



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARCIA COSTA MARQUES LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA
EXPERIMENTAL $\text{Ti}_{25}\text{Ta}_{25}\text{Nb}_{3}\text{Sn}$ APÓS TRATAMENTO
ALCALINO: estudos in vitro**

2018

MARCIA COSTA MARQUES LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA EXPERIMENTAL
Ti₂₅Ta₂₅Nb₃Sn APÓS TRATAMENTO ALCALINO: estudos in vitro**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA. Área: Inovação tecnológica multidisciplinar com ênfase em odontologia. Linha de pesquisa: Inovação tecnológica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Lima, Marcia Costa Marques

Caracterização da superfície da liga experimental Ti25Ta25Nb3Sn após tratamento alcalino: estudos in vitro [dissertação] São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018. / Marcia Costa Marques Lima. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Ana Paula Rosifini Alves Claro.

1. Liga titânio. 2. Modificação de superfície. 3. Tratamento alcalino. I. Claro, Ana Paula Rosifini Alves, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dra. Laís Regiane da Silva Concílio

Universidade de Taubaté

Campus de Taubaté

Dra. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 17 de outubro de 2018.

DEDICATÓRIA

*Meus queridos
pais, esposo e
filho: dedico esse trabalho a vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me deu o dom da vida e me abençoa todos os dias e que foi minha maior força nos momentos de angustia e desespero. Obrigada, senhor, por colocar esperança, amor e fé no meu coração e pelas pessoas maravilhosas com quem compartilhei este momento.

. Agradeço ao meu esposo Rubens e ao meu filho Lucas, que ao longo de toda a trajetória me deu apoio para eu alcançar este objetivo. Agradeço aos meus amigos que torceram por mim e em especial a aqueles que diretamente me auxiliaram, como Marisa, Ednei, Alecsandra, Taylha, Vera e Ana Carolina.

Agradeço a todos meus professores que acompanharam a minha jornada e proporcionaram-me o conhecimento e aprendizado, durante o curso. Sou grata principalmente a, Profa. Dra. Ana Paula, minha orientadora, pelo empenho e dedicação.

Agradeço a todos os funcionários da pós-graduação pela valiosa ajuda e carinho.

Agradeço à Unesp pela oportunidade de fazer este curso.

“Prefiram a minha instrução à prata,
e o conhecimento ao ouro puro”

Provérbios 8:10

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Considerações gerais	16
3.2 Osseointegração	17
3.3 Tratamento de superfície de implantes dentários.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Obtenção dos corpos de prova da liga Ti25Ta25 Nb3Sn.....	34
4.2 Tratamento de superfície – tratamento alcalino e térmico	35
4.3 Caracterização da superfície da liga	36
4.4 Avaliação da adesão bacteriana: estudo <i>in vitro</i>	39
4.5 Cultura celular.....	40
5 RESULTADO	42
5.1 Microscopia eletrônica de varredura	42
5.2 Ângulo de contato.....	46
5.3 Difração de raios x.....	47
5.4 Adesão bacteriana: estudo <i>in vitro</i>	47
5.5 Adesão celular.....	50
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da rede de fibrina formada na superfície do implante. células mesenquimais se movimentam na rede de fibrina em direção à superfície do implante.....	13
Figura 2 - Esquema de implante saudável (A) e com peri-implantite (B).....	19
Figura 3 - Fluxograma empregado para o desenvolvimento da pesquisa	33
Figura 4 - Barra da liga $Ti_{25}Ta_{25}Nb_3Sn$ obtida em forno a arco voltaico, homogeneizado a $950^{\circ}C$, forjamento a frio e tratamento térmico a $900^{\circ}C$	34
Figura 5 - Discos da liga $Ti_{25}Ta_{25}Nb_3Sn$ obtida com 3mm de espessura	35
Figura 6 - Tubos Falcon com as amostras imersas na solução de NaOH com as respectivas molaridades (A) e Banho Termostatizado (B)	36
Figura 7 - Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Magellan 400L	37
Figura 8 - Superfície da liga $Ti_{25}Ta_{25}Nb_2Sn$ lixada (controle), aumento 20.000x	42
Figura 9 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (0,5M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x.....	43
Figura 10 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (1,0M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x.....	44
Figura 11 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (1,5M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x.....	45
Figura 12 - Difratoograma de raios X da liga $Ti_{25}Ta_{25}Nb_3Sn$	47
Figura 13 - Valores médios de Log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de <i>S. aureus</i> aderidos a espécimes da liga $Ti_{25}Ta_{25}Nb_3Sn$ somente lixada e após o tratamento alcalino com diferentes molaridades. Barras de erro: desvio- padrão. (n=6)	48

Figura 14 - Imagens de Microscopia Confocal a Laser dos biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> formados sobre espécimes da liga de Ti25Ta25Nb3Sn. Magnificação: 40x.....	49
Figura 15 - Contagem de células aos quatro e sete dias após a inoculação celular nos corpos de prova de da liga Ti25Ta25Nb3Sn	50
Figura 16-Crescimento de células nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn com superfície lixada aos 4 dias (a) e aos 7dias (b). Legenda: Coloração foi feita com DAPI (para núcleos, coloração azul) e F - actina (para filamentos (citoesqueleto), coloração vermelha)	51
Figura 17-Núcleos de células (azul) e espraçamento das células (vermelho) nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH0,5 M, aos 4 dias (a) e aos 7dias (b).....	52
Figura 18 - Núcleos (azul) e prolongamento celular (vermelho) nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH1,0 M, aos 4 dias (a) e aos 7dias (b).....	53
Figura 19 - Núcleo (azul) e prolongamento das células (vermelho) nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH1,5M, aos 4 dias (a) e aos 7dias (b).....	54
Figura 20 - Viabilidade celular na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn lixada e tratada com NaOH, aos 4 dias e aos 7dia. (Alamar Blue)	55
Figura 21 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn lixada, aos quatro dias.	55
Figura 22 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 0,5M, aos quatro dias.....	56
Figura 23 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 1M, aos quatro dias.....	56
Figura 24 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 1,5M, ao quatro dias.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração (Grupos) do tratamento alcalino	36
Tabela 2 - Avaliação celular dias após a aplicação da cultura celular nos corpos de prova da liga	41
Tabela 3 - Medidas do ângulo de contato da liga $\text{Ti}_{25}\text{Ta}_{25}\text{Nb}_{3}\text{Sn}$ somente lixada e após tratamento alcalino com as variações de molaridade	46

Lima MCM. Caracterização da superfície da liga experimental Ti₂₅Ta₂₅Nb₃Sn após tratamento alcalino: estudos *in vitro* [dissertação] São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Titânio e suas ligas são considerados materiais bioinertes e dessa forma técnicas de modificação de superfície podem ser empregadas para uma melhor interação osso/biomaterial. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a modificação da superfície da liga experimental Ti₂₅Ta₂₅Nb₃Sn a partir do emprego do tratamento alcalino, com vistas à obtenção de uma superfície bioativa. Os lingotes das ligas foram obtidos em forno a arco voltaico e posteriormente foram submetidos a tratamento térmico e forjamento a frio, de tal forma que discos com 10 mm de diâmetro e 3mm de espessura fossem obtidos. Para o tratamento alcalino as amostras foram imersas em solução de NaOH na concentração de 0,5, 1,0 e 1,5M. A morfologia das superfícies das amostras foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura e a composição avaliada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As fases presentes após tratamento foram avaliadas por técnicas de difração de raios-X e a molhabilidade das superfícies a partir do ângulo de contato. Estudos *in vitro* foram realizados para avaliar a adesão bacteriana e proliferação celular. Os resultados evidenciam a produção de uma estrutura porosa na superfície da liga quando ela foi submetida ao tratamento com NaOH em todas as molaridades usadas. A molhabilidade da superfície apresentou característica hidrofílica, o difratograma revelou picos mais intensos após o tratamento alcalino. Verificou também maior quantidade de bactérias nas superfícies porosas resultante do tratamento alcalino e maior adesão celular com viabilidade sem variação entre os tratamentos. Conclui-se que o tratamento com NaOH 1,0M proporciona uma superfície bioativa.

Palavras-chave: Liga titânio. Modificação de superfície. Tratamento alcalino.

Lima MCM. Characterization of the surface of the experimental alloy Ti25Ta25Nb3Sn after alkaline treatment: in vitro studies [dissertation] São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are considered bioinert materials and thus surface modification techniques can be employed for better bone / biomaterial interaction. Thus, the present study aimed to evaluate the surface modification of the experimental alloy Ti25Ta25Nb3Sn to obtain a bioactive surface, from the use of alkaline treatment. The ingots of the alloys were obtained in an arc furnace and afterwards they were subjected to thermal treatment and cold forging, in such a way that disks with 10 mm of diameter and 3 mm of thickness were obtained. For the alkaline treatment the samples were immersed in NaOH solution at the concentration of 0.5, 1.0 and 1.5M. The morphology of the surfaces of the samples was evaluated by scanning electron microscopy and the composition evaluated by dispersive energy spectroscopy (EDS). The phases present after treatment were evaluated by X-ray diffraction techniques and the wettability of the surfaces from the contact angle. In vitro studies were performed to evaluate bacterial adhesion and cell proliferation. The results evidenced the production of a porous structure on the alloy surface when it was subjected to NaOH treatment in all the molarities used. The wettability of the surface presented a hydrophilic character, the diffractogram showed more intense peaks after the alkaline treatment. It also verified a greater amount of bacteria in the porous surfaces resulting from the alkaline treatment and greater cell adhesion with viability without variation between the treatments. It is concluded that the treatment with 1.0M NaOH provides a bioactive surface.

Keywords: Titanium alloy. Surface modification. Alkaline treatment.

