vanádio nas soluções *stock* para ambos os meios de cultura considerados pode ser justificada pelo conteúdo elevado de cloreto (~ 120 mM). Ademais, a obtenção de uma concentração ligeiramente maior para o vanádio no meio de cultura DMEM com relação ao meio de cultura α -MEM pode estar relacionada ao maior conteúdo de alguns componentes (albumina e glicose) deste primeiro meio de cultura.

As soluções (extratos) com diluições D1 a D5 da mistura *stock* de V_2O_5 nos meios de cultura α -MEM e DMEM foram utilizadas para os ensaios de viabilidade celular com as linhagens MC3T3-E1 e NIH3T3, respectivamente. Os resultados obtidos para estes ensaios são apresentados a seguir.

A Figura 11 apresenta os resultados do ensaio de MTT para a linhagem MC3T3-E1.

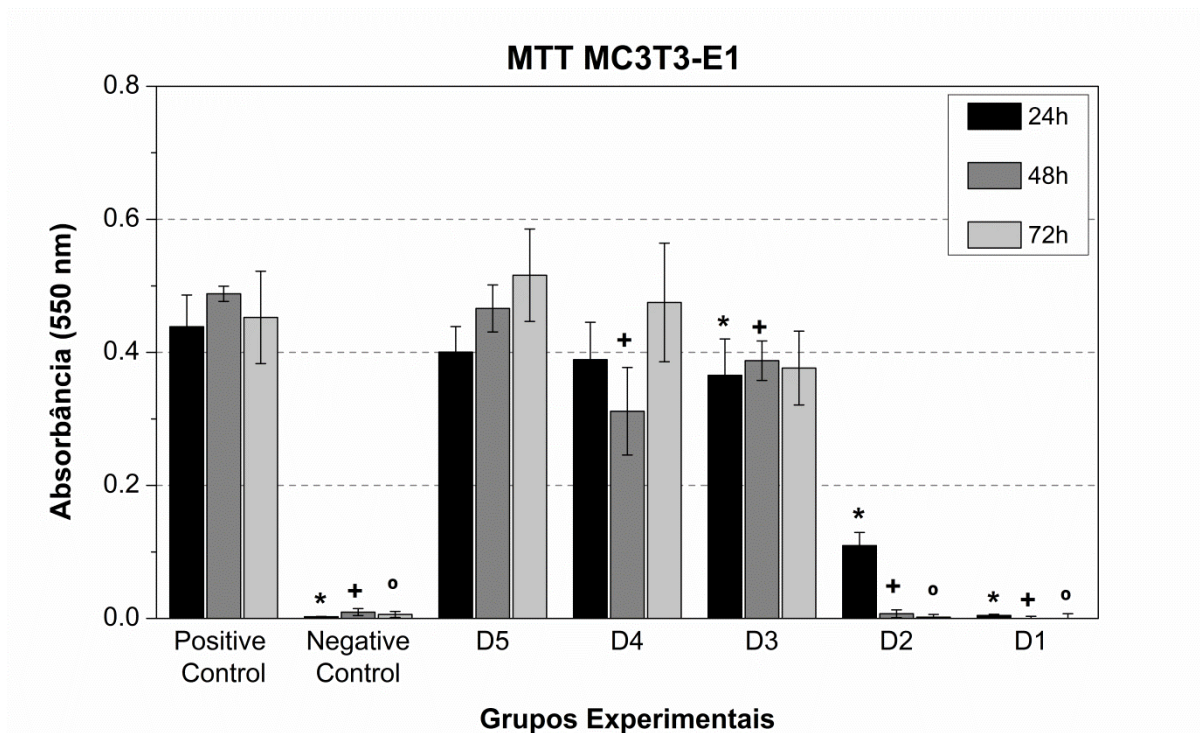


Figura 11: Resultados para o ensaio de viabilidade celular para linhagem MC3T3-E1 após incubação com os extratos de V_2O_5 .

Observação: * significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 24h, + significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 48h e ° significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 72h).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 11, é possível observar que os extratos obtidos a partir da incubação de pó comercial V_2O_5 com o meio de cultura (α -MEM) demonstraram um efeito negativo global sobre a viabilidade celular da linhagem MC3T3-E1 para as duas menores diluições da solução *stock*, $D1 = 10^1$ ($1,5 \times 10^{-3}$ M) e $D2 = 10^2$ ($1,5 \times 10^{-4}$ M). A completa morte celular nos períodos experimentais de 48 h e 72 h para estas duas concentrações, além e uma diminuição significativa na viabilidade D2 e completa morte celular para D1 foram observadas no período de 24 h. Ademais, para estas duas diluições, nenhum efeito de recuperação foi observado ao longo do tempo.

Por outro lado, as três maiores diluições da mistura *stock* de V_2O_5 em α -MEM, ou seja, $D3 = 10^3$ ($1,5 \times 10^{-5}$ M) a $D5 = 10^5$ ($1,5 \times 10^{-7}$ M), não mostraram influência significativa na viabilidade celular.

As análises de microscopia óptica para estes mesmos grupos experimentais corroborou os resultados observados nos ensaios MTT. As imagens obtidas são mostradas na Figura 12.

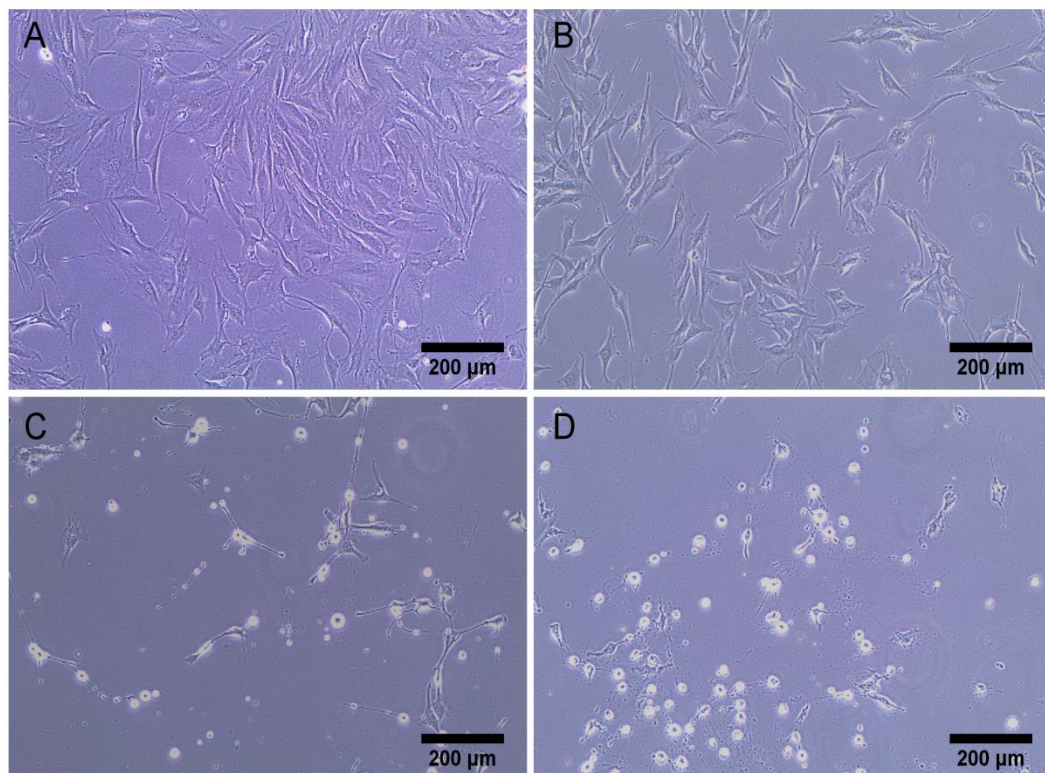


Figura 12: Imagens de microscopia óptica para a linhagem celular MC3T3-E1: (A) Controle positivo após 72h, (B) células expostas ao extrato na diluição D3 após 72h, (C) células expostas ao extrato na diluição D2 após 24h e (D) células expostas ao extrato na diluição D1 após 24h. (Barra de escala de 100 µm).

A partir da Figura 12 B, pode-se observar que, mesmo após o período experimental máximo (72 h), não há diferenças significativas na morfologia celular para os osteoblastos tratados com o extrato D3 = 10^3 ($1,5 \times 10^{-5}$ M) com relação ao grupo controle (Figura 12 A). No entanto, mudanças significativas podem ser destacadas para D2 = 10^2 ($1,5 \times 10^{-4}$ M), mesmo nas primeiras 24 horas experimentais (Figura 12 C), em que danos às membranas e extensões citoplasmáticas podem ser observados, juntamente com um grande número de células mortas, confirmando os resultados obtidos com o MTT. Essas modificações morfológicas aparecem mais evidentes para D1 = 10^1 ($1,5 \times 10^{-3}$ M) para as quais as imagens de microscopia óptica (Figura 12 D) mostraram danos morfológicos mais severos para os pré-osteoblastos MC3T3-E1 ainda viáveis, bem como um número quase total de células mortas.

A Figura 13 apresenta os resultados para viabilidade celular para os fibroblastos de NIH3T3 expostos aos extratos de V_2O_5 nas mesmas concentrações D1 à D5.

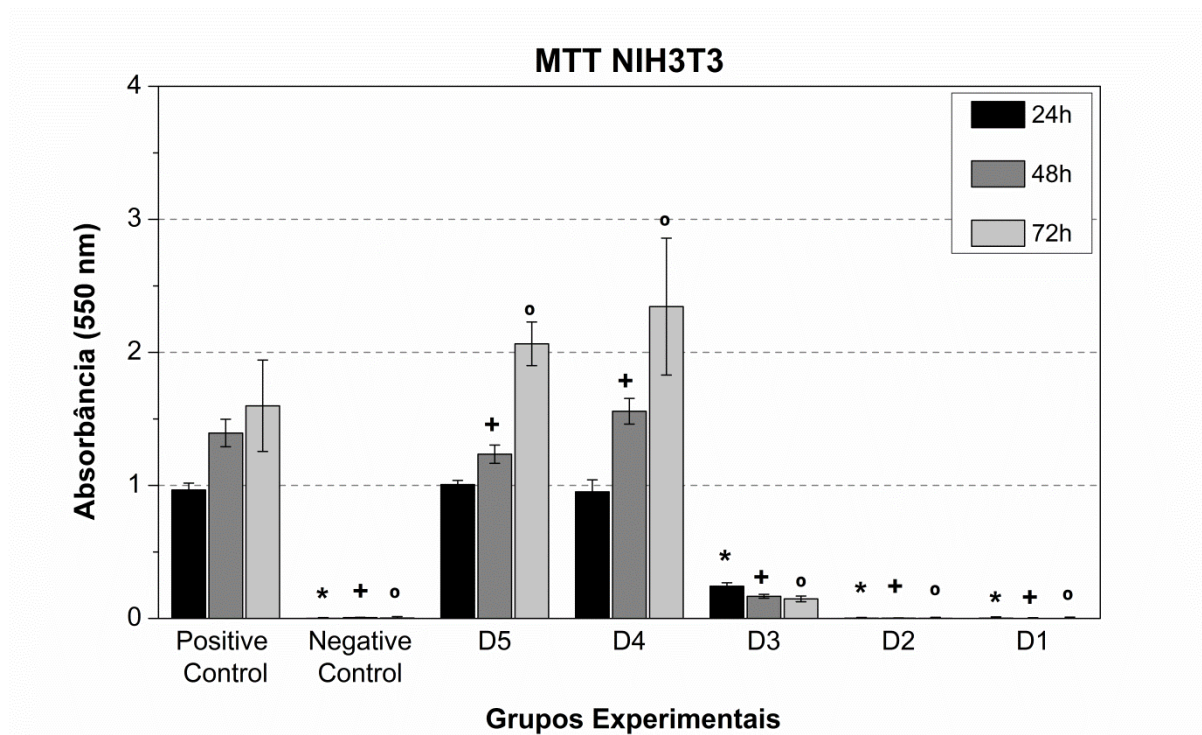


Figura 13: Resultados para o ensaio de viabilidade celular para linhagem NIH3T3 após incubação com os extratos de V_2O_5 .

Observação: (* significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 24h, + significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 48h e ° significa $p < 0,05$ comparado ao controle positivo para 72h).

Quando comparados aos resultados de viabilidade celular para a linhagem MC3T3-E1 (Figura 11), os dados apresentados na Figura 13 apontam diferenças significativas para o comportamento das células da linhagem NIH3T3, que aparentam ser mais sensíveis à exposição aos extratos de V_2O_5 .

Os resultados apresentados na Figura 13 apontam para uma diminuição significativa na viabilidade das células da linhagem NIH3T3 a partir da diluição $D3 = 10^3$ ($2,3 \times 10^{-5}$ M) em todos os períodos experimentais, enquanto o mesmo efeito com relação à linhagem MC3T3-E1 só foi observado para a diluição $D2 = 10^2$ ($2,3 \times 10^{-4}$ M). A análise da Figura 13 também evidencia a completa morte celular para as duas menores diluições do extrato de V_2O_5 , nomeadamente, $D1 = 10^1$ ($2,3 \times 10^{-3}$ M) e $D2 = 10^2$ ($2,3 \times 10^{-4}$ M) em todos os períodos experimentais, exceto para D2 após 48h. Ademais, um aumento notável na viabilidade foi registrado para as células da linhagem NIH3T3 após a exposição ao extrato de V_2O_5 na diluição $D5 = 10^5$ ($2,3 \times 10^{-7}$ M), principalmente após o período experimental de 72 h.

A morfologia celular para esta linhagem também foi avaliada por microscopia óptica e os resultados obtidos são mostrados na Figura 14.

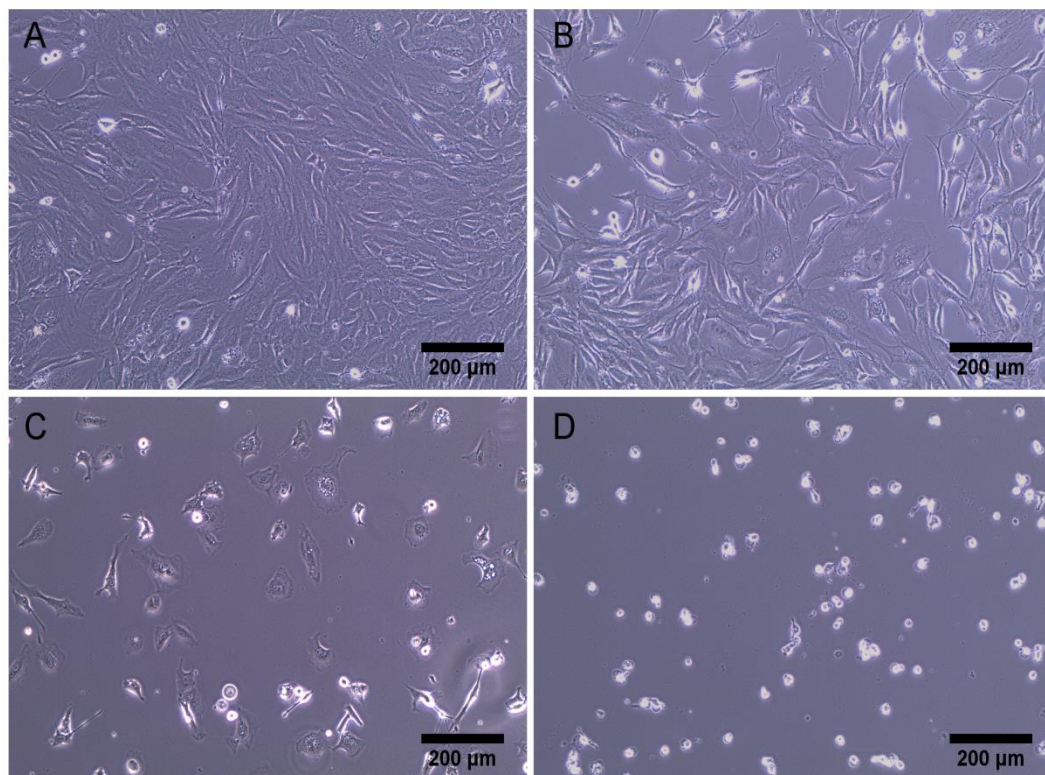


Figura 14: Imagens de microscopia óptica para a linhagem celular NIH3T3: (A) Controle positivo após 72h, (B) células expostas ao extrato na diluição D4 após 72h, (C) células expostas ao extrato na diluição D3 após 24h e (D) células expostas ao extrato na diluição D1 após 24h. (Barra de escala de 100 µm).

A partir da Figura 14B, é possível observar que a exposição até a diluição $D4 = 10^4$ ($2,3 \times 10^{-7}$ M) da solução *stock* de V_2O_5 não provoca alterações significativas na morfologia das células da linhagem NIH3T3 em comparação ao grupo controle (Figura 14A). No entanto, danos morfológicos severos (perda da forma poligonal/fusiforme, ausência de extensões citoplasmáticas e grandes espaços intercelulares) foram induzidos nestas células quando expostas aos extratos de V_2O_5 a partir da diluição $D3 = 10^3$ ($2,3 \times 10^{-6}$ M), mesmo após o período experimental de 24 h (Figura 14C). Por fim, a completa celular, previamente observada no ensaio de MTT para a diluição $D1 = 10^1$ ($2,3 \times 10^{-3}$ M) pode ser visualizada na Figura 14D.

Para obter uma melhor compreensão dos resultados de viabilidade e morfologia celular apresentados nas Figuras 11-14 e utilizando os dados fornecidos nas Tabelas 10 e 11 a especiação iônica para o vanádio foi calculada a partir do software HySS (ALDERIGHI et al., 1999) com a utilização das constantes de estabilidade para espécies iônicas de vanádio hidrolisadas da Equação 3 (ELVINGSON; GONZÁLES BARÓ; PETTERSSON, 1996; PETTERSSON; ANDERSSON; GORZSÁS, 2003; CRANS et al., 2004).

A especiação realizada permite identificar as espécies iônicas de vanádio em cada um dos meios de cultura utilizados nos testes de viabilidade para ambas as linhagens celulares, a partir da suposição simplificada de que não existem ligantes potenciais para tais espécies, o que de fato não é verdadeiro.

Os resultados para a especiação iônica mencionada são apresentados na Figura 15 para as concentrações de vanádio mais altas (diluição D1), intermediárias (diluição D3) e mais baixas (diluição D5) em ambos os meios de cultura.

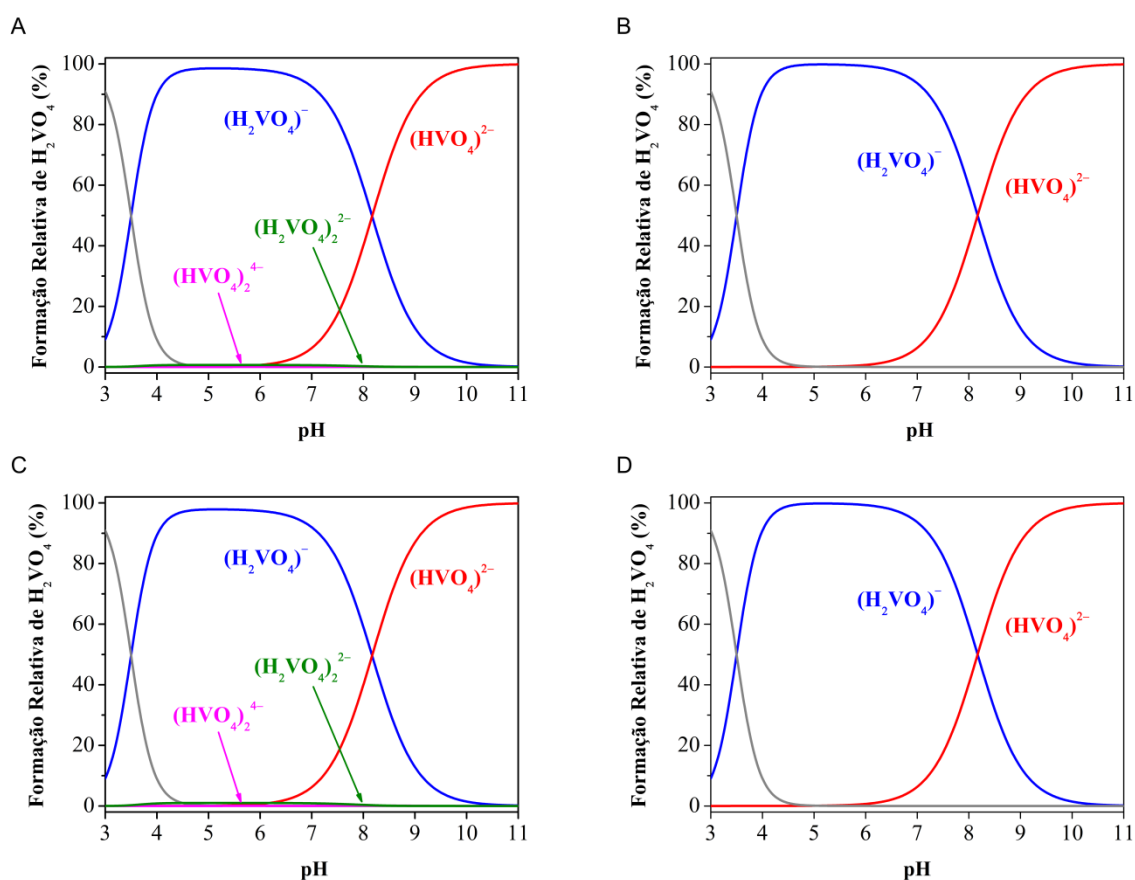


Figura 15: Especiação iônica para o vanádio em diferentes concentrações para ambos os meios de cultura celular: (A) D1 = 1.5×10^{-3} M em α -MEM, (B) D5 = 1.5×10^{-7} M em α -MEM, (C) D1 = 2.3×10^{-3} M em DMEM, (D) D5 = 2.3×10^{-7} M em DMEM.

Observando as Figuras 15 A e C, é possível notar uma distribuição complexa para espécies iônicas de vanádio nas concentrações mais elevadas para ambos os meios de cultura celular, com a presença de pelo menos nove espécies iônicas diferentes, como se segue: $(H_2VO_4)_{10}H_6^{4-}$, $(H_2VO_4)_{10}H_5^{5-}$, $(H_2VO_4)_4^{4-}$, $(H_2VO_4)_2^{2-}$, $(H_2VO_4)^-$, $(HVO_4)^{2-}$, $(H_2VO_4)_5^{5-}$, $(HVO_4)_4H_3^{5-}$, e $(HVO_4)_2^{4-}$.

No entanto, considerando os valores de pH relevantes para este trabalho (entre 7,3 e 7,4), as espécies $(\text{H}_2\text{VO}_4)_{10}\text{H}_6^{4-}$ e $(\text{H}_2\text{VO}_4)_{10}\text{H}_5^{5-}$ podem ser desconsideradas. Ademais, conforme mostrado nas Figuras 15 B e D, para concentrações mais baixas, a quantidade de espécies iônicas de vanádio diminuiu consideravelmente, e os meios de cultura celular condicionados foram compostos predominantemente por $(\text{H}_2\text{VO}_4)^-$ e $(\text{HVO}_4)^{2-}$.

Para obter uma melhor compreensão da distribuição das espécies iônicas de vanádio em termos de porcentagens em ambos os meios de cultura de células, seus respectivos valores foram traçados como uma função das espécies existentes. Os resultados são mostrados na Figura 16.

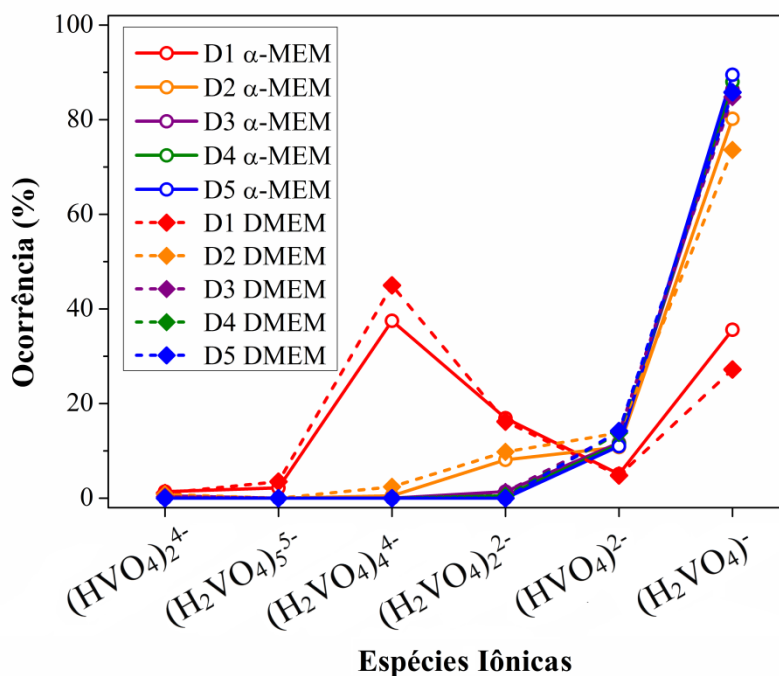


Figura 16: Quantificação das espécies iônicas (%) em pH~7 para cada meio de cultura celular. Linhas da mesma cor representam a mesma concentração para ambos os meios de cultura, diferindo apenas pelo tipo de traço (sólido para α-MEM e pontilhado para DMEM).

A partir da Figura 16, é possível observar que as ocorrências para todas as espécies iônicas de vanádio seguiram a mesma tendência geral para todas as concentrações em ambos os meios de cultura de células, embora tenha sido observado um comportamento diferente para D1 (linhas vermelhas), que apresentou maior quantidade de $(\text{H}_2\text{VO}_4)_4^{4-}$ em DMEM em comparação com α-MEM e um valor menor de $(\text{H}_2\text{VO}_4)^-$. Esta observação é suportada pelas Figuras 15 A e C.

De forma complementar aos resultados apresentados na Figura 15, em que a especiação iônica foi realizada a partir da suposição simplificada de que não existem ligantes potenciais para as espécies iônicas de vanádio em α -MEM e DMEM, uma simulação adicional (considerando compostos com concentrações relativamente relevantes: BSA, glicose e piruvato) foi realizada para determinação quantitativa das espécies iônicas de vanádio e possíveis ligantes em meio de cultura. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17.

Nesta figura, os símbolos (BSA), (Glu) e (Pyr) referem-se aos compostos albumina de soro bovino, glicose e piruvato, respectivamente. Ademais, as concentrações relacionadas a cada um destes compostos e as constantes adotadas para aos mesmos para a realização da especiação, são descritos na seção 4.1.6.

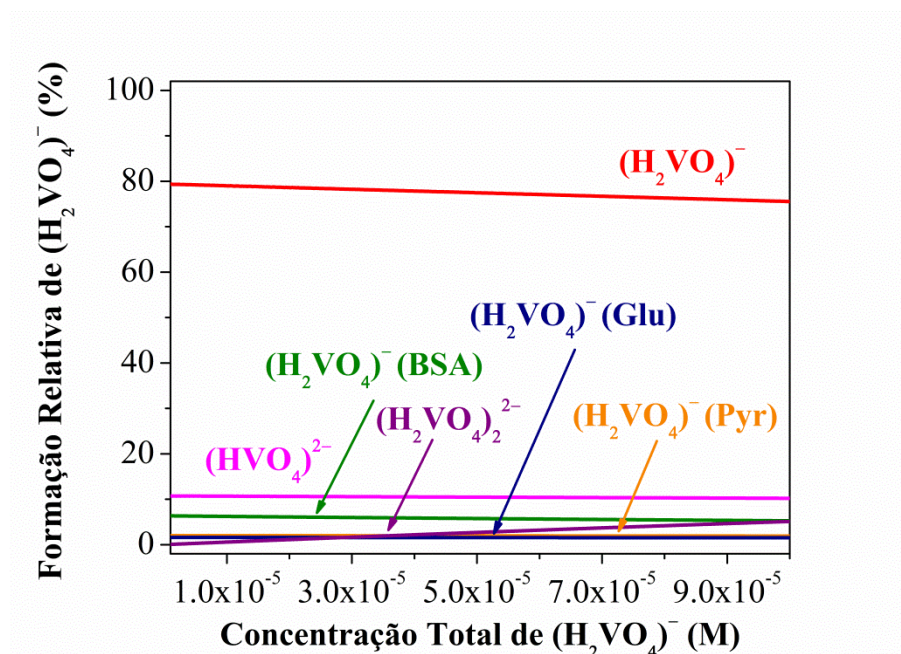


Figura 17: Especiação iônica para o vanádio e potenciais ligantes nos meios cultura celular utilizados neste trabalho.

De acordo com a Figura 17 é possível observar que, mesmo considerando a presença de potenciais ligantes para os íons de vanádio em meio de cultura, as espécies iônicas mais relevantes ainda são $H_2VO_4^-$ e HVO_4^{2-} . Além disso, a maior parte destas espécies não se encontra ligada (em torno de 80% para $H_2VO_4^-$ e 10% para HVO_4^{2-} , independentemente da concentração total de vanádio). Ademais, é possível apontar valores entre 7-8% da quantidade total de $H_2VO_4^-$ ligado à BSA e entre 2-4% para $H_2VO_4^-$ ligado à glicose e piruvato.

Avaliando o conjunto de resultados obtidos, não é possível apontar que o efeito citotóxico mais pronunciado observado para as células da linhagem NIH3T3 em comparação às células da linhagem MC3T3-E1 (Figuras 11-14) esteja relacionado à presença de diferentes

espécies iônicas de vanádio. Isto porque a análise da Figura 16 permite constatar que as espécies iônicas presentes para ambos os meios de cultura na diluição D3 da solução *stock* de V_2O_5 são essencialmente as mesmas, ou seja, $(H_2VO_4)^-$ e $(HVO_4)^{2-}$, e em concentrações muito próximas. No entanto, a diluição D3 em DMEM conduziu a uma significativa diminuição na viabilidade celular para a linhagem NIH3T3, enquanto a mesma diluição D3 em α -MEM não apresentou o mesmo efeito.

Assim, acredita-se que as diferenças em citotoxicidade com relação aos íons de vanádio observadas para estas duas linhagens celulares esteja exclusivamente ligada às diferenças na quantidade total de vanádio dissolvido nos meios de cultura utilizados nos ensaios para cada uma delas. Segundo a Tabela 11, a concentração total para o vanádio dissolvido no meio de cultura para a linhagem NIH3T3, DMEM foi $2,3 \times 10^{-5}$ M, o que é ligeiramente maior que a concentração total de vanádio dissolvido no meio de cultura para a linhagem MC3T3-E1, α -MEM ($1,5 \times 10^{-5}$ M).

No passado, outros autores também investigaram a influência de compostos e íons de vanádio com relação a diferentes linhagens celulares. Cortizo e colaboradores (CORTIZO et al., 1997) avaliaram a proliferação celular e alterações morfológicas em fibroblastos de camundongo Swiss-3T3 expostos a três espécies iônicas de vanádio diferentes (vanadato, vanadil e pervanadato), em concentrações variando de $2,5 \times 10^{-6}$ M a 100×10^{-6} M. De acordo com os resultados obtidos em seu trabalho, estes autores apontam um efeito proliferativo para todos os materiais testados em concentrações entre $2,5 \times 10^{-6}$ M e 25×10^{-6} M, mas também efeitos citotóxicos, bem como alterações morfológicas significativas para vanadato e pervanadato em concentrações acima de 50×10^{-6} M.

Ivanković e colaboradores (IVANKOVIĆ et al., 2006) também avaliaram a citotoxicidade do pentóxido de vanádio com relação a cinco linhagens celulares diferentes (V79, L929, FSAR, SCCVII e B16F10) em concentrações de 20×10^{-6} M e 100×10^{-6} M. Esses autores observaram uma acentuada diminuição da viabilidade celular em todas as linhagens celulares testadas a concentração de 100×10^{-6} M e a 20×10^{-6} M para as linhagens V79, L929, FsaR e B16F10. O mecanismo proposto para a citotoxicidade observada foi a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*).

Neste trabalho, acredita-se que o mecanismo pelo qual os íons de vanádio interagem com as células, diminuindo sua viabilidade, seja através da sua interferência com o ciclo e manutenção celular em processos relacionados a outro íon reconhecidamente essencial para estes processos, o fosfato (PO_4^{3-}).

As semelhanças estruturais entre as espécies iônicas vanadato (VO_4^{3-}) e fosfato (PO_4^{3-}), bem como de seus análogos protonados $\text{HVO}_4^{2-}/\text{HPO}_4^{2-}$ e $\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ são largamente reportadas na literatura científica. Do ponto de vista geométrico, esses dois ânions compostos por uma estrutura tetraédrica simples, também não são muito diferentes. Assim, íons vanadatos podem ocupar sítios naturalmente ocupados por íons fosfatos em moléculas de organismos vivos (REHDER, 2013; PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015).

Vanadatos e suas espécies protonadas são estáveis entre pH 1 e 10 e são assimiladas por organismos vivos no sistema de transporte de ânions de fósforo (CONTRERAS-CADENA et al., 2014). Além disso, diferentes espécies iônicas de vanádio estão ligadas à regulação de processos dependentes de fosfatos, tais como processos metabólicos envolvendo fosfatases (fosfotirosina fosfatase, PTP) e quinases (proteína tirosina quinase, PTK) (ELBERG; LI; SHECHTER, 1994; KREJSA et al., 1997; SRIVASTAVA; MEHDI, 2005; FERRER et al., 2006; MCLAUCHLAN et al., 2010; SRIVASTAVA; KUMAR; ROY, 2014). Esses processos, como por exemplo, controle celular e expressão gênica, são modulados por via de sinalização, com fosforilação e desfosforilação das proteínas/enzimas, podendo ser alteradas pela presença de vanádio (ELBERG; LI; SHECHTER, 1994; KREJSA et al., 1997)

As semelhanças estruturais entre os íons vanadato e fosfato (protonados) são apresentadas na Figura 18.