1 INTRODUÇÃO

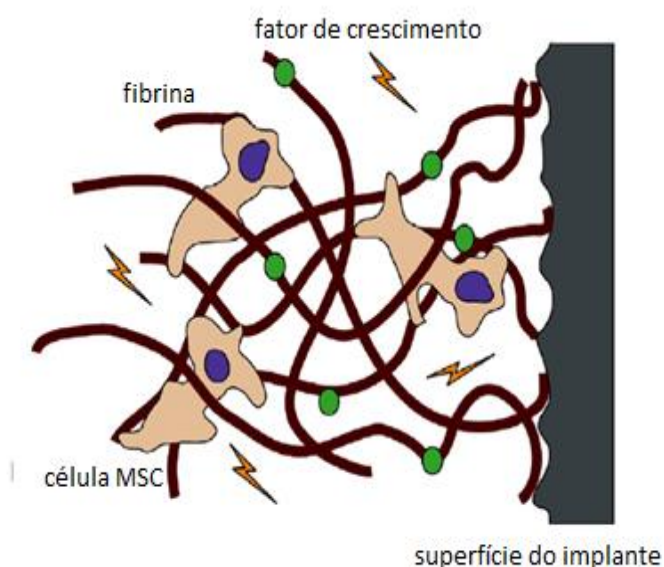
Desde a década de 1960 quando os implantes dentários confeccionados em titânio comercialmente puro (Ti CP) passaram a ser empregados na Odontologia, diversas pesquisas foram realizadas na busca por uma melhor resposta na interface osso/implante. A osseointegração envolve uma série de eventos biológicos e diversos autores estabelecem as propriedades de superfície, tais como: rugosidade, molhabilidade, porosidade, micro topografia, fotocátalise e superfície funcionalizada, determinantes para o seu sucesso (Bell et al., 2011; Contreras et al., 2010; Cuellar-Flores et al., 2016; Hanib et al., 2016; Fujio et al., 2017; Jaramillo et al., 2010; Kasek-Desik et al., 2018; Yeo, 2014; Yuan et al., 2014).

Um dos primeiros eventos que ocorre quando o implante é inserido dentro do corpo humano é a adsorção de moléculas de água, proteínas e lipídios do sangue para a superfície, sendo que a superfície determinará o tipo de proteína que será aderida. A adesão das plaquetas sanguíneas e a subsequente liberação do seu conteúdo interno levarão à formação de rede de fibrina que servirão como um trabéculo imaturo com espaços vazios, facilitando dessa forma a migração celular em direção à superfície do implante (Figura 1). Assim, a cobertura da superfície e a resistência da adesão da fibrina dependerão das propriedades da superfície. Um aumento da rugosidade poderá levar a um aumento da adesão da fibrina ou da quantidade da fibrina promovendo melhor cicatrização (Gittens et al., 2014).

As ligas de titânio são a opção ideal para a confecção desses implantes por causa da sua excelente, biocompatibilidade, resistência à corrosão e propriedades mecânicas (Bezerra et al., 1999; Toptan et al., 2017). Recentemente, o estudo da liga quaternária Ti₂₅Ta₂₅Nb₃Sn (Seixas et al.,

2018) mostrou que a adição dos elementos nióbio, tântalo e estanho proporcionou um aumento das propriedades mecânicas e resistência à corrosão quando comparado ao titânio CP e a liga Ti6Al4V (Ti grau 5), ambos empregados na área Odontológica. O segundo passo na busca do emprego dessa liga na área biomédica é a modificação de sua superfície buscando melhor resposta e desempenho após inserção.

Figura 1 - Representação esquemática da rede de fibrina formada na superfície do implante. Células mesenquimais se movimentam na rede de fibrina em direção à superfície do implante



Fonte: adaptado de Gittens et al.(2014)

As técnicas mecânicas, químicas e físicas de modificação da superfície do titânio podem ser empregadas com o objetivo aumentar a bioatividade, biocompatibilidade, compatibilidade sanguínea, desgaste e resistência à corrosão.

O tratamento alcalino é um método químico bastante empregado para melhorar a bioatividade de titânio e suas ligas e foi introduzido na década de

1990 por Kim et al. (1997). Ao longo dos anos foi empregado para modificação das ligas Ti7,5Mo (Escada et al., 2010) e Ti30Ta (Capellato et al., 2013) apresentando sempre uma melhor resposta no que diz respeito a adesão e proliferação celular. A técnica é simples e se baseia na imersão das ligas em solução de hidróxido de sódio com molaridade e temperaturas variáveis, de acordo com a composição química da camada passiva existente, resultante dos elementos de ligas formadores do material.

O tratamento de superfície alcalino afeta diretamente a molhabilidade de superfície deixando-a hidrofílica. A molhabilidade da superfície pode afetar quatro importantes aspectos do sistema biológico: 1) adesão das proteínas e outras macromoléculas; 2) interação de tecidos moles e duros com as superfícies; 3) adesão bacteriana e formação de biofilmes; 4) taxa de osseointegração, sendo que superfícies hidrofílicas promovem uma formação óssea favorável com maior sucesso clínico (Gittens et al., 2014).

Dessa forma, o desenvolvimento de ligas de titânio com propriedades mecânicas de qualidade superior e com superfície hidrofílica para a utilização em implantes é muito importante. Neste caso, a alteração da superfície será feita por meio do tratamento alcalino da superfície em diferentes concentrações para utilização da liga Ti25Ta25Nb3Sn na área de saúde.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a modificação da superfície da liga experimental Ti25Ta25Nb3Sn a partir do emprego do tratamento alcalino, em diferentes concentrações, com vistas à obtenção de uma superfície bioativa.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir essa meta serão necessários os seguintes objetivos específicos:

- Submeter a liga Ti25Ta25Nb3Sn ao tratamento alcalino usando diferentes concentrações de NaOH;
- Fazer a caracterização da superfície por meio de MEV, difração de raios x e ângulo de contato;
- Verificar , *in vitro*, a viabilidade (confocal), a adesão e proliferação de bactérias e células osteoblásticas na superfície da liga.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações gerais

O uso de materiais naturais na substituição a partes do corpo humano tem sido usado desde a antiguidade, quando materiais como madeira, ouro, marfim, linho, couro e outros foram aplicados, empiricamente, em substituição das partes mutiladas (Huebsch, Mooney, 2009; Oladeji et al., 2012). Segundo Bergmann e Stumpf (2013) os primeiros biomateriais inertes usados por egípcios e romanos, foram ouro e marfim para substituição de ossos cranianos com defeitos. A partir disso, os materiais foram sendo substituídos. Estudos antropológico e arqueológicos evidenciaram que um osso de mandíbula humano, de origem Maia, que data do século 7 dC, continham três pequenos fragmentos de coral que serviram como substitutos dos incisivos mandibulares e os pesquisadores descobriram que houve formação de osso compacto em torno desses fragmentos de corais, integrando-o à mandíbula. Este caso foi considerado o exemplo mais antigo de implantes aloplásticos inseridos com sucesso em um ser humano vivo. Além disso, este exemplo demonstra que, durante muito tempo, materiais foram inseridos ao lado de tecidos orais como um substituto para dentes perdidos, sem conhecer a consequência biológica. Esta prática empírica continuou ao longo da Idade Média e Moderna, quando a odontologia foi considerada essencialmente o trabalho dos artesãos, sem qualquer base científica. (Bugarin Junior, Garrafa, 2007; Oladeji et al., 2012).

Os materiais metálicos como titânio e suas ligas são usados como substitutos ósseos devido as suas propriedades mecânicas e resistência à corrosão, por exemplo, na fabricação de implantes dentários (Wong et al., 2013).

O emprego do titânio na área biomédica ocorreu acidentalmente em 1952 pelo pesquisador Branemark, quando estudava o fluxo sanguíneo em fêmures de coelho. Para o experimento foram colocadas câmaras de titânio no interior dos animais e ao longo do tempo a câmara foi fixada ao osso de tal forma que não pode ser removida. O osso havia se integrado à superfície de titânio originando mais tarde a definição do termo “osseointegração” (Branemark, 1983).

O titânio pode ser classificado como um biomaterial inerte, ou seja, quando inserido no corpo humano não induz uma resposta do meio como ocorre com os biomateriais bioativos. Materiais bioinertes podem apresentar a formação de uma camada fibrosa não aderente ao redor do componente implantado com uma espessura de 20-50nm, não permitindo quaisquer interações diretas com o tecido receptor. Neste caso, a ligação existente entre estes materiais e o tecido ósseo é puramente mecânica, o que exige um longo período de osseointegração e pode levar muitas vezes a movimentação da interface osseointerface (Guastaldi, Aparecida, 2010).

3.2 Osseointegração

A osseointegração é a ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor do implante, sem crescimento ou desenvolvimento de tecido fibroso na interface osso-implante (Albrektsson et al., 1986, Albrektsson, 1993). Este processo ampliou o alcance das opções de tratamento para pacientes edêntulos parcial ou completo, utilizando diferentes métodos e técnicas para compensar a perda de dente. O processo completo de osseointegração, tem a duração de três a cinco meses, e segundo Kirmanidou et al. (2016) tem início

com a absorção de íons, proteínas e polissacarídeos pela camada de óxido de titânio e mais tarde, os macrófagos, os neutrófilos e as células osteoprogenitoras migram para a interface ósseo-implante.

Segundo Natali et al. (2009), a osseointegração é considerada bem sucedida, do ponto de vista clínico, quanto se verifica a estabilidade do implante, que ocorre após a sua integração. Para avaliar a estabilidade, deve-se considerar a estabilidade primária e secundária do implante. A estabilidade primária está associada ao embricamento mecânico do implante com o osso circundante, enquanto os fenômenos de regeneração e remodelação dos ossos determinam a estabilidade secundária (biológica) ao implante. (Greenstein et al., 2008; Natali et al., (2009). A estabilidade primária está positivamente associada a uma estabilidade secundária (Davies, 1998).

Depois que um material é implantado no corpo, o sistema imune inicia uma sequência de respostas. (Franz et al., 2011). A resposta inflamatória ao biomaterial é mediada, em grande parte, pelo microambiente inflamatório local, a qual desencadeia a migração de diversas células para a vizinhança. (Olivares-Navarrete et al., 2015). Um alto nível de inflamação cria um período de resolução mais longo porque os fibroblastos inicialmente produzem matriz extracelular em um esforço para suportar o tecido danificado. Entretanto, a ativação prolongada de macrófagos e outras células imunes leva a redução na remodelação da matriz e no tecido cicatricial fibrótico, que se formou na fase de suporte da cicatrização de feridas e que permanece. (Olivares-Navarrete et al., 2015).

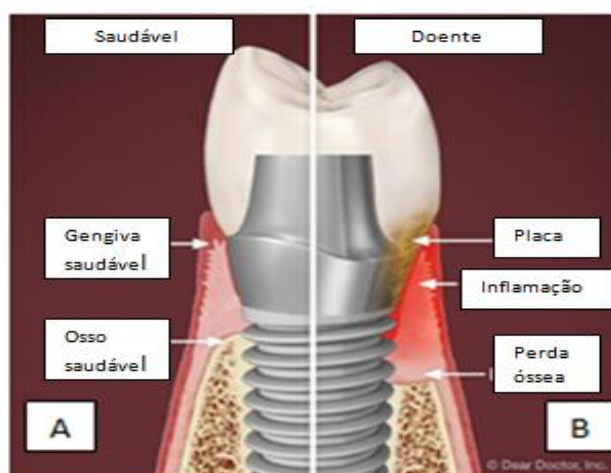
O maior tempo para a osseointegração favorece a aderência de microrganismos no implante, requisito para formação do biofilme, que pode causar periimplantite. Um biofilme, segundo Saini et al. (2011) é formado por uma comunidade bem organizada, estruturada e cooperante de microrganismos, em condições de fluido. Segundo este autor mais de 95% das bactérias

existentes na natureza se encontra em biofilmes, que protegem estes microrganismos de formas suaves de remoção como um enxague. (Donlan, 2002). A placa dental é o exemplo mais comum de um biofilme associado ao hospedeiro.

Mombelli, Décaillot (2011) constataram que a periimplantite pode ser vista como uma infecção anaeróbica mista, na qual a composição da flora é semelhante, na maioria dos casos, à flora subgengival da periodontite crônica que é dominada por bactérias Gram-negativas. As perimplantites podem ocasionalmente ser ligadas a uma microbiota diferente, incluindo um elevado número de *peptostreptococos* ou *estafilococos* e os efeitos benéficos das intervenções mecânicas e químicas, para interromper o biofilme, demonstram que os microrganismos estão envolvidos no processo da doença, mesmo que nem sempre seja a origem da doença.

Na Figura 2 observa-se um implante saudável (A) e outro com peri-implantite (B).

Figura 2 - Esquema de implante saudável (A) e com peri-implantite (B)



Por meio de técnicas modernas de biologia molecular, Saini et al. (2011) relata que identificaram cerca de mil espécies bacterianas diferentes no biofilme dentário. As bactérias colonizadoras iniciais são do gênero *Streptococcus*, *S. viridens*, *S. mitis* e *S. oralis*. Os colonizadores secundários se ligam à bactéria predominantemente composta das espécies de *Actinomyces*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. As bactérias se multiplicam e coagregam com as espécies parceiras. A espécie *Fusobacterium nucleatum* tem a propriedade de co-agregar com inúmeras espécies de bactérias, portanto, esta espécie é um elo importante nos biofilmes dentários que superam os colonizadores precoce e tardio. (Kolenbrander et al., 2002). A espécie de bactéria mais representativa, imersa nessa matriz polimérica rica, em polissacarídeos e minerais, é *Streptococcus mutans*. (Nemezio et al., 2017).

Em seus estudos, Liu et al. (2017) verificaram que uma insuficiente osseointegração e a infecção bacteriana em um implante de titânio, são os principais desafios em suas aplicações clínicas, o que pode resultar na falta de sucesso. (Ferraris, Spriano, 2016).

Para que os implantes sejam bem sucedidos e durem por longos períodos de tempo, no ambiente hostil da cavidade oral, é necessária a formação de um selo biológico efetivo entre o material do implante e os tecidos dos maxilares, (Jayesh, Dhinakarsamy, 2015), tornando-se assim um fator importante e crucial na longevidade dos implantes dentários. Ele serve como uma barreira fisiológica efetiva o suficiente para prevenir a entrada de toxinas, placas bacterianas, detritos orais e outras substâncias deletérias na cavidade bucal.

Todos esses agentes são iniciadores conhecidos de lesões de tecidos e células, e devem ser impedidos de ter acesso ao ambiente interno, que fornece suporte para o dispositivo de implante (Alva et al., 2013). O tecido mole, peri-implante, atua como um selo transmucosal contra irritantes bacterianos. Ele proporciona estabilidade estrutural para resistir a trauma mecânico, resiste à

ruptura da junção epitelial com o implante e ajuda a limitar a disseminação apical de lesões inflamatórias marginais que podem levar à perda óssea e, eventualmente, a falha no implante. Os tecidos moles, com contornos adequados, criam um ambiente de autolimpeza para a restauração do implante, minimizando a acumulação de alimentos (Alva et al., 2013).

Yuan et al. (2014) avaliaram quatro tipos de tratamento de superfície de implantes após contaminação por *Prevotella intermedia* [jateado, plasma-spray com hidroxiapatita (HA), ataque-ácido e oxidação anódica]. Os implantes foram inseridos em tíbia de coelhos e após seis semanas foram retirados para análise. Os resultados mostraram uma pobre osseointegração devido à presença bacteriana, e os implantes, nos quais a superfície foi tratada com plasma-spray com hidroxiapatita e ataque-ácido apresentaram a pior osseointegração. Em relação ao torque, para retirada do implante da tíbia, foram observadas que as superfícies mais rugosas contaminadas, foram as mais difíceis de serem removidas, quando comparadas com os implantes de superfícies lisas igualmente contaminadas.

A resistência do biofilme formado torna o tratamento das infecções associadas uma tarefa desafiadora. Além disso, tem-se verificado um aumento considerável da incidência de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos em ambientes clínicos, que torna o tratamento de infecções bacterianas uma das mais graves ameaças à saúde (Guridi et al., 2015). De acordo com Águila-Arcos et al. (2016) as infecções causadas por *estafilococos* representam uma preocupação médica, especialmente quando relacionada a biofilmes localizados em dispositivos médicos implantados, como próteses e cateteres. Infelizmente, sua frequente resistência a altas doses de antibióticos torna o tratamento dessas infecções uma tarefa difícil.

A pesquisa sobre biofilmes microbianos está em várias frentes, com particular ênfase na elucidação dos genes especificamente expressos por

organismos associados ao biofilme, avaliação de várias estratégias de controle, incluindo dispositivos médicos tratados com agentes antimicrobianos e bloqueios antimicrobianos, para prevenir ou remediar a colonização de biofilmes de dispositivos médicos e desenvolvimento de novos métodos para avaliar a eficácia desses tratamentos. A pesquisa também deve concentrar-se no papel dos biofilmes na resistência antimicrobiana, biofilmes como um reservatório para organismos patogênicos e o papel dos biofilmes em doenças crônicas.

3.3 Tratamento de superfície de implantes dentários

Conforme abordado no tópico anterior, a osseointegração dos implantes dentários de titânio cp é altamente dependente das propriedades da sua superfície. Os resultados experimentais obtidos por Lind et al. (1999), Kokubo et al. (2003) demonstraram que devido ao crescimento lento do osso na superfície de titânio e da fixação retardada do implante de titânio ao osso, que pode ocorrer durante longos períodos, muitas pesquisas foram direcionadas para a modificação de superfície visando aumentar a interação deste material com o meio biológico e reduzir o tempo necessário para a osseointegração adequada. (Kokubo et al., 2003; Oliveira et al, 2016).

As características superficiais dos implantes afetam o comportamento do osso circundante e, conseqüentemente, o processo de osseointegração. Neste contexto, estudos relataram que os implantes com superfícies rugosas demonstraram melhor comportamento e maiores taxas de sobrevivência em comparação com os usinados (Al-Nawas et al., 2007; Gotfredsen et al., 1992; Pinholt, 2003). Além disso, Gotfredsen et al. (1992) relatam que implantes jateados com partículas de dióxido de titânio mostraram um melhor ponto de

ancoragem e contato osso-implante do que os implantes usinados. Nischimoto et al. (2008) observaram que houve uma maior adesão celular no espécime tratado com apatita e maior disseminação de células na superfície lixada do que nas superfícies revestidas com apatita e que receberam tratamento ácido.

Vários trabalhos têm como proposta recobrir a superfície do titânio e suas ligas com hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Esse material é o principal componente da fase mineral do osso e desempenha um papel importante na biomineralização óssea, porque favorece a gênese e o crescimento ósseo neoformado e diminui o tempo de osseointegração. (Metikos-Hukovic et al, 2003; Jaramillo et al., 2010; Valente et al., 2016). A reabsorção das apatitas e sua bioatividade permitem a bioadesão, propriedade fundamental para assegurar a boa ancoragem mecânica do implante no osso, por meio da possível formação de ligação química entre o tecido e o material. (Branemark et al., 1987; Hench, 1998).

O titânio com tratamento de superfície visa imitar a estrutura óssea natural e a rigidez óssea para erradicar a reabsorção óssea. Além disso, a porosidade melhora o desempenho do implante e aumenta a área superficial, permitindo níveis mais elevados de crescimento ósseo (Karageorgiou, Kaplan, 2005; Hing, 2005) e incorporação de moléculas funcionais. (Lyndon et al., 2014).

A interação ocorre quando o implante entra em contato com os fluidos e tecidos orais após a implantação em uma ligação hospedeira. Esta interação bilateral dependerá da intensidade da irrigação mecânica e química e da natureza da superfície do implante. (Kubies et al., 2011). As características da superfície do implante são um dos fatores que afetam a taxa de osseointegração. Alguns estudos determinaram que as modificações superficiais incluam aspectos físicos e morfológicos como rugosidade, porosidade, topografia, fotocatalise (Garcia-Conteras et al., 2011) e superfície funcionalizada com péptido de matriz

extracelular (Bell et al., 2011) para aumentar a adesão celular. Além disso, as alterações de tratamento químico envolvendo plasma, soluções salinas, oxidação anódica e hidroxiapatita (Lou et al., 2015) melhoraram agregação celular.

Para isso, estudos em animais demonstram maiores deposição óssea sobre superfícies de próteses de titânio e suas ligas, particularmente quando as superfícies possuem uma microtopografia rugosa (De Leonardis et al, 1999; Stenport, Johansson, 2008). Estudos *in vitro* indicam que as superfícies de titânio e de suas ligas com microtextura promovem a diferenciação dos osteoblastos e a produção de fatores que favorecem a formação óssea *in vivo*, Olivares-Navarrete et al., 2012; Olivares-Navarrete et al., 2013; Gittens et al, 2014).

Katahira et al. (2016) afirmam que as propriedades da superfície, a rugosidade e a composição química são consideradas como os parâmetros mais importantes para a interação implante-tecido e osseointegração. A morfologia isotrópica e que exibe microcavidades com bordas definidas facilita a retenção de células osteogênicas e as permite migrar para a superfície do implante. Implantes com uma morfologia superficial semelhante à que induz a retenção de fibrinas, favorecem a adsorção de fibronectina, uma proteína fundamental para o crescimento, migração e diferenciação celular e facilitam a osseointegração. (Braceras et al, 2009; Chang et al., 2016). Após a colocação do implante, o período de cicatrização começa com a aderência das proteínas séricas, seguida da fixação e proliferação de células mesenquimais, com consequente mineralização. (Winter et al., 2013). A partir de então, a remodelação óssea ocorre como uma adaptação ao ambiente dos implantes. (Jayesh et al., 2005). Segundo Buser et al. (1991) quando a ancoragem micromecânica é alcançada, o processo de reparo ósseo muda de corticalização do osso esponjoso (KOS) (Narang et al., 2014) que é mais lenta, ao redor da superfície do implante, para

formação do osso com espaços trabecular (espaço da medula óssea) mais rápida e crescimento ósseo na superfície áspera.