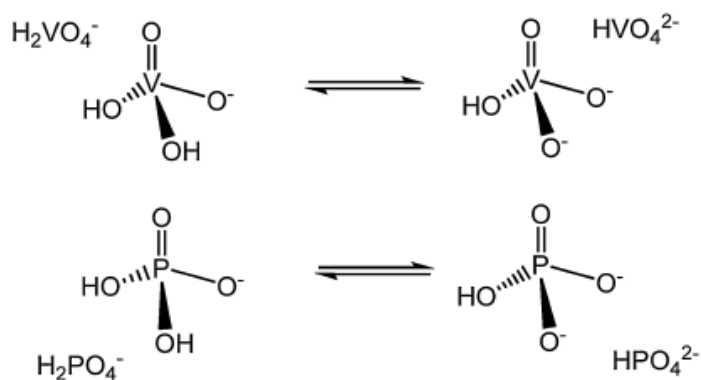


Figura 18: Analogia entre vanadatos e fosfatos (Adaptado de PESSOA; ETCHEVERRY; GAMBINO, 2015).

Neste trabalho, as espécies iônicas identificadas nos meios de cultura foram essencialmente vanadatos e suas diferentes espécies protonadas. Assim, pode hipotetizar-se que, para concentrações variando de 10^{-7} M a 10^{-6} M (D5 e D4), pelo menos até 72 h, as células de ambas as linhagens celulares estudadas (NIH3T3 e MC3T3-E1) podem absorver e processar as espécies iônicas de vanádio sem lesão ou morte celular significativa. No entanto,

concentrações de vanádio entre 10^{-5} M e 10^{-3} M (D3 a D1) exercem efeitos negativos na viabilidade e morfologia das células da linhagem NIH3T3, enquanto os mesmos efeitos sobre as células da linhagem MC3T3-E1 só começaram exercidos em uma concentração 10 vezes maior, ou seja, variando de 10^{-4} M e 10^{-3} M (D2 a D1).

O estudo da citotoxicidade de espécies iônicas liberadas a partir do pentóxido de vanádio neste trabalho está relacionado à possibilidade de ocorrência tal evento *in vivo*, uma vez que a camada passiva sobre a superfície de implantes metálicos baseados na liga Ti-6Al-4V pode conter tal óxido. Com relação a este tema, é relatado na literatura científica que em pacientes com próteses baseadas nesta liga e funcionando adequadamente, uma concentração de vanádio de 288 ng/mL (cerca de 6 μ M ou 6×10^{-6} M) pode ser encontrada na cápsula articular. No entanto, para pacientes em que este dispositivo médico não está funcionando adequadamente, essa concentração aumenta para 1.514 ng/mL (cerca de 30 μ M ou 3×10^{-5} M) (HALLAB et al., 2001).

Assim, considerando esta informação e com base nos conjunto de resultados obtidos nesta etapa do trabalho, é possível apontar que, de acordo com o modelo testado (células de camundongo, *in vitro*), a exposição de células dos tecidos ao redor de um implante metálico (fibroblastos) a íons de vanádio em concentrações muito próximas ($D3 = 2,3 \times 10^{-5}$ M) àquelas passíveis de ocorrência *in vivo* (3×10^{-5} M) (HALLAB et al., 2001) para pacientes que apresentam o mau funcionamento de sua prótese baseada na liga Ti-6Al-4V, pode representar riscos significativos à saúde.

5.2 Avaliação dos aspectos de degradação

As Figuras 19 A, B e C apresentam os resultados para as caracterizações iniciais (antes da realização dos testes de tribocorrosão) com relação à estrutura cristalina por difração de raios-X (XRD) para as amostras das ligas metálicas Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST, respectivamente.

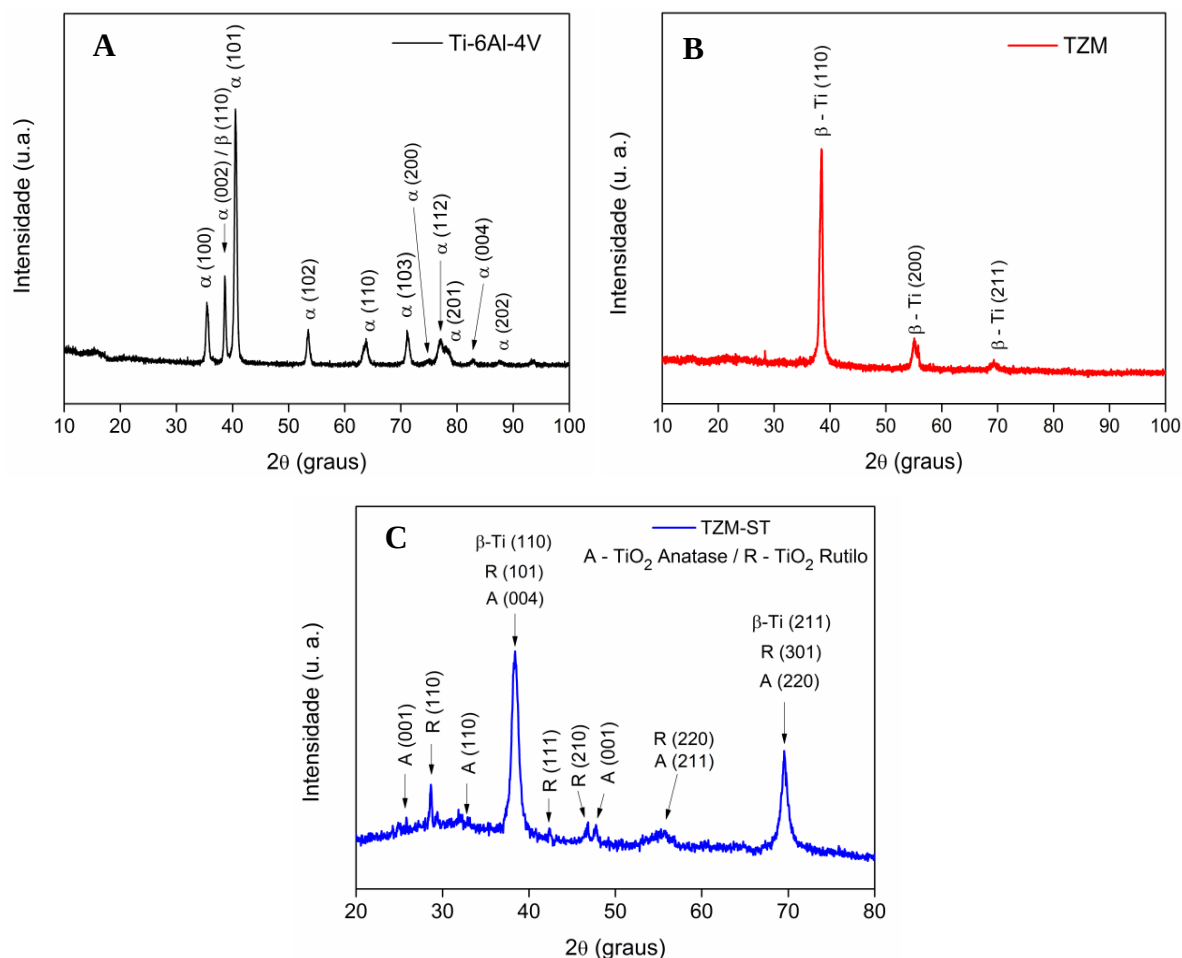


Figura 19: Difratomogramas de raios-X para as amostras (A) Ti-6Al-4V, (B) Ti-15Zr-15Mo (TZM) e (C) Ti-15Zr-15Mo com modificação superficial (TZM-ST).

Como é possível observar a partir da Figura 19 A, a amostra Ti-6Al-4V apresentou uma composição mista entre as fases α (hexagonal) 44-1288, respectivamente. A amostra Ti-15Zr-15Mo (Figura 19 B), por outro lado, apresentou somente a presença da estrutura cristalina cúbica do tipo β (cúbica) para o titânio, em que os picos observados foram indexados pelo cartão teórico PDF 44-1288.

No padrão de difração de raios-X referente à amostra TZM-ST e mostrado na Figura 19 C, picos referentes ao dióxido de titânio (TiO_2) também foram identificados. Este óxido, formado durante o processo de anodização sobre a superfície da amostra TZM-ST está presente nas fases cristalinas anatase e rutilo (ambas tetragonais), as quais foram indexadas pelos cartões teóricos PDF 89-4203 e 21-1276, respectivamente. Além disso, considerando a intensidade relativa dos picos presentes para cada fase do dióxido de titânio, a fase rutilo aparenta estar presente em maior quantidade.

O resultado apresentado na Figura 19 C difere significativamente dos resultados obtidos por Alves e colaboradores (ALVES et al., 2013) em que filmes de TiO_2 foram crescidos sobre a superfície de Ti-cp a partir da mesma técnica (MAO) e metodologia utilizadas neste trabalho. Estes autores verificaram que a camada óxida de TiO_2 obtida sobre o titânio comercialmente puro, apesar de apresentar uma composição mista entre as fases cristalinas anatase e rutilo, era predominantemente composta pela fase cristalina anatase. Isto indica que as características do substrato (estrutura cristalina, composição e microestrutura) podem influenciar as características da camada óxida de dióxido de titânio crescida em sua superfície pela técnica de micro arco oxidação.

A Figura 20 apresenta as análises de microestrutura e morfologia superficial obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) para as amostras das ligas metálicas de Ti-6Al-4V e TZM e a Figura 21 apresenta o mesmo tipo de análise para a amostra de Ti-15Zr-15Mo com modificação superficial (TSM-ST), respectivamente. Estas figuras referem-se à caracterização de microestrutura destas amostras antes da realização dos testes de tribocorrosão.

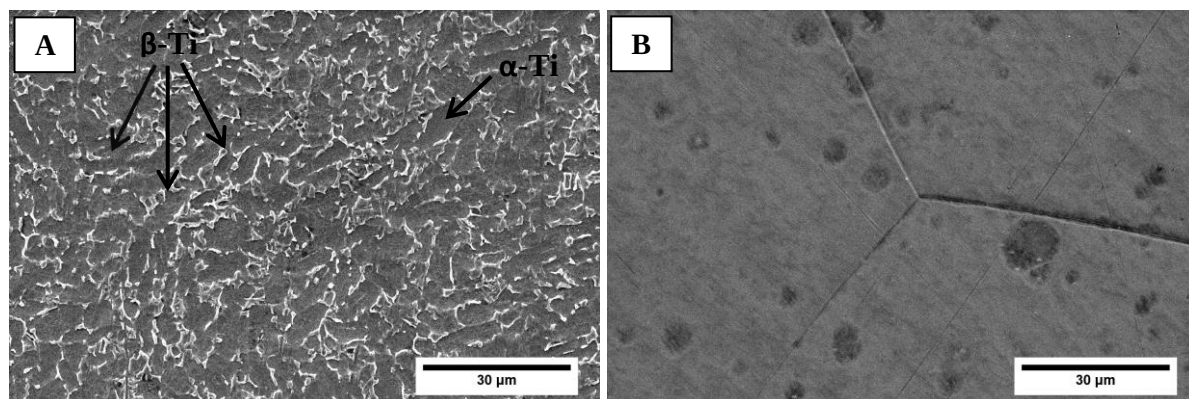


Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (elétrons secundários) para as amostras (A) Ti-6Al-4V e (B) TZM, sendo ambas atacadas quimicamente em uma solução $\text{H}_2\text{O}:\text{HNO}_3:\text{HF}$, 1:1:1.

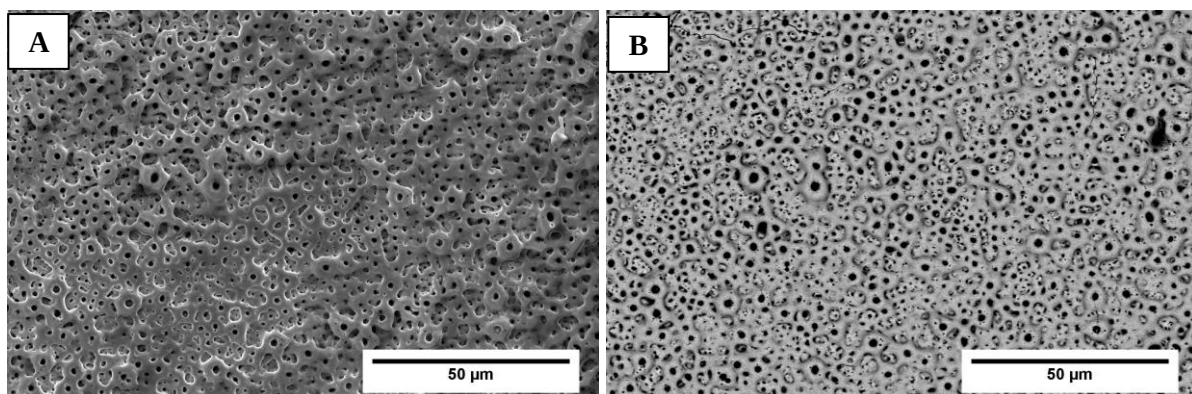


Figura 21: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para a amostra TZM-ST: (A) elétrons secundários e (B) elétrons retroespalhados.

As Figuras 20 A e B apresentam as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as amostras Ti-6Al-4V e TZM, a partir das quais é possível observar diferenças significativas. A microestrutura observada para a amostra Ti-15Zr-15Mo (grãos e a presença clara de contornos de grão) é característica para o titânio em sua estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (β) (XAVIER et al., 2017). Da mesma forma, a microestrutura observada para a amostra Ti-6Al-4V (uma composição de duas microestruturas distintas indicadas pelas setas) na Figura 20 A também é característica para o titânio composto pelas estruturas cristalinas hexagonal (α) e cúbica de corpo centrado (β) (RODRIGUES, 2013).

A partir da Figura 21 A, é possível observar que a anodização por micro-arco oxidação da amostra TZM-ST promoveu a o crescimento de uma estrutura porosa em sua superfície, em que poros semelhantes a vulcões interconectados encontram-se presentes. Esta estrutura porosa refere-se à camada de dióxido de titânio formada na superfície da liga Ti-15Zr-15Mo e anteriormente já constatada na análise por difração de raios-X (Figura 19 C). A Figura 21 B, referente à imagem obtida por elétrons retroespalhados, em que o contraste observado está relacionado às diferenças em composição química, evidencia que esta superfície apresenta homogeneidade em termos de composição.

Apesar de apresentar diferenças com relação à proporção de fases cristalinas presentes (Figura 19 C) daquela verificada por Alves e colaboradores (ALVES et al., 2013), a morfologia da camada óxida de TiO_2 sobre a superfície liga Ti-15Zr-15Mo é, de forma geral, semelhante àquela obtida para o dióxido de titânio sobre o Ti-cp verificada por estes autores.

As amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST também foram caracterizadas de acordo com sua composição química, via espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Os resultados permitiram identificar os elementos presentes e a composição média de cada uma das ligas em estudo. Para isso, espectros em cinco regiões diferentes em cada uma das três amostras de cada grupo foram tomados. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 12: Composição química semi-quantitativa (EDS) para as amostras em estudo.

Amostra	Ti-6Al-4V	TZM	TZM-ST
Elemento	Conteúdo (% em peso)		
Ti	89,6 ± 0,5	68,5 ± 0,2	34,9 ± 1,6
Al	6,4 ± 0,3	-	-
V	4,4 ± 0,6	-	-
Zr	-	15,8 ± 0,2	-
Mo	-	15,7 ± 0,1	-
O	-	-	50,4 ± 1,6
Ca	-	-	9,8 ± 0,8
P	-	-	5,3 ± 0,5

A partir dos dados da Tabela 12 foi possível verificar que a liga Ti-6Al-4V apresenta uma composição química dentro dos limites indicados pela ASTM (88,5 a 90,5% em peso para o Ti, 5,5 a 6,5% em peso para o Al e 3,5 a 4,5% em peso para o V) e que a liga de TZM foi processada de acordo com a composição pretendida (aproximadamente 15% em peso para o zircônio, 15% em peso para o molibdênio e 70% em peso para o titânio). Também a partir desta tabela, foi possível verificar a incorporação dos elementos bioativos (Ca e P) na camada óxida de TiO₂ sobre a superfície da liga TZM-ST. Adicionalmente, a razão (em porcentagem atômica) entre os elementos bioativos incorporados a esta superfície foi determinada como aproximadamente $(Ca/P) = 1,4 \pm 0,2$.

Após a caracterização físico-química inicial, todas as amostras foram submetidas aos testes de tribocorrosão. Nestes testes, o comportamento eletroquímico dos materiais em estudo foi avaliado a partir do registro de curvas para o potencial de circuito aberto (OCP) antes, depois e após o período de deslizamento para todas as amostras. A Figura 22 apresenta as curvas representativas obtidas para cada grupo de amostras (Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST).

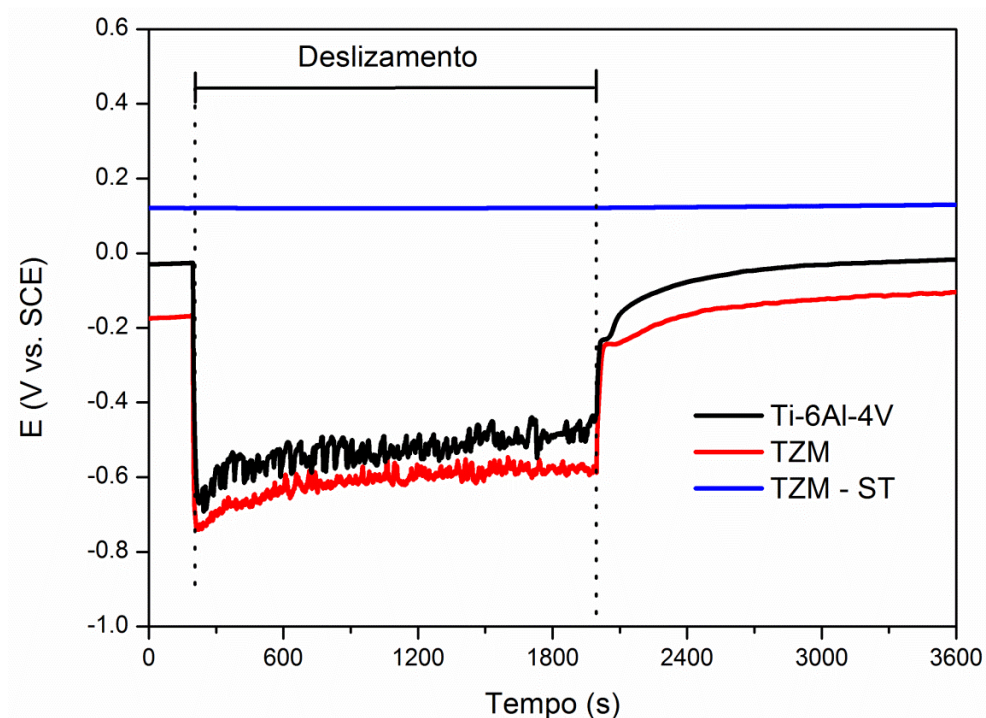


Figura 22: Curvas de potencial de circuito aberto (OCP) registradas antes, durante e após o deslizamento nos testes de tribocorrosão para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.

Analisando o gráfico da Figura 22, e considerando-se os 180 segundos iniciais, observa-se o potencial de estabilização para as amostras Ti-6Al-4V (preto), TZM (vermelho) e TZM-ST (azul), cujos valores correspondem a aproximadamente 0, -200 mV e +150 mV, respectivamente. Este potencial estável está relacionado com a formação de uma camada óxida passiva protetora na superfície das amostras quando as mesmas são colocadas em contato com o eletrólito e iniciam seu processo de corrosão. Em geral, quanto maior o valor para este potencial de estabilização, menor é a tendência de corrosão para um material específico. Desta forma, pode-se dizer que dentre as amostras testadas, aquela que possui maior tendência à corrosão (no início do teste) é a liga TZM e a que possui menor tendência à corrosão (no início do teste) é a amostra TZM-ST, ambas com relação à amostra Ti-6Al-4V, que apresenta um potencial de estabilização intermediário entre TZM e TZM-ST.

Quando o deslizamento é iniciado (após os 180 segundos iniciais), há uma queda abrupta para os valores de potencial para as amostras Ti-6Al-4V e TZM e valores próximos a -700 mV são atingidos para ambas as amostras, enquanto não é possível observar nenhuma alteração significativa no potencial registrado para a amostra TZM-ST, que é mantido até o termino e após o deslizamento.

A queda abrupta no potencial para as amostras Ti-6Al-4V e TZM está relacionada à remoção da camada óxida de passivação (formada na superfície das amostras durante o período de estabilização) pela ação do desgaste mecânico promovido pelo deslizamento do contra-corpo (esfera de alumina) sobre a superfície das amostras (MISCHLER, 2008). A mesma queda abrupta no potencial não foi observada para a amostra TZM-ST, pois a camada óxida de TiO_2 formada em sua superfície pela micro-arco oxidação foi capaz de promover uma proteção adicional com relação à corrosão para esta amostra (ALVES et al., 2013, 2017; OLIVEIRA et al., 2015b).

Durante o deslizamento, entre 180 e 1980 segundos, é possível observar pequenas oscilações para os valores de potencial registrados para as amostras Ti-6Al-4V e TZM. Estas oscilações estão relacionadas aos processos de destruição da camada passiva pela ação do deslizamento do contra-corpo (esfera de alumina) e repassivação da superfície das amostras durante o período de deslizamento (CORREA et al., 2015). É possível observar também, que durante o deslizamento, não há grandes diferenças entre os valores de potencial registrados para estas duas amostras, o que indica que não há diferença significativa com relação ao comportamento a tribocorrosão para as mesmas durante este período.

Ao término do deslizamento, observou-se um aumento praticamente instantâneo no potencial para as amostras Ti-6Al-4V e TZM, seguido por um período de estabilização, em que valores de potencial próximos aos valores de potencial de estabilização registrados no início do teste para cada uma das amostras são atingidos. Isto está relacionado à repassivação da superfície após o fim do deslizamento, através da formação de uma nova camada óxida protetora.

Correa e colaboradores (CORREA et al., 2016) estudaram o comportamento com relação à tribocorrosão para a liga Ti-15Zr-15Mo em comparação ao Ti-cp em fluido corporal simulado, utilizando como parâmetros de teste uma carga normal de 1,5 N, frequência de 2 Hz e duração de deslizamento de 30 min. De acordo com os resultados obtidos por estes autores, não há diferenças significativas no comportamento com relação à tribocorrosão para a liga Ti-15Zr-15Mo em comparação ao Ti-cp. No entanto, uma resistência à corrosão significativamente menor durante o deslizamento (OCP $\sim 1,2$ V vs SCE) foi verificada para esta liga em fluido corporal simulado e nas condições de teste adotadas por estes autores em comparação à observada neste trabalho (OCP $\sim 0,7$ V vs. SCE).

Durante o período de deslizamento nos testes de tribocorrosão, o coeficiente de fricção (COF) entre o contra-corpo e a amostra também foi monitorado e a evolução dos

valores registrados para cada uma das amostras em função do tempo é apresentado na Figura 23. Matematicamente, o coeficiente de fricção registrado para estas amostras é dado pela Equação 4, em que F_T é a força tangencial ao deslizamento e F_N , a força normal aplicada.

$$COF = \frac{F_T}{F_N} \quad (\text{Equação 4})$$

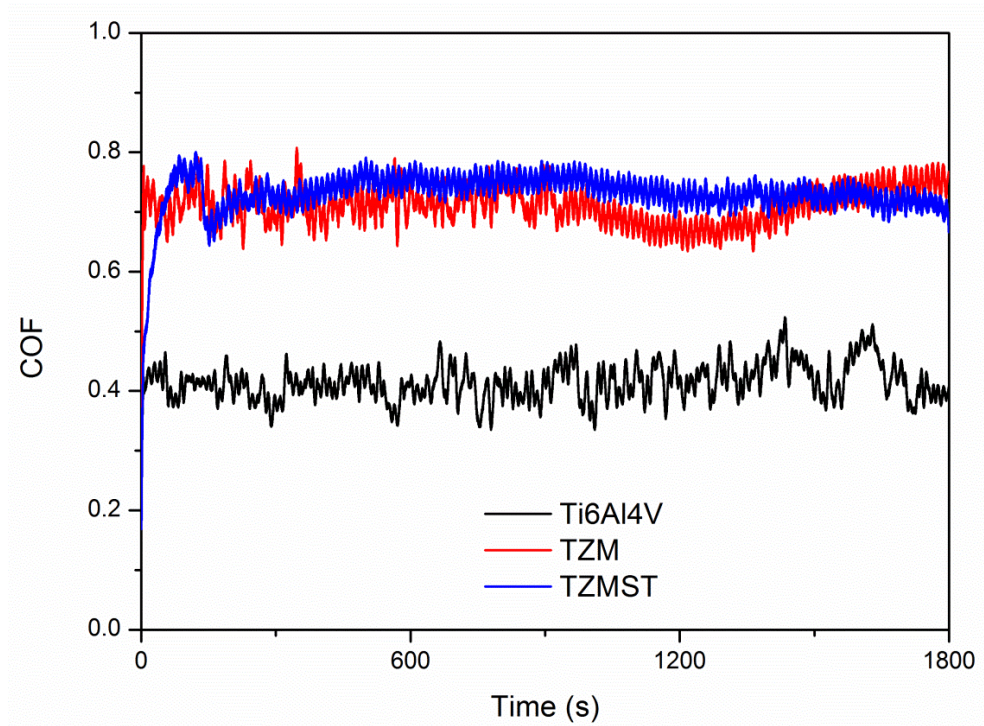


Figura 23: Evolução do coeficiente de fricção ao longo do tempo durante o período de deslizamento nos testes de tribocorrosão para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.

De acordo com a Figura 23, as amostras TZM e TZM-ST apresentaram valores mais elevados para o coeficiente de fricção com relação àqueles registrados para a liga Ti-6Al-4V durante todo o período de deslizamento (valores médios de 0,7 contra 0,4). Considerando que os valores para o coeficiente de fricção estão relacionados à resistência ao deslizamento da amostra com relação ao contra-corpo, pode-se dizer que as amostras TZM e TZM-ST apresentam maior resistência ao deslizamento quando comparadas à amostra Ti-6Al-4V.

Após os testes de tribocorrosão, as triplicatas de todos os grupos foram lavadas em banho ultrassônico em ciclos de 10 minutos em água e etanol e submetidas a análises de microscopia eletrônica de varredura. As imagens representativas para as pistas de desgaste obtidas, por elétrons secundários (SE, do inglês *secondary electrons*) e por elétrons

retroespalhados (BSE, do inglês *back scattered electrons*), para cada grupo são apresentadas na Figura 24.

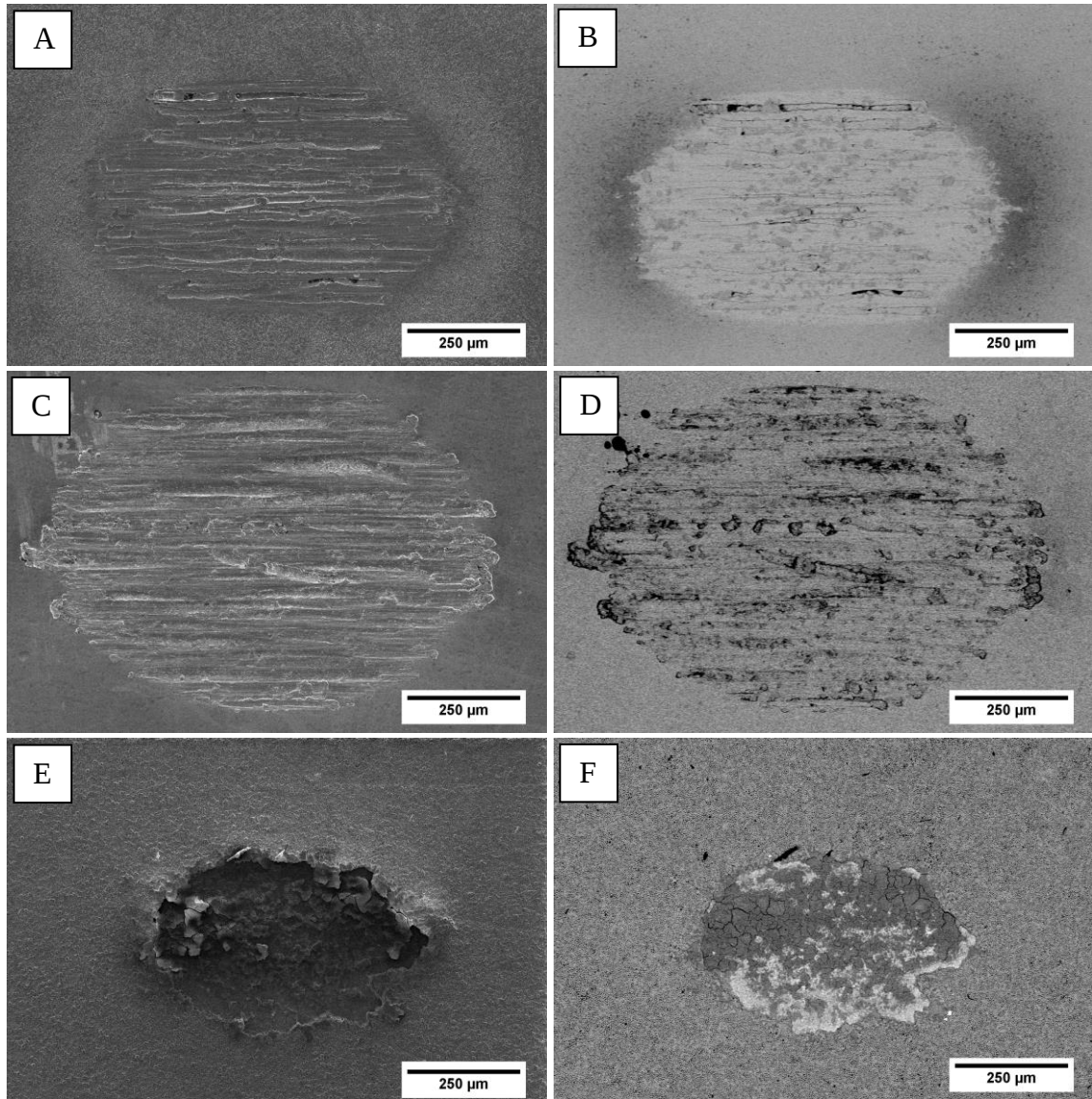


Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para as pistas de desgaste geradas durante os testes de tribocorrosão para as amostras: (A) Ti-6Al-4V (SE), (B) Ti-6Al-4V (BSE) (C) TZM (SE), (D) TZM (BSE), (E) TZM-ST (SE) e (F) TZM-ST (BSE).

Analisando de forma geral as Figuras 24 A - D, é possível notar que as pistas de desgaste obtidas para as amostras Ti-6Al-4V e TZM são similares entre si na sua forma, diferindo, no entanto em largura e comprimento. O tamanho médio calculado para a largura das pistas de desgaste para o grupo de amostras de Ti-6Al-4V corresponde a $504 \pm 12 \mu\text{m}$, enquanto o mesmo valor para o grupo de amostras TZM corresponde a $726 \pm 16 \mu\text{m}$. Analisando as imagens das Figuras 24 B e D, que correspondem às análises por elétrons

retroespalhados, em que o contraste obtido está relacionado à composição química, nota-se que as amostras TZM apresentam regiões mais oxidadas que a amostra Ti-6Al-4V (mais regiões escuras) e também mais resíduos de desgaste em suas bordas.

Para o grupo de amostras TZM-ST, cuja imagem representativa é mostrada na Figura 24 E, um perfil completamente diferente com relação à pista de desgaste obtida é apresentado. Para estas amostras foi possível notar que a pista de desgaste foi significativamente menor em termos de largura e comprimento que àquelas obtidas para as amostras Ti-6Al-4V e TZM, indicando um dano menor à sua superfície, o que corrobora com os dados apresentados na Figura 22, em que um melhor comportamento com relação à tribocorrosão foi registrado. Para a amostra TZM-ST a largura média calculada corresponde a $361 \pm 32 \mu\text{m}$.

Também é possível observar, a partir da Figura 24 F, a presença de rachaduras nas bordas da camada óxida porosa de TiO_2 presente sobre a superfície da amostra TZM-ST, além da presença de regiões mais claras em suas imagens de elétrons retroespalhados, que estão relacionadas à remoção completa da camada porosa de TiO_2 e exposição da superfície de liga de Ti-15Zr-15Mo do substrato.

A comparação entre os valores calculados para as larguras das pistas de desgaste de todas as amostras é apresentada na Figura 25.