Assim, vários métodos de modificação de superfície foram desenvolvidos com o intuito de se obter uma interface favorável à fixação, melhorar a biocompatibilidade e obtenção de propriedades físico-químicas específicas para cada aplicação clínica, mantendo-se as propriedades do substrato. (Kurella, Daotre, 2005, Geetha et al., 2009).

Os métodos de modificação de superfície podem ser mecânicos, físicos e químicos, de acordo com o mecanismo de formação da camada modificada na superfície do implante. (Liu et al., 2004; Tossato, 2009).

Os métodos mecânicos envolvem basicamente alguns tratamentos físicos e a remoção de material da superfície do implante, sendo a usinagem, a moagem, o polimento e o jateamento os exemplos mais comuns. Possuem como principais objetivos a obtenção de uma topografia e rugosidade específicas, a remoção de uma possível contaminação superficial, e/ou o aperfeiçoamento da adesão. (Lin et al., 2004).

Os métodos físicos de modificação de superfície não envolvem reações químicas, sendo a formação da camada formada ou do revestimento em um implante de titânio atribuída às energias térmica, cinética e elétrica. Um dos exemplos mais usuais é a aspersão por plasma (Plasma Spraying). (Lin et al., 2004).

O tratamento físico complementar da superfície do revestimento, como spray térmico e spray de plasma, melhora a aparência estética dos materiais e seu desempenho. (Jemat et al., 2008). O jateamento de grão é um procedimento de subtração mecânica que aumenta a rugosidade da superfície, pela projeção pressurizada de partículas na superfície do implante. Os principais materiais utilizados são partículas de areia, HA, alumina ou TiO_2 . Após o jateamento de grão, o impregnado ácido é aplicado para remover as partículas residuais. O

jateamento com grão via força física é um dos tratamentos de superfície mais utilizados para aperfeiçoar a topografia da superfície do implante dentário e melhorar a bioatividade celular aumentando a rugosidade superficial. No entanto não se acelera a capacidade da osseointegração (Jones, 2001; Jemat et al., 2015).

Os métodos químicos abrangem várias técnicas, tais como revestimentos sol-gel, deposições químicas a vapor, modificações bioquímicas e tratamentos químicos e eletroquímicos (anodização eletroquímica) (Lin et al., 2004).

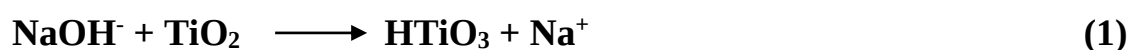
No tratamento ácido da superfície de titânio, Chrcanovic e Martins (2014) constataram que este tratamento não cria uma topografia padrão, ela varia de acordo com vários parâmetros, tais como tratamento prévio, composição da mistura de ácido, temperatura e tempo de tratamento ácido. Os tratamentos ácidos favoráveis, segundo experimento de Chrcanovic e Martins (2014) foi a combinação de ácidos fortes (HF e HCl / H₂SO₄) em altas concentrações, a uma temperatura relativamente alta ($\geq 60^{\circ}\text{C}$) durante um tempo considerável ($\geq 60\text{ min}$).

De acordo com Huanhuan et al., (2017) não está claro se a química bioativa da superfície desempenha um papel importante na osseointegração precoce de implantes de titânio micro estruturado, que possuem a mesma topografia superficial nas escalas micrométrica e sub micrométrica. Para esclarecer esta dúvida estes pesquisadores empregaram a metodologia *Magnetron Sputtering* para a preparação do revestimento de estrôncio (Sr) no implante de titânio jateado e com SLA (Sandblasted+Large grit+Acid-etched) sem alterar as características da superfície. As superfícies Sr-SLA e somente SLA apresentaram recortes irregulares isotrópicos típicos semelhantes. Os íons de estrôncio foram efetivamente incorporados na superfície SLA (a razão atômica é de 2%). Após duas e oito semanas de cicatrização, aumentos significativos nos valores de torque de remoção foram observados em relação ao implante Sr-SLA. Histologicamente, as porcentagens de contato ósseo-implante

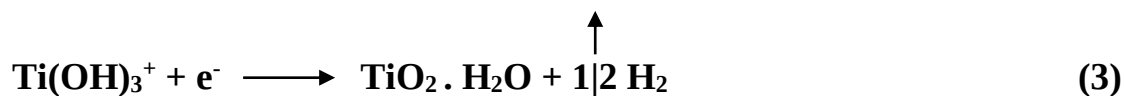
dos implantes de Sr-SLA e a razão da área óssea foram significativamente maiores em comparação com o implante SLA, para oito semanas. Para duas semanas, as porcentagens de contato osso-implante, juntamente com a proporção da área óssea da superfície de Sr-SLA, foram um pouco maiores que a superfície SLA, no entanto, a diferença estatística não foi significativa. Estes resultados indicam que a modificação química com estrôncio, aumenta notavelmente a aposição óssea precoce. Assim, ficaram evidentes, que além de modificações relacionadas à rugosidade, a molhabilidade e a química da superfície, também são fatores importantes para o sucesso da osseointegração.

O tratamento alcalino é um método químico de modificação de superfície para melhorar a bioatividade e foi introduzido na década de 1990 por Kim et al., (1997). O tratamento térmico subsequente promove desidratação desta camada (Alves-Rezende et al., 2013), estabilizando-a como titanato de sódio amorfo contendo pequenas quantidades de titanato de sódio cristalino ($\text{Na}_2\text{Ti}_2\text{O}_5$) e rutilo (TiO_2). Desde então, vários pesquisadores constataram que uma camada estável de hidrogel de titanato de sódio (amorfo), é formada na superfície de titânio após o tratamento alcalino (Nishiguchi et al., 1999; Nishio et al., 2000; Escada et al., 2010; Pattanayak et al., 2011; Capellato et al., 2013), como demonstrada na seguinte equação:

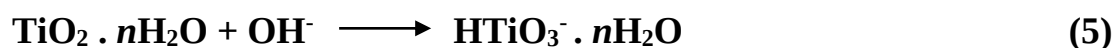
- a) O dióxido de titânio (TiO_2) em contato com a solução de NaOH (base forte) é parcialmente dissolvido, pelo ataque do óxido pela hidroxila (OH^-)



- b) Ocorre a hidratação do titânio, simultaneamente:



c) A hidroxila de TiO_2 sofre um ataque e produz hidratos carregados negativamente sobre a superfície do substrato:



Estas amostras com carga negativa incorporam íon Na^+ e forma uma camada de hidrogel de titanato de sódio, com característica negativa, que com o desidrata e estabiliza a camada de titanato de sódio cristalino (Lee, Yoo, 2015; Kokubo, 1998; Gil et al., 2002; Fujio et al., 2017). O tratamento alcalitérmico é considerado a etapa prévia para o processamento biomimético de implantes e titânio, conforme o protocolo desenvolvido por Kokubo e Takadama (2006).

Quanto à rugosidade da superfície, Komasa et al. (2014) e Fujio et al. (2017) utilizando NaOH 10M a 30°C por 24 horas, obteve uma rede porosa na superfície liga Ti6Al4V , por outro lado Hanib et al. (2016) utilizando liga Ti6Al4V tratada com NaOH e KOH com tratamento térmico de 700°C , obteve a formação de uma rede porosa da camada de titanato alcalina apenas com o uso de KOH .

Dentre os tratamentos de superfície utilizados, o tratamento alcalino com solução de NaOH , assim como o jateamento de partículas produz macroestruturas, ataque ácido produz microestruturas, enquanto o tratamento alcalino confere rugosidade submicron ou nano à superfície do Ti (Kim et al., 2013. Kazek-Kesik et al. (2018), utilizando duas soluções alcalinas diferentes,

NaOH e KOH, verificaram que o titânio anodizado em uma solução contendo NaOH 1 M de 60 °C por 8 h produziu resposta biológica favorável e a liga Ti-13-Nb-13Zr apresentou-se mais biocompatível que Ti-15Mo e Ti-6Al-7Nb. O tratamento com hidróxido de sódio aumentou a hidrofilicidade na superfície das placas de Ti e a fixação de células e a proliferação do ligamento periodontal, aumentando o número de células viáveis, coincidindo com um estudo anterior de Contreras et al. (2010) e Cuellar-Flores et al. (2016).

Segundo Bollen et al. (1996) e Quirynen et al. (1993) a rugosidade abaixo do padrão de 0,2µm não influencia na quantidade de biofilme formado sobre as superfícies de implantes o aumento de bactérias do tipo cocos está associado à mas condições de higiene do que da superfície do implante.

Este resultados foram corroborados por Tellefesen et al. (2016) ao verificarem que a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* IB em superfície de titânio polida (Ra= 0,026 a 0,029µm), jateada(Ra=2,12 a 1,67 µm) e maquinada (original) (Ra= 0,489 a 0,254 µm) foi afeta pela tratamento com sacarose e não pela rugosidade. O crescimento bacteriano foi mais pronunciado no experimento de biofilme do que no experimento de adesão primária.

Em liga de Ti-6Al-4V Andrade et al. (1999) verificaram que o alumínio e vanádio presentes na superfície de uma liga Ti-6Al-4V, usada em implantes, produz adesão osso/implante numa extensão de até 25,1% menor do que aquela possível de ocorrer num implante de titânio puro. Estes pesquisadores verificaram também que em implantes de liga Ti-6Al-4V tratados quimicamente em meio alcalino, remove-se diretamente o Al na forma de aluminato de sódio ou forma o vanadato de sódio, alcalinos, passíveis de serem removido por dissolução em água pura, o que poderá prover uma adesão osso/implante até igual àquela de um implante de titânio puro. . Além disso, o tratamento químico alcalino aplicado a implantes de liga Ti-6Al-4V, removendo diretamente o Al na forma de aluminato de sódio e formando em seu lugar o titanato de sódio, por

um lado, e vanadato de sódio sólido, por outro lado, seguido de imersão do implante em solução sorológica contendo cálcio e fósforo, levará ao surgimento de titanato-apatita no sítio antes ocupado pelo alumínio e vanadato-apatita naquele originalmente ocupado pelo vanádio; sobre estas apatitas crescerá a hidroxiapatita, que proverá uma adesão osso/implante aproximadamente igual àquela de um implante de titânio puro (Andrade et al.,1999) .