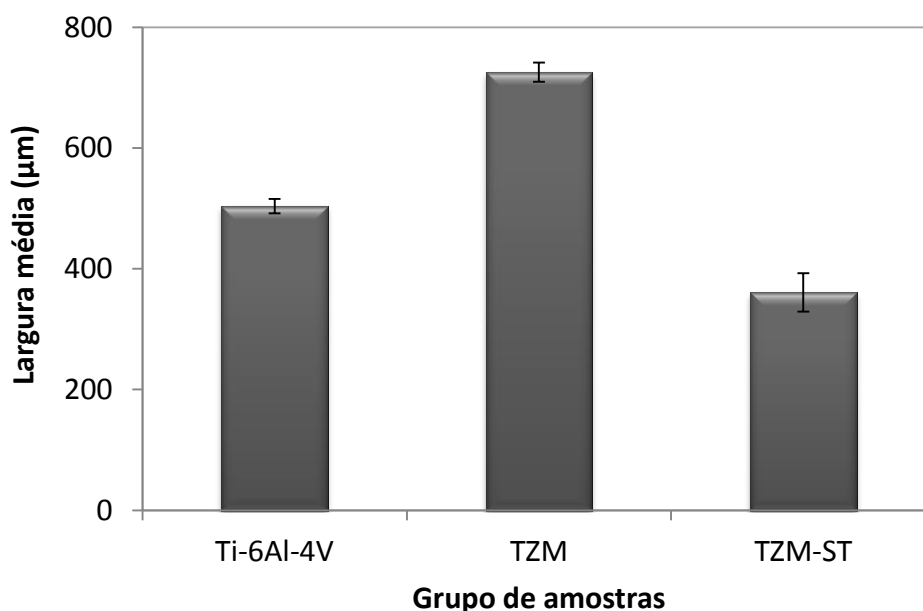


Figura 25: Largura média calculada para as pistas de desgaste de cada grupo de amostras.

Complementarmente, a Figura 26 (A-F) apresenta os perfis 3D representativos das pistas de desgaste para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST, obtidos por microscopia

confocal e também os perfis gráficos 2D para as mesmas amostras, obtidos a partir da técnica de profilometria.

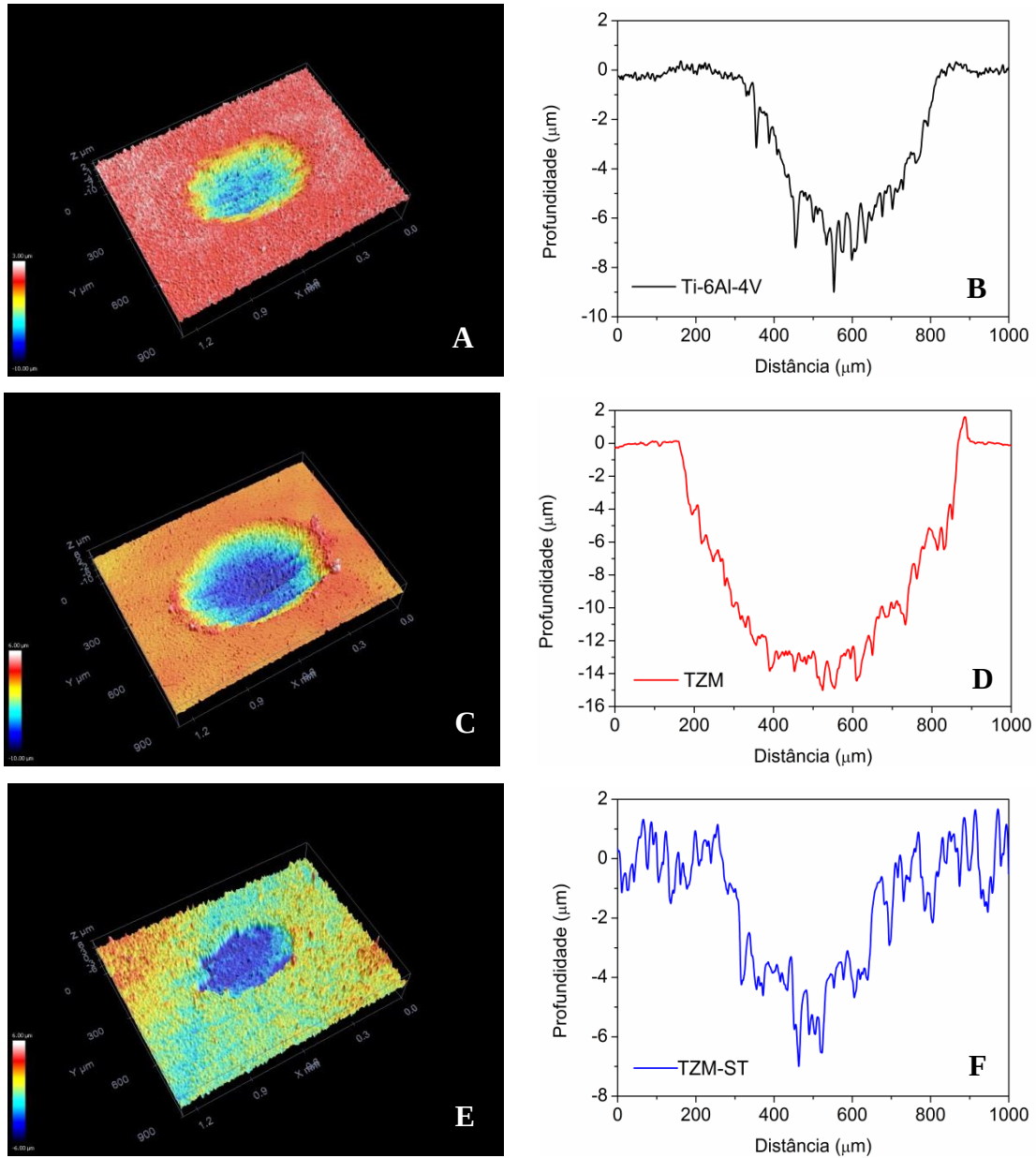


Figura 26: Perfis para as pistas de desgaste: (A) 3D (confocal) e (B) 2D (profilometria) para a amostra Ti-6Al-4V, (C) 3D (confocal) e (D) 2D (profilometria) para a amostra TZM, (E) 3D (confocal) e (F) 2D (profilometria) para a amostra TZM-ST.

De acordo com os perfis 2D e 3D apresentados na Figura 26 para cada um dos grupos de amostras nota-se que os valores para a profundidade média das pistas de desgaste obtidas seguiram a mesma tendência que os valores obtidos para a largura média, apresentados na Figura 25, ou seja, valores maiores para a profundidade média da amostra

TZM, valores intermediários para a amostra Ti-6Al-4V e valores menores para a amostra TZM-ST. Os valores para profundidade média calculados para cada grupo de amostras foram: $8,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$ para Ti-6Al-4V, $14 \pm 0,7 \mu\text{m}$ para TZM e $4,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ para TZM-ST.

A partir dos valores de profundidade e largura das pistas de desgaste, diâmetro da esfera de alumina utilizada como contra-corpo para os testes de tribocorrosão e a área total de desgaste calculada a partir dos perfis 2D para as amostras e fornecido diretamente pelo software utilizado para as análises de profilometria, os volumes de desgaste para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST foram calculados a partir da Equação 5 (DONI et al., 2013; ALVES et al., 2017), em que ΔV é a perda total de volume em μm^3 , $\bar{D}$ é a profundidade média, R é o raio da esfera de alumina, $\bar{A}_w$ a perda de área média calculada a partir dos perfis 2D e l é a largura total para a pista de desgaste ($600\mu\text{m}$). Os resultados obtidos são apresentados graficamente na Figura 27.

$$\Delta V = \left[\frac{1}{3} * \pi * \bar{D}^2 (3R - \bar{D}) \right] + \bar{A}_w * l \quad (\text{Equação 5})$$

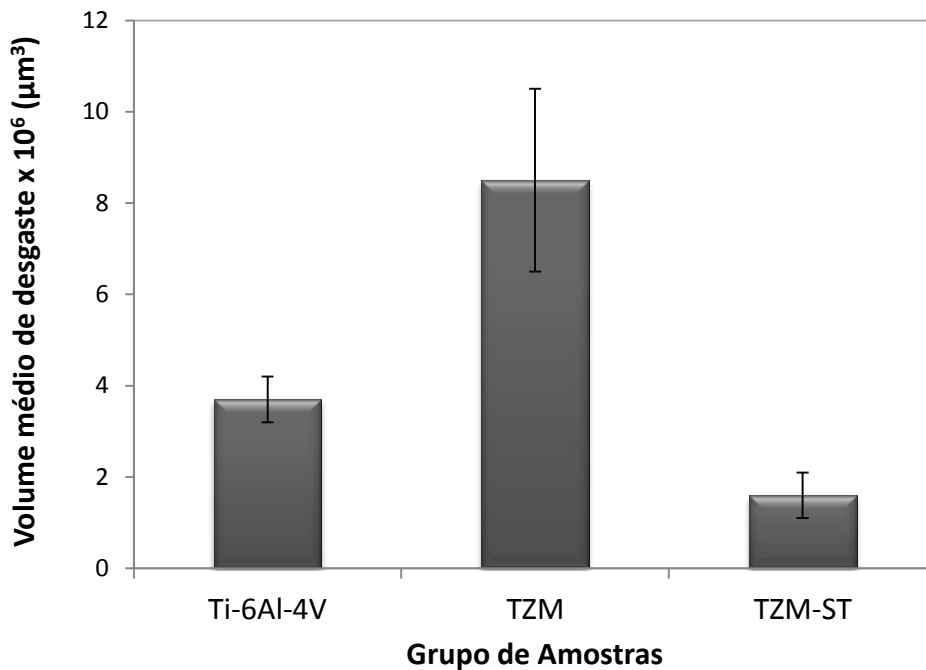


Figura 27: Volume médio de desgaste para as amostras Ti-6Al-4V, TZM e TZM-ST.

Como sugerido pelos resultados apresentados na Figura 27, a amostra TZM apresentou um volume médio de desgaste maior ($8,5 \pm 2,0 \mu\text{m}^3$), a amostra Ti-6Al-4V apresentou um volume de desgaste médio intermediário ($3,7 \pm 0,5 \mu\text{m}^3$) e a amostra TZM-ST um volume médio de desgaste menor ($1,6 \pm 0,5 \mu\text{m}^3$).

Levando em consideração o conjunto de resultados obtidos, pode-se sugerir que o desgaste mecânico resultante dos processos de tribocorrosão é mais acentuado ou provavelmente mais atenuado pelo processo de corrosão para a amostra Ti-15Zr-15Mo (TZM) do que para a amostra Ti-6Al-4V. Isto porque, apesar de não apresentar diferenças significativas com relação ao comportamento eletroquímico quando comparada à liga Ti-6Al-4V, valores significativamente maiores para a largura e volume de desgaste para esta liga foram observados, o que pode estar diretamente relacionado às propriedades mecânicas da liga Ti-15Zr-15Mo. No entanto, quando um processo de modificação superficial é adotado para esta liga (amostra TZM-ST), seu comportamento com relação à degradação superficial é melhorado significativamente, tanto em termos de corrosão quanto em termos de desgaste mecânico.

5.3 Produção e caracterização dos produtos de desgaste

Como descrito na seção 4.3, as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram submetidas a testes de tribocorrosão para a produção de partículas de desgaste. Na Figura 28 é possível observar a configuração final após 15h de teste para ambas as amostras.

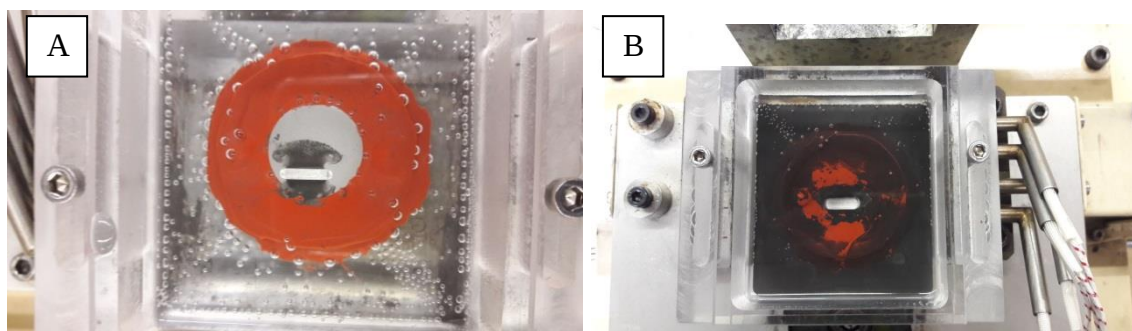


Figura 28: Configuração final das amostras (A) Ti-6Al-4V e (B) Ti-15Zr-15Mo após 15h de teste para produção de partículas de desgaste.

Observando a Figura 28 é possível notar que a quantidade de partículas de desgaste, que conferem o aspecto negro para o eletrólito utilizado no teste, é significativamente maior para a amostra TZM (Figura 28 B) quando comparada à amostra Ti-6Al-4V (Figura 28 A). De acordo com os dados verificados anteriormente para comprimento e volume de desgaste para esta amostra (Figuras 25 e 27), isto pode ser considerado coerente, uma vez que esta amostra aparenta ter menor resistência ao desgaste mecânico.

As partículas de desgaste produzidas para cada uma das ligas testadas foram submetidas a análises por microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliação de parâmetros como tamanho, morfologia e composição. Posteriormente, a estrutura cristalina para cada um dos grupos de partículas de desgaste produzidas também foi avaliada a partir de análises por difração de elétrons (ED), em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM).

A Figura 29 apresenta algumas das imagens obtidas para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V em diferentes magnificações.

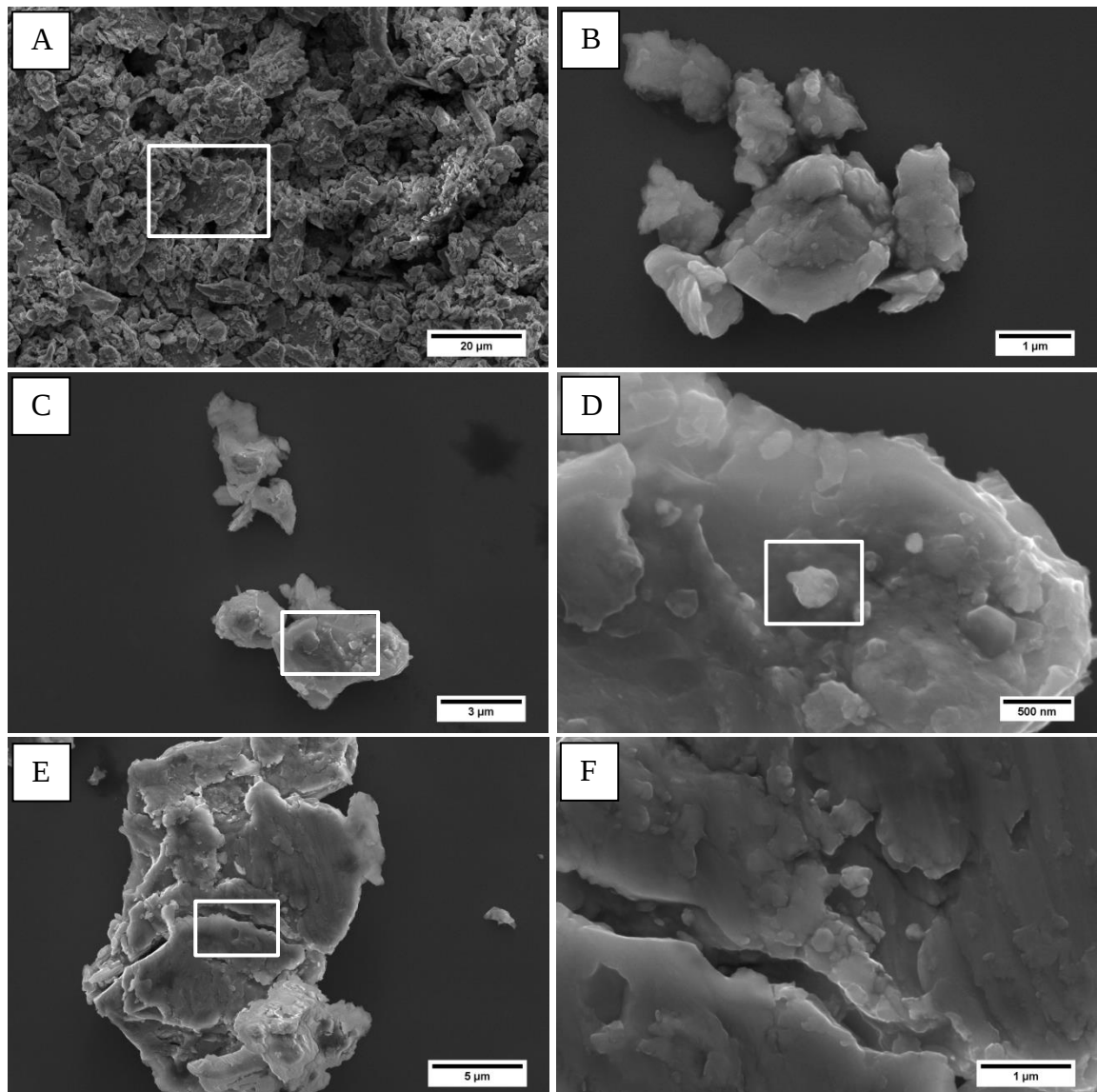


Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as partículas de desgaste obtidas a partir da liga Ti-6Al-V. (A) análise geral, (B) e (C) pequenos conjuntos de partículas em maior magnificação, (D) área destacada em (C) em detalhes, (E) um conjunto de partículas maiores e (F) área destacada em (E) em detalhes.

A partir da Figura 29 (A-C), é possível observar que partículas de desgaste com uma ampla faixa de distribuição de tamanhos foram obtidas a partir dos testes de tribocorrosão sobre a liga Ti-6Al-4V. Isso, além de estar relacionado com os parâmetros de testes adotados e propriedades do material em questão, também está relacionado aos mecanismos de desgaste mecânico para a amostra.

Sobre esta questão, na área destacada da Figura 29 A é possível observar a presença uma partícula grande e laminada, características observadas com frequência para mais partículas em outras imagens. De uma forma geral, as características apresentadas por estas partículas podem estar relacionadas a processos de clivagem e delaminação da amostra em planos determinados. Assim, o deslizamento contínuo ao longo dos testes, na presença destas partículas, pode atenuar os processos de desgaste mecânico, produzindo partículas menores e em maior quantidade. Por fim, uma análise mais detalhada de diversas imagens obtidas para esta amostra, revelou que as partículas de desgaste obtidas apresentam tamanhos variando entre 1 e 15 μm .

Partículas sub-micrométricas também foram verificadas sobre as superfícies de partículas maiores, como é possível observar nas Figuras 29 D e F. De uma forma geral, a geração destas partículas pode estar relacionada ao mecanismo descrito no parágrafo anterior. Além disso, estas partículas podem ficar fracamente aderidas sobre as superfícies das partículas maiores, como mostrado em detalhe na Figur 29 D, ou incrustar-se nestas superfícies conferindo um aspecto rugoso às mesmas (Figura 29 F).

A presença de rachaduras sobre as superfícies das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V (Figura 29 E) corrobora a hipótese de que fragmentos menores de partículas podem ser gerados pela ação do deslizamento contínuo ao longo do teste.

Por fim, de acordo com a Figura 29, pode-se dizer que, de uma forma geral, as partículas de desgaste obtidas a partir dos testes de tribocorrosão sobre a liga Ti-6Al-4V apresentam uma morfologia flocular, irregular e superfície predominantemente rugosa.

O tamanho médio para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V também foi determinado a partir do levantamento de um histograma, mostrado na Figura 30, em que foram consideradas as dimensões transversais de 320 partículas. De acordo com o mesmo, a maior parte das partículas obtidas apresenta tamanhos entre 1 e 5 μm (~75%), sendo aquelas com tamanhos entre 2 e 3 μm as mais frequentes. As partículas sub-micrométricas verificadas sobre a superfície de partículas maiores não foram levadas em consideração na elaboração deste histograma.

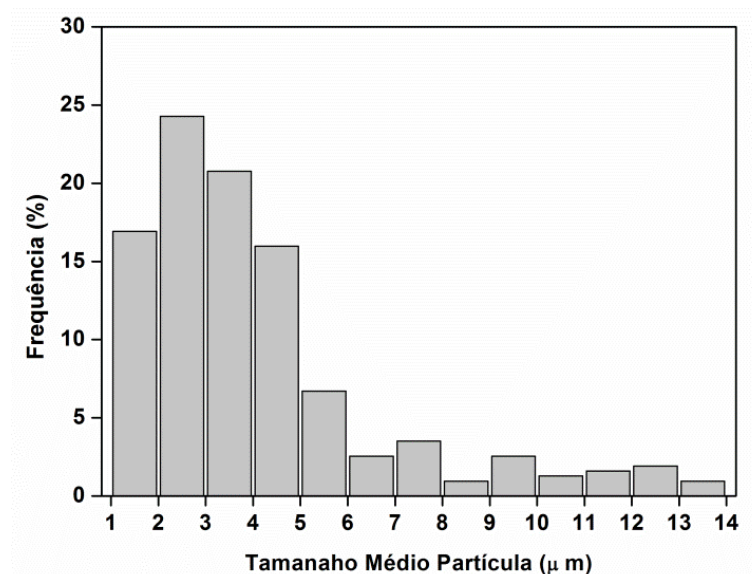


Figura 30: Histograma para o tamanho médio das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

Análises complementares para avaliação da composição química das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V foram realizadas a partir da técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Com relação a estas análises, a Figura 31 apresenta um espectro representativo em que é possível visualizar os elementos identificados para esta amostra. A Figura 32, por sua vez, apresenta o mapeamento químico para estes elementos para um conjunto de partículas. Por fim, na Tabela 13, são apresentadas as análises semi-quantitativas (porcentagens em peso) para cada um dos elementos identificados na composição química destas partículas de desgaste (vinte regiões analisadas).

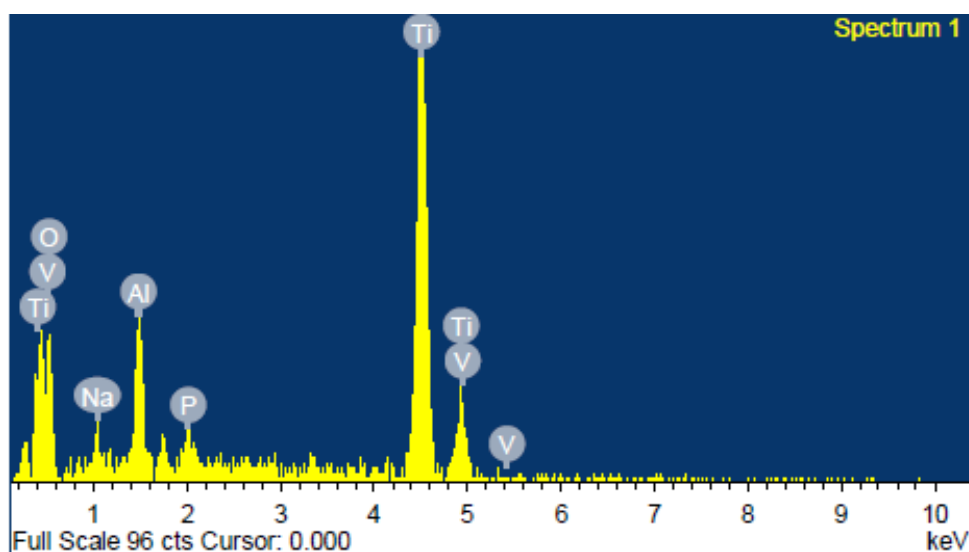


Figura 31: Espectro de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

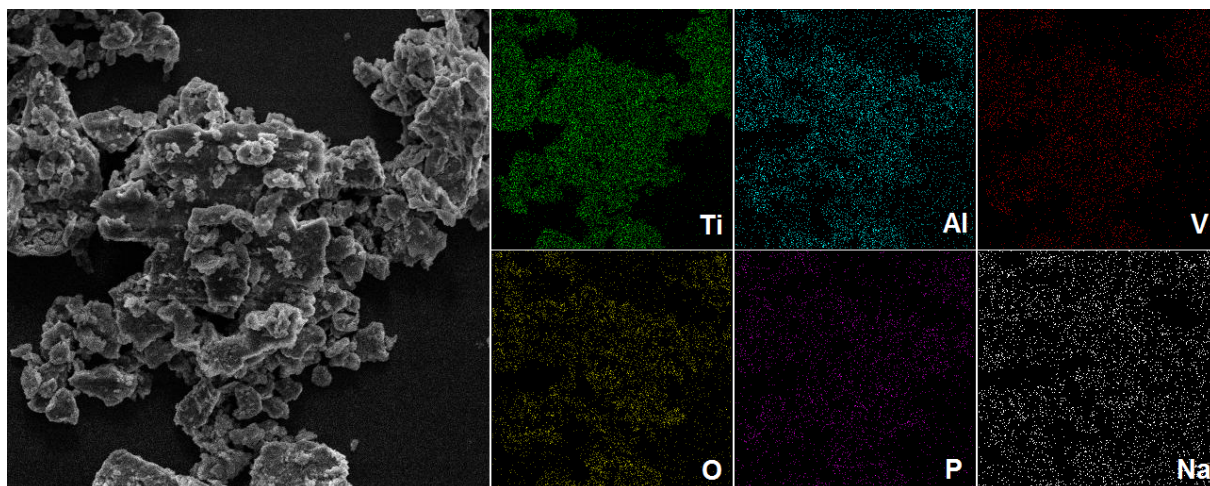


Figura 32: Mapeamento químico para os elementos identificados nas partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

Tabela 13: Composição química média semi-quantitativa para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V.

Partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V						
Elemento	Ti (%p)	Al (%p)	V (%p)	O (%p)	P (%p)	Na (%p)
Média	72,0	4,3	3,7	17,5	1,5	1,0
Desvio Padrão	± 4,2	± 0,9	± 1,4	± 3,6	± 0,6	± 0,4

O espectro de EDS, apresentado na Figura 31, indica que na composição química das partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V estão presentes os elementos químicos: titânio (Ti), alumínio (Al) e vanádio, correspondentes à composição da liga, e também oxigênio (O), fósforo (P) e sódio (Na). O oxigênio encontrado nas amostras está provavelmente associado à presença dos óxidos de titânio, alumínio e vanádio nas mesmas, o que é coerente com o fato de que tais óxidos são formados sobre a superfície desta liga (CVIJOVIĆ-ALAGIĆ et al., 2016). A presença dos elementos sódio e fósforo, por sua vez, está relacionada à provável adesão destes elementos, que constituem os sais dissolvidos no eletrólito utilizado durante os testes de tribocorrosão, nas partículas originadas.

A partir da Figura 32 é possível observar que não há segregação dos elementos identificados nas análises de EDS, estando os mesmos distribuídos homogeneamente na amostra em questão. Ademais, a partir da Tabela 13, é possível apontar que os elementos de alumínio e vanádio preservam sua proporção em relação à composição original da liga Ti-6Al-4V nas partículas de desgaste, enquanto o conteúdo de titânio é diminuído. Além disso, a percentagem de elementos constituintes do eletrólito é inferior a 2% para cada elemento.

Por fim, as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V foram caracterizadas com relação à sua estrutura cristalina, a partir da técnica de difração de elétrons. A Figura 33 apresenta o padrão de difração obtido, bem como a partícula selecionada para obtenção do mesmo.

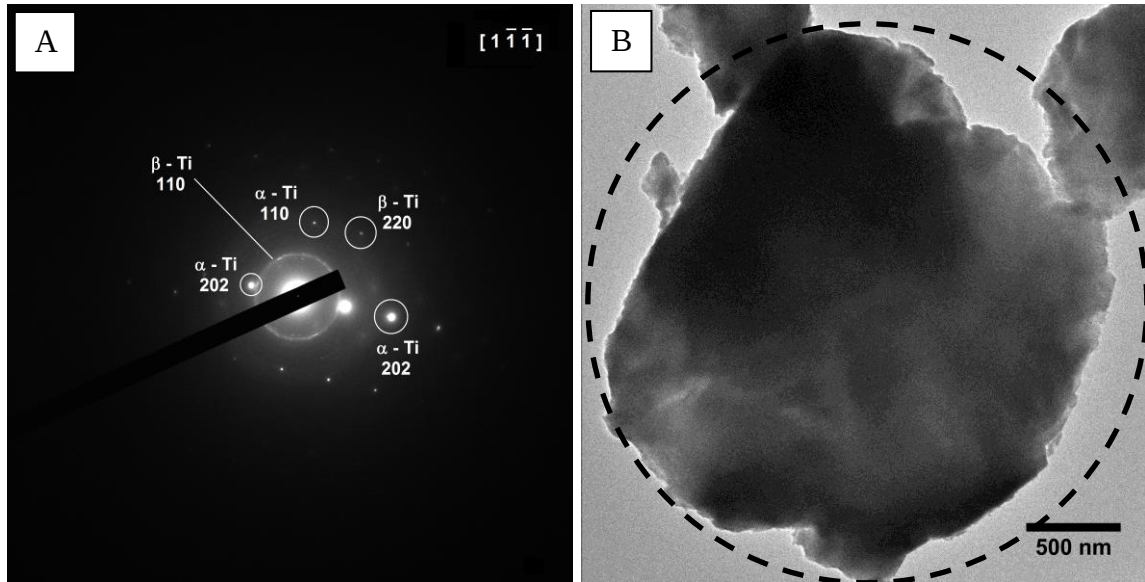


Figura 33: Padrão de Difração (A) obtido no eixo de zona $[1\bar{1}\bar{1}]$ para uma única partícula Ti-6Al-4V (B).

Na Figura 33 A, um padrão de difração característico para materiais cristalinos pode ser visualizado, em que os *spots* e/ou anéis observados estão relacionados à presença de planos (ou famílias de planos) cristalinos. Assim, de acordo com a indexação dos *spots* presentes no padrão de difração de elétrons apresentado nesta figura, é possível verificar que as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V preservam a mesma estrutura cristalina do material a partir do qual são geradas, ou seja, uma fase hexagonal (α -Ti) e uma fase cúbica de corpo centrado (β -Ti).

As partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e algumas das imagens obtidas para as mesmas são apresentadas na Figura 34.

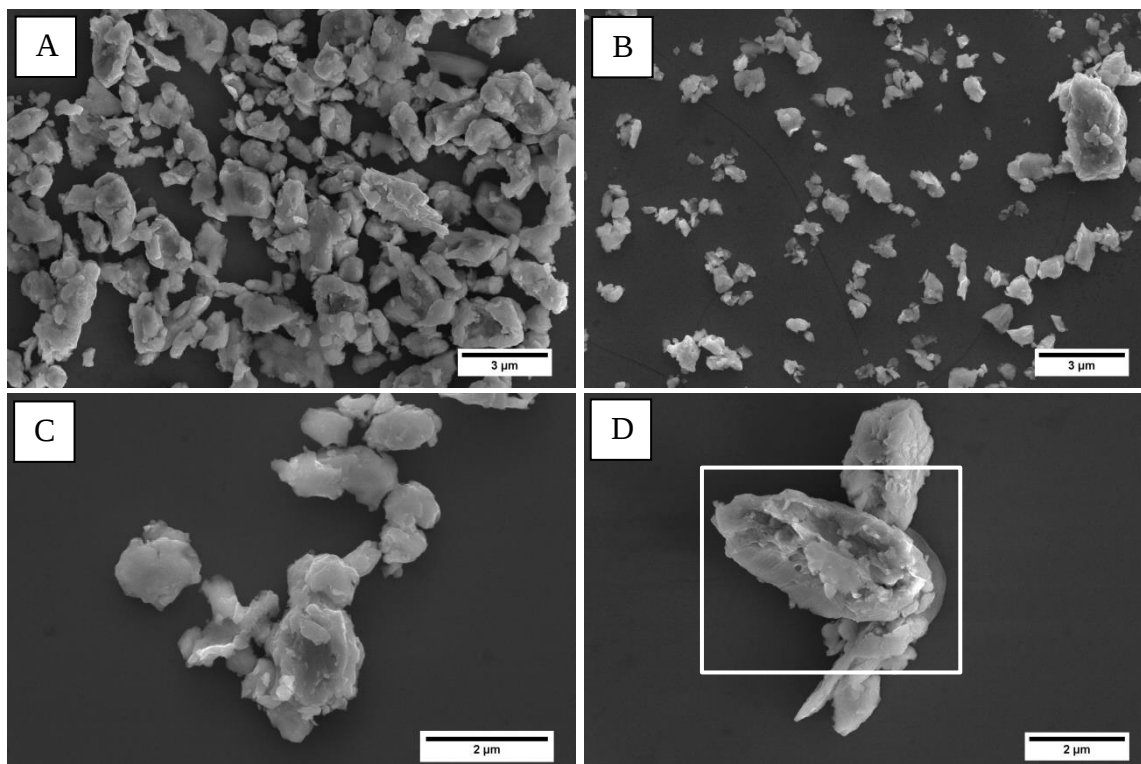


Figura 34: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo: (A): análise geral, (B) partículas mais bem dispersas, (C) e (D) conjuntos de partículas em detalhes.

De acordo com a Figura 34 (A-C), é possível observar que as partículas de desgaste obtidas para a liga Ti-15Zr-15Mo apresentam, em geral, tamanhos menores que aquelas obtidas para a liga Ti-6Al-4V (Figura 29 A) nas mesmas condições de teste. Adicionalmente, partículas sub-micrométricas não agregadas à superfície de partículas maiores foram observadas para esta amostra.

A análise das diversas imagens obtidas para estas partículas revelou que a faixa de distribuição de tamanhos para esta amostra está entre 0,3 e 3,6 µm, o que é significativamente diferente do que foi observado para as partículas de Ti-6Al-4V, que apresentaram tamanhos entre 1 e 15 µm. Ao contrário, de forma similar às partículas de Ti-6Al-4V, partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo que aparentam ser o resultado da clivagem da amostra em planos determinados também foram visualizadas (Figura 34 D). No entanto, para esta amostra, estas partículas são menores e mais espessas.