Segundo Alla et al. (2010) o tratamento de titânio em hidróxido de sódio a 4-5 M e submetido a temperatura de 600 °C por 24 horas tem mostrado produzir titanato de sódio gel, com topografia apresentando alto grau de porosidade aberta.

Para avaliar a bioatividade da liga Ti-27Nb-13Zr, Mendes et al., (2012) utilizaram o tratamento químico à base de NaOH associado à imersão em solução simulador de fluido corporal (SBF) 3, 7, 11 e 15 dias e verificaram a formação de recobrimento à base de fosfatos de cálcio sobre a liga desde o terceiro dia de imersão em SBF.

O tratamento químico, ácido ou alcalino, aplicado em membranas finas de titânio pode danificá-la sem promover o resultado desejado. Entretanto, Kobatake et al. (2017) verificou, em placas de titânio com 20 µm de espessura tratadas com soluções ácida ou alcalina (NaOH 5 M), que as membranas de titânio que receberam tratamento alcalino exibiram a formação de estruturas de poros de nanoescala nas suas superfícies, teve a hidrofiliabilidade melhorada e quase a mesma espessura em comparação com as membranas tratadas com ácido. Além disso, a resistência à tração de membranas tratadas com produto alcalino era comparável às membranas não tratadas.

Ao associar anodização e tratamento alcalino durante 24 e 48 horas, respectivamente e tratamento térmico com temperatura de 500, 700 e 800°C por uma hora, Hamouda et al. (2012) verificaram que a anodização e tratamento alcalino promoveram aumento da rugosidade na superfície de placas de titânio

e a formação de uma camada bioativa de óxido de titânio e titanato de sódio na superfície do titânio, especialmente após o tratamento térmico a 800 ° C. Houve uma deposição de cálcio significativamente maior em nas placas com tratamento alcalino por 48 horas. Em trabalho desenvolvido por Su et al. (2017), que consiste em otimizar a criação de uma superfície nano-estruturada na liga de titânio Ti6Al4V, o tratamento alcalino foi realizado utilizando uma solução de NaOH 10 M, nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, de modo a determinar a temperatura ideal. Isto foi combinado com tratamentos térmicos subsequentes (200, 400, 600 e 800°C) no ar. Ótimos resultados foram obtidos a 30°C, juntamente com o tratamento térmico a 600°C durante uma hora. Esta técnica de tratamento com calor alcalino modificado tem potencial para melhorar a atividade biológica nas interfaces de material celular.

Em comparação com a superfície titânio cp, o tratamento com jateamento (AS) e alcalino/tratamento térmico (AH) pode promover, significativamente, a adesão celular, diferenciação e mineralização de osteoblastos. Os tratamentos SA e AH combinados exibem efeitos sinérgicos em comparação com o tratamento de SA e AH individualmente e são mais favoráveis para estimular uma série de respostas osteogênicas da adesão celular à mineralização de osteoblastos (Wang et al., 2017). Este estudo fornece algumas evidências de que a micro / nanoestrutura integrada na superfície de Cp Ti pode promover a osseointegração óssea entre as interfaces do implante de titânio, *in vitro*.

Utilizando em tratamento alcalino em ligas de titânio, Al Mustafa et al. (2015) comprovaram que ele promove a adesão de células ósseas, fibroblastos gengivais e outras duas linhas de células em uma hora após o semeio. As células cultivadas durante um dia, nas superfícies da liga de titânio processadas por tratamento alcalino apresentaram viabilidade semelhante à liga não tratada. Este resultado se deve, segundo Kirmanidou et al. (2014) ao melhoramento das

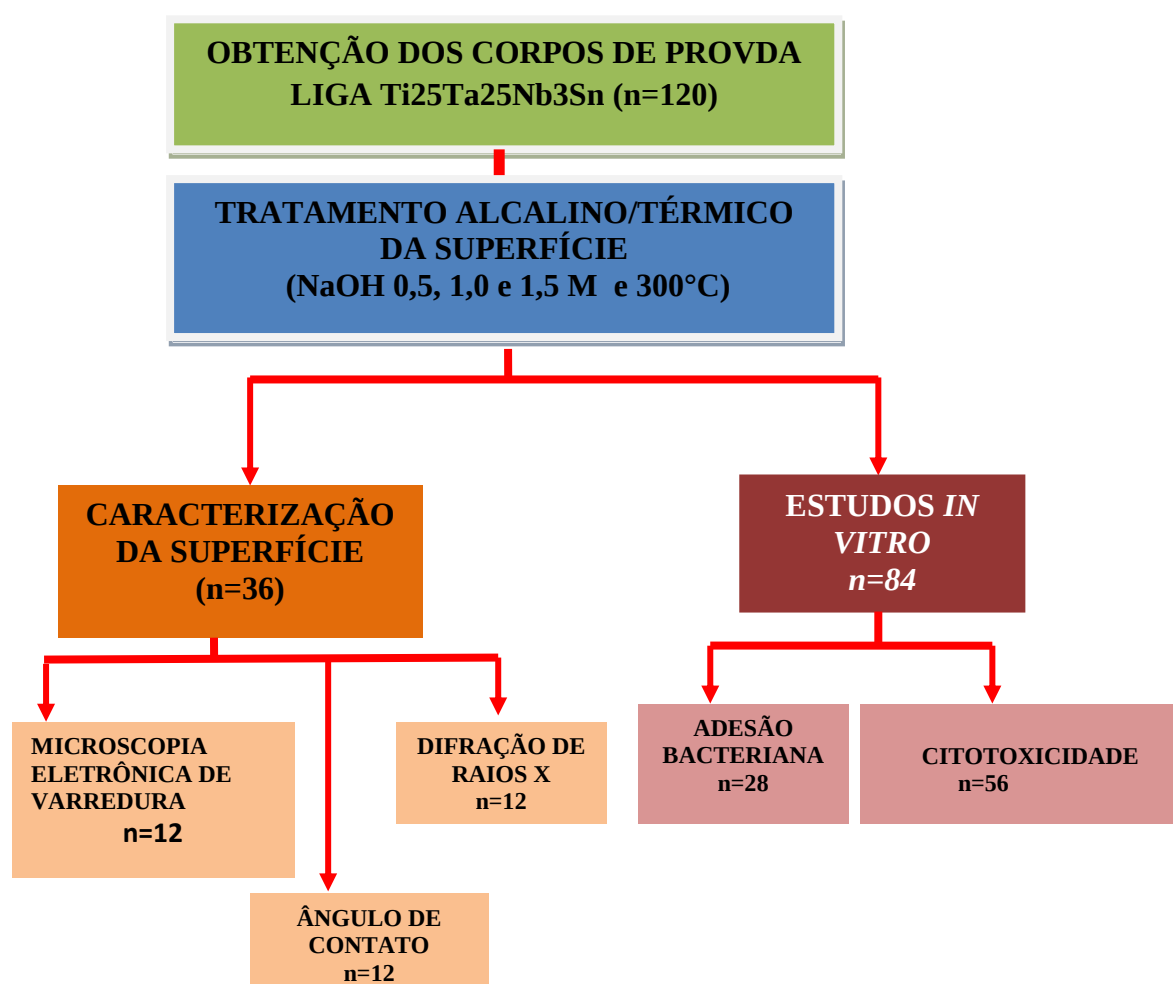
características da superfície e da bioatividade, em decorrência do uso de temperatura mais elevadas. Os resultados referentes a adesão celular e viabilidade celular deste trabalho são contrários aos obtidos por Kim et al. (2014) que verificou redução que verificou redução no crescimento celular em um conjunto de amostras de Ti embebidas em NaOH, a ligação e o espalhamento das células diminuíram significativamente com a temperatura de tratamento acima de 37 °C. As fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de amostras de Ti embebidas em KOH também mostram redução da adesão celular e espalhamento aparente em temperatura igual 37 °C. Isso se deve ao teor de titanato de sódio amorfo, que segundo Su et al. (2016) melhora a adesão celular indicando que depende do uso da temperatura durante a imersão no tratamento alcalino e, posteriormente, do tratamento de calor.

Com o objetivo de determinar como as placas de Ti submetidas a tratamento alcalino (NaOH) afetam a adesão e a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano (HPLF), Cuellar-Flores et al. (2016) utilizaram placas de titânio tratadas por ultra-som e NaOH a 5 M (pH 13,7) durante 45 segundos e inoculadas com HPLF. Estes pesquisadores verificaram que este tratamento resultou em valores médios de rugosidade iguais a 0,04 µm com uma superfície quase plana e alguns sulcos. O tratamento alcalino das placas de Ti causou significativamente adesão e proliferação dos fibroblastos do ligamento periodontal mais pronunciadas em comparação com as placas de Ti não tratadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dessa pesquisa foi realizado de acordo com o fluxograma da Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma empregado para o desenvolvimento da pesquisa



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 Obtenção dos corpos de prova da liga Ti25Ta25 Nb3Sn

Os lingotes da liga Ti25Ta25Nb3Sn foram obtidos a partir de chapas de titânio (grau 2), nióbio, tântalo e estanho comercialmente puros, em quantidade compatível com a composição da liga e com massa determinada em balança analítica, de acordo com metodologia descrita por Seixas (2015). O tratamento térmico de homogeneização foi realizado após essa etapa, em temperatura de 950 °C por 24 h, com resfriamento dentro do forno. Posteriormente foram obtidas barras com 10 mm de diâmetro (Figura 4) com o forjamento rotativo a frio, as quais foram tratadas termicamente a 900 °C por 2 horas. Discos com 3 mm de espessura foram seccionados com uma máquina de corte Isomet 4000, Buehler, lixados (lixa # 100) e lavados em ultrassom com acetona por 30 min (Figura 5).