Acredita-se que o mecanismo envolvido na geração das partículas de desgaste seja semelhante para ambas as amostras, no entanto, devido às diferentes propriedades mecânicas e menor resistência ao desgaste mecânico constatado para a amostra Ti-15Zr-15Mo, a clivagem da amostra durante o deslizamento nos testes de tribocorrosão, resulta na liberação

de partículas menores, e que conseqüentemente tornam-se menores ainda quando sofrem os efeitos do deslizamento contínuo ao longo dos testes.

Ademais, de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas, foi possível verificar que a superfície das partículas de desgaste para a liga Ti-15Zr-15Mo aparenta ser mais suave, ao contrário do que foi verificado para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V, que apresentam uma superfície mais rugosa.

O tamanho médio para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo também foi determinado a partir do levantamento de um histograma, mostrado na Figura 35.

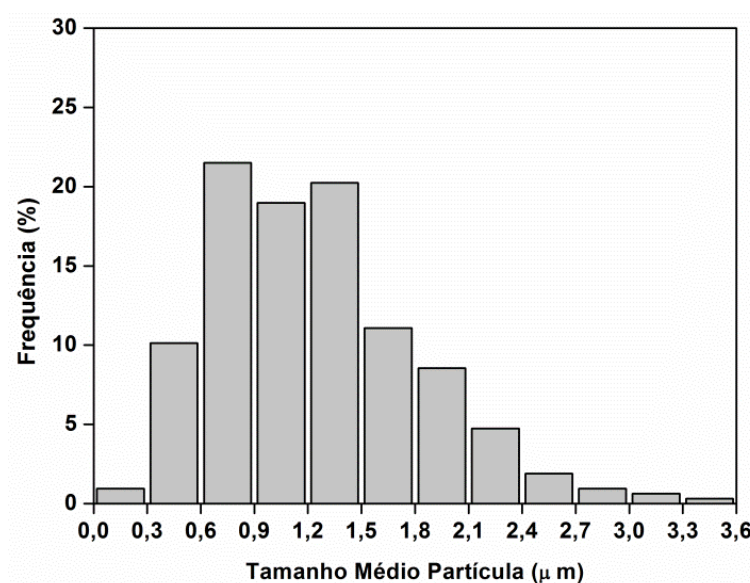


Figura 35: Histograma para o tamanho médio das partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo.

Para o levantamento do histograma da Figura 35 foram consideradas as dimensões transversais de 320 partículas e de acordo com este histograma, a maior parte das partículas obtidas para a liga Ti-15Zr-15Mo apresenta tamanhos entre 0,6 e 1,5 μm (~65%).

Análises para a composição química das partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo são apresentadas nas Figuras 36 e 37 a seguir, nas quais é possível observar, respectivamente, o espectro de espectroscopia de dispersão de raios-X (EDS) e o mapeamento químico dos elementos para esta amostra. Adicionalmente, na Tabela 14 são apresentadas as análises semi-quantitativas (porcentagens em peso) para cada um dos elementos identificados na composição química destas partículas de desgaste (vinte regiões analisadas).

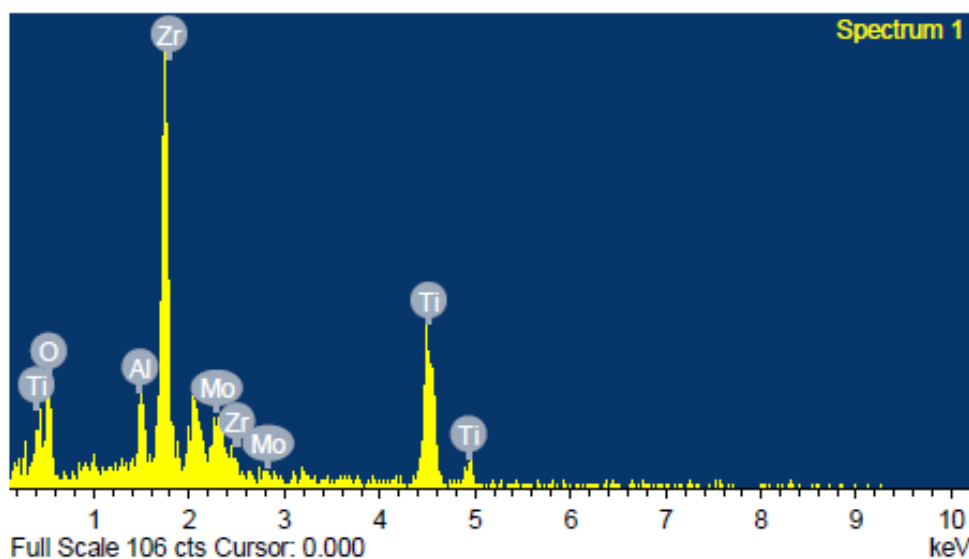


Figura 36: Espectro de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) para as partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.

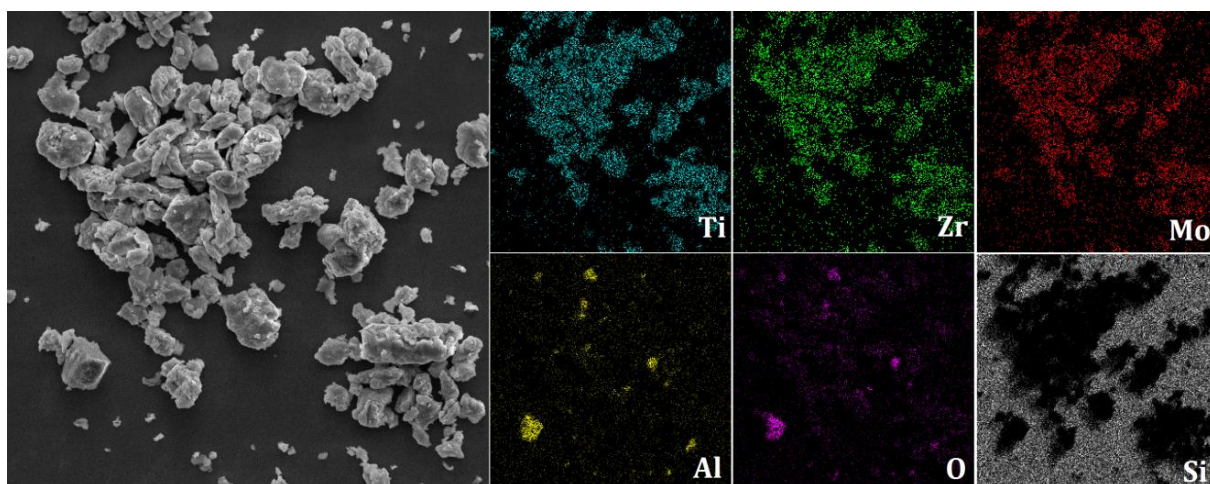


Figura 37: Mapeamento químico para os elementos identificados nas partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo

Tabela 14: Composição química média semi-quantitativa para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo.

Partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo					
Elemento	Ti (%p)	Zr (%p)	Mo (%p)	O (%p)	Al (%p)
Média	51,7	13,3	13,2	17,9	3,2
Desvio Padrão	± 2,5	± 1,4	± 1,1	± 2,3	± 0,9

A partir do espectro de EDS apresentado na Figura 36, foi possível identificar a presença dos elementos titânio (Ti), zircônio e molibdênio (Mo), correspondentes à composição nominal da liga a partir da qual as partículas de desgaste analisadas foram

geradas. Ademais, também foi identificada a presença de alumínio (Al) e oxigênio (O) para estas amostras. O alumínio presente nas amostras está relacionado com a contaminação das partículas de Ti-15Zr-15Mo por partículas de desgaste geradas a partir do contra-corpo (Al_2O_3) utilizado nos testes de tribocorrosão. O oxigênio, por sua vez, além de estar associado ao óxido de alumínio do contra corpo, também pode estar relacionado à presença dos óxidos de titânio, zircônio e molibdênio formados sobre a superfície da liga Ti-15Zr-15Mo.

A presença do óxido de alumínio derivado do desgaste mecânico da esfera de alumina utilizada como contra-corpo nos testes de tribocorrosão fica mais evidente no mapeamento químico dos elementos apresentado na Figura 37. Nesta imagem é possível distinguir claramente as partículas de Al_2O_3 das partículas de Ti-15Zr-15Mo. Ademais, também de acordo com esta figura, é possível visualizar que todos os demais elementos identificados para esta amostras estão distribuídos homogeneamente sobre as partículas de desgaste da liga.

A Tabela 12, por sua vez, mostra que, assim como aconteceu para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V, as partículas de desgaste para a liga Ti-15Zr-15Mo também apresentaram as proporções (em porcentagem em peso) correspondentes à composição nominal da liga para os elementos zircônio e molibdênio.

A seguir, na Figura 38 é apresentado o padrão de difração de elétrons para as partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo. Ademais, a partícula selecionada para obtenção do padrão de difração também é mostrada.

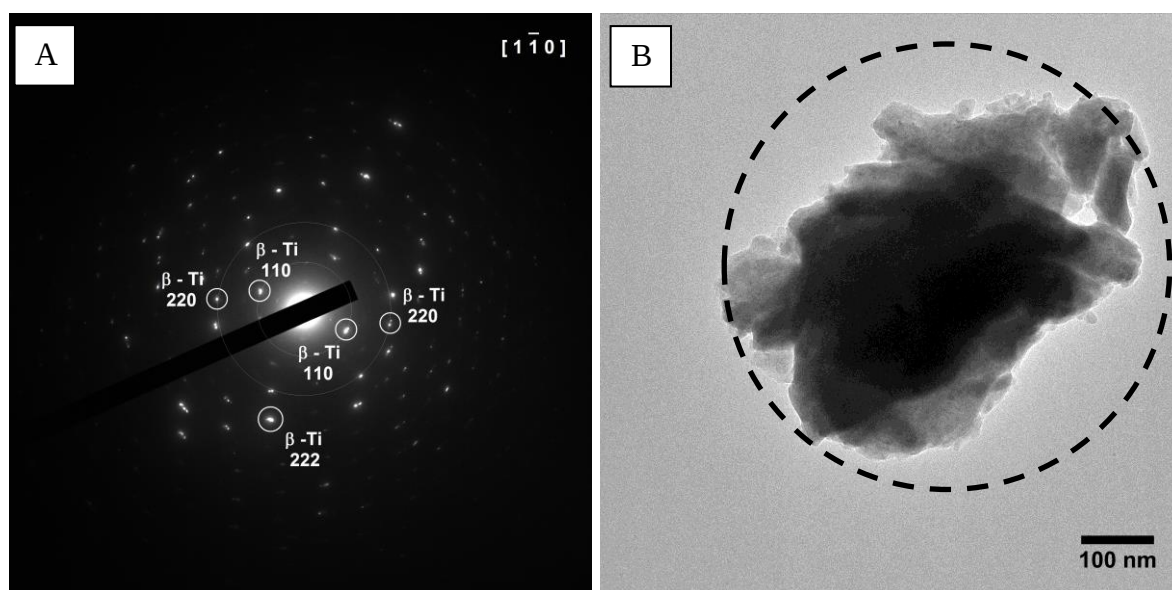


Figura 38: Padrão de Difração (A) obtido no eixo de zona $[1\bar{1}0]$ para uma única partícula de Ti-15Zr-15Mo (B).

Assim como foi verificado para as partículas de desgaste da liga Ti-6Al-4V, de acordo com os *spots* observados no padrão de difração de elétrons mostrado na Figura 38 B, foi possível verificar que as partículas de desgaste de da liga Ti-15Zr-15Mo também preservaram a mesma estrutura cristalina do material a partir do qual são geradas, ou seja, uma estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (β -Ti).

Complementarmente às análises com relação ao tamanho, morfologia e estrutura cristalina para as partículas de desgaste das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, partículas comerciais de Ti-6Al-4V (Electro Optical Systems) também foram caracterizadas de acordo com as mesmas características. Os resultados obtidos são descritos brevemente nos parágrafos a seguir.

Na Figura 39 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para esta amostra.

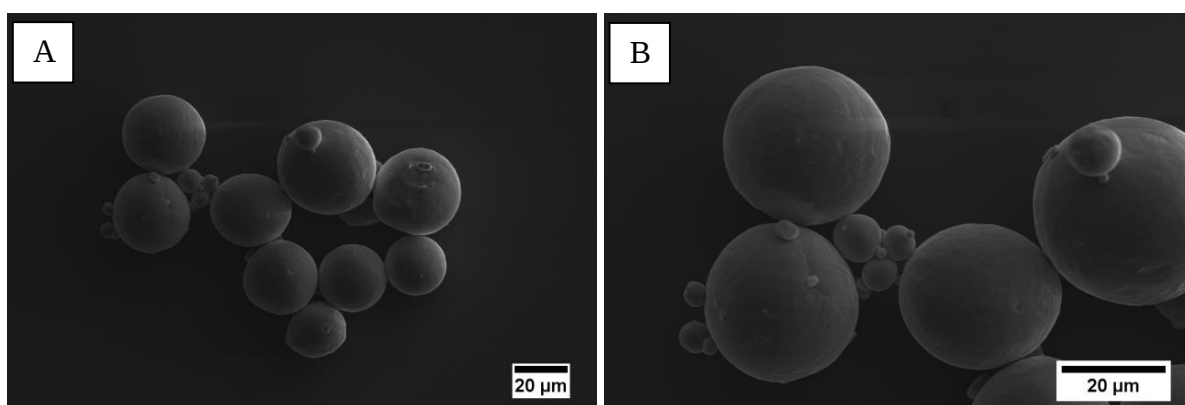


Figura 39: (A) e (B): Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

De acordo com as imagens apresentadas na Figura 39 (A-B) é possível verificar que as partículas comerciais de Ti-6Al-4V apresentam morfologia esférica e superfície lisa e regular. Ademais, foi verificado que os diâmetros para as partículas desta amostra estão distribuídos entre 10 e 60 μm .

Ainda com relação ao tamanho, a Figura 40 apresenta o histograma obtido a partir das medidas de diâmetro para 220 partículas desta amostra.

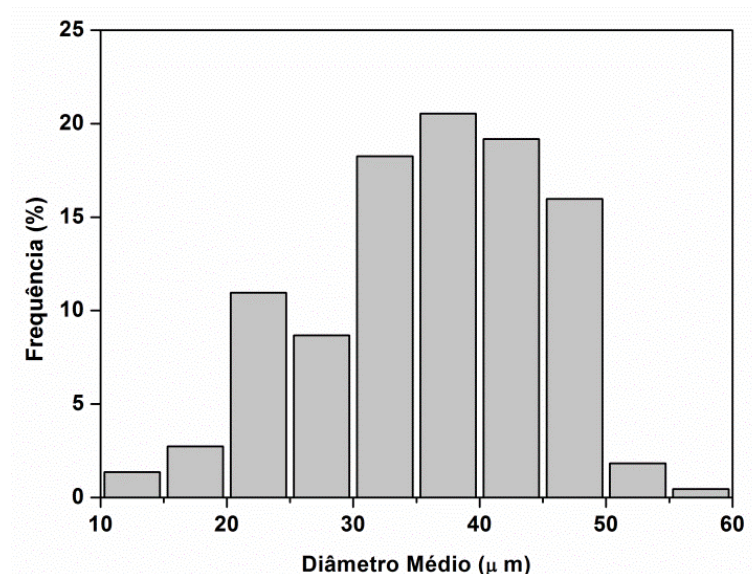


Figura 40: Histograma para o diâmetro médio das partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

A análise do histograma apresentado na Figura 40 revela que a maior parte das partículas comerciais de Ti-6Al-4V apresentam diâmetro médio entre 30 e 50 μm (~74%).

A composição química destas partículas também foi avaliada a partir da técnica de espectroscopia de dispersão de raios-X (EDS) e os resultados obtidos são apresentados na Figura 41 e Tabela 15, referentes ao espectro de EDS obtido e a análise semi-quantitativa para a composição, respectivamente.

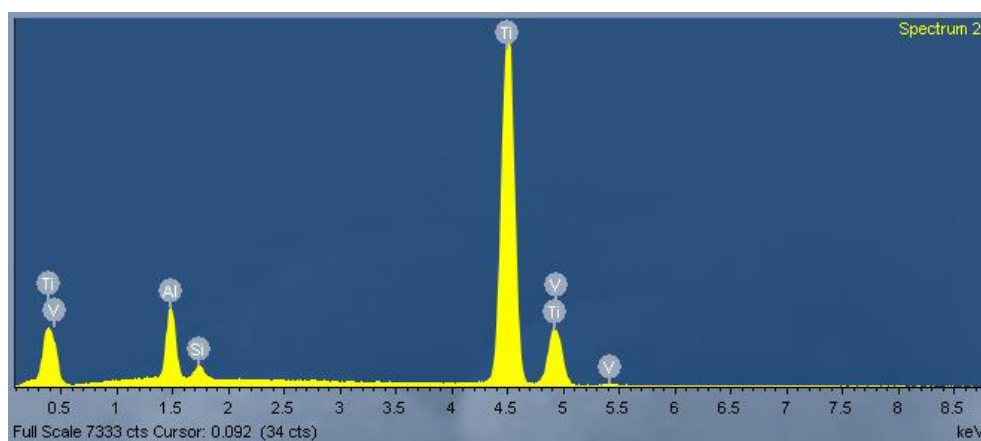


Figura 41: Espectro de espectroscopia de dispersão de raios-X para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

Tabela 15: Composição química média semi-quantitativa para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

Partículas comerciais de Ti-6Al-4V			
Elemento	Ti (%p)	Al (%p)	V (%p)
Média	90.1	5.5	4.3
Desvio Padrão	± 1,4	± 1,9	± 1,5

No espectro de EDS apresentado na Figura 41 estão identificados todos os elementos presentes na composição nominal das partículas comerciais de Ti-6Al-4V, ou seja, titânio (Ti), alumínio (Al) e vanádio (V). O pequeno pico de silício (Si) observado nesta figura está relacionado ao substrato utilizado para deposição das partículas para as análises no microscópio eletrônico de varredura. Ademais, de acordo com os resultados observados na Tabela 15, as partículas comerciais de Ti-6Al-4V também preservam a proporção em peso dos elementos com relação à sua composição nominal.

Por fim, por representar um método de aquisição mais simples e barato que àquele utilizado para as partículas de desgaste e por dispor de uma maior quantidade para esta amostra, a estrutura cristalina para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V foi avaliada a partir da técnica de difração de raios-X (XRD) e o resultado obtido é apresentado na Figura 42.

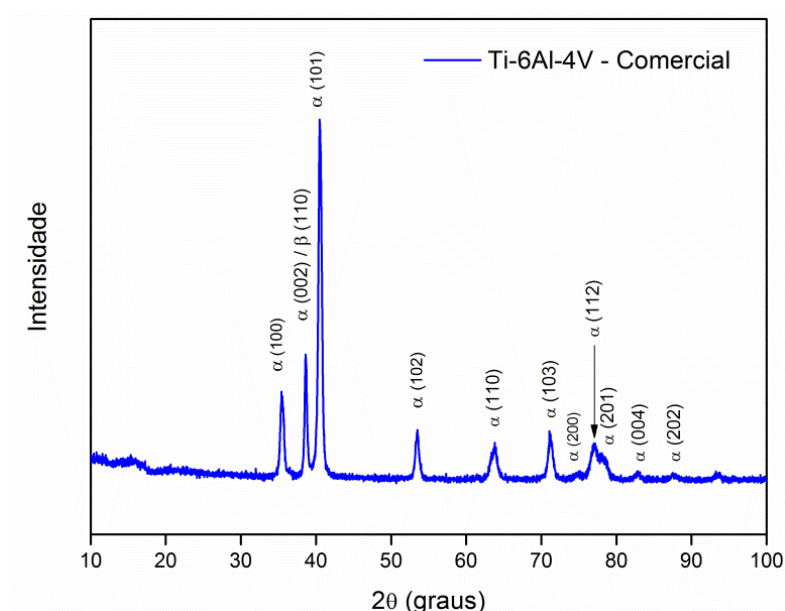


Figura 42: Difratograma de raios-X para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

A partir dos picos de difração observados na Figura 42, foi possível verificar que, como esperado, as partículas comerciais de Ti-6Al-4V possuem estrutura mista entre as fases cristalinas α (hexagonal, PDF 65-6231) e β (cúbica de corpo centrado, PDF 44-1288).

Considerando o conjunto de dados obtidos com relação à caracterização dos produtos de desgaste produzidos pelos ensaios de tribocorrosão para as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, as seguintes conclusões parciais podem ser apresentadas: (i) o mesmo mecanismo pode ser apontado como responsável pela produção de desgaste por ambas as ligas, no entanto (ii) as propriedades mecânicas para cada uma delas, individualmente, podem influenciar as características dos produtos obtidos, nomeadamente em termos de quantidade e tamanho. Neste sentido, (iii) a quantidade de partículas produzidas pela liga Ti-15Zr-15Mo é substancialmente maior do que aquela produzida pela liga Ti-6Al-4V. Além disso, (iv) partículas significativamente menores também são obtidas para a primeira em comparação com a segunda. Por fim, (v) as partículas de desgaste produzidas por ambas as ligas estudadas neste trabalho mantêm a estrutura cristalina dos materiais a partir do qual foram geradas.

5.4 Remoção de endotoxinas

Conforme descrito na seção 4.4.1, as partículas de desgaste obtidas a partir dos testes de tribocorrosão sobre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo foram submetidas a um tratamento térmico (180 °C, 45 min, atmosfera de argônio) com o objetivo de remover endotoxinas possivelmente adsorvidas em sua superfície.

Um conjunto completo de amostras, todas submetidas ao mesmo tratamento térmico, incluindo a partículas de desgaste provenientes dos ensaios de tribocorrosão, partículas comerciais de Ti-6Al-4V e pentóxido de vanádio (V_2O_5) foram suspensas em solução tampão fosfato-salino (PBS) livre de endotoxinas nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ para utilização em ensaios baseados na reação com LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) do tipo gel-clot.

A presença de endotoxinas nas amostras acima do nível de detecção do ensaio utilizado (0,125 EU/mL ou 0,06 EU/mL) é verificada a partir de sua reação positiva ou negativa com o lisado da enzima que reveste o fundo dos tubos de ensaio. Neste sentido, uma reação positiva é caracterizada pela formação de um gel firme que permanece aderido no fundo do tubo quando o mesmo é invertido (rotacionado 180°). Ao contrário, uma reação negativa é caracterizada pela não formação deste gel.

A Tabela 16 apresenta os resultados para os ensaios LAL para cada um dos grupos de amostras testados.

Tabela 16: Resultados para os ensaios baseados na reação com LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) para as amostras submetidas ao tratamento térmico para remoção de endotoxinas.

Amostra (Concentração)	Sensibilidade 0,125 EU/mL	Sensibilidade 0,06 EU/mL
Controle (0,250 EU/mL)	Reação positiva (Formação de gel)	Não testado
Controle (0,125 EU/mL)	Não testado	Reação positiva (Formação de gel)
Partículas comerciais de Ti-6Al-4V (500 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas comerciais de Ti-6Al-4V (100 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas de desgaste de Ti-6Al-4V (500 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas de desgaste de Ti-6Al-4V (100 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo (500 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo (500 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas comerciais de V ₂ O ₅ (500 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa
Partículas comerciais de V ₂ O ₅ (100 µg/mL)	Reação negativa	Reação negativa

A partir dos dados apresentados na Tabela 16 é possível observar que os tratamentos térmicos empregados sobre as partículas foram eficazes na remoção de endotoxinas. Ilustrativamente, a Figura 43 apresenta as características dos tubos utilizados no ensaio para detecção de endotoxinas, tanto para uma reação positiva (controle), quanto para uma reação negativa (amostras).

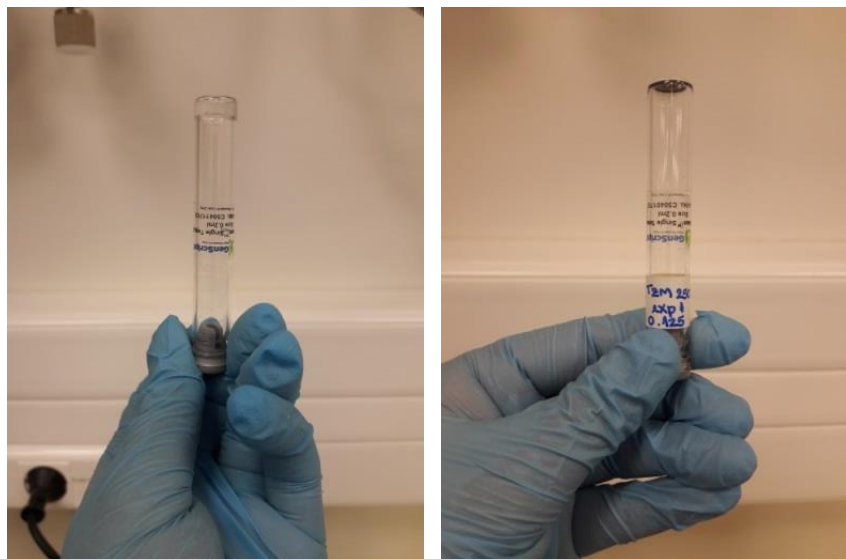


Figura 43: Tubos para os ensaios baseados na reação com LAL para verificação de endotoxinas (A) Controle para sensibilidade 0,125 EU/mL e sua reação positiva e (B) Amostra de Ti-15Zr-15Mo tratada termicamente num tubo de teste com sensibilidade 0,125 EU/mL e sua reação negativa.

5.5 Avaliação dos efeitos biológicos resultantes da interação entre osteoblastos humanos e as partículas de desgaste

Como mencionado na seção 4.5.2, a primeira etapa para a avaliação dos efeitos biológicos resultantes da interação entre as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15-Zr-15Mo com osteoblastos foi o levantamento de uma curva dose-resposta para a viabilidade celular da linhagem MG63.

Desta forma, a citotoxicidade relacionada à exposição das células desta linhagem às partículas de desgaste foi avaliada a partir de ensaios de viabilidade celular por redução de MTT. Nestes ensaios também foram considerados grupos experimentais para partículas comerciais de Ti-6Al-4V e pentóxido de vanádio (V_2O_5).

A Figura 44 apresenta os resultados obtidos para este ensaio com relação às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

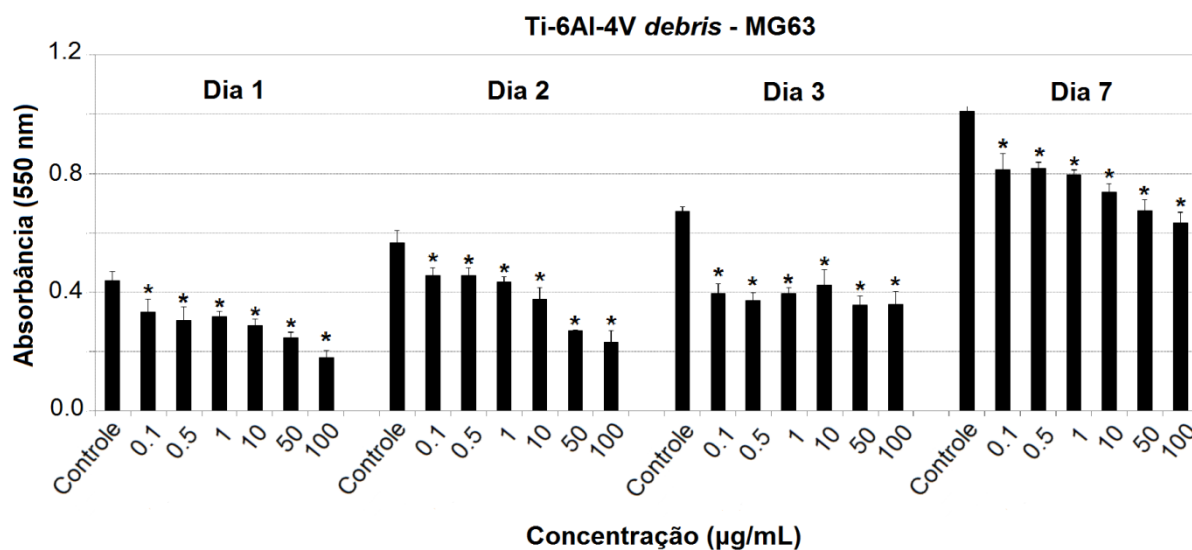


Figura 44: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

Observação: * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 44 é possível observar, no geral, uma redução para a viabilidade das células da linhagem MG63 após sua exposição às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V para todos os períodos experimentais com relação ao grupo controle. A redução em viabilidade pode atingir valores de até 60% com relação aos grupos controle, como para o caso da concentração de 100 µg/mL para os períodos experimentais de um e dois dias.

É possível observar também que a redução na viabilidade das células da linhagem MG63 é dependente da dose até a concentração de 1 µg/mL para todos os períodos experimentais, exceto para o dia 3, que apresenta uma redução média de 43% para a viabilidade em todas as concentrações com relação ao seu controle. Para concentrações abaixo de 1 µg/mL, a viabilidade das células não apresenta mais influência da dose de exposição das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

No entanto, apesar de negativamente influenciadas pela interação com as partículas de desgaste, as células da linhagem MG63 expostas às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V apresentaram taxas de proliferação (dia 1 ao dia 7) maiores que aquela observada para o controle, independentemente da concentração de exposição.

A Figura 45 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de viabilidade da linhagem MG63 com relação às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.

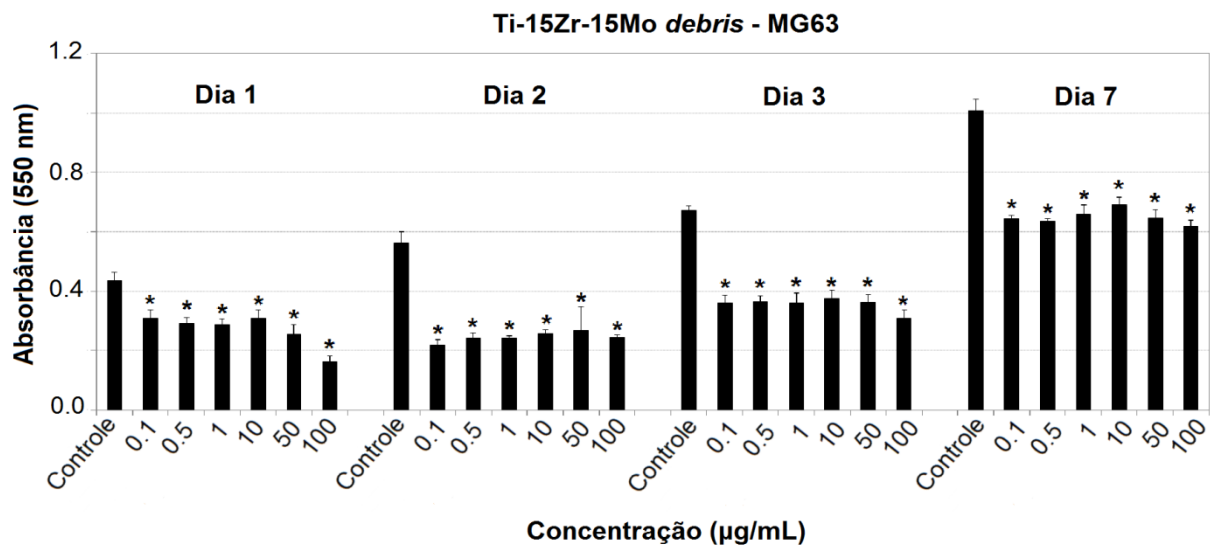


Figura 45: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo.

Observação: * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

Assim como observado para as células da linhagem MG63 expostas às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V, um efeito negativo global sobre a viabilidade celular também foi observado para esta linhagem após exposição às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo. A partir da Figura 45 pode-se notar que, no geral, a viabilidade celular para esta linhagem foi reduzida para todas as concentrações e períodos experimentais com relação ao grupo controle.

Para estas partículas, no entanto, a relação com a dose de exposição sobre a viabilidade celular é menos evidente que no caso anterior, uma vez que uma dependência até a concentração de 50 µg/mL foi verificada apenas para os períodos experimentais de um e três dias e nenhum tipo de relação com a dose pôde ser estabelecida para as demais concentrações e períodos experimentais.

Valores até 60% menores foram observados para a viabilidade das células da linhagem MG63 após sua interação com as partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo na concentração de 100 µg/mL nos períodos de um, dois e três dias. Ademais, para os períodos experimentais de três e sete dias, que não apresentam relação evidente com relação à dose de exposição das partículas, a redução média na viabilidade celular foi de 47% e 36%, respectivamente.

Também, como observado para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V, as células expostas às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo em todas as concentrações apresentaram taxas de proliferação celular (dia 1 para o dia 7) superiores àquela observada para o controle.

Os resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular para a linhagem MG63 com relação às partículas comerciais de Ti-6Al-4V são apresentados na Figura 46.