Figura 4 - Barra da liga Ti25Ta25Nb3Sn obtida em forno a arco voltaico, homogeneizado a 950°C, forjamento a frio e tratamento térmico a 900°C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Discos da liga Ti25Ta25Nb3Sn obtida com 3mm de espessura

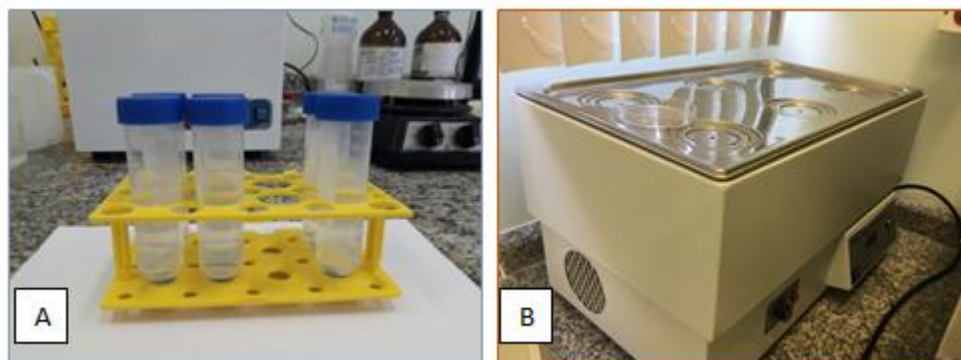


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Tratamento de superfície – tratamento alcalino e térmico

As amostras foram colocadas em tubo Falcon, com 30 ml de hidróxido de sódio (NaOH), com as respectivas molaridades (0,5M, 1,0M e 1,5M) e no banho termostatizado, marca Solab, por 24 h em uma temperatura de 60°C, como mostra a Figura 6. Após 24 h, as amostras foram lavadas com água deionizada e colocadas na estufa por 24 h, em uma temperatura de 40°C para secagem. Em seguida, as amostras foram para o forno por 1h na temperatura de 300°C para o tratamento térmico.

Figura 6 - Tubos Falcon com as amostras imersas na solução de NaOH com as respectivas molaridades (A) e Banho Termostático (B)



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização da superfície da liga

Para a caracterização da superfície foram avaliados os seguintes grupos:

Tabela 1 - Concentração (Grupos) do tratamento alcalino

Liga	Concentração (Grupo) NaOH
Ti25Ta25Nb3Sn	Lixada (n=12)
Ti25Ta25Nb3Sn	0,5 Molar (n=12)
Ti25Ta25Nb3Sn	1,0 Molar (n=12)
Ti25Ta25Nb3Sn	1,5 Molar (n=12)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A caracterização foi realizada empregando a Microscopia eletrônica de varredura (MEV), ângulo de contato e difração de raios X (DRX).

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica da camada de titanato de sódio formado na superfície dos corpos de prova, após os tratamentos de superfície, foi feita com o microscópio eletrônico de varredura (FEI Magellan 400L), do Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Figura 7).

Figura 7 - Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Magellan 400L



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Molhabilidade (ângulo de contato)

O efeito do tratamento de superfície na molhabilidade da superfície dos corpos de prova da liga foi analisado por meio das medidas do ângulo de contato (θ). Os corpos de prova foram pulverizados em 2 μ L de água destilada, utilizando um medidor de ângulo de contato (goniômetro: Krüss, modelo DAS 100) do Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia, Campus Guaratinguetá (FEG /UNESP).

4.3.3 Difração de raios X (DRX)

A camada de titanato de sódio foi analisada, físico-quimicamente, por meio da difração de raios-X. Esta análise foi feita na Escola de Engenharia de Lorena na utilizando o equipamento de difração de raios x, marca PANalytical e modelo Empyrean (Figura 8). As amostras foram presas a um suporte no interior da máquina e para a análise foram utilizados os seguintes parâmetros de operação: potencia de 40 kV, e corrente de 30 mA, comprimento de onda do CuK α , varredura entre os ângulos 30° e 90°, com velocidade angular de varredura de 0,2°/segundo (Konatu, 2014; Seixas, 2015). Os picos foram identificados por meio de comparação entre os difratogramas experimentais e os simulados usando o programa POWDERCELL e as informações cristalográficas.

4.4 Avaliação da adesão bacteriana: estudo *in vitro*

A adesão bacteriana foi realizada na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Para este estudo foi utilizada a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A bactéria foi semeada em *Miller Hinton Agar* e incubada, à 37 °C, por 48 horas. Em seguida, oito colônias foram transferidas para 10mL de meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB), formando o pré-inóculo, e este foi incubado por um período overnight (18 horas), a 37 °C. Decorrido esse tempo, 1,5 mL do pré-inóculo foi transferido para um novo tubo falcon contendo 28,5 mL de meio TSB fresco, formando o inóculo, e este foi incubado por 4 horas a 37°C. Foi, então, realizada a checagem da densidade óptica do inóculo (DO_{600nm}) para padronização do mesmo de acordo com curva de crescimento previamente estabelecida pelo laboratório. A suspensão de microrganismo foi submetida à centrifugação (4000 xg, por 5 minutos, à 4°C) e o *pellet* lavado com PBS. Nova centrifugação foi realizada para que o *pellet* fosse ressuspenso em meio de cultura TSB. Os espécimes estéreis foram acondicionados numa placa de 24 poços, e 2 mL de inóculo foi adicionado a cada poço. Para que houvesse a adesão dos microrganismos, a placa foi mantida em incubadora com agitador orbital (37°C, 75 rpm) por 90 minutos. Após esse período foram realizadas duas lavagens com 1 mL PBS para a remoção dos microrganismos não aderidos. Foram, então, adicionados 2 mL de meio TSB em cada poço, e a placa foi mantida em incubadora com agitador orbital por 48 horas, havendo troca de meio após 24 horas

Para análise quantitativa, após o período determinado para obtenção do biofilme, os espécimes foram cuidadosamente lavados três vezes com PBS (para remoção de células não aderidas), e foi realizada a raspagem dos biofilmes com o auxílio de uma ponteira de 1000 µL estéril. Foi então realizada a diluição

seriada do sobrenadante contendo o biofilme e todas as diluições foram plaqueadas em placa de petri contendo *Mueller Hinton Agar*. As placas foram mantidas em incubadora estática, a 37°C, por 24 horas e, posteriormente, foi realizada a contagem do número de colônias. O resultado obtido foi submetido ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Foi realizado o teste estatístico ANOVA 1-way com post-test de Tukey ($\alpha = 5\%$). A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

4.5 Cultura celular

A avaliação celular foi realizada no *Colorado State University Fort Collins – USA*, com o Prof. Ketul Popat. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o teste *Alamar Blue*, para adesão e proliferação a microscopia de fluorescência e para visualizar o espalhamento das células utilizamos a microscopia eletrônica de varredura.

Para este trabalho foram utilizadas células primárias de osso de rato, colocados em meio de cultura α MEM (Invitrogen, 12571-063), 10% FBS (F2442), *Penicillin-streptomycin* (Invitrogen, 15140-148) (5 ml of 100X for 500ml media), para obtermos o cultivo e a contagem das células. Para a viabilidade celular foi feita a leitura por meio do espectofotômetro, Omega Software.

A adesão e proliferação, foram avaliadas por meio da microscopia de fluorescência, após 4 e 7 dias com Rhodamine Phalloidin (F – actin stain – cytoskeleton), fixadas com 3,7% de formaldeído (5mL de formaldeído 37% em 45 mL de PBS), por 15 min em temperatura ambiente, após foram colocados

300µl de 1% de Triton, incubadas por 3 min, então foi colocado 300µl de actin Rhodamine, incubado por 25 min e adicionado o DAPI.

No preparo das amostras para o MEV as células foram fixadas em solução de 30% de glutaraldeído, 1,68g de cacodylate, 2,72g de sucrose em 77,6 mL de água destilada. Após a fixação as células foram desidratadas em etanol (35%, 50%, 70% e 100%). As amostras então foram colocadas em uma placa de vidro com 100% de dexamethyldisilazane (HDMS – Sigma), por 10 min.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, no equipamento Philips XL-30 FEG e as amostras foram tratadas com ouro no equipamento Balzers Sputter Coater SCD 004, para melhorar a emissão de elétrons.

Para a cultura celular foram utilizadas 56 amostras, sendo 14 amostras por grupo, subdividido para cada teste/dia (as células foram avaliadas por 4 e 7 dias), como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação celular dias após a aplicação da cultura celular nos corpos de prova da liga

Tratamentos	Método de avaliação		
	<i>Alamar Blue</i>	Fluorescência	MEV
Lixada (controle)	4	6	4
NaOH 0,5M	4	6	4
NaOH 1,0M	4	6	4
NaOH 1,5M	4	6	4

Fonte: Elaborada pelo autor

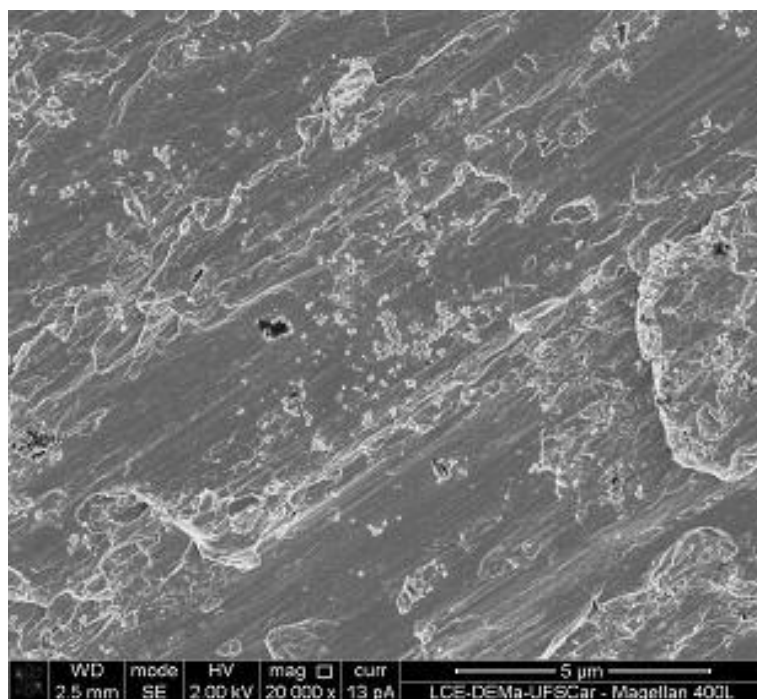
5 RESULTADO

5.1 Microscopia eletrônica de varredura

5.1.1 Tratamento alcalino

Na Figura 8 apresenta-se a imagem obtida em microscópio eletrônico de varredura para a superfície da amostra da liga Ti25Ta25Nb3Sn somente lixada (controle).