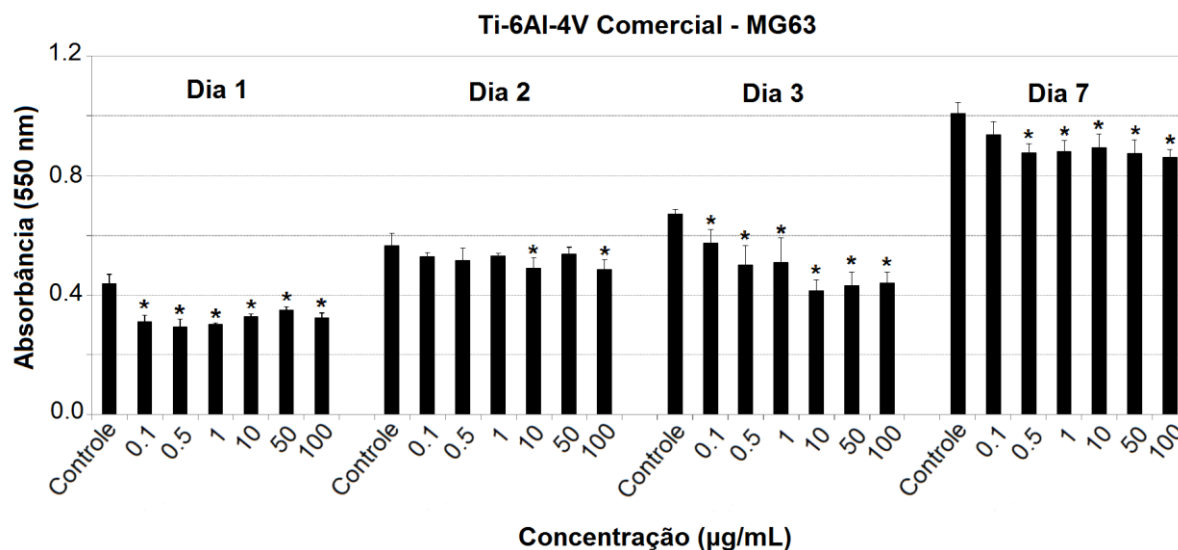


Figura 46: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas comerciais de Ti-6Al-4V.

Observação: * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

Para as células MG63 expostas às partículas comerciais de Ti-6Al-4V, os efeitos globais sobre a viabilidade foram, de uma forma geral, mais sutis que aqueles observados para esta mesma linhagem com relação às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo.

Como é possível observar na Figura 46, apesar de apresentar valores reduzidos para viabilidade celular com relação aos grupos controle, o impacto causado pela interação com as partículas desde grupo experimental é muito menos acentuado, uma vez que mesmo para a maior concentração de exposição às partículas comerciais de Ti-6Al-4V (100 µg/mL), a diminuição máxima em viabilidade para as células da linhagem MG63 foi de aproximadamente 30% (dia 3), o que é significativamente menor que aquela observada para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo (aproximadamente 60%).

Além disso, é possível apontar também que não existe relação entre a viabilidade celular observada com a dose de exposição às partículas comerciais de Ti-6Al-4V e a diminuição média para esta viabilidade foi de 26%, 8%, 28% e 12% com relação aos grupos controle para os períodos experimentais de um, dois, três e sete dias, respectivamente. Ademais, novamente foram observadas taxas de proliferação maiores (dia 1 para o dia 7) para as células que sofreram interação com estas partículas em relação ao controle.

Por fim, a Figura 47 apresenta os resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem em questão com relação às partículas comerciais de pentóxido de vanádio (V_2O_5).

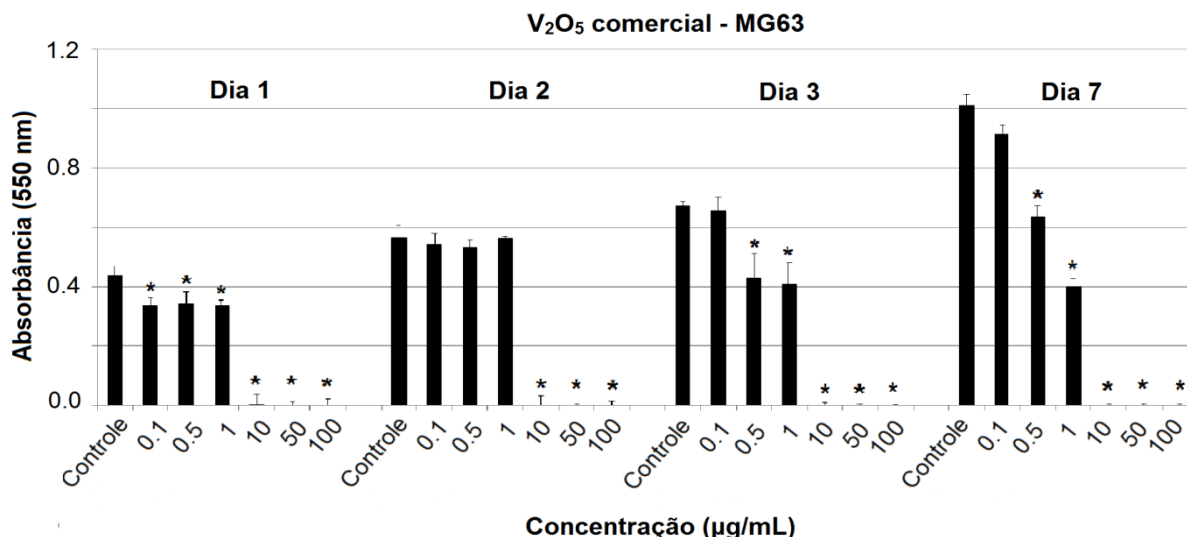


Figura 47: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem MG63 com relação às partículas comerciais de pentóxido de vanádio.

Observação: * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

Os resultados apresentados na Figura 47 mostram um comportamento com relação à viabilidade celular completamente diferente aos que foram apresentados anteriormente (partículas comerciais de Ti-6Al-4V e partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo) para às células da linhagem MG63 após sua exposição às partículas comerciais de pentóxido de vanádio. Como é possível observar a partir desta figura, concentrações de exposição de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL são capazes de induzir a completa morte celular para esta linhagem em todos os períodos experimentais, enquanto células viáveis, mesmo que em menor número com relação aos grupos controle ainda são encontradas para as concentrações de 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,1 µg/mL. Ademais, as células ainda viáveis para estas concentrações apresentam efeito de recuperação do dia um para o dia dois e do dia três para o dia sete.

De uma forma geral, acredita-se que a completa morte celular observada para esta linhagem após a exposição ao pentóxido de vanádio em concentrações de até 10 µg/mL está relacionada com a absorção de espécies iônicas de vanádio em quantidades acima daquelas possíveis de serem assimiladas pelas células e interferência destas espécies sobre processos fundamentais ao metabolismo das células regulados por íons fosfato, como discutido

anteriormente na seção 5.1 em que a viabilidade celular de fibroblastos e osteoblastos de camundongo foi avaliada após sua exposição a íons de vanádio gerados a partir deste óxido.

A Figura 48 apresenta as imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência durante o ensaio *Live and Dead* para as células da linhagem MG63 exposta às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo e partículas comerciais de Ti-6Al-4V e pentóxido de vanádio (V_2O_5), que no geral, corroboram os resultados para o ensaio de MTT.

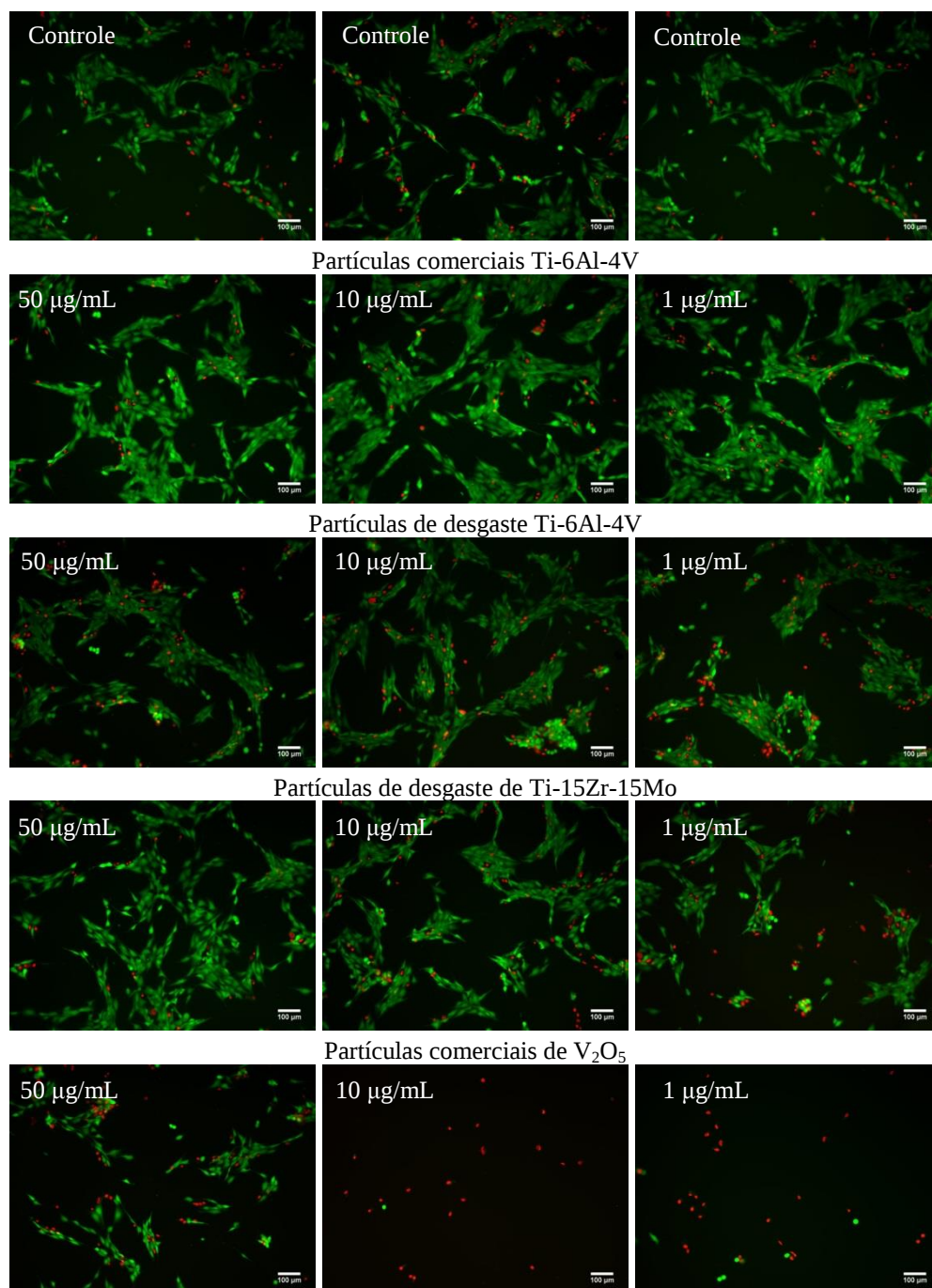


Figura 48: Imagens representativas de microscopia de fluorescência para o ensaio *Live and Dead* com a linhagem celular MG63 e grupos experimentais selecionados. Células viáveis são representadas pela cor verde.

Os resultados apresentados nas Figuras 44, 45 e 46, apontam para um impacto mais acentuado sobre a redução da viabilidade para as células expostas às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo com relação àquele observado para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V e de uma forma geral, isto pode ser associado às características das partículas em questão.

Na seção 5.3 verificou-se que as partículas comerciais da liga Ti-6Al-4V apresentam tamanhos médios entre 30 - 50 μm , enquanto este mesmo parâmetro está entre 1 - 5 μm para as partículas de desgaste desta mesma liga e 0,6 - 1,5 μm para as partículas de desgaste da liga Ti-15Zr-15Mo. Também, as partículas comerciais de Ti-6Al-4V apresentam uma morfologia esférica com superfície regular e lisa enquanto as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo apresentam morfologia regular e superfícies mais rugosas.

Características como menor tamanho médio (maior área de superfície) e superfície irregular e rugosa fazem com que a taxa de liberação de íons a partir das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo seja maior que aquela para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V, que apresentam maior tamanho médio (menor área de superfície) e superfície regular (SHARIFI et al., 2012).

Assim, embora o mecanismo geral relacionado à redução na viabilidade celular da linhagem MG63 ainda não esteja claro, acredita-se que o efeito negativo global mais acentuado com relação a esta redução observado para as partículas de desgaste esteja relacionado à liberação e consequente interação de uma maior quantidade de íons metálicos com as células. Também, o tamanho reduzido para as partículas de desgaste aumenta a probabilidade de internalização das mesmas pelas células, o que também pode afetar seu metabolismo, causando sua morte (RIBEIRO et al., 2016).

Com base nos resultados observados para a linhagem MG63 com relação à exposição das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo e partículas comerciais de Ti-6Al-4V e levando em consideração as possíveis concentrações *in vivo* para o titânio (elemento de matriz, presente em maior quantidade na composição das partículas de desgaste em estudo neste trabalho), que é relatada como aproximadamente 30 $\mu\text{g/mL}$ na cápsula articular de pacientes que apresentam falhas e necessidade de revisão de seu implante (HALLAB et al., 2001), decidiu-se prosseguir à avaliação da citotoxicidade dos materiais em estudo neste trabalho com relação à linhagem celular HOOb nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ para os períodos experimentais de três e sete dias.

A Figura 49 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular desta linhagem após a exposição às partículas de todos os grupos experimentais na condição livre de endotoxinas.

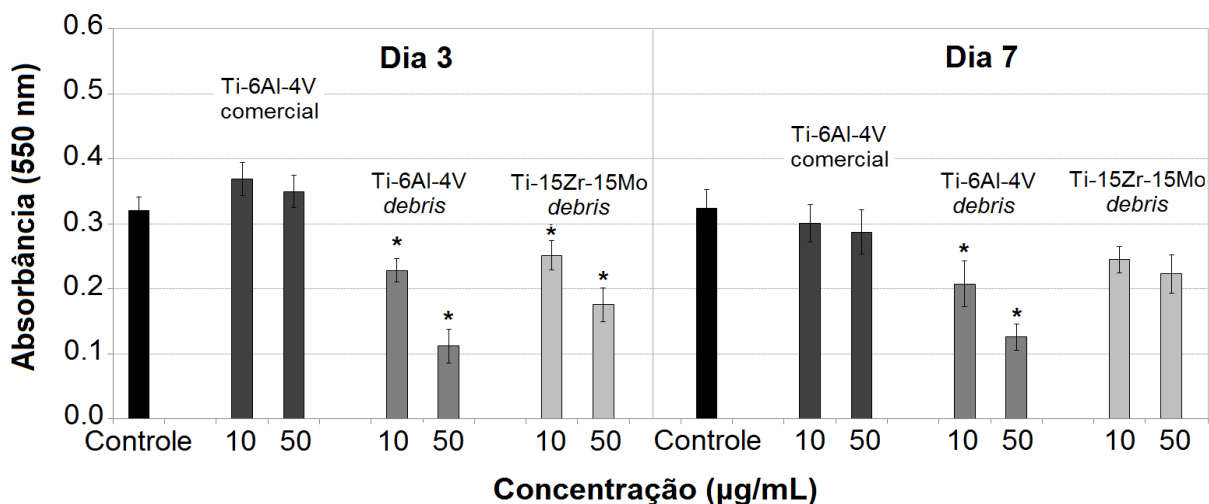


Figura 49: Resultados para o ensaio de viabilidade celular da linhagem HOb com relação às partículas de todos os grupos experimentais livres de endotoxinas.

Observação: * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

A partir da Figura 49 é possível observar que os efeitos da exposição das células da linhagem celular HOb às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo são ligeiramente similares entre si e de forma geral conduzem à diminuição da viabilidade da linhagem celular testada. Ademais, a diminuição na viabilidade celular para estes dois grupos experimentais aparenta ser dependente da dose de exposição para ambos os períodos experimentais avaliados.

Para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V uma diminuição na viabilidade celular de cerca 35% e 40% foi registrada para as concentrações de 50 µg/mL e 10 µg/mL no período experimental de três dias e esta tendência é mantida para o período experimental de sete dias.

Os efeitos de exposição das células da linhagem HOb às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo, por outro lado, aparentam ser mais sutis. Para estas partículas, a diminuição na viabilidade celular foi de aproximadamente 45% para a concentração de 50 µg/mL e 15% para a concentração de 10 µg/mL para o período experimental de três dias. Este comportamento foi mantido ao longo do tempo, de modo que para o período experimental de sete dias, a diminuição na viabilidade celular registrada para as concentrações de 50 µg/mL e 10 µg/mL destas partículas foi de 31% e 12%, respectivamente.

Assim, além de relacionados à morfologia e tamanho das partículas de desgaste, para a linhagem de osteoblastos humanos normais, a viabilidade celular também aparenta ser influenciada pela composição destas partículas.

De uma forma geral, os resultados observados para a linhagem celular HOb estão de acordo com aqueles observados para a linhagem MG63 após a interação com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo. O mesmo foi observado para as partículas comerciais de Ti-6Al-4V: de acordo com os resultados apresentados na Figura 49, a interação das células da linhagem HOb com estas partículas, como observado para a linhagem MG63, não afetou significativamente a viabilidade celular.

A Figura 50 apresenta as imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência durante o ensaio *Live and Dead* para as células da linhagem HOb exposta às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo e partículas comerciais de Ti-6Al-4V, que no geral, corroboram os resultados para o ensaio de MTT.

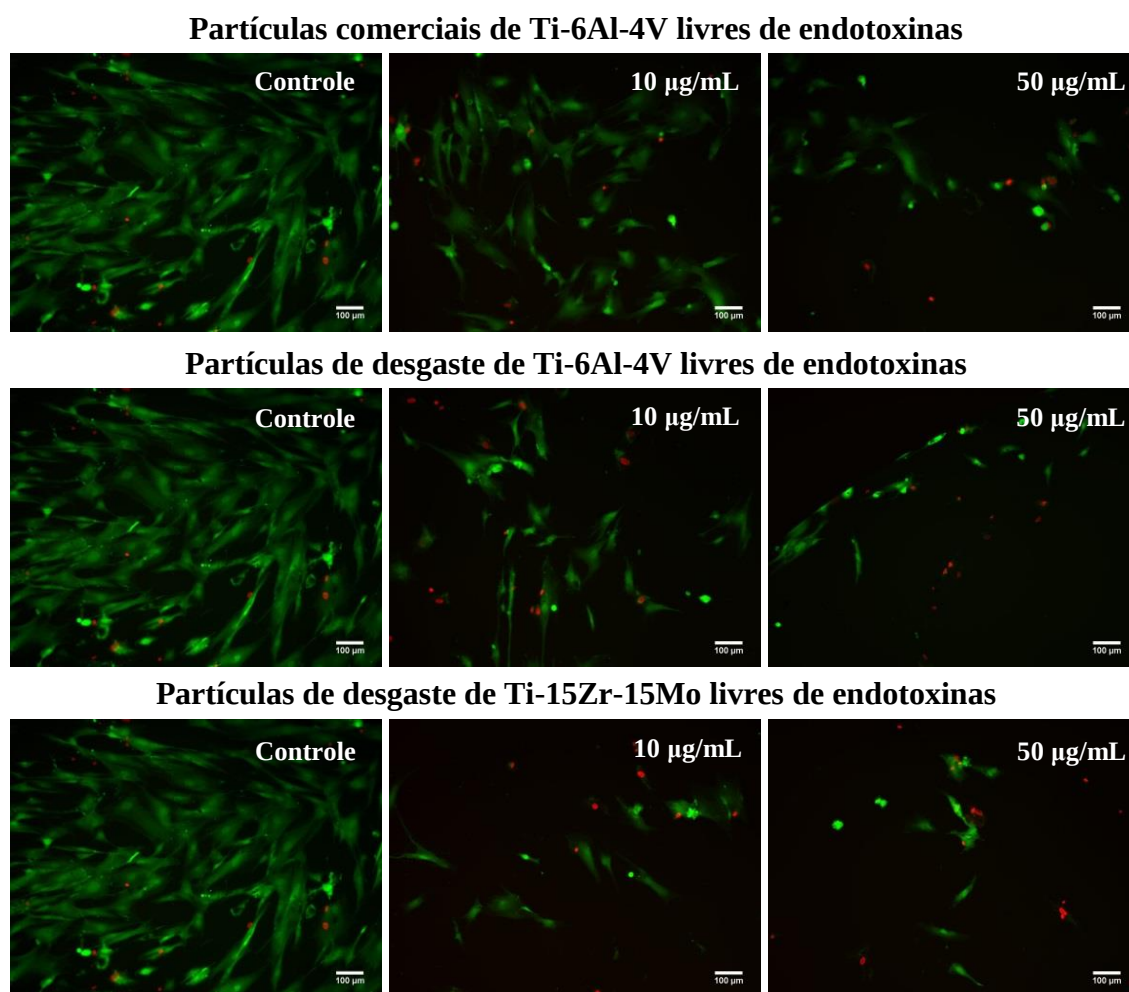


Figura 50: Imagens representativas de microscopia de fluorescência para o ensaio *Live and Dead* com a linhagem celular HOb e grupos experimentais selecionados. Células viáveis são representadas pela cor verde.

As análises da possível internalização das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, pelas células da linhagem HOb por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) são mostradas na Figura 51.

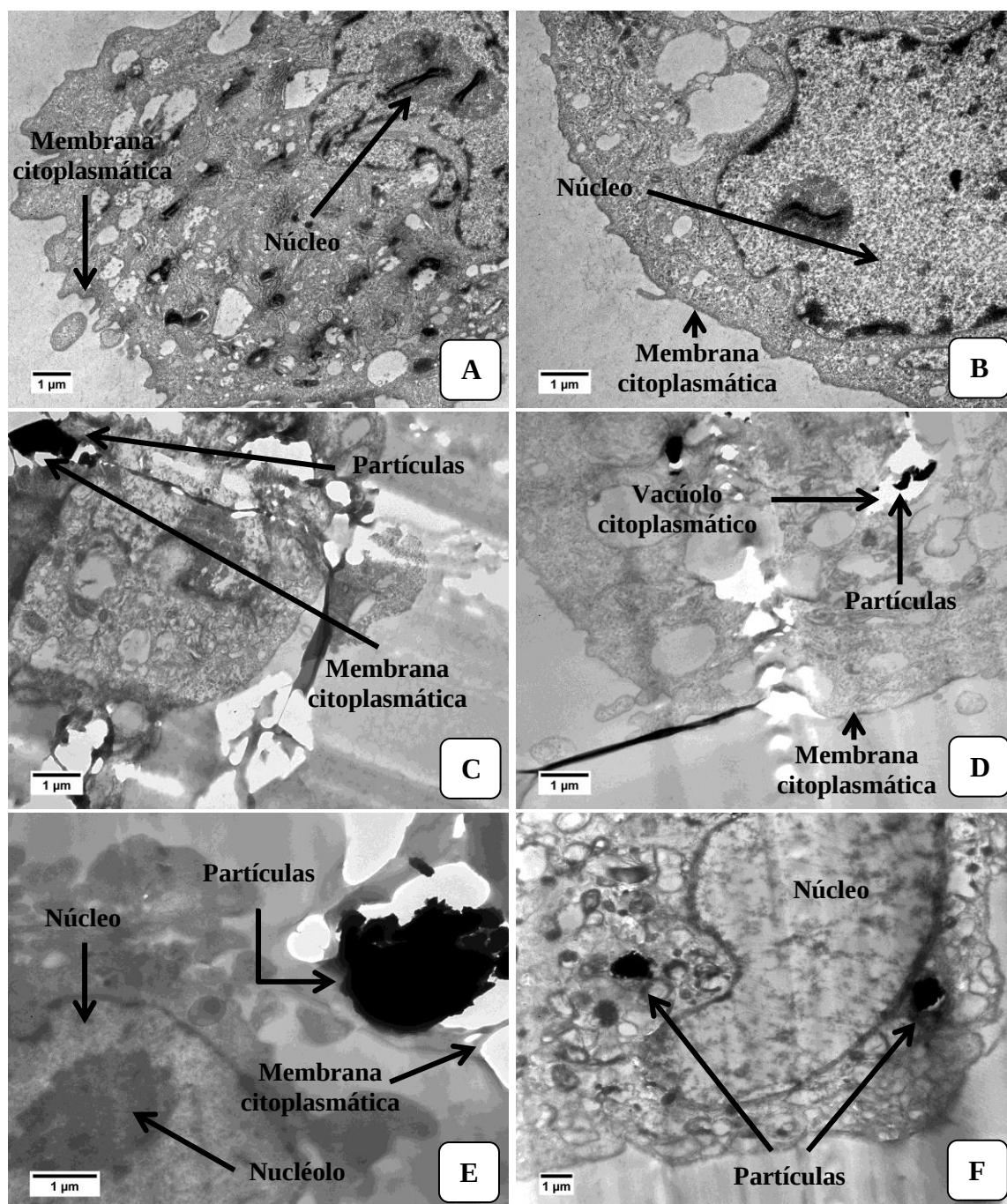


Figura 51: Imagens de microscopia de transmissão (TEM) para as células da linhagem HOb: (A) e (B) células grupo controle, mostrando algumas estruturas celulares básicas, (C) célula interagindo com as partículas de Ti-6Al-4V, (D) partículas de Ti-6Al-4V internalizadas por uma célula, (E) partículas de Ti-15Zr-15Mo interagindo com a membrana celular e (F) partículas de Ti-15Zr-15Mo internalizadas por uma célula e depositadas próximas ao seu núcleo.

A partir das Figuras 51 A e B, referentes às células do grupo controle da linhagem celular HOb (cultivadas em seu respectivo meio de cultura e sem nenhum tipo de tratamento), é possível identificar algumas estruturas celulares básicas, como a membrana citoplasmática e o núcleo celular. Também é possível verificar que as células para este grupo experimental apresentam estrutura normal, núcleo bem definido e membrana nuclear/ membrana citoplasmática íntegras.

As Figuras 51 C e D representam as células da linhagem HOb que interagiram com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Na Figura 51 C, em seu canto superior direito, pode-se visualizar um grupo de partículas de desgaste (aglomeradas) interagindo com extensões da membrana citoplasmática no início de um processo de internalização por endocitose. Depois de internalizadas, as análises das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelam que as partículas de desgaste ficam aprisionadas em vesículas citoplasmáticas, como pode ser observado na Figura 51 D.

Por fim, as Figuras 51 E e F apresentam as imagens representativas para as células da linhagem celular HOb após sua interação com as partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Como observado anteriormente para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V, tanto a interação destas partículas com a membrana citoplasmática de uma célula no início do seu processo de internalização (Figura 51 E), quanto o seu aprisionamento em vesículas citoplasmáticas após internalização (Figura 51 F) puderam ser visualizados.

Análises por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) para as partículas internalizadas pelos osteoblastos humanos foram realizadas para checar suas respectivas composições e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 52, 53 e 54.

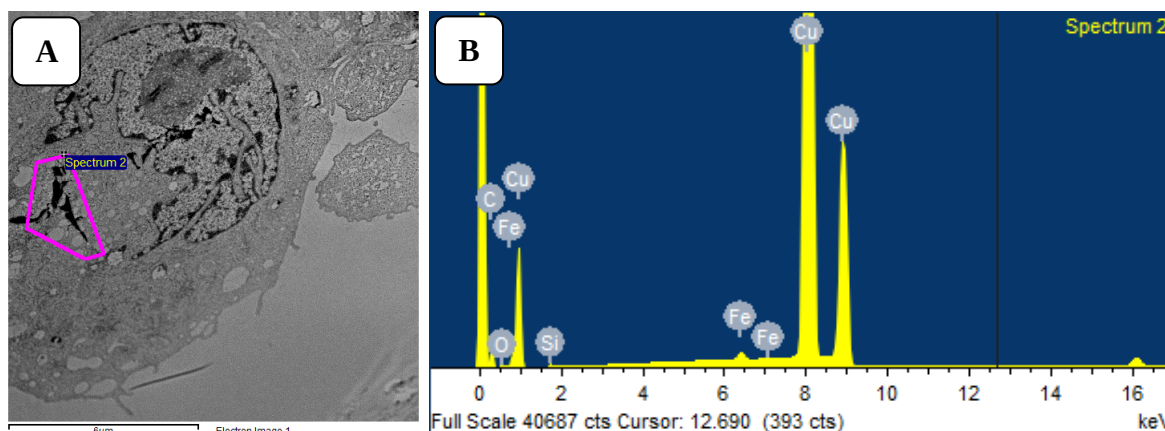


Figura 52: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOb do grupo controle e (B) Espectro EDS para a região destacada em (A).

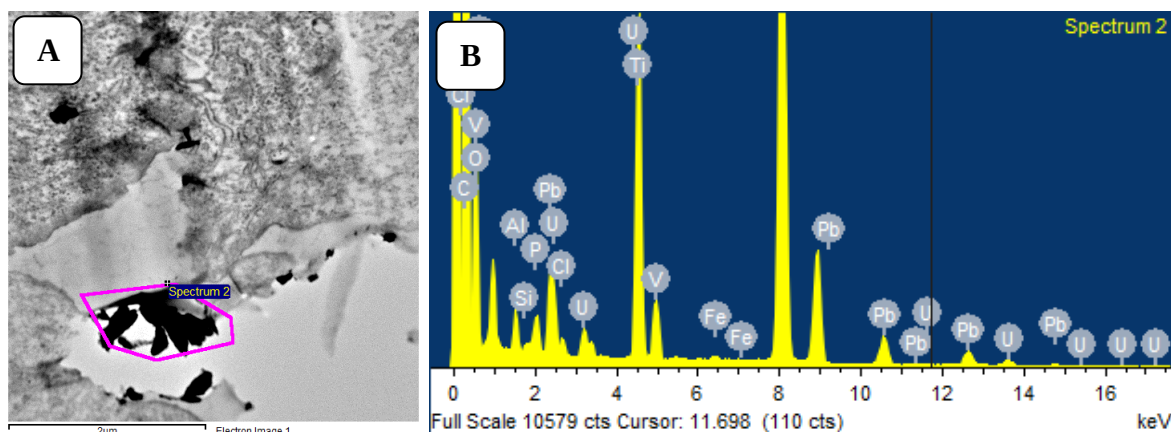


Figura 53: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOB interagindo com partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e (B) Espectro EDS para a região contendo as partículas e destacada em (A).

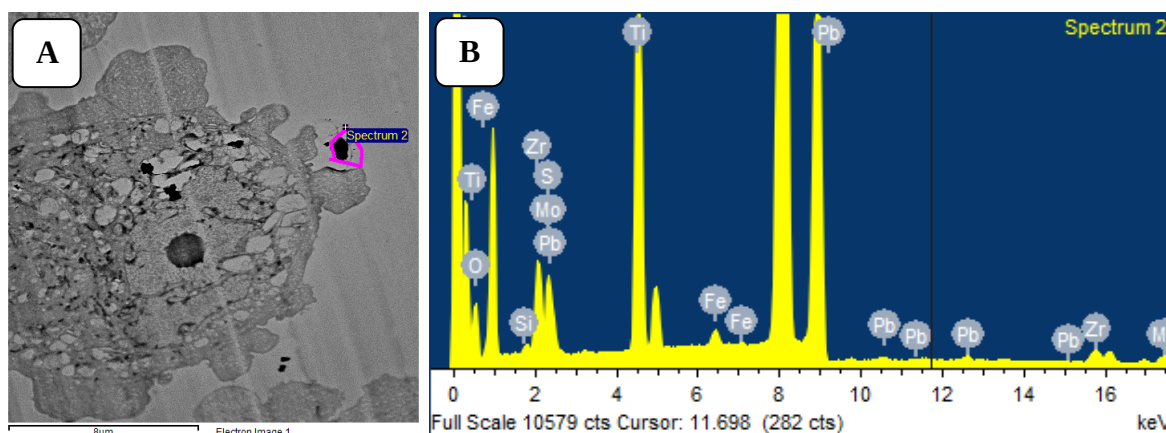


Figura 54: (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão para uma célula da linhagem HOB interagindo com partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo e (B) Espectro EDS para a região contendo as partículas e destacada em (A).

Na Figura 52 A é possível observar uma célula da linhagem HOB referente ao grupo controle (cultivada em seu respectivo meio de cultura e sem nenhum tipo de tratamento), na qual é possível identificar o núcleo e membrana citoplasmática. O espectro EDS apresentado na Figura 52 B refere-se à região (de contraste mais escuro) destacada na Figura 52 A, e de acordo com os picos observados no mesmo, foi possível verificar a presença dos elementos carbono (C) e oxigênio (O), característicos de estruturas orgânicas.

Para as células que interagiram com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V, uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) representativa é mostrada na Figura 53 A, a partir da qual é possível visualizar a presença de estruturas de contraste mais escuro (supostamente partículas) interagindo com a membrana citoplasmática de uma célula. O

espectro EDS referente à região destacada na Figura 53 A é apresentado na Figura 53 B, e a partir do mesmo é possível verificar a presença de picos relacionados aos elementos titânio (Ti), alumínio (Al) e vanádio (V), confirmando que as estruturas de contraste mais escuro (região em destaque) identificadas na imagem da Figura 53 A realmente referem-se às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V.

O mesmo tipo de conclusão pode ser obtida a partir da análise das Figuras 54 A e B, que apresentam uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão para o grupo experimental de células tratadas com as partículas de Ti-15Zr-15Mo e o espectro de EDS obtido a partir da região destacada, respectivamente. Particularmente, na primeira imagem é possível visualizar uma célula (seu núcleo e membrana citoplasmática) interagindo com estruturas de contraste mais escuro (possivelmente partículas). Notoriamente, também é possível observar a evaginação da membrana citoplasmática da célula para internalização destas estruturas por um processo de endocitose. Ademais, a partir do espectro EDS, foi possível confirmar que as estruturas de contraste mais escuro destacadas na primeira imagem referem-se às partículas de desgaste de Ti-15Zr-15Mo, uma vez que picos referentes aos elementos constituintes desta amostra (titânio, zircônio e molibdênio) foram identificados.

Por fim, a avaliação, a partir dos ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), com relação à produção de citocinas pró-inflamatórias – nomeadamente interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2) – pelos osteoblastos humanos da linhagem HOb após sua interação com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, são apresentadas nas a seguir. Ademais, como descrito na seção 4.5.7, dois grupos controle adicionais foram considerados para estes ensaios, em que o meio de cultura suplementado utilizado para o cultivo das células do grupo controle positivo foi substituído por meio de cultura contendo endotoxinas nas concentrações de 50 e 100 ng/mL. A utilização de tais grupos serviu, tanto para confirmar (ou não) a produção de tais citocinas por parte da linhagem celular em estudo pelo estímulo das endotoxinas, tanto como padrão de comparação para os grupos de células tratadas com as partículas de desgaste.

A Figura 55 apresenta os resultados obtidos para a interleucina 6 (IL-6). Ademais, nesta figura, o símbolo * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

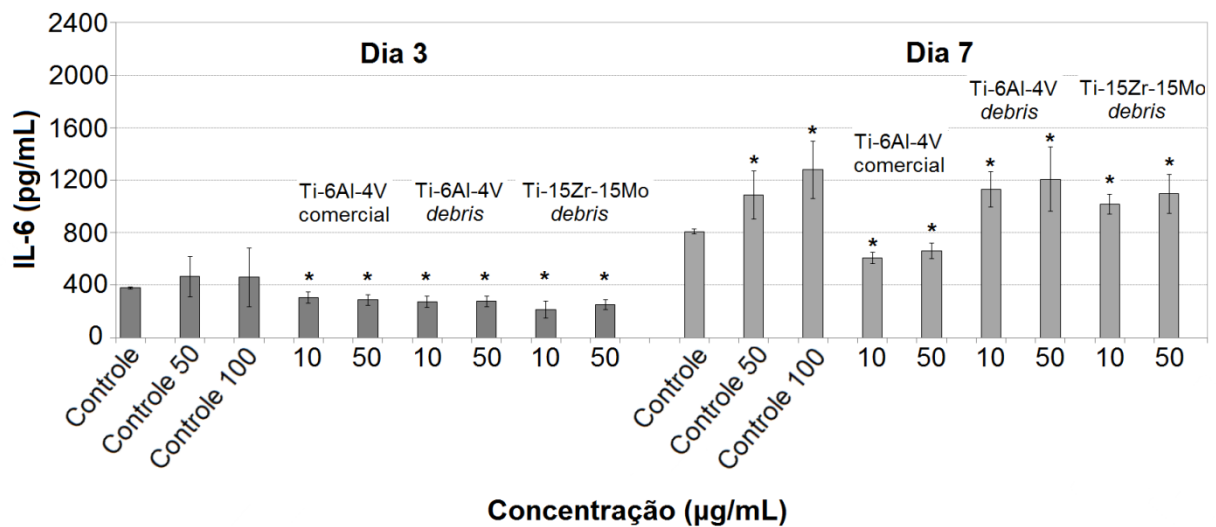


Figura 55: Resultados para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com relação à produção de interleucina 6 (IL-6) após a interação das células da linhagem HOB com relação a grupos experimentais selecionados.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 55, é possível verificar que a produção de IL-6 pelas células da linhagem HOB não é significativamente alterada após sua interação com endotoxinas em nenhuma das concentrações testadas no período experimental de três dias. No entanto, após sete dias de incubação, a produção desta interleucina por parte das células que interagiram com as endotoxinas nas concentrações 50 ng/mL e 100 ng/mL é aumentada.

Também, para o período experimental de sete dias é possível notar um aumento na produção de IL-6 pelas células que interagiram com as partículas de desgaste geradas a partir de ambas as ligas em estudo neste trabalho, mas especialmente para o grupo das partículas de Ti-6Al-4V na concentração de 50 µg/mL.

Os resultados obtidos no ensaio ELISA para a prostaglandina E2 são apresentados na Figura 56. Ademais, nesta figura, o símbolo * significa $p < 0,05$ com relação aos controles positivos nos seus respectivos períodos experimentais.

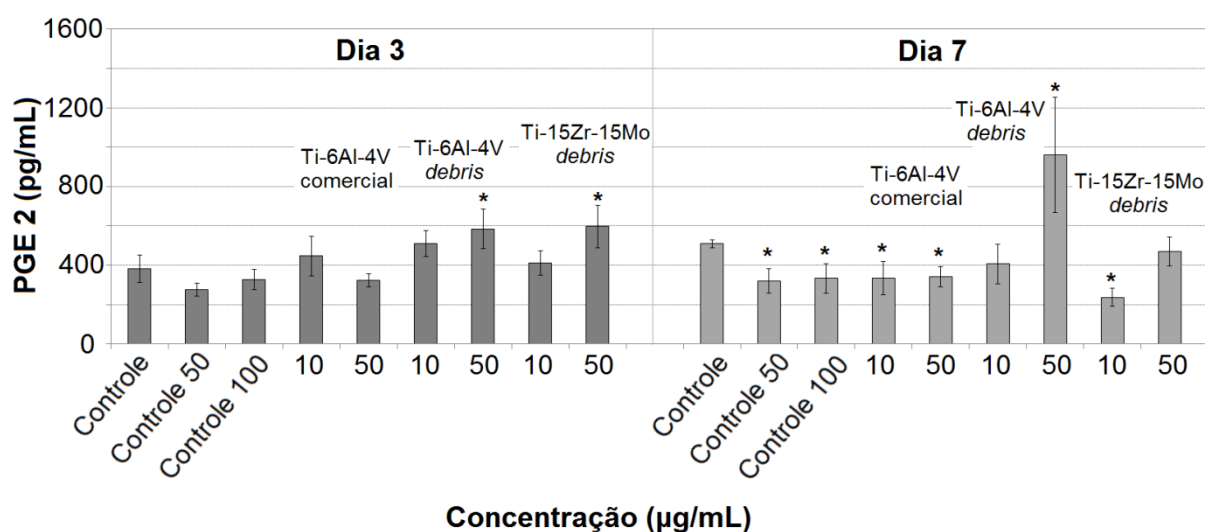


Figura 56: Resultados para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com relação à produção de prostaglandina E2 (PGE2) após a interação das células da linhagem HOb com relação a grupos experimentais selecionados.

A partir da Figura 56, pôde-se verificar que a produção da citocina prostaglandina E2 não é significativamente alterada para a maior parte dos grupos experimentais, com relação ao grupo controle para o período de três dias, exceto para os grupos de células que interagiram com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo nas maiores concentrações (50 µg/mL). Para o período experimental de sete dias, por outro lado, foi possível observar que para a maior parte dos grupos experimentais testados, as células produziram uma menor quantidade de PGE2, o que inclui os grupos controle com adição de endotoxinas (50 ng/mL e 100 ng/mL). Tal verificação dá indícios que, diferentemente do que foi observado para a citocina IL-6, possivelmente a produção da prostaglandina E2 por parte dos osteoblastos humanos não é sensível à interação com endotoxinas. Ademais, para o grupo experimental de células que interagiram com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V, um notável aumento na produção de PGE2 foi verificado.

De forma semelhante ao que foi realizado neste trabalho, Bukata e colaboradores (2004) avaliaram a produção das citocinas IL-6 e PGE2 por fibroblastos (células frequentemente encontradas em membranas peri-prostéticas em cirurgias de revisão para pacientes que apresentaram a falha de seu implante) após sua interação com partículas de titânio comercialmente puro comercial (1–3 µm), *in vitro*, a partir de um modelo de células de camundongo. De acordo com os resultados obtidos por estes autores, um aumento significativo na produção de ambas as citocinas avaliadas foi registrado para o grupo

experimental de células tratadas partículas de titânio em quantidade equivalente a 10 µg. Ademais, estes autores sugerem que, ao menos para o modelo por eles utilizado (fibroblastos de camundongo), a produção da citocina IL-6 em resposta à interação com as partículas de titânio pode ser dependente da produção da citocina PGE2, sendo que este último processo é desencadeado a partir da ativação da via de sinalização dependente da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (BUKATA et al., 2004).

Por fim, considerando os resultados obtidos para a avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (Figura 55), uma hipótese alternativa para interpretação dos resultados apresentados na Figura 49 (referente aos ensaios de viabilidade para as células da linhagem HOb após sua interação com as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo) pode ser levantada.

Como mencionado na seção 4.5.3, a viabilidade celular das células da linhagem HOb foi avaliada a partir de ensaios de MTT, nos quais a atividade mitocondrial das células pode ser estimada através da leitura de absorbância da conversão do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em seu produto formazan. Nestes ensaios, estima-se que uma maior leitura de absorbância esteja relacionada a uma maior atividade mitocondrial, o que dá indícios acerca de um maior número de células viáveis (sendo também a afirmação inversa verdadeira). No entanto, se levarmos em consideração aspectos relacionados ao metabolismo para cada tipo celular individualmente, esta associação nem sempre pode ser verdadeira.

Os osteoblastos, especificamente, são há muito tempo reconhecidos como células que apresentam glicólise ativa. Tal processo é a rota predominante de utilização celular da glicose e trata-se de um processo que ocorre na matriz citoplasmática, caracterizado pela quebra de uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$) em duas moléculas de piruvato ($C_3H_4O_3$). As moléculas de piruvato produzidas a partir da glicólise podem migrar para a mitocôndria, onde serão metabolizadas aerobicamente para produção de energia na forma de ATP (do inglês, *adenosine tri-phosphate*) ou, permanecer na matriz citoplasmática, onde podem ser convertidas a lactato ($C_3H_6O_3$) pela enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês *lactate dehydrogenase*). Neste sentido, estudos no início dos anos 1960 evidenciaram que os osteoblastos não somente consomem uma grande quantidade de glicose, mas também produzem lactato como produto final principal. Ademais, estima-se que cerca de 80% da glicose consumida pelas células do tecido ósseo seja convertida em lactato (ESEN; LONG, 2014).

Também especificamente com relação a este tipo celular, Wu e colaboradores (2017) relatam que a produção de lactato como produto final da glicólise associada ao estímulo produzido por um conjunto de citocinas pode estar fortemente relacionada ao processo de diferenciação de osteoblastos (WU et al., 2017). Ademais, Peruzzi e colaboradores (2012) sugerem que a diminuição do metabolismo energético aeróbico, e consequente diminuição na atividade mitocondrial, pode aumentar taxas de diferenciação celular em osteoblastos, com potencial expressão gênica de marcadores fenotípicos específicos, como a produção de interleucina 6 (IL-6) (PERUZZI et al., 2012).

Apesar de não realizar ensaios específicos para o suporte da conclusão que se segue, levando em consideração as informações dos parágrafos anteriores e o aumento observado na produção da citocina IL-6 (Figura 55), é possível supor que a leitura de um menor valor de absorbância (relacionada à menor atividade mitocondrial) para as células da linhagem HOb tratadas com as partículas de desgaste (Figura 49) pode, não necessariamente, estar relacionada a diminuição no número de células viáveis, mas sim a uma alteração em seu metabolismo energético aeróbico associado a um estímulo de diferenciação por parte das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo (principalmente após 7 dias), uma vez que, trabalhos publicados recentemente na literatura reportam o envolvimento de um meio enriquecido em titânio em atividades metabólicas de osteoblastos, interferindo em mecanismos de adesão, proliferação e diferenciação destas células (BEZERRA et al., 2017; ROSSI et al., 2017; FERNANDES et al., 2018).

Considerando o conjunto de resultados obtidos nesta etapa do trabalho é possível apontar as seguintes que: (i) a interação com partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo pode influenciar negativamente a viabilidade ou (possivelmente) alterar o metabolismo celular aeróbico dos osteoblastos das linhagens MG63 e HOb. Ademais a interação de osteoblastos humanos (HOb) com estas partículas de desgaste pode (ii) resultar na internalização destas partículas pelas células (o que certamente também provocará alterações em seu metabolismo global) e (iii) aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IL-6 e PGE2, principalmente após sete dias. Por fim, (iv) características como tamanho, morfologia e composição para as partículas de desgaste podem influenciar as respostas celulares com relação à sua exposição, o que faz com que (iv) a utilização de partículas comerciais para estudos relacionados aos efeitos produzidos por partículas de desgaste não seja um bom modelo.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A proposta inicial deste projeto de pesquisa foi a avaliação da citotoxicidade relacionada aos íons de vanádio possivelmente liberados a partir da degradação superficial de uma liga de Ti-6Al-4V. Com relação a este aspecto e considerando o conjunto de resultados obtidos nesta avaliação, é possível apontar que, de acordo com o modelo utilizado neste trabalho (osteoblastos e fibroblastos de camundongo), as espécies iônicas de vanádio predominante identificadas na realização dos experimentos foram essencialmente vanadatos, nomeadamente H_2VO_4^- e HVO_4^{2-} . Ademais, observou-se que a interação destas espécies iônicas com as células das linhagens utilizadas pode apresentar influências negativas sobre a viabilidade e morfologia (principalmente dos fibroblastos) em concentrações próximas, ou até mesmo menores, que aquelas possíveis de ocorrência *in vivo* (para pacientes que apresentam o mau funcionamento de seu dispositivo médico).

De forma complementar, propôs-se também a avaliação do comportamento com relação à tribocorrosão das ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo (isenta da adição dos elementos alumínio e vanádio), e alternativamente, da liga Ti-15Zr-15Mo, em que uma modificação superficial pela técnica de micro-arco oxidação foi empregada. Os resultados relacionados à avaliação deste aspecto sugerem que o processo de tribocorrosão aparenta ser mais acentuado ou provavelmente mais atenuado pelo processo de corrosão para a amostra Ti-15Zr-15Mo em comparação à amostra Ti-6Al-4V. Apesar disso, observou-se que a aplicação da modificação superficial sobre a liga Ti-15Zr-15Mo foi capaz de promover uma melhoria significativa em seu comportamento com relação à tribocorrosão, a partir do crescimento de um filme poroso de dióxido de titânio (TiO_2) em sua superfície. Além disso, a utilização desta técnica também foi capaz de promover a incorporação efetiva de elementos bioativos a esta camada superficial.

Por fim, a produção de partículas de desgaste a partir de ensaios de tribocorrosão sobre as ligas Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, suas respectivas caracterizações com relação à parâmetros físico-químicos (tamanho, morfologia, composição química e estrutura cristalina) e a sua utilização em ensaios biológicos para avaliação da influência de sua interação com células do tecido ósseo (osteoblastos humanos) sobre a viabilidade celular e produção de citocinas relacionadas ao processo inflamatório (interleucina 6 e prostaglandina E2) também foi proposta.

Com relação à geração e caracterização destas partículas, os resultados obtidos permitem apontar que, embora o mecanismo associado à geração das partículas de desgaste para ambas as ligas em estudo neste trabalho possa ser essencialmente o mesmo, a menor resistência ao desgaste mecânico previamente observada para a liga Ti-15Zr-15Mo é capaz de influenciar significativamente a quantidade de partículas produzidas. Além disso, embora as partículas de desgaste obtidas para ambas as ligas apresentem características muito semelhantes em termos de morfologia e sejam capazes de preservar a estrutura cristalina e composição química do material a partir do qual foram geradas, diferenças significativas em termos de tamanho podem ser verificadas.

Com relação à avaliação dos efeitos relacionados à exposição de osteoblastos humanos (linhagens MG63 e HOb) às partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo, os resultados obtidos indicam a interação das células destas linhagens com estas partículas de desgaste pode promover a diminuição em viabilidade celular (ou, possivelmente, alterações em seu metabolismo). Ademais, de acordo com os resultados obtidos a partir dos ensaios ELISA, é possível apontar que a interação com as partículas de desgaste pode aumentar a produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2) por parte destas células. Complementarmente, verificou-se também que as partículas de desgaste de ambas as composições estudadas neste trabalho podem ser internalizadas por osteoblastos humanos (HOb).

De maneira geral e contextualizada aos objetivos gerais, considerando o conjunto de resultados obtidos com relação à interação das partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e Ti-15Zr-15Mo com as células do tecido ósseo humano (osteoblastos) avaliados neste trabalho, é possível concluir que a geração e deposição destas partículas de desgaste sobre as células do tecido adjacente a um implante metálico pode causar efeitos nocivos.

Por fim, considerando as diferenças significativas entre as características físico-químicas para as partículas de desgaste de Ti-6Al-4V e as partículas comerciais de mesma composição e a variação das respostas celulares relacionadas à interação com estes dois tipos de partículas, também é possível apontar que utilização de partículas comerciais para estudos relacionados aos efeitos produzidos por partículas de desgaste não é um bom modelo.

6 ANEXOS

6.1 Protocolo original do fabricante para os ensaios de detecção de endotoxinas



Make Research Easy

ToxinSensor™ Single Test Kit

Technical Manual No.TM0639

Update date: 03102015

I Description	1
II Key Features	1
III Product Information	2
IV Materials and equipment not provided	2
V Endotoxin detection protocol	2
VI Example	4
VII Troubleshooting.....	5
VIII Ordering Information	5

I. DESCRIPTION

GenScript **ToxinSensor™ Single Test Kit** is designed to be a qualitative *In Vitro* end-point endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) as supplied is to be reconstituted with sample or control directly. After incubation for 1 hour, and in the presence of endotoxin, gelation occurs; in the absence of endotoxin, gelation does not occur.

GenScript supply a series of ToxinSensor™ Single Test Kits with different sensitivity (0.015 EU/ml, 0.03 EU/ml, 0.06 EU/ml, 0.125 EU/ml and 0.25 EU/ml).

When using the ToxinSensor™ Single Test Kit, you just need to add 200µl of sample or control to LAL, then, wait for the required incubation time to allow for gel to form. There is no need to reconstitute the system with LAL Reagent Water before use.

II. KEY FEATURES

- High reproducibility
- Broad detection range
- Easy to use

III. PRODUCT INFORMATION

Product Name	Cat. No.	Size	Sensitivity
ToxinSensor™ Single Test Kit	L00447-20	20 Assays	0.015 EU/ml
	L00447-40	40 Assays	
	L00448-20	20 Assays	0.03 EU/ml
	L00448-40	40 Assays	
	L00449-20	20 Assays	0.06 EU/ml
	L00449-40	40 Assays	
	L00450-20	20 Assays	0.125 EU/ml
	L00450-40	40 Assays	
	L00451-20	20 Assays	0.25 EU/ml
	L00451-40	40 Assays	

Each kit contains designated number of vials of 20 or 40 containing lysate prepared from the circulating amebocytes of the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) standardized to detect the labeled concentration (EU/ml) of the FDA Reference Standard Endotoxin.

IV. MATERIALS AND EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Sodium hydroxide, 0.1 N, dissolved in LAL reagent water. The reagent is for pH adjustment.
2. Hydrochloric acid, 0.1 N, diluted in LAL reagent water. The reagent is for pH adjustment.
3. Water bath or heating blocks set at 37 °C ± 1.0°C
4. Vortex mixer
5. Endotoxin Standard
6. Pipettes, 0.2 ml and 1.0 ml, endotoxin-free
7. Endotoxin-free vials
8. Timer

V. ENDOTOXIN DETECTION PROTOCOL

To avoid contamination, conduct the experiment in a laminar flow cabinet at room temperature in a designated Reagent Preparation Area; wear disposable gloves and use endotoxin-free materials in order to avoid contamination.

1. Sample Preparation**pH adjustment**

The pH of the sample should be at pH 6-8 to ensure good linearity. We recommend adjusting the pH with 0.1 N HCl or NaOH if needed.

Dilution

When the estimated endotoxin level in a sample is out of the detection range, the sample needs to be diluted before detection. The dilution factor is determined by MVD*. For best performance, do not exceed the MVD of your sample.

*MVD (Maximum Valid Dilutions): a dilution factor calculated by endotoxin limit (in EU/ml) divided by lambda. Lambda is the labeled sensitivity of LAL reagent. We provide LAL reagent with different sensitivities. For specific sensitivity, please refer to the label on the kit.

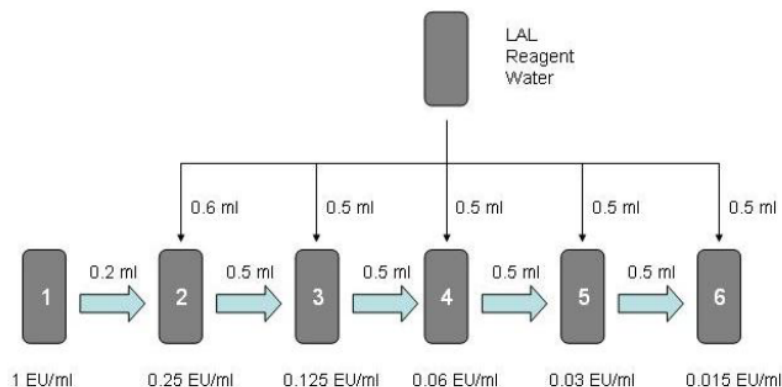
For example, if the endotoxin limit is 10,000 EU/ml, and lambda (the reagent's labeled sensitivity) of LAL test is 0.25EU/ml (L00451-20 or L00451-40), then MVD should be calculated as: $10,000/0.25 = 40,000$.

Note: Our kit is used for testing samples that are certified free of Beta Glucans contaminant. This contaminant can come from yeast, bacteria, and cellulosic materials, such as blood products.

2. Preparation of Positive Controls.

Note: We recommend having an Endotoxin Standard as Positive Controls (Can be just 1 positive control at least 2 lambda concentration of endotoxin) in each experiment. However, this step could be skipped if a simple & quick screening is preferred.

- Reconstitute endotoxin control according to the label with LAL Reagent Water.
- Vortex the vial of endotoxin for at least 15 minutes or refer to product information sheet.
- Dilute the endotoxin with LAL Reagent Water to a concentration of 1 EU/ml. Each dilution should be vortexed for 60 seconds prior to proceeding to the next dilution.
- Prepare a serial of two-fold dilutions from the 1 EU/ml endotoxin solution as shown in the following chart. Make sure the concentrations of the dilution covers the detection sensitivity of the LAL kit. :



3. Negative Control

LAL Reagent Water may be used as a negative control.

4. Test Procedure

A. The vials containing LAL serve as the test containers. Before use, bring all the contents of the vial together by gently tapping the bottom of the vial on a hard surface. Remove the rubber stopper carefully to avoid microbial and endotoxin contamination.

B. Carefully transfer 0.2 ml of positive control, negative control and the test samples to the LAL vials. Cap the vials and mix them thoroughly.

Note: We recommend using a positive control that is at least 2 lambda concentration of endotoxin, e.g., if the sensitivity of the kit is 0.125EU/ml, use an endotoxin positive control at least at 0.25EU/ml.

C. Incubate all vials at $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a water bath or heating block set. Keep racks standing upright while incubating.

D. Remove the rack after 60 ± 2 minutes of incubation. Invert each vial and check whether a gel has formed or not. Do not shake vigorously while checking; it will break up the clotted gel.

a) A positive reaction is characterized by the formation of a firm gel that remains intact when inverting the vial upside down.

b) A negative reaction is characterized by the absence of a solid clot. The lysate may show an increased turbidity or viscosity. This is considered a negative result.

E. Calculate the endotoxin level: the endotoxin level in the positive sample is equal or higher than the detection sensitivity of LAL kit used, while in the negative sample it is lower than the detection sensitivity of LAL kit applied.

VI. EXAMPLE

1. Sample: Protein A (1 mg/ml in PBS, pH 7.4) is purified from *E. coli* lysate by Ni-NTA Resin.

2. Make dilutions using LAL Water: 1: 200,000, 1: 400,000, 1: 800,000

3. The test is performed as described above and the assay result is listed below:

Positive control	Negative control	1: 200,000	1: 400,000	1: 800,000
+	-	+	-	-

4. Endotoxin concentration in this sample is: from $200,000 \times 0.25$ to $400,000 \times 0.25$, so that is, from 50,000 to 100,000 EU/ml. (0.25 EU/ml is the lambda of the kit)

VII. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible Cause	Suggestions
A gel formed in negative control	The materials (e.g. tips, vials, water etc.) may be contaminated.	Pay more attention to operation and keep the assay under laminar flow cabinet.
No gel formed in positive control	The endotoxin standard is not mixed well.	The standard should be vigorously vortexed for 15 minutes prior to use.

VIII. ORDERING INFORMATION

Product Name	Cat. No.
ToxinSensor™ Single Test Kit	L00447-20, L00447-40
	L00448-20, L00448-40
	L00449-20, L00449-40
	L00450-20, L00450-40
	L00451-20, L00451-40
ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	L00350
	L00350C
ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay kit	L00351
ToxinEraser™ Endotoxin Removal kit	L00338

GenScript USA Inc.
 860 Centennial Ave.,
 Piscataway, NJ 08854
 Tel: 732-885-9188, 732-885-9688
 Fax: 732-210-0262, 732-885-5878
 Email: product@genscript.com
 Web: www.genscript.com
For In Vitro Research Use Only.

6.2 Protocolo original do fabricante para o ensaio ELISA IL-6

invitrogen

PRODUCT INFORMATION SHEET

Human IL-6 ELISA Kit

Catalog Number KHC0061 (96 tests), KHC0062 (2 x 96 tests), KHC0061C (5 x 96 tests)

Pub. No. MAN0014630 **Rev.** 2.0 (30)

CAUTION! This kit contains materials with small quantities of sodium azide and Proclin™ 300. Sodium azide reacts with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal, flush drains with a large volume of water to prevent azide accumulation. In case of contact, rinse affected area with plenty of water. Proclin™ 300 is toxic, corrosive, and a skin irritant. Avoid ingestion and contact with eyes, skin and mucous membranes. In case of contact, rinse affected area with plenty of water. Observe all federal, state, and local regulations for disposal.

Note: For safety and biohazard guidelines, see the “Safety” appendix in the *ELISA Technical Guide* (Pub. no. MAN0006706). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Product description

The Invitrogen™ Human IL-6 ELISA Kit is a solid-phase sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This assay is designed to detect and quantify the level of human IL-6 in human serum, plasma, buffered solution, or cell culture medium. The assay will recognize both natural and recombinant human IL-6.

Contents and storage

Upon receipt, store the kit at 2°C to 8°C.

Contents	Cat. No. KHC0061 (96 tests)
Human IL-6 Standard, recombinant Human IL-6; contains 0.1% sodium azide	2 vials
Standard Diluent Buffer; contains 7.7 mM sodium azide	25 mL
Antibody Coated Wells, 96-well plate	1 plate
Human IL-6 Biotin Conjugate; contains 7.7 mM sodium azide	6 mL
Streptavidin-HRP (100X); contains 0.04% Proclin™ 300, 3.3 mM thymol, and 0.06% methoxyphenol	0.125 mL
Streptavidin-HRP Diluent; contains 0.04% Proclin 300	25 mL
Wash Buffer Concentrate (25X)	100 mL
Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB)	25 mL
Stop Solution	25 mL
Adhesive Plate Covers	3

Materials required but not supplied

- Distilled or deionized water
- Calibrated adjustable precision pipettes and glass or plastic tubes for diluting solutions; beakers, flask and cylinders for preparation of reagents
- Microtiter plate reader with software capable of measurement at or near 450 nm
- Plate washer—automated or manual (squirt bottle, manifold dispenser, or equivalent)

Before you begin

IMPORTANT! Reagents are lot-specific. Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.

- Review the **Procedural guidelines** and **Plate washing directions** in the *ELISA Technical Guide* available at thermofisher.com.
- Allow reagents to reach room temperature before use. Mix to redissolve any precipitated salts.

Prepare 1X Wash Buffer

1. Dilute 16 mL of Wash Buffer Concentrate (25X) with 384 mL of deionized or distilled water. Label as 1X Wash Buffer.
2. Store the concentrate and 1X Wash Buffer in the refrigerator. Use the diluted buffer within 14 days.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Sample preparation guidelines

- Refer to the *ELISA Technical Guide* at thermofisher.com for detailed sample preparation procedures.
- Collect samples in pyrogen/endotoxin-free tubes.
- Freeze samples after collection if samples will not be tested immediately. Avoid multiple freeze-thaw cycles of frozen samples. Thaw completely and mix well (do not vortex) prior to analysis.
- Avoid the use of hemolyzed or lipemic sera. If large amounts of particulate matter are present in the sample, centrifuge or filter sample prior to analysis.

Pre-dilute samples

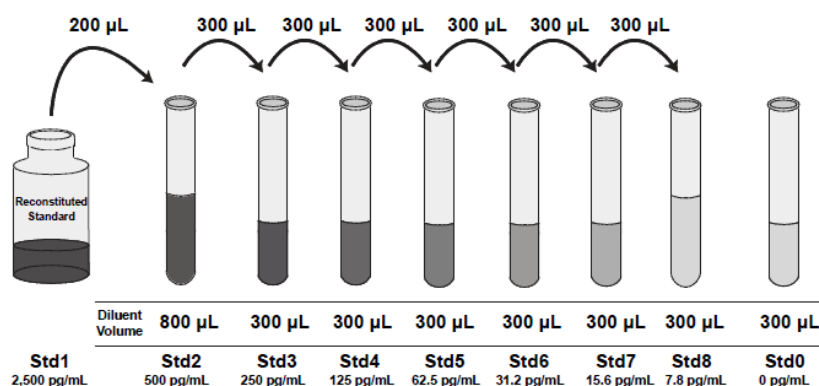
Sample concentrations should be within the range of the standard curve. Because conditions may vary, each investigator should determine the optimal dilution for each application.

- Perform sample dilutions with Standard Diluent Buffer.

Dilute standards

Note: Use glass or plastic tubes for diluting standards.

1. Reconstitute Human IL-6 Standard to 2,500 pg/mL with Standard Dilution Buffer. Refer to the standard vial label for instructions. Swirl or mix gently and allow the contents to sit for 10 minutes to ensure complete reconstitution. Label as 2,500 pg/mL Human IL-6. **Use the standard within 1 hour of reconstitution.**
2. Add 200 μ L Reconstituted Standard to one tube containing 800 μ L Standard Diluent Buffer and mix. Label as 500 pg/mL Human IL-6.
3. Add 300 μ L Standard Diluent Buffer to each of 7 tubes labeled as follows: 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, and 0 pg/mL Human IL-6.
4. Make serial dilutions of the standard as shown in the following dilution diagram. Mix thoroughly between steps.
5. Discard any remaining reconstituted standard. Return the Standard Diluent Buffer to the refrigerator.



Prepare 1X Streptavidin-HRP solution

Note: Prepare 1X Streptavidin-HRP within 15 minutes of usage.

The Streptavidin-HRP (100X) is in 50% glycerol, which is viscous. To ensure accurate dilution:

1. For each 8-well strip used in the assay, pipet 10 μ L Streptavidin-HRP (100X) solution, wipe the pipette tip with clean absorbent paper to remove any excess solution, and dispense the solution into a tube containing 1 mL of Streptavidin-HRP Diluent. Mix thoroughly.
2. Return the unused Streptavidin-HRP (100X) solution to the refrigerator.

Perform ELISA (Total assay time: 3 hours)

IMPORTANT! Perform a standard curve with each assay.

- Allow all components to reach room temperature before use. Mix all liquid reagents prior to use.
- Determine the number of 8-well strips required for the assay. Insert the strips in the frames for use. Re-bag any unused strips and frames, and store at 2°C to 8°C for future use.



1	Bind antigen	 a. Add 100 µL of standards or samples to the appropriate wells. b. Add 50 µL Hu IL-6 Biotin Conjugate solution into each well except the chromogen blanks. c. Tap the side of the plate to mix. Cover the plate with a plate cover and incubate for 2 hours at room temperature. d. Thoroughly aspirate the solution and wash wells 4 times with 1X Wash Buffer.
2	Add Streptavidin-HRP	 a. Add 100 µL 1X Streptavidin-HRP solution (see page 2) into each well except the chromogen blanks. b. Cover the plate with a plate cover and incubate for 30 minutes at room temperature. c. Thoroughly aspirate the solution from the wells and wash wells 4 times with 1X Wash Buffer.
3	Add Stabilized Chromogen	 a. Add 100 µL Stabilized Chromogen to each well. The substrate solution begins to turn blue. b. Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark. Note: TMB should not touch aluminum foil or other metals.
4	Add Stop Solution	 Add 100 µL Stop Solution to each well. Tap the side of the plate to mix. The solution in the wells changes from blue to yellow.

Read the plate and generate the standard curve

1. Read the absorbance at 450 nm. Read the plate within 2 hours after adding the Stop Solution.
2. Use curve-fitting software to generate the standard curve. A 4 parameter algorithm provides the best standard curve fit. Optimally, the background absorbance may be subtracted from all data points, including standards, unknowns and controls, prior to plotting.
3. Read the concentrations for unknown samples and controls from the standard curve. Multiply value(s) obtained for sample(s) by the appropriate factor to correct for the sample dilution.
 Note: Dilute samples producing signals greater than the upper limit of the standard curve in Standard Diluent Buffer and reanalyze. Multiply the concentration by the appropriate dilution factor.

Performance characteristics

Standard curve example

The following data were obtained for the various standards over the range of 0 to 500 pg/mL human IL-6.