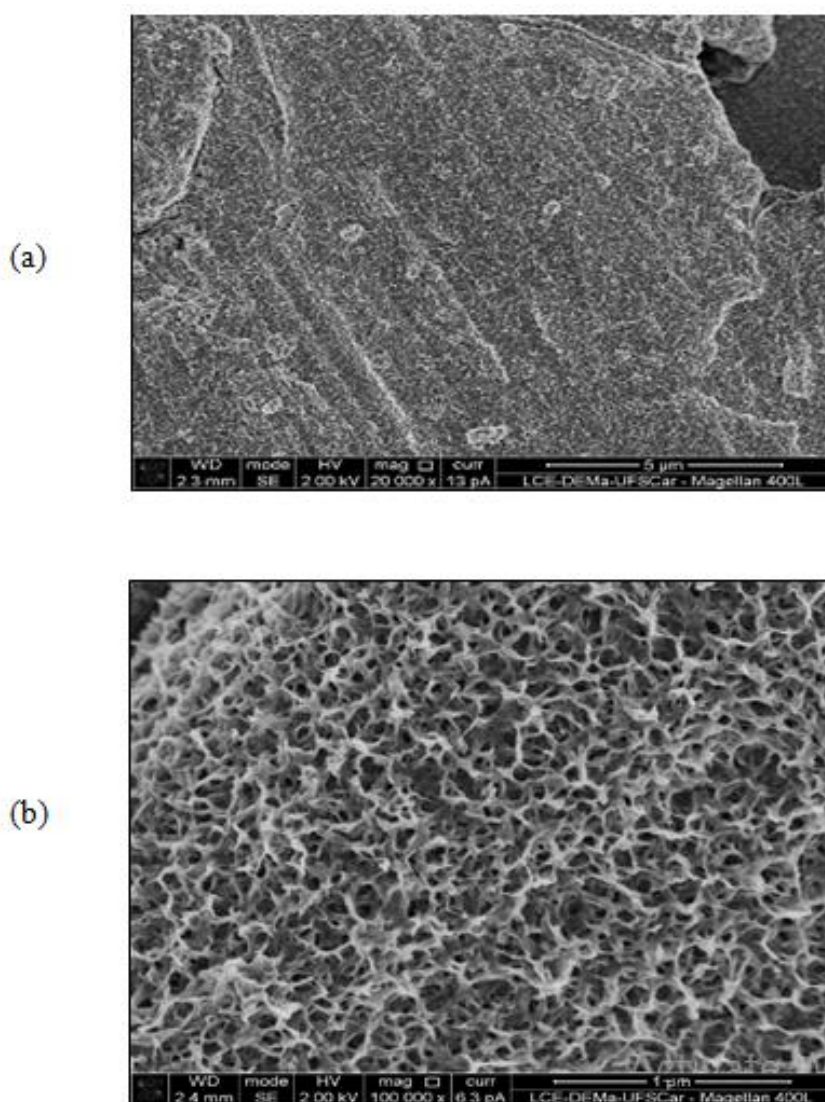
Figura 8 - Superfície da liga Ti25Ta25Nb2Sn lixada (controle), aumento 20.000x



Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 9 observam-se as imagens da microscopia eletrônica de varredura da liga Ti25Ta25Nb3Sn após o tratamento alcalino (0,5M) com diferentes ampliações (a) e (b). Nestas figuras observou-se a formação de uma superfície porosa após o tratamento alcalino.

Figura 9 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (0,5M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x

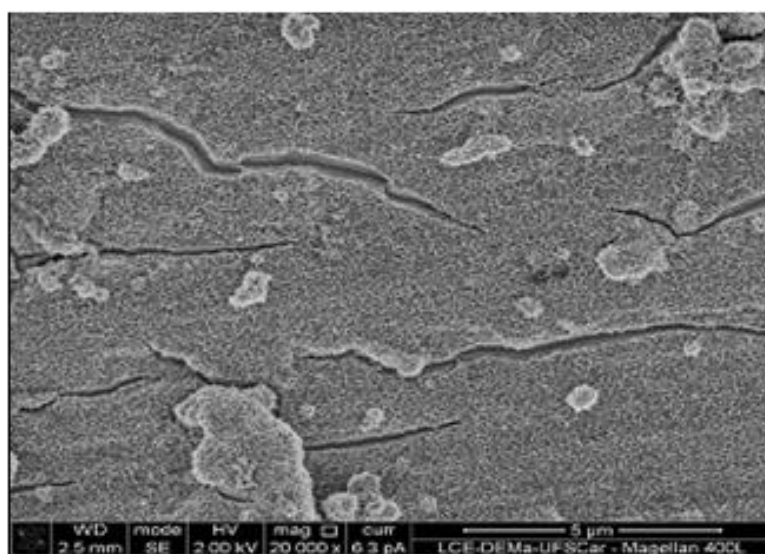


Fonte: Elaborada pelo autor.

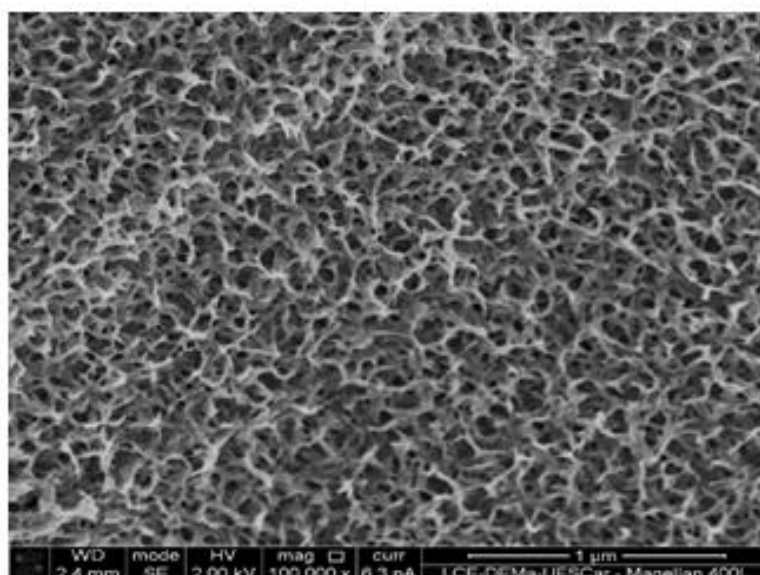
Na Figura 10 são apresentadas as imagens da microscopia eletrônica de varredura da liga $\text{Ti}_{25}\text{Ta}_{25}\text{Nb}_{3}\text{Sn}$ após o tratamento alcalino (1,0M) com diferentes magnitudes (a) e (b).

Figura 10 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (1,0M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x

(a)



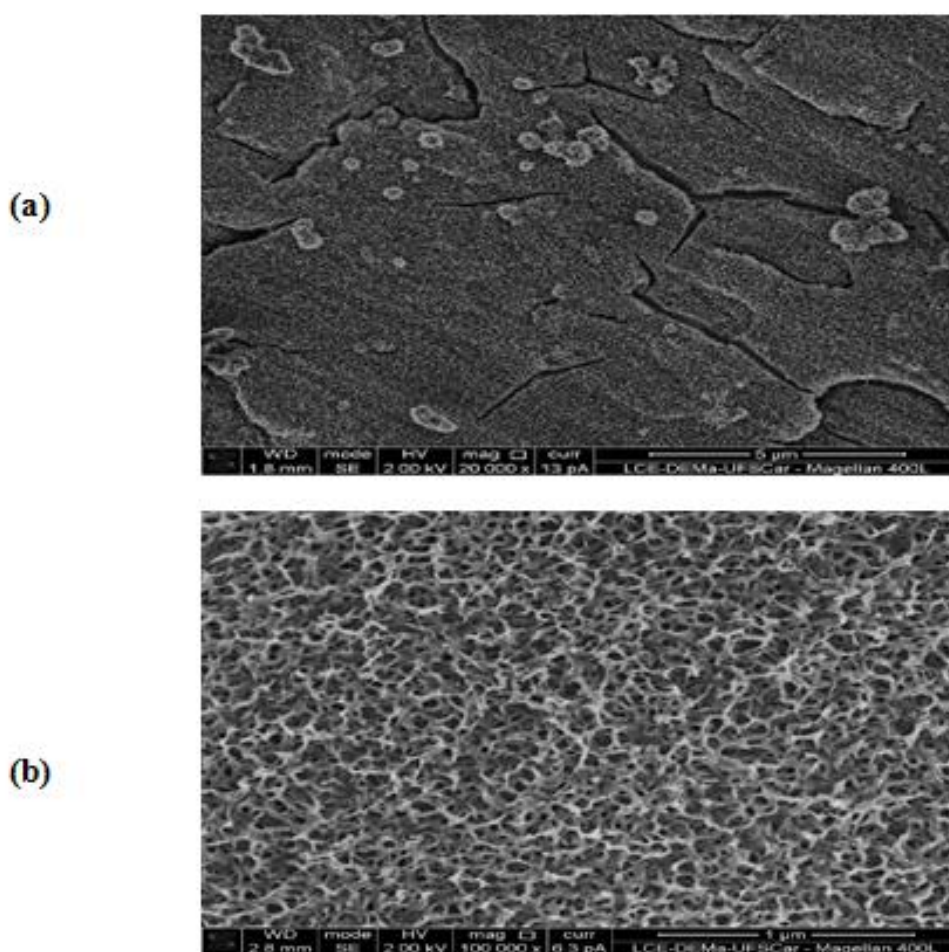
(b)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 11 são apresentadas as imagens da microscopia eletrônica de varredura da liga Ti25Ta25Nb3Sn após o tratamento alcalino com NaOH 1,5M, com diferentes magnitudes (a) e (b).

Figura 11 - Superfícies das amostras após tratamento alcalino (1,5M), com diferentes magnitudes (a) 20.000x e (b) 100.000x



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Ângulo de contato

Na Tabela 3 observam-se os valores e imagens do ângulo de contato da liga Ti25Ta25Nb3Sn somente lixada e após o tratamento alcalino com as variações de molaridade, 0,5M, 1,0M e 1,5M. Nesta tabela verifica-se que após o tratamento alcalino a liga Ti25Ta25Nb3Sn apresentou um caráter superhidrofílico.