Standard Human IL-6 (pg/mL)	Optical Density (450 nm)
500	2.59
250	1.33
125	0.73
62.5	0.40
31.2	0.24
15.6	0.13
7.8	0.10
0	0.06

Inter-assay precision

Samples were assayed 8 times in 5 different assays to determine precision between assays.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/mL)	35.3	97.4	236.7
Standard Deviation	3.3	6.4	18.5
% Coefficient of Variation	9.3	6.5	7.8

Intra-assay precision

Samples of known human IL-6 concentration were assayed in replicates of 16 to determine precision within an assay.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/mL)	38.8	101.2	242.7
Standard Deviation	3.0	5.8	12.5
% Coefficient of Variation	7.7	5.7	5.1

Expected values

Eight samples, that consisted of 10% human whole blood in culture medium stimulated with LPS/PHA, were assayed for human IL-6. The values ranged from 720 to 12,000 pg/mL. The mean value was 2,500 pg/mL.

Sample	Range (pg/mL)	Average (pg/mL)
10% Human whole blood in culture medium stimulated with LPS/PHA	720–12,000	2,500

Linearity of dilution

Human serum containing 222 pg/mL of measured human IL-6 was serially diluted in Standard Diluent Buffer over the range of the assay. Linear regression analysis of samples versus the expected concentration yielded an average correlation coefficient of 0.998.

Sample	Correlation Coefficient
Human serum	0.998

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

Recovery

The recovery of human IL-6 added to normal human serum and normal human plasma averaged 88% and 70%, respectively. The recovery of human IL-6 added to tissue culture medium containing 10% fetal bovine serum averaged 111%.

Sensitivity

The analytical sensitivity of the assay is <2 pg/mL human IL-6. This was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. obtained when the zero standard was assayed 32 times, and calculating the corresponding concentration.

Specificity

Buffered solutions of a panel of substances at 50 ng/mL were assayed with the Human IL-6 ELISA Kit. The following substances were tested and found to have no cross-reactivity: Human IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , LIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, OSM, RANTES TGF- β , TNF- α , TNF- β ; mouse IL-6; rat IL-6.

Product label explanation of symbols and warnings

	Catalog Number		Batch code		Temperature limitation		Use by		Manufacturer		Consult instructions for use		Caution, consult accompanying documents
--	----------------	--	------------	--	------------------------	--	--------	--	--------------	--	------------------------------	--	---

Manufacturer's address: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

21 November 2017

ThermoFisher
SCIENTIFIC

6.3 Protocolo original do fabricante para o ensaio ELISA Prostaglandina E2



ELISA Kit
Catalog # KHL1701

Human
Prostaglandin E₂

www.invitrogen.com
Invitrogen Corporation
542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012
Tel: 800-955-6288
E-mail: techsupport@invitrogen.com

TABLE OF CONTENTS

Introduction	4
Principle of the Method.....	5
Reagents Provided.....	6
Supplies Required But Not Provided	7
Procedural Notes/Lab Quality Control.....	7
Safety.....	8
Directions for Washing.....	9
Sample Preparation.....	10
Reagent Preparation and Storage.....	10
Dilution of Prostaglandin E ₂ Standard.....	12
Assay Method.....	13
Data Analysis.....	16
Typical Data.....	18
Limitations of the Procedure.....	18
Performance Characteristics	19
Precision.....	19
Specificity.....	20
References	21

3

Rev. A6 05/07/10 PR382

INTRODUCTION

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is a potent lipid mediator produced by metabolism of arachidonic acid via the cyclooxygenase (COX) pathway. Following cellular stimulation, arachidonic acid is hydrolyzed from phospholipids stores by one of a family of phospholipase A₂ enzymes and converted to the unstable endoperoxide PGH₂ by either COX-1 or COX-2.^{1,2} PGH₂ is isomerized to PGE₂ by one of 3 distinct enzymes - microsomal PGES-1 (mPGES-1), mPGES-2, or a cytosolic enzyme, cPGES.³ PGE₂ is active in a number of physiological systems and settings including inflammation, immune regulation, generation of fever, pain perception, protection of the gastric mucosa, fertility and parturition, as well as sodium and water retention.⁴⁻⁹ The effects of PGE₂ are transduced by 4 subtypes of G protein-coupled receptors designated EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, with K_d values for PGE₂ ranging from 1-10 nM.¹⁰ PGE₂ is rapidly metabolized *in vivo* by the prostaglandin 15-dehydrogenase pathway (15-hydroxy PGDH) to the inactive metabolite 13,14-dihydro-15-keto PGE₂.^{11,12} The half-life of PGE₂ in the circulatory system is approximately 30 seconds and normal plasma levels are 3-12 pg/mL.¹³

For Research Use Only. CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

READ ENTIRE PROTOCOL BEFORE USE

4

PRINCIPLE OF THE METHOD

The Invitrogen Human Prostaglandin E₂ (PGE₂) kit is a competitive immunoassay for the quantitative determination of PGE₂ in biological samples. This assay is based on the competition between PGE₂ and a PGE₂-alkaline phosphatase tracer for a limited amount of PGE₂-specific monoclonal antibody. Because of the competition between PGE₂ in the sample and PGE₂ tracer for the PGE₂ antibody, the signal obtained with the assay will be inversely proportional to the amount of PGE₂ in each sample. This equilibration is performed in the wells of a 96-well microtiter plate pre-coated with goat polyclonal anti-mouse IgG, which binds all of the PGE₂ monoclonal antibody added to the well. After the equilibration step, the plate is washed, and a solution of *para*-nitrophenyl phosphate (pNPP), a substrate for alkaline phosphatase, is added. The product of this enzymatic reaction has a distinct yellow color which absorbs at 412 nm, allowing quantification of PGE₂ in each sample.

5

REAGENTS PROVIDED

Note: This kit should be stored at -20°C and used before the expiration date.

Reagent	96 Test Kit
Prostaglandin E ₂ Monoclonal Antibody, lyophilized. Contains 0.05% sodium azide.	1 vial
Prostaglandin E ₂ AP Tracer, lyophilized. Contains 0.05% sodium azide.	1 vial
Prostaglandin E ₂ Standard in ethanol; 0.5 mL per vial.	1 vial
Goat Anti-mouse IgG Coated Plate, 96 wells per plate.	1 plate
Tris Buffer Concentrate. Contains 0.5% sodium azide; 10 mL per vial.	2 vials
Wash Buffer Concentrate; 5 mL per vial.	1 vial
DEA Buffer Concentrate; 2.5 mL per vial.	1 vial
pNPP Tablets.	5 tablets
Plate Cover, adhesive strips.	1

Disposal Note: This kit contains materials with small quantities of sodium azide. Sodium azide reacts with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal, flush drains with a large volume of water to prevent azide accumulation. Avoid ingestion and contact with eyes, skin and mucous membranes. In case of contact, rinse affected area with plenty of water. Observe all federal, state and local regulations for disposal.

6

SUPPLIES REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Ultrapure (18 M Ω) distilled or deionized water.
2. Calibrated adjustable precision pipettes, preferably with disposable plastic tips. (A manifold-channel pipette is desirable for large assays.)
3. An orbital shaker.
4. A plate reader capable of measuring between 405–420 nm.
5. Plate washer: automated or manual (squirt bottle, manifold dispenser, etc.).
6. Glass tubes for diluting and aliquoting standard.
7. Absorbent paper towels.
8. Calibrated beakers and graduated cylinders in various sizes.
9. 1.0 M HCl.
10. Methanol.
11. Hexane.
12. Ethyl acetate.
13. SPE C-18 cartridges.

PROCEDURAL NOTES/LAB QUALITY CONTROL

1. Microtiter plates should be allowed to come to room temperature before opening the foil bags. Once the desired number of strips has been removed, immediately reseal the bag and store at 2 to 8°C to maintain plate integrity.
2. Samples should be frozen if not analyzed shortly after collection. Avoid multiple freeze-thaw cycles of frozen samples. Thaw completely and mix well prior to analysis.
3. If particulate matter is present, centrifuge or filter prior to analysis.
4. All standards, controls and samples should be run in duplicate.

7

5. Samples that are greater than the highest standard point should be diluted and retested.
6. When pipetting reagents, maintain a consistent order of addition from well-to-well. This ensures equal incubation times for all wells.
7. Cover or cap all reagents when not in use.
8. **Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.**
9. Do not use reagents after the kit expiration date.
10. Read absorbances within 2 hours of assay completion.
11. In-house controls should be run with every assay. If control values fall outside pre-established ranges, the accuracy of the assay is suspect.
12. All residual wash liquid must be drained from the wells by efficient aspiration or by decantation followed by tapping the plate forcefully on absorbent paper. *Never* insert absorbent paper directly into the wells.

SAFETY

All blood components and biological materials should be handled as potentially hazardous. Follow universal precautions as established by the Centers for Disease Control and Prevention and by the Occupational Safety and Health Administration when handling and disposing of infectious agents.

8

DIRECTIONS FOR WASHING

Incomplete washing will adversely affect the test outcome. All washing must be performed with *Wash Buffer* provided.

Washing can be performed manually as follows: completely aspirate the liquid from all wells by gently lowering an aspiration tip (aspiration device) into the bottom of each well. Take care not to scratch the inside of the well.

After aspiration, fill the wells with at least 0.4 mL of diluted *Wash Buffer*. Let soak for 15 to 30 seconds, then aspirate the liquid. Repeat as directed under **ASSAY METHOD**. After the washing procedure, the plate is inverted and tapped dry on absorbent tissue.

Alternatively, the *Wash Buffer* may be put into a squirt bottle. If a squirt bottle is used, flood the plate with *Wash Buffer*, completely filling all wells. After the washing procedure, the plate is inverted and tapped dry on absorbent tissue.

If using an automated washer, the operating instructions for washing equipment should be carefully followed. If your automated washer allows, 30 second soak cycles should be programmed into the wash cycle.

9

SAMPLE PREPARATION

Purification Procedure:

While the following purification protocol works well for many samples, it is important to be aware that it may not be sufficient for the purification of PGE₂ from all samples.

1. Split samples into two equal parts and place each sample into clean test tubes.
2. Spike one of these sets of samples with PGE₂.
3. Perform the following steps on all samples:
 - a. Acidify the sample to pH <4.0 by the addition of 1.0 M HCl.
 - b. Prepare a SPE C-18 cartridge by conditioning it first with 5 mL of methanol followed by 5 mL distilled or deionized water.
 - c. Apply the sample and allow to flow through the column.
 - d. Rinse the column with 5 mL distilled or deionized water, followed by 5 mL hexane. Allow the column to become dry following the hexane wash.
 - e. Elute the PGE₂ with 5 mL ethyl acetate containing 1% methanol. If unable to run the assay at this time, store the samples in ethyl acetate/methanol at -80°C.
 - f. Dry the sample under a stream of nitrogen. Reconstitute the sample in 1x Tris Buffer. Assay both unspiked and spiked samples with the ELISA.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

- A. All diluted buffers should be stored at 2 to 8°C. When stored in this manner, they will be stable for approximately two months.

10

1. **Tris Buffer.**
Dilute the contents of one vial of *Tris Buffer Concentrate* with 90 mL of distilled or deionized water. It is common for the concentrated buffer to contain crystalline salts after thawing. It is important to rinse the vial to obtain any salts that may have precipitated.
2. **Wash Buffer.**
Dilute the 5 mL vial of *Wash Buffer Concentrate* to a final volume of 750 mL with distilled or deionized water.
3. **DEA Buffer.**
Dilute the 2.5 mL vial of *DEA Buffer Concentrate* to a final volume of 25 mL with distilled or deionized water.
4. **Prostaglandin E₂ Standard.**
(*Note: If assaying culture medium samples that have not been diluted with Tris Buffer, the culture medium rather than Tris Buffer should be used for dilution of the standard curve.*)

Equilibrate a pipette tip in ethanol, by repeatedly filling and expelling. Use the equilibrated pipette tip to transfer 200 µL of the *PGE₂ Standard* into a clean test tube. Dilute with 300 µL distilled or deionized water. The concentration of this stock standard is 40 ng/mL. Label eight glass test tubes #1 through #8. Pipette 900 µL of 1x Tris Buffer into tube #1, and 500 µL into tubes #2 through #8. Transfer 100 µL of the 40 ng/mL standard into tube #1 and vortex to mix. Transfer 500 µL from tube #1 to tube #2. Vortex to mix. Transfer 500 µL from tube #2 to tube #3. Vortex to mix. Continue this process for standard tubes #4 through #8. These diluted standards should be used within twenty-four hours.

11

B. Dilution of Prostaglandin E₂ Standard

Standard:	Add:	Into:
4 ng/mL	100 µL of 40 ng/mL stock std. prepared in Step 4.	900 µL 1x Tris Buffer
2 ng/mL	500 µL of the 4 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
1 ng/mL	500 µL of the 2 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
0.5 ng/mL	500 µL of the 1 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
0.25 ng/mL	500 µL of the 0.5 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
0.13 ng/mL	500 µL of the 0.25 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
0.06 ng/mL	500 µL of the 0.13 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer
0.03 ng/mL	500 µL of the 0.06 ng/mL std.	500 µL 1x Tris Buffer

Diluted standards may be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours.

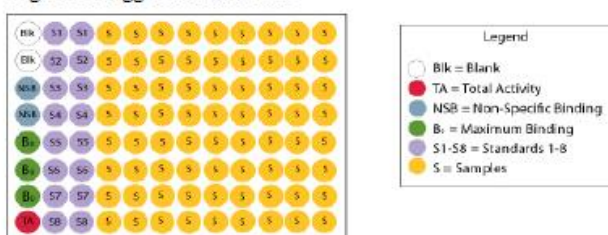
12

5. **Prostaglandin E_2 Alkaline Phosphatase Tracer.**
Reconstitute the *PGE₂ Alkaline Phosphatase Tracer* with 6 mL of 1x Tris buffer. Vortex to mix. Store this reconstituted tracer at 2 to 8°C and use within four weeks.
6. **Prostaglandin E_2 Monoclonal Antibody.**
Reconstitute the *PGE₂ Monoclonal Antibody* with 6 mL of 1x Tris Buffer. Vortex to mix. Store this reconstituted antiserum at 2 to 8°C and use within four weeks.

ASSAY METHOD: PROCEDURE

(Note: All reagents should be allowed to warm to room temperature before use.)

Figure 1: Suggested Plate Plan.



1. Pipette 150 μ L 1x Tris Buffer into non-specific binding (NSB) wells, and 100 μ L 1x Tris Buffer into zero standard (B_0) wells. If tissue culture medium was used to dilute the standard, substitute 100 μ L of this same medium for the Tris Buffer in the NSB and B_0 wells.

13

2. Pipette 100 μ L of *Prostaglandin E_2 Standard* into the appropriate wells.
3. Pipette 100 μ L of samples into the appropriate wells. Each sample should be assayed in duplicate or triplicate.
4. Pipette 50 μ L of *Prostaglandin E_2 Alkaline Phosphatase Tracer* into each well except the blank wells and total activity (TA) wells.
5. Pipette 50 μ L of *Prostaglandin E_2 Antibody* into each well except the blank wells, TA wells and NSB wells

Note: The table below specifies reagents required for designated wells. Reading across the table, confirm you added the correct reagent(s) to each well.

Well	Tris Buffer	Std/Sample	Tracer	Antibody
Blank	-	-	-	-
TA	-	-	5 μ L (at development)	-
NSB	150 μ L	-	50 μ L	-
B_0	100 μ L	-	50 μ L	50 μ L
Std/Sample	-	100 μ L	50 μ L	50 μ L

DEFINITIONS OF KEY TERMS

Blank - No sample; to measure background absorbance.

TA (Total Activity) - total activity of the AP-linked tracer.

14

NSB (Non-Specific Binding) - non-immunological binding of the tracer to the well.

B_0 (Maximum Binding) - maximum amount of the tracer that the antiserum can bind in the absence of the analyte.

6. Cover each plate with a plate cover and incubate for two hours at room temperature on an orbital shaker.
7. Dissolve 5 pNPP tablets in 25 mL 1x DEA buffer (25 mL is sufficient to develop 100 wells). *[Note: Reconstituted pNPP is not stable, so we recommend that you make only the amount that you need at any one time.]*
8. Thoroughly aspirate or decant solution from wells and discard the liquid. Wash wells 5 times. See **DIRECTIONS FOR WASHING**.
9. Add 200 μ L pNPP solution to each well including blank and TA wells. Add 5 μ L of tracer to the TA wells. Cover the plate and allow to develop in the dark on an orbital shaker. This assay typically develops in approximately 60 to 90 minutes.
10. Wipe the bottom of the plate with a paper towel to remove any finger prints, smudges or dirt which may interfere with obtaining an accurate absorbance reading. Remove the plate cover, and read the plate at a wavelength of between 405 and 420 nm.

15

DATA ANALYSIS

Most plate readers come with data reduction software that plots data automatically. Alternatively a spreadsheet program can be used. The data should be plotted as %B/ B_0 versus log concentration of standard using either a 4-parameter logistic or a log-logit curve fit.

1. Prepare the Data.

The following procedure is recommended to prepare the data prior to graphing:

- a. Subtract the absorbance of the blank wells from all wells on the plate, if not already done.
- b. Average the absorbance readings from the NSB wells.
- c. Average the absorbance readings from the B_0 wells.
- d. Subtract the average NSB from the average B_0 . This is the corrected B_0 .

$$\text{Corrected } B_0 = \text{Average } B_0 - \text{Average NSB}$$

- e. Calculate the %B/ B_0 for each standard and sample. To do this, subtract the average NSB absorbance from the standard and sample absorbances and divide by the corrected B_0 (from step d). Multiply by 100 to obtain %B/ B_0 . Repeat for all wells.

$$\%B/B_0 = \left[\frac{\text{Absorbance} - \text{Average NSB}}{\text{Corrected } B_0} \right] \times 100$$

16

2. **Plot the Standard Curve.**

Plot %B/B₀ for all standards *versus* PGE₂ concentration using log (x) and linear (y) axes, and fit the data to a four parameter logistic equation. Alternatively, the data can be linearized using a logit transformation. [Note: Do not use %B/B₀ in this calculation.]

$$\text{Logit (B/B}_0\text{)} = \ln [\text{B/B}_0\text{/(1-B/B}_0\text{)}]$$

Plot the data as logit (B/B₀) *versus* log concentration of standard and perform a linear regression fit.

3. **Determine the Concentration of your Samples.**

Calculate the %B/B₀ for each sample. Determine the concentration of each sample using the equations obtained from the analysis of the standard curve. Remember to account for any dilution made to the sample prior to addition to the well. %B/B₀ values of greater than 80% or less than 20% should be re-assayed as they generally fall outside of the linear range of the standard curve.

4. **Correct for Recovery (if purification was performed).**

Divide the concentration determined in step #3 by the recovery factor. Correct for any volume changes of the sample which may have occurred during purification.

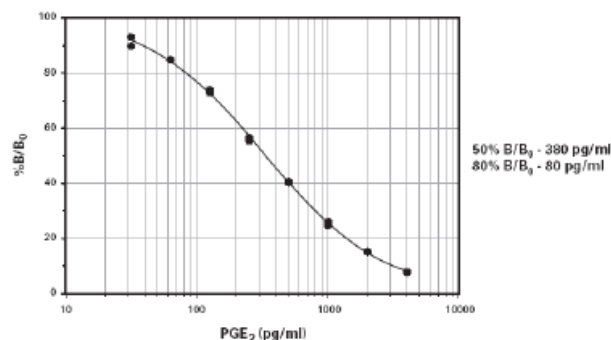
$$\text{Recovery Factor} = \frac{\text{ELISA value of spiked (pg/mL)} - \text{ELISA value of unspiked sample (pg/mL)}}{\text{Concentration of spike (pg/mL)}}$$

17

TYPICAL DATA

The standard curve is an example of data typically produced by this kit (Figure 2). Your results will vary from these, and it is therefore important that you run a standard curve each time you use the kit.

Figure 2: Standard curve for Prostaglandin E₂



LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

For Research Use Only. CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

18

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. PRECISION

Intra-assay precision was determined by measuring samples containing low, medium, and high concentrations of PGE₂ multiple times in the same assay (eight samples per plate on a total of five plates). Inter-assay precision was determined by measuring low, medium, and high concentrations of the samples in eight separate assays.

	PGE ₂ (pg/mL)	Intra-assay % CV	Inter-assay % CV
High	1000	3.5	9.3
Medium	500	4.5	9.8
Low	125	9.9	15.9

19

2. SPECIFICITY

Buffered solutions of a panel of substances were assayed. The following substances were tested and their corresponding cross reactivity percentages are noted.

Analyte	Cross-Reactivity	Analyte	Cross-Reactivity
Prostaglandin E ₂	100%	Prostaglandin B ₂	<0.01%
Prostaglandin E ₂ Ethanolamide	100%	Prostaglandin D ₂	<0.01%
Prostaglandin E ₃	43.0%	15-keto Prostaglandin E ₂	<0.01%
8-iso Prostaglandin E ₂	37.4%	Prostaglandin F _{1a}	<0.01%
Prostaglandin E ₁	18.7%	Prostaglandin F _{2a}	<0.01%
6-keto Prostaglandin F _{1a}	1.0%	13, 14-dihydro-15-keto Prostaglandin F _{2a}	<0.01%
8-iso Prostaglandin F _{2a}	0.25%	Prostaglandin F _{3a}	<0.01%
Prostaglandin A ₁	<0.01%	Thromboxane B ₂	<0.01%
Prostaglandin A ₂	<0.01%	Tetranor PGEM	<0.01%
Prostaglandin A ₃	<0.01%	Tetranor PGFM	<0.01%
Prostaglandin B ₁	<0.01%		

20

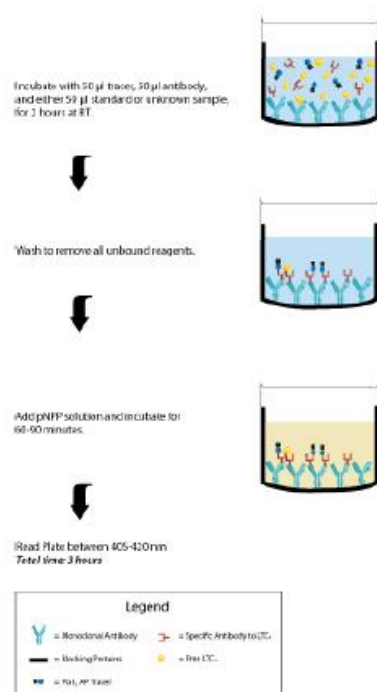
REFERENCES

1. Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69:145-182.
 2. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875.
 3. Helliwell, R.J.A., Adams, L.F., and Mitchell, M.D. (2004) Prostaglandin synthases: Recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70:101-113.
 4. Robert, A., Schultz, J.R., Nezamis, J.E., *et al.* (1976) Gastric antisecretory and antiulcer properties of PGE₂, 15-methyl PGE₂, and 16,16-dimethyl PGE₂. Intravenous, oral and intrajejunal administration. *Gastroenterology* 70:359-370.
 5. Arvind, P., Papavassiliou, E.D., Tsioulas, G.J., *et al.* (1995) Prostaglandin E₂ down-regulates the expression of HLA-DR antigen in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biochemistry* 34:5604-5609.
 6. Jackson, G.M., Sharp, H.T., and Vamer, M.W. (1994) Cervical ripening before induction of labor: A randomized trial of prostaglandin E₂ gel versus low-dose oxytocin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171:1092-1096.
 7. Willis, A.L. and Comelsen, M. (1973) Repeated injection of prostaglandin E₂ in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. *Prostaglandins* 3:353-357.
 8. Negishi, M., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. (1993) Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog. Lipid Res.* 32:417-434.
-
9. Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79:1193-1226.
 10. Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., *et al.* (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1483:285-293.
 11. Hamberg, M. and Samuelsson, B. (1971) On the metabolism of prostaglandins E₁ and E₂ in man. *J. Biol. Chem.* 246:6713-6721.
 12. Granström, E., Hamberg, M., Hansson, G., *et al.* (1980) Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂: The reason for low assay reliability. *Prostaglandins* 19:933-945.
 13. Fitzpatrick, F.A., Aguirre, R., Pike, J.E., *et al.* (1980) The stability of 13,14-dihydro-15 keto-PGE₂. *Prostaglandins* 19:917-931.

9. Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79:1193-1226.
10. Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., *et al.* (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim. Biophys. Acta* 1483:285-293.
11. Hamberg, M. and Samuelsson, B. (1971) On the metabolism of prostaglandins E_1 and E_2 in man. *J. Biol. Chem.* 246:6713-6721.
12. Granström, E., Hamberg, M., Hansson, G., *et al.* (1980) Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂: The reason for low assay reliability. *Prostaglandins* 19:933-945.
13. Fitzpatrick, F.A., Aguirre, R., Pike, J.E., *et al.* (1980) The stability of 13,14-dihydro-15 keto-PGE₂. *Prostaglandins* 19:917-931.

22

Prostaglandin E₂ Assay Summary



24

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFOLARANMI, G. A.; AKBAR, M.; BREWER, J.; GRANT, M. H. Distribution of metal released from cobalt-chromium alloy orthopaedic wear particles implanted into air pouches in mice. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 6, p. 1529–1538, 2012.
- ALDERIGHI, L.; GANS, P.; IENCO, A.; PETERS, D.; SABATINI, A.; VACCA, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184, p. 311–318, 1999.
- ALMEIDA, A.; GUPTA, D.; LOABLE, C.; VILAR, R. Laser-assisted synthesis of Ti-Mo alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1190–1195, 2012.
- ALVES, A. C.; OLIVEIRA, F.; WENGER, F.; PONTIAUX, P.; CELIS, J.-P.; ROCHA, L. A. 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.; ROSSI, A. L.; RIBEIRO, A. R.; TOPTAN, F.; PINTO, A. M.; CELIS, J. P.; SHOKUH FAR, T.; ROCHA, L. A. Tribo-electrochemical behavior of bio-functionalized TiO₂ nanotubes in artificial saliva: Understanding of degradation mechanisms. **Wear**, v. 384–385, n. February, p. 28–42, 2017.
- ALVES, S. A.; SAÉNZ, R. B. V.; GARCIA, D. V. M. P.; IGARTUA, A.; FERNANDES, M. H.; ROCHA, L. A. 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, 2015.
- AMANATULLAH, D. F.; SUCHER, M. G.; BONADURER, G. F.; PEREIRA, G. C.; TAUNTON, M. J. Metal in Total Hip Arthroplasty: Wear Particles, Biology, and Diagnosis. **Orthopedics**, v. 39, n. 6, p. 371–379, 2016.

ANANTH, H.; KUNDAPUR, V.; MOHAMMED, H. S.; ANAND, M.; AMARNATH, G. S.; MANKAR, S. A review on biomaterials in dental implantology. **International Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 3, p. 113–120, 2015.

ANISSIAN, L.; STARK, A.; DAHLSTRAND, H.; GRANBERG, B.; GOOD, V.; BUCHT, E. Cobalt ions influence proliferation and function of human osteoblast-like cells. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 73, n. 3, p. 369–374, 2002.

ANKE, M.; SEIFERT, M.; ARNHOLD, W.; ANKE, S.; SCHÄFER, U. The biological and toxicological importance of molybdenum in the environment and in the nutrition of plants, animals and man. **Acta Alimentaria**, v. 39, n. 1, p. 12–26, 2010.

BABILAS, D.; SŁUZALSKA, K.; KRZĄKAŁA, A.; MACIEJ, A.; SOCHA, R. P.; DERCZ, G.; TYLKO, G.; MICHALSKA, J.; OSYCZKA, A. M.; SIMKA, W. Plasma electrolytic oxidation of a Ti-15Mo alloy in silicate solutions. **Materials Letters**, v. 100, p. 252–256, 2013.

BANERJEE, D.; WILLIAMS, J. C. Perspectives on titanium science and technology. **Acta Materialia**, v. 61, n. 3, p. 844–879, 2013.

BARÃO, V. A. R.; MATHEW, M. T.; ASSUNÇÃO, W. G.; YUAN, J. C. C.; WIMMER, M. A.; SUKOTJO, C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 9, p. 1055–1062, 2012.

BARRY, M.; KENNEDY, D.; KEATING, K.; SCHAUPERL, Z. Design of dynamic test equipment for the testing of dental implants. **Materials & Design**, v. 26, n. 3, p. 209–216, 2005.

BEZERRA, F.; FERREIRA, M. R.; FONTES, G. N.; FERNANDES, C. J. C.; ANDIA, D. C.; CRUZ, N. C.; SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 8, p. 1888–1898, 2017.

BI, Y.; SEABOLD, J. M.; KAAR, S. G.; RAGAB, a a; GOLDBERG, V. M.; ANDERSON, J. M.; GREENFIELD, E. M. Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2082–2091, 2001.

BILLI, F.; BENYA, P.; KAVANAUGH, A.; ADAMS, J.; EBRAMZADEH, E.; MCKELLOP, H. The John Charnley award: An accurate and sensitive method to separate, display, and characterize wear debris: Part 1: Polyethylene particles. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 470, n. 2, p. 329–338, 2012.

BITAR, D.; PARVIZI, J. Biological response to prosthetic debris. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 2, p. 172–189, 2015.

BITOUNIS, D.; POURCHEZ, J.; FOREST, V.; BOUDARD, D.; COTTIER, M.; KLEIN, J. P. Detection and analysis of nanoparticles in patients: A critical review of the status quo of clinical nanotoxicology. **Biomaterials**, v. 76, p. 302–312, 2016.

BRAR, S.; HENDERSON, D.; SCHENCK, J.; ZIMMERMAN, E. a. Iron accumulation in the substantia nigra of patients with Alzheimer disease and parkinsonism. **Arch Neurol**, v. 66, n. 3, p. 371–374, 2009.

BREME, J.; BIEHL, V. Metallic Biomaterials. In: MURPHY, W.; BLACK, J.; HASTINGS, H. (Ed.). **Handbook of biomaterials properties**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2016. p. 676.

BROWN, C.; WILLIAMS, S.; TIPPER, J. L.; FISHER, J.; INGHAM, E. Characterisation of wear particles produced by metal on metal and ceramic on metal hip prostheses under standard and microseparation simulation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 819–827, 2007.

BUCHLOH, S.; STIEGER, B.; MEIER, P. J.; GAUCKLER, L. Hepatocyte performance on different crystallographic faces of rutile. **Biomaterials**, v. 24, n. 15, p. 2605–2610, 2003.

BUKATA, S. V.; GELINAS, J.; WEI, X.; ROSIER, R. N.; PUZAS, J. E.; ZHANG, X.; SCHWARZ, E. M.; SONG, X. Y. R.; GRISWOLD, D. E.; O'KEEFE, R. J. PGE2 and IL-6 production by fibroblasts in response to titanium wear debris particles is mediated through a Cox-2 dependent pathway. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 1, p. 6–12, 2004.

CADOSCH, D.; SUTANTO, M.; CHAN, E.; MHAWI, A.; GAUTSCHI, O. P.; VON KATTERFELD, B.; SIMMEN, H. P.; FILGUEIRA, L. Titanium uptake, induction of RANK-L expression, and enhanced proliferation of human T-lymphocytes. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 3, p. 341–347, 2010.

CALIN, M.; GEBERT, A.; GHINEA, A. C.; GOSTIN, P. F.; ABDI, S.; MICKEL, C.; ECKERT, J. Designing biocompatible Ti-based metallic glasses for implant applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 875–883, 2013.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: An introduction**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2007.

CATHERINE A MCINTYRE, P.; REININ, G. Reduction in endotoxin levels after performing the prepare for aseptic sort procedure on the BD FACSAria II flow cytometer. **BD Biosciences Application Note**, n. November, p. 12, 2009.

CELIS, J. P.; PONTIAUX, P.; WENGER, F. Tribo-corrosion of materials: Interplay between chemical, electrochemical, and mechanical reactivity of surfaces. **Wear**, v. 261, n. 9, p. 939–946, 2006.

CHAMPION, J.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 8, p. 1815–1821, 2008.

CHAN, E. P.; MHAWI, A.; CLODE, P.; SAUNDERS, M.; FILGUEIRA, L. Effects of titanium(IV) ions on human monocyte-derived dendritic cells. **Metallomics**, v. 1, n. 2, p. 166, 2009.

CHEN, H. T.; CHUNG, C. J.; YANG, T. C.; TANG, C. H.; HE, J. L. Microscopic observations of osteoblast growth on micro-arc oxidized β titanium. **Applied Surface Science**, v. 266, p. 73–80, 2013.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. **Biomaterials - A basic introduction**. New York: CRC Press, 2014.

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

CHEN, Y. Y.; XU, L. J.; LIU, Z. G.; KONG, F. T.; CHEN, Z. Y. Microstructures and properties of titanium alloys Ti-Mo for dental use. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 16, n. SUPPL., p. 2–6, 2006.

CONTRERAS-CADENA, D. A.; GÓMEZ-PECH, C.; RANGEL-GARCÍA, M.; RUIZ-HERNÁNDEZ, A.; MARTINEZ-BULIT, P.; BARBA-BEHRENS, N. La importancia del vanadio en los seres vivos. **Educación Química**, v. 25, p. 245–253, 2014.

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, 2017.

CORREA, D. R. N. **Efeitos de elementos substitucionais e intersticiais nas propriedades mecânicas e na biocompatibilidade de ligas do sistema Ti-15Zr-xMo**. 2015. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 2015.

CORREA, D. R. N.; KURODA, P. A. B.; GRANDINI, C. R.; ROCHA, L. A.; OLIVEIRA, F. G. M.; ALVES, A. C.; TOPTAN, F. Tribocorrosion behavior of β -type Ti-15Zr-based alloys. **Materials Letters**, v. 179, p. 118–121, 2016.

CORREA, D. R. N.; VICENTE, F. B.; ARAUJO, R. O.; LOURENÇO, M. L.; KURODA, P. A. B.; BUZALAF, M. A. R.; GRANDINI, C. R. Effect of the substitutional elements on the microstructure of the Ti-15Mo-Zr and Ti-15Zr-Mo systems alloys. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 4, n. 2, p. 180–185, 2015.

CORTIZO, A. M.; SÁLICE, V. C.; VESCINA, C. M.; ETCHEVERRY, S. B. Proliferative and morphological changes induced by vanadium compounds on Swiss 3T3 fibroblasts. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 10, n. 2, p. 127–133, 1997.

COSTA E SILVA, A. L. V.; MEI, P. R. **Aços ferramenta, inoxidáveis e ligas especiais**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2010.

COSTA PESSOA, J.; GARRIBBA, E.; SANTOS, M. F. A.; SANTOS-SILVA, T. Vanadium and proteins: uptake, transport, structure, activity and function. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 49–86, 2015.

CRANS, D. C.; BUNCH, R. L.; THEISEN, L. A. Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 19, p. 7597–7607, 1989.

CRANS, D. C.; SMEE, J. J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 849–902, 2004.

CRANS, D. C.; TARLTON, M. L.; MCLAUCHLAN, C. C. Trigonal bipyramidal or square pyramidal coordination geometry? Investigating the most potent geometry for vanadium phosphatase inhibitors. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2014, n. 27, p. 4450–4468, 2014.

CRUZ, H. V.; SOUZA, J. C. M.; HENRIQUES, M.; ROCHA, L. A. Tribocorrosion and Bio-Tribocorrosion in the Oral Environment: The Case of Dental Implants. In: **Biomedical Tribology**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2011. p. 1–33.

CVIJOVIĆ-ALAGIĆ, I.; CVIJOVIĆ, Z.; BAJAT, J.; RAKIN, M. Electrochemical behaviour of Ti-6Al-4V alloy with different microstructures in a simulated bio-environment. **Materials and Corrosion**, v. 67, n. 10, p. 1075–1087, 2016.

CVIJOVIC-ALAGIC, I.; CVIJOVIC, Z.; MITROVIC, S.; PANIC, V.; RAKIN, M. 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, 2011.

DALEY, B.; DOHERTY, A. T.; FAIRMAN, B.; CASE, C. P. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 86, n. 4, p. 598–606, 2004.

DARBRE, P. D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 121–143, 2006.

DAVIS, J. R. **Handbook of Materials for Medical Devices**. Materials Park, Ohio: ASM International, 2003.

DIAS, D. M.; RODRIGUES, J. P. G. L. M.; DOMINGUES, N. S.; BONVIN, A. M. J. J.; CASTRO, M. M. C. A. Unveiling the interaction of vanadium compounds with human serum albumin using ^1H STD NMR and computational docking studies. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 26, p. 4619–4627, 2013.

DIMAH, M. K.; DEVESA ALBEZA, F.; AMIGÓ BORRÁS, V.; IGUAL MUÑOZ, A. Study of the biotribocorrosion behaviour of titanium biomedical alloys in simulated body fluids by electrochemical techniques. **Wear**, v. 294–295, p. 409–418, 2012.

DONATO, T. A. G.; DE ALMEIDA, L. H.; NOGUEIRA, R. A.; NIEMEYER, T. C.; GRANDINI, C. R.; CARAM, R.; SCHNEIDER, S. G.; SANTOS, A. R. Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 4, p. 1365–1369, 2009.

DONI, Z.; ALVES, A. C.; TOPTAN, F.; GOMES, J. R.; RAMALHO, A.; BUCIUMEANU, M.; PALAGHIAN, L.; SILVA, F. S. Dry sliding and tribocorrosion behaviour of hot pressed CoCrMo biomedical alloy as compared with the cast CoCrMo and Ti6Al4V alloys. **Materials and Design**, v. 52, p. 47–57, 2013.

ELBERG, G.; LI, J.; SHECHTER, Y. Vanadium activates or inhibits receptor and non-receptor protein tyrosine kinases in cell-free experiments, depending on its oxidation state: Possible role of endogenous vanadium in controlling cellular protein tyrosine kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 13, p. 9521–9527, 1994.

ELIAS, C. N.; FERNANDES, D. J.; RESENDE, C. R.; ROESTEL, J. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. **Dental Materials**, v. 31, n. 2, p. e1–e13, 2015.

ELVINGSON, K.; GONZÁLES BARÓ, A.; PETTERSSON, L. Speciation in vanadium bioinorganic systems. 2. An NMR, ESR, and potentiometric study of the aqueous H^+ –vanadate–maltol system. **Inorganic Chemistry**, v. 35, p. 3388–3393, 1996.

ESEN, E.; LONG, F. Aerobic glycolysis in osteoblasts. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 4, p. 433–438, 2014.

FAGHIHI, S.; AZARI, F.; SZPUNAR, J. A.; VALI, H.; TABRIZIAN, M. Titanium crystal orientation as a tool for the improved and regulated cell attachment. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 91A, n. 3, p. 656–662, 2009.

FELGUEIRAS, H. P.; CASTANHEIRA, L.; CHANGOTADE, S.; POIRIER, F.; OUGHLIS, S.; HENRIQUES, M.; CHAKAR, C.; NAAMAN, N.; YOUNES, R.; MIGONNEY, V.; CELIS, J. P.; PONTIAUX, P.; ROCHA, L. A.; LUTOMSKI, D. Biotribocorrosion (tribo-electrochemical) characterization of anodized titanium biomaterial containing calcium and phosphorus before and after osteoblastic cell culture. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B**, v. 103, n. 3, p. 661–669, 2015.

FERNANDES, C. J. C.; BEZERRA, F.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, A. F. C.; PINTO, T. S.; ZAMBUZZI, W. F. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM remodeling. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 321–328, 2018.

FERREIRA, P. C.; PIAI, K. D. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 16, n. 1, p. 151–157, 2008.

FERRER, E. G.; BOSCH, A.; YANTORNO, O.; BARAN, E. J. A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin. **Bioorganinc Medical Chemistry**, v. 16, p. 3878–3886, 2008.

FERRER, E. G.; SALINAS, M. V.; CORREA, M. J.; NASO, L.; BARRIO, D. A.; ETCHEVERRY, S. B.; LEZAMA, L.; ROJO, T.; WILLIAMS, P. A. M. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 791–801, 2006.

GALLO, J.; RAŠKA, M.; MRÁZEK, F.; PETREK, M. Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. **Physiological Research**, v. 57, n. 3, p. 339–349, 2008.

GALLO, J.; SLOUF, M.; GOODMAN, S. B. The relationship of polyethylene wear to particle size, distribution, and number: A possible factor explaining the risk of osteolysis after hip arthroplasty. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 94, n. 1, p. 171–177, 2010.

GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009.

GEPREEL, M. A.-H.; NIINOMI, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 20, p. 407–415, 2013.

GHONEIM, A. A.; MOGODA, A. S.; AWAD, K. A.; HEAKAL, F. E. Electrochemical Studies of Titanium and its Ti-6Al-4V Alloy in Phosphoric Acid Solutions. **Int. J. Electrchem. Sci**, v. 7, p. 6539–6554, 2012.

GHOSH, S. K.; SAHA, R.; SAHA, B. Toxicity of inorganic vanadium compounds. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, n. 7, p. 4873–4897, 2015.

GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. **Central European Journal of Biology**, v. 1, n. 3, p. 314–332, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11535-006-0029-z>>.

GOMES, C. C.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, V. J. S. V; RAMOS, A. S.; LYON, J. P.; SOARES, C. P.; SANTOS, F. V. Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 116–121, 2011.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: The uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811–6817, 2005.

GOTTLOW, J.; DARD, M.; KJELLSON, F.; OBRECHT, M.; SENNERBY, L. Evaluation of a new Titanium-Zirconium dental implant: A biomechanical and histological comparative study in the mini pig. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 4, p. 538–545, 2012.

GRANDIN, H. M.; BERNER, S.; DARD, M. A review of Titanium-Zirconium (TiZr) alloys for use in endosseous dental implants. **Materials**, v. 5, n. 8, p. 1348–1360, 2012.

GRANDJEAN, J.; LE GOÏC, G.; FAVRELIERE, H.; LEDOUX, Y.; SAMPER, S.; FORMOSA, F.; DEVUN, L.; GRADEL, T. Multi-scalar analysis of hip implant components using modal decomposition. **Measurement Science and Technology**, v. 23, p. NC, 2012.

GREENFIELD, E. M.; BI, Y.; RAGAB, A. A.; GOLDBERG, V. M.; NALEPKA, J. L.; SEABOLD, J. M. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 72, n. 1, p. 179–185, 2005.

HALLAB, N. J.; JACOBS, J. J. Biologic effects of implant debris. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 67, n. 2, p. 182–188, 2009.

HALLAB, N. J.; JACOBS, J. J. Chemokines associated with pathologic responses to orthopedic implant debris. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2017.

HALLAB, N. J.; MIKECZ, K.; VERMES, C.; SKIPOR, A.; JACOBS, J. J. Orthopaedic implant related metal toxicity in terms of human lymphocyte reactivity to metal-protein complexes produced from cobalt-base and titanium-base implant alloy degradation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 222, n. 1–2, p. 127–136, 2001.

HALLAB, N. J.; VERMES, C.; MESSINA, C.; ROEBUCK, K. A.; GLANT, T. T.; JACOBS, J. J. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, n. 3, p. 420–433, 2002.

HANAWA, T. Biofunctionalization of titanium for dental implant. **Japanese Dental Science Review**, v. 46, n. 2, p. 93–101, 2010.

HOLLINGER, J. O. Consensus definitions, fundamental concepts, and a standardized approach to applied biomaterials sciences. In: **An Introduction to Biomaterials**. 2. ed. New York: Taylor and Francis Group, 2012. p. 1–4.

HONGTAO, L.; SHIRONG, G.; SHOUFAN, C.; SHIBO, W. Comparison of wear debris generated from ultra high molecular weight polyethylene in vivo and in artificial joint simulator. **Wear**, v. 271, n. 5–6, p. 647–652, 2011.

HOREV-AZARIA, L.; KIRKPATRICK, C. J.; KORENSTEIN, R.; MARCHE, P. N.; MAIMON, O.; PONTI, J.; ROMANO, R.; ROSSI, F.; GOLLA-SCHINDLER, U.; SOMMER, D.; UBOLDI, C.; UNGER, R. E.; VILLIERS, C. Predictive toxicology of cobalt nanoparticles and ions: Comparative in vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 489–501, 2011.

INGRAM, J. L.; ANTAO-MENEZES, A.; TURPIN, E. a; WALLACE, D. G.; MANGUM, J. B.; PLUTA, L. J.; THOMAS, R. S.; BONNER, J. C. Genomic analysis of human lung fibroblasts exposed to vanadium pentoxide to identify candidate genes for occupational bronchitis. **Respiratory research**, v. 8, p. 34, 2007.

IVANKOVIĆ, S.; MUSIĆ, S.; GOTIĆ, M.; LJUBEŠIĆ, N. Cytotoxicity of nanosize V₂O₅ particles to selected fibroblast and tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 3, p. 286–294, 2006.

JAIMES, R. F. V. V.; AFONSO, M. L. C. de A.; ROGERO, S. O.; AGOSTINHO, S. M. L.; BARBOSA, C. A. New material for orthopedic implants: Electrochemical study of nickel free P558 stainless steel in minimum essential medium. **Materials Letters**, v. 64, n. 13, p. 1476–1479, 2010.

JAKUSCH, T.; DEAN, A.; ONCSIK, T.; BENYEI, A. C.; DI MARCO, V.; KISS, T. Vanadate complexes in serum: a speciation modeling study. **Dalton Transactions**, v. 39, p. 212–220, 2010.

KONTTINEN, Y. T.; PAJARINEN, J. Adverse reactions to metal-on-metal implants. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, p. 5–6, 2013.

KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. Vanadium Compounds as Pro-Inflammatory Agents: Effects on Cyclooxygenases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12648–12668, 2015.

KOSEKI, H.; MATSUMOTO, T.; ITO, S.; DOUKAWA, H.; ENOMOTO, H.; SHINDO, H. Analysis of polyethylene particles isolated from periprosthetic tissue of loosened hip arthroplasty and comparison with radiographic appearance. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 10, n. 3, p. 284–290, 2005.

KREJSA, C. M.; NADLER, S. G.; ESSELSTYN, J. M.; KAVANAGH, T. J.; LEDBETTER, J. A.; SCHIEVEN, G. L. Role of oxidative stress in the action of vanadium fosfotyrosine phosphatase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 17, p. 11541–11549, 1997.

KUMAR, S.; SANKARA NARAYANANA, T. S. N.; GANESH SUNDARA RAMAN, S.; SESHADRI, S. K. Surface modification of CP-Ti to improve the fretting-corrosion resistance: Thermal oxidation vs. anodizing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 6, p. 921–927, 2010.

KUPHASUK, C.; OSHIDA, Y.; ANDRES, C. J.; HOVIJITRA, S. T.; BARCO, M. T.; BROWN, D. T. Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 195–202, 2001.

KWON, Y.-M.; XIA, Z.; GLYN-JONES, S.; BEARD, D.; GILL, H. S.; MURRAY, D. W. Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro. **Biomedical Materials**, v. 4, n. 2, p. 25018, 2009.

LANDGRAEBER, S.; JÄGER, M.; JACOBS, J. J.; HALLAB, N. J. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. **Mediators of Inflammation**, p. 185150, 2014.

LEVINA, A.; CRANS, D. C.; LAY, P. A. Speciation of metal drugs, supplements and toxins in media and bodily fluids controls in vitro activities. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 473–498, 2017.

LEYENS, C.; PETERS, M. **Titanium and titanium alloys: Fundamentals and applications**. Weinheim: WILEY-VCH, 2003.

LI, X.; LIU, W.; SUN, L.; AIFANTIS, K. E.; YU, B.; FAN, Y.; FENG, Q.; CUI, F.; WATARI, F. Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 7, p. 2499–2507, 2014a.

LI, Y.; BORASCHI, D. Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies. **Nanomedicine**, v. 11, n. 3, p. 269–287, 2016.

LI, Y.; WONG, C.; XIONG, J.; HODGSON, P.; WEN, C. Cytotoxicity of Titanium and Titanium Alloying Elements. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 5, p. 493–497, 2010.

LI, Y.; YANG, C.; ZHAO, H.; QU, S.; LI, X.; LI, Y. New developments of ti-based alloys for biomedical applications. **Materials**, v. 7, n. 3, p. 1709–1800, 2014b.

LIBER, K.; DOIG, L. E.; WHITE-SOBEY, S. L. Toxicity of uranium, molybdenum, nickel, and arsenic to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutus* in water-only and spiked-sediment toxicity tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1171–1179, 2011.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 47, n. 3–4, p. 49–121, 2004.

LOHMANN, C. H.; SCHWARTZ, Z.; KÖSTER, G.; JAHN, U.; BUCHHORN, G. H.; MACDOUGALL, M. J.; CASASOLA, D.; LIU, Y.; SYLVIA, V. L.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. **Biomaterials**, v. 21, n. 6, p. 551–561, 2000.

MADEJCZYK, M. S.; BAER, C. E.; DENNIS, W. E.; MINARCHICK, V. C.; LEONARD, S. S.; JACKSON, D. A.; STALLINGS, J. D.; LEWIS, J. A. Temporal changes in rat liver gene expression after acute cadmium and chromium exposure. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–27, 2015.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C. V. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review. v. 10, n. 3, p. 1–15, 2011.

MARTIN, É.; AZZI, M.; SALISHCHEV, G. A.; SZPUNAR, J. Influence of microstructure and texture on the corrosion and tribocorrosion behavior of Ti-6Al-4V. **Tribology International**, v. 43, n. 5–6, p. 918–924, 2010.

MARTINS JÚNIOR, J. R. S.; NOGUEIRA, R. A.; ARAÚJO, R. O. de; DONATO, T. A. G.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; CLARO, A. P. R. A.; MORAES, J. C. S.; BUZALAF, M. A. R.; GRANDINI, C. R. Preparation and characterization of Ti-15Mo alloy used as biomaterial. **Materials Research**, v. 14, n. 1, p. 107–112, 2011.

MARUYAMA, K.; SANO, G. I.; MATSUO, K. Murine osteoblasts respond to LPS and IFN- γ similarly to macrophages. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 24, n. 6, p. 454–460, 2006.

MATHEW, M. T.; ABBEY, S.; HALLAB, N. J.; HALL, D. J.; SUKOTJO, C.; WIMMER, M. A. Influence of pH on the tribocorrosion behavior of CpTi in the oral environment: Synergistic interactions of wear and corrosion. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100 B, n. 6, p. 1662–1671, 2012.

MATHEW, M. T.; SRINIVASA PAI, P.; POURZAL, R.; FISCHER, A.; WIMMER, M. A. Significance of tribocorrosion in biomedical applications: Overview and current status. **Advances in Tribology**, v. 2009, 2009.

MCLAUCHLAN, C. C.; HOOKER, J. D.; JONES, M. A.; DYMON, Z.; BACKHUS, E. A.; GREINER, B. A.; DORNER, N. A.; YOUKHANA, M. A.; MANUS, L. M. Inhibition of acid, alkaline, and tyrosine (PTP1B) phosphatases by novel vanadium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 274–281, 2010.

MCLAUCHLAN, C. C.; PETERS, B. J.; WILLSKY, G. R.; CRANS, D. C. Vanadium-phosphatase complexes: Phosphatase inhibitors favor the trigonal bipyramidal transition state geometries. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301, p. 163–199, 2015.

MELLO, G. M. R. **Transformações de fases e características microestruturais de ligas Ti-Al e Ti-Nb**. 2000. Universidade Estadual de Campinas, 2000.

MISCHLER, S. Triboelectrochemical techniques and interpretation methods in tribocorrosion: A comparative evaluation. **Tribology International**, v. 41, n. 7, p. 573–583, 2008.

MISHNAEVSKY, L.; LEVASHOV, E.; VALIEV, R. Z.; SEGURADO, J.; SABIROV, I.; ENIKEEV, N.; PROKOSHKIN, S.; SOLOV'YOV, A. V.; KOROTITSKIY, A.; GUTMANAS, E.; GOTMAN, I.; RABKIN, E.; PSAKH, S.; DLUHOŠ, L.; SEEFELDT, M.

SMOLIN, A. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 81, p. 1–19, 2014.

MORE, N. S.; DIOMIDIS, N.; PAUL, S. N.; ROY, M.; MISCHLER, S. Tribocorrosion behavior of beta- titanium alloys in physiological solutions containing synovial components. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 400–408, 2011.

MOSTARDI, R. A.; KOVACIK, M. W.; RAMSIER, R. D.; BENDER, E. T.; FINEFROCK, J. M.; BEAR, T. F.; ASKEW, M. J. A comparison of the effects of prosthetic and commercially pure metals on retrieved human fibroblasts: The role of surface elemental composition. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 702–707, 2010.

MUKHERJEE, B.; PATRA, B.; MAHAPATRA, S.; BANERJEE, P.; TIWARI, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium - An element of atypical biological significance. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 2, p. 135–143, 2004.

MURR, L. E.; GAYTAN, S. M.; MARTINEZ, E.; MEDINA, F.; WICKER, R. B. Next generation orthopaedic implants by additive manufacturing using electron beam melting. **International Journal of Biomaterials**, n. June 2017, 2012.

NASAB, M. B.; HASSAN, M. R.; SAHARI, B. Bin. Metallic biomaterials of knee and hip - A review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 24, n. 2, p. 69–82, 2010.

NEALE, S. D.; HAYNES, D. R.; HOWIE, D. W.; MURRAY, D. W.; ATHANASOU, N. a. The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro. **The Journal of arthroplasty**, v. 15, n. 5, p. 654–62, 2000.

NEL, A. Toxic Potential of Materials. **Science**, v. 311, n. 5726, p. 622–627, 2007.

NINE, M. J.; CHOUDHURY, D.; HEE, A. C.; MOOTANAH, R.; OSMAN, N. A. A. Wear debris characterization and corresponding biological response: Artificial hip and knee joints. **Materials**, v. 7, n. 2, p. 980–1016, 2014.

NOURI, A.; CHEN, X. B.; HODGSON, P. D.; WEN, C. E. Preparation and characterisation of new titanium based alloys for orthopaedic and dental applications. **Advanced Materials Research**, v. 15–17, p. 71–76, 2007.

OLIVEIRA, C. A.; CANDELÁRIA, I. S.; OLIVEIRA, P. B.; FIGUEIREDO, A.; CASEIRO-ALVES, F. Metallosis: A diagnosis not only in patients with metal-on-metal prostheses. **European Journal of Radiology Open**, v. 2, p. 3–6, 2015a.

OLIVEIRA, F. G. **Biofunctionalization of titanium surfaces for dental implants: osteogenic, anti-microbial, and tribocorrosion resistant surfaces**. 2015. Universidade do Minho, 2015.

OLIVEIRA, F. G.; RIBEIRO, A. R.; PEREZ, G.; ARCHANJO, B. S.; GOUVEA, C. P.; ARAÚJO, J. R.; CAMPOS, A. P. C.; KUZNETSOV, A.; ALMEIDA, C. M.; MARU, M. M.; ACHETE, C. A.; PONTIAUX, P.; CELIS, J. P.; ROCHA, L. A. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. **Applied Surface Science**, v. 341, n. 2015, p. 1–12, 2015b.

OLIVEIRA, L. S. A.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – Métodos de análise e perspectivas futuras. **Revista de ciências médicas e biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37–44, 2010.

PAPAGEORGIOU, I.; SHADRICK, V.; DAVIS, S.; HAILS, L.; SCHINS, R.; NEWSON, R.; FISHER, J.; INGHAM, E.; CASE, C. P. Macrophages detoxify the genotoxic and cytotoxic effects of surgical cobalt chrome alloy particles but not quartz particles on human cells in vitro. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 643, n. 1–2, p. 11–19, 2008.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials - An introduction**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2007.

PERUZZI, B.; CAPPARIELLO, A.; DEL FATTORE, A.; RUCCI, N.; DE BENEDETTI, F.; TETI, A. C-*Src* and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling. **Nature Communications**, v. 3, p. 610–630, 2012.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 301–302, p. 24–48, 2015.

PETTERSSON, L.; ANDERSSON, I.; GORZSÁS, A. Speciation in peroxovanadate systems. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 237, p. 77–87, 2003.

PONTHIAUX, P.; WENGER, F.; CELIS, J. Tribocorrosion : Material behavior under combined conditions of corrosion and mechanical loading. In: **Corrosion Resistance**. [s.l.: s.n.]p. 81–106.

PONTHIAUX, P.; WENGER, F.; DREES, D.; CELIS, J. P. Electrochemical techniques for studying tribocorrosion processes. **Wear**, v. 256, n. 5, p. 459–468, 2004.

POURZAL, R.; CATELAS, I.; THEISSMANN, R.; KADDICK, C.; FISCHER, A. Characterization of wear particles generated from CoCrMo alloy under sliding wear conditions. **Wear**, v. 271, n. 9–10, p. 1658–1666, 2011.

QIU, K. J.; LIU, Y.; ZHOU, F. Y.; WANG, B. L.; LI, L.; ZHENG, Y. F.; LIU, Y. H. Microstructure, mechanical properties, castability and in vitro biocompatibility of Ti-Bi alloys developed for dental applications. **Acta Biomaterialia**, v. 15, p. 254–265, 2015.

QUIRYNEN, M.; AL-NAWAS, B.; MEIJER, H. J. A.; RAZAVI, A.; REICHERT, T. E.; SCHIMMEL, M. Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 7, p. 831–840, 2015.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2002.

RAMOS-SAENZ, C. R.; SUNDARAM, P. A.; DIFFOOT-CARLO, N. Tribological properties of Ti-based alloys in a simulated bone-implant interface with Ringer's solution at fretting contacts. **Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials**, v. 3, n. 8, p. 549–558, 2010.

RAO, A. J.; GIBON, E.; MA, T.; YAO, Z.; SMITH, R. L.; GOODMAN, S. B. Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 7, p. 2815–2823, 2012.

REHDER, D. Vanadium. Its role for Humans. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Ed.). **Metal Ions in Life Science**. New York: Springer, 2013. p. 139–169.

REHDER, D.; COSTA PESSOA, J.; GERALDES, C. F. G. C.; CASTRO, M. M. C. A.; KABANOS, T.; KISS, T.; MEIER, B.; MICERA, G.; PETTERSSON, L.; RANGEL, M.; SALIFOGLU, A.; TUREL, I.; WANG, D. In vitro study of the insulin-mimetic behaviour of vanadium (IV, V) coordination compounds. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, p. 384–396, 2002.

RIBEIRO, A. R.; GEMINI-PIPERNI, S.; TRAVASSOS, R.; LEMGRUBER, L.; SILVA, R. C.; ROSSI, A. L.; FARINA, M.; ANSELME, K.; SHOKUH FAR, T.; SHAHBAZIAN-YASSAR, R.; BOROJEVIC, R.; ROCHA, L. A.; WERCKMANN, J.; GRANJEIRO, J. M. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. **Scientific reports**, v. 6, n. October 2015, p. 23615, 2016.

RIBEIRO, A. R.; OLIVEIRA, F.; BOLDRINI, L. C.; LEITE, P. E.; FALAGAN-LOTSCH, P.; LINHARES, A. B. R.; ZAMBUZZI, W. F.; FRAGNEAUD, B.; CAMPOS, A. P. C.; GOUVÊA, C. P.; ARCHANJO, B. S.; ACHETE, C. A.; MARCANTONIO, E.; ROCHA, L. A.; GRANJEIRO, J. M. Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 196–206, 2015.

ROCHA, L. A.; OLIVEIRA, F. G.; CRUZ, H. V.; SUKOTJO, C.; MATHEW, M. T. Bio-tribocorrosion in dental applications. In: **Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2013.

RODRIGUES, N. R. **Tribocorrosion behavior of nanostructured Ti-6Al-4V alloy as a femoral stem of hip joint prosthesis**. 2013. Universidade do Minho - Campus de Azurém, 2013.

ROSSI, M. C.; BEZERRA, F. J. B.; SILVA, R. A.; CRULHAS, B. P.; FERNANDES, C. J. C.; NASCIMENTO, A. S.; PEDROSA, V. A.; PADILHA, P.; ZAMBUZZI, W. F. Titanium-released from dental implant enhances pre-osteoblast adhesion by ROS modulating crucial intracellular pathways. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 105, n. 11, p. 2968–2976, 2017.

RUNA, M. J.; MATHEW, M. T.; ROCHA, L. A. Tribocorrosion response of the Ti6Al4V alloys commonly used in femoral stems. **Tribology International**, v. 68, p. 85–93, 2013.

SANSONE, V.; PAGANI, D.; MELATO, M. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review. **Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 34–40, 2013.

SARGEANT, A.; GOSWAMI, T. Hip implants - Paper VI - Ion concentrations. **Materials and Design**, v. 28, n. 1, p. 155–171, 2007.

SHARIFI, S.; BEHZADI, S.; LAURENT, S.; FORREST, M. L.; STROEVE, P.; MAHMOUDI, M.; BANK, N. C.; CHEMISTRY, B.; MAISTRIAU, A. Toxicity of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2323–2343, 2012.

SHREIR, L. L. Basic concepts of corrosion. In: **Shreir's corrosion: Basic concepts, high temperature corrosion**. Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 724.

SHUKLA, A. K.; BALASUBRAMANIAM, R.; BHARGAVA, S. Properties of passive film formed on CP titanium, Ti-6Al-4V and Ti-13.4Al-29Nb alloys in simulated human body conditions. **Intermetallics**, v. 13, n. 6, p. 631–637, 2005.

SILVA, H. M.; SCHNEIDER, S. G.; NETO, C. M. Study of nontoxic aluminum and vanadium-free titanium alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, n. 5, p. 679–682, 2004.

SMITH, A. J.; DIEPPE, P.; HOWARD, P. W.; BLOM, A. W. Failure rates of metal-on-metal hip resurfacings: Analysis of data from the National Joint Registry for England and Wales. **The Lancet**, v. 380, n. 9855, p. 1759–1766, 2012.

SRIVASTAVA, A. K.; MEHDI, M. Z. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 1, p. 2–13, 2005.

SRIVASTAVA, S.; KUMAR, N.; ROY, P. Role of ERK/NFkB in vanadium (IV) oxide mediated osteoblast differentiation in C3H10t1/2 cells. **Biochimie**, v. 101, n. 1, p. 132–144, 2014.

STOJILOVIC, N.; EHRMAN, J. D.; BENDER, E. T.; TOKASH, J. C.; RAMSIER, R. D.; KOVACIK, M. W. Analysis of prosthetic knee wear debris extracted from synovial fluid. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 10, p. 3760–3766, 2006.

SUKUR, E.; AKMAN, Y. E.; OZTURKMEN, Y.; KUCUKDURMAZ, F. Particle Disease: A current review of the biological mechanisms in periprosthetic osteolysis after hip arthroplasty. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 10, n. 1, p. 241–251, 2016.

SUNDELL, G.; DAHLIN, C.; ANDERSSON, M.; THUVANDER, M. The bone-implant interface of dental implants in humans on the atomic scale. **Acta Biomaterialia**, v. 48, p. 445–450, 2017.

TOPOLOVEC, M.; CÖR, A.; MILOŠEV, I. Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 34, p. 243–252, 2014.

TSOU, H. K.; HSIEH, P. Y.; CHI, M. H.; CHUNG, C. J.; HE, J. L. Improved osteoblast compatibility of medical-grade polyetheretherketone using arc ionplated rutile/anatase titanium dioxide films for spinal implants. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100(A), n. 10, p. 2787–2792, 2012.

VASCONCELOS, D. M.; SANTOS, S. G.; LAMGHARI, M.; BARBOSA, M. A. The two faces of metal ions: From implants rejection to tissue repair/regeneration. **Biomaterials**, v. 84, p. 262–275, 2016.

VERKET, A.; TIAINEN, H.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; NILSEN, O.; RESELAND, J. E. Enhanced osteoblast differentiation on scaffolds coated with TiO₂ compared to SiO₂ and CaP coatings. **Biointerphases**, v. 7, n. 1, p. 36, 2012.

VERONESI, F.; TSCHON, M.; FINI, M. Gene expression in osteolysis: Review on the identification of altered molecular pathways in preclinical and clinical studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 499–522, 2017.

VERSTRAETEN, S. V.; AIMO, L.; OTEIZA, P. I. Aluminium and lead: Molecular mechanisms of brain toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 11, p. 789–802, 2008.

VICENTE, F. B. **Efeito do oxigênio intersticial no módulo de elasticidade de ligas Ti-15Mo-xZr (x = 5, 10, 15%p)**. 2014. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 2014.

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, n. 1, p. 1, 2017.

VIRTANEN, S.; MILOŠEV, I.; GOMEZ-BARRENA, E.; TREBŠE, R.; SALO, J.; KONTTINEN, Y. T. Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 468–476, 2008.

WANG, M. L.; TULI, R.; MANNER, P. A.; SHARKEY, P. F.; HALL, D. J.; TUAN, R. S. Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 4, p. 697–707, 2003.

WANG, S.; GE, S.; LIU, H.; HUANG, X. Wear behaviour and wear debris characterization of UHMWPE on alumina ceramic, stainless steel, CoCrMo and Ti6Al4V hip prostheses in a hip joint simulator. **Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering**, v. 7, n. 1, p. 7–25, 2010.

WANG, Z. B.; HU, H. X.; ZHENG, Y. G.; KE, W.; QIAO, Y. X. Comparison of the corrosion behavior of pure titanium and its alloys in fluoride-containing sulfuric acid. **Corrosion Science**, v. 103, p. 50–65, 2016.

WATTERS, T. S.; CARDONA, D. M.; MENON, K. S.; VINSON, E. N.; BOLOGNESI, M. P.; DODD, L. G. Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion: A clinicopathologic review of an underrecognized cause of prosthetic failure. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, n. 6, p. 886–893, 2010.

WEI, S.; SIEGAL, G. P. Mechanisms modulating inflammatory Osteolysis: A review with insights into therapeutic targets. **Pathology - Research and Practice**, v. 204, n. 10, p. 695–706, 2008.

WHITNEY, E. N.; ROLFES, S. R. **Understanding Nutrition**. Stamford: Cengage Learning, 2012.

WILLIAMS, K. L. **Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation**. 167. ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

WOLYNEC, S. **Técnicas eletroquímicas em corrosão**. São Paulo: EdUSP, 2003.

WU, Y.; WANG, M.; FENG, H.; PENG, Y.; SUN, J.; QU, X.; LI, C. Lactate induces osteoblast differentiation by stabilization of HIF1 α . **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 452, p. 84–92, 2017.

XAVIER, C. C. **Estudo de tratamentos térmicos da liga Ti-15Zr-xMo**. 2016. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 2016.

XAVIER, C. C.; CORREA, D. R. N.; GRANDINI, C. R.; ROCHA, L. A. Low temperature heat treatments on Ti-15Zr-xMo alloys. **Journal of Alloys and Compounds**2, v. 727, p. 246–253, 2017.

ZHAO, J.; CASTRANOVA, V. Toxicology of Nanomaterials Used in Nanomedicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 14, n. 8, p. 593–632, 2011.

ZHOU, Z.-R.; YU, H.-Y.; ZHENG, J.; QIAN, L.-M.; YAN, Y. **Dental Biotribology**. New York: Springer-Verlag, 2013.