Tabela 3 - Valores do ângulo de contato da liga Ti25Ta25Nb3Sn somente lixada e após tratamento alcalino com as variações de molaridade

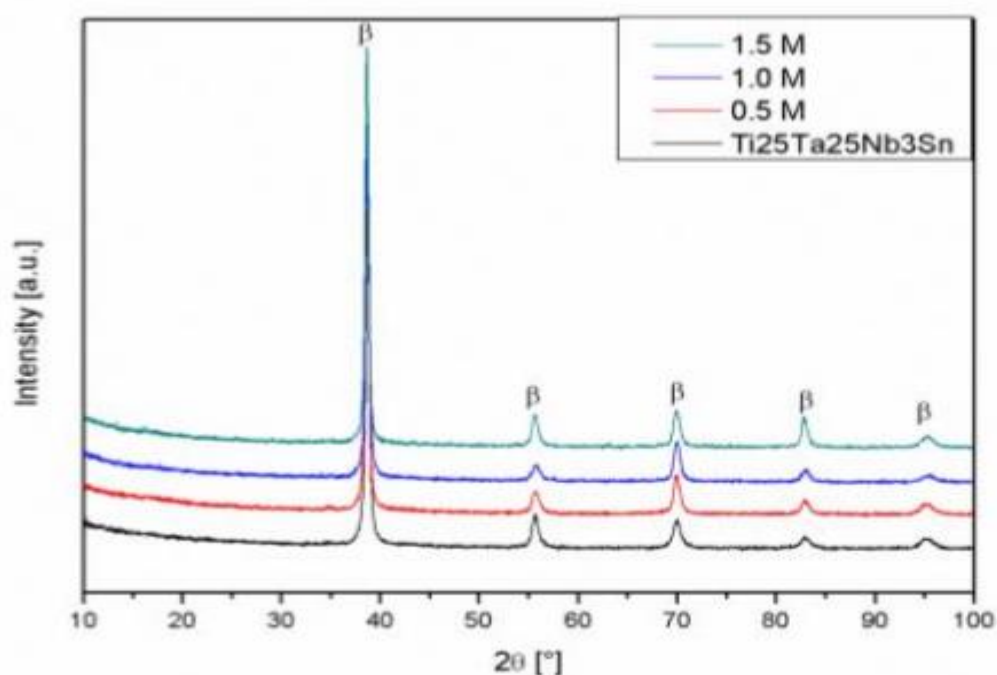
Tratamento da Superfície da Liga	Ângulo de Contato	
lixada	68,25°±17,72	
NaOH 0,5M	0°	
NaOH 1,0M	0°	
NaOH 1,5 M	0°	

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Difração de raios x

No difratograma de raios X da liga Ti25Ta25Nb3Sn (Figura 12) apresenta-se a liga somente lixada e após o tratamento alcalino em diferentes concentrações 0,5M, 1,0M e 1,5M.

Figura 12 - Difratograma de raios X da liga Ti25Ta25Nb3Sn



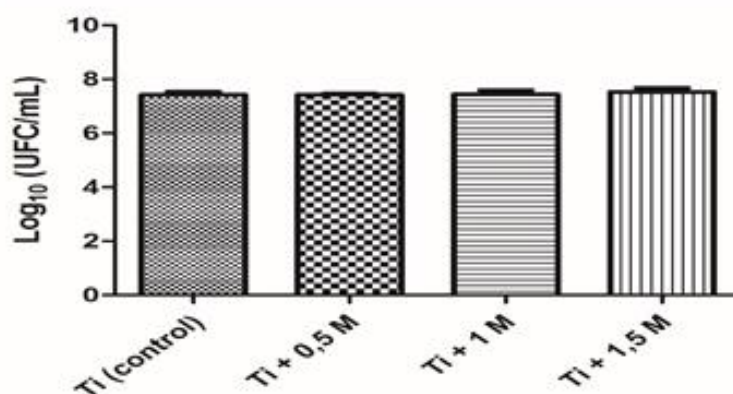
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Adesão bacteriana: estudo *in vitro*

Os resultados da análise dos valores de Log_{10} (UFC/mL), que evidenciam a presença de biofilme *Staphylococcus aureus*, são apresentados na

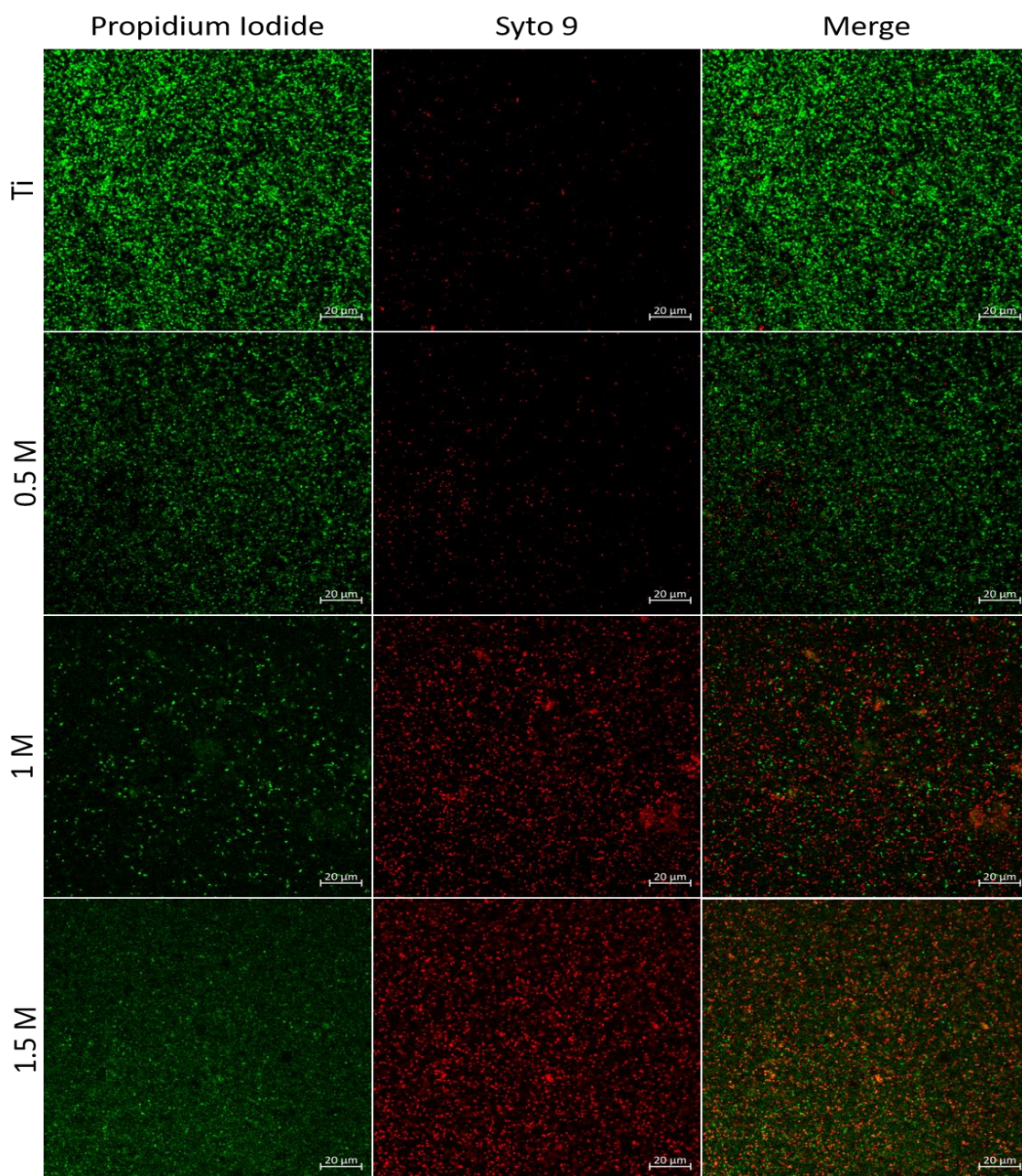
Figura 13 e verifica-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos da liga com as diferentes concentrações (grupos).

Figura 13 - Valores médios de Log_{10} (UFC/mL) de biofilmes de *S. aureus* aderidos a espécimes da liga Ti25Ta25Nb3Sn somente lixada e após o tratamento alcalino com diferentes molaridades. Barras de erro: desvio- padrão. (n=6)



Fonte: Elaborada pelo autor.

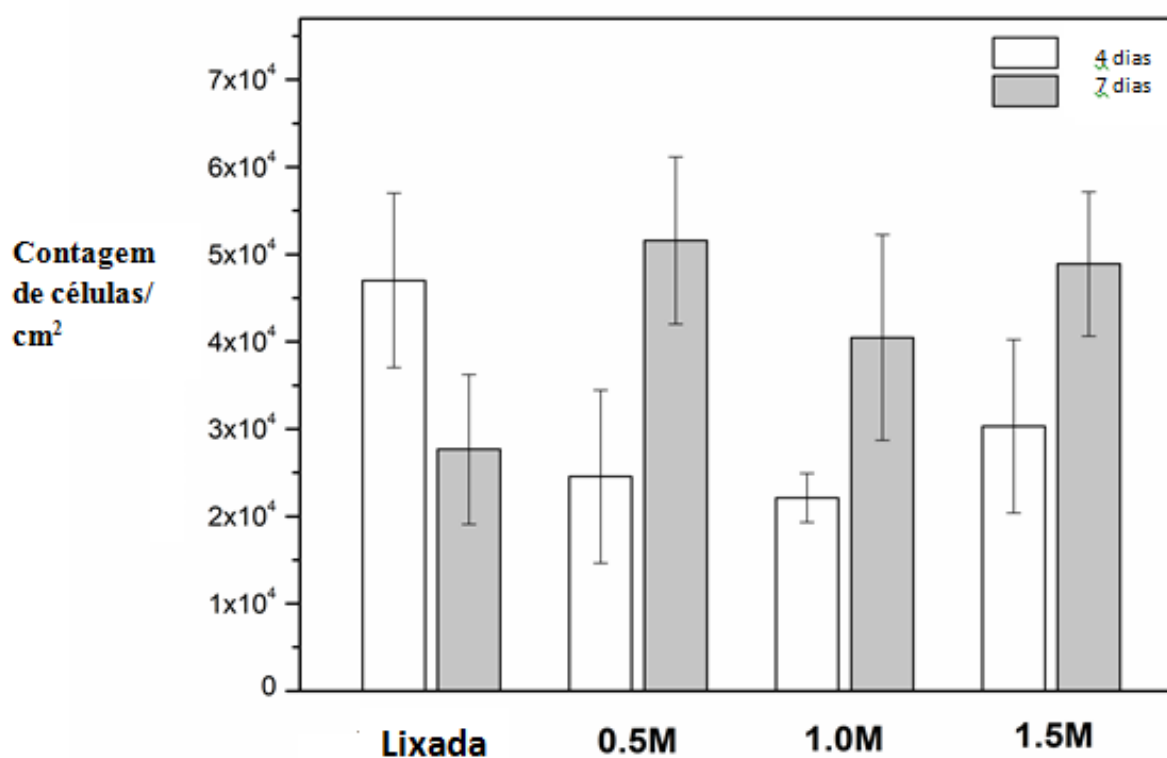
Figura 14 - Imagens de Microscopia Confocal a Laser dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados sobre espécimes da liga de Ti25Ta25Nb3Sn. Magnificação: 40x



Fonte: Elaborada pelo autor.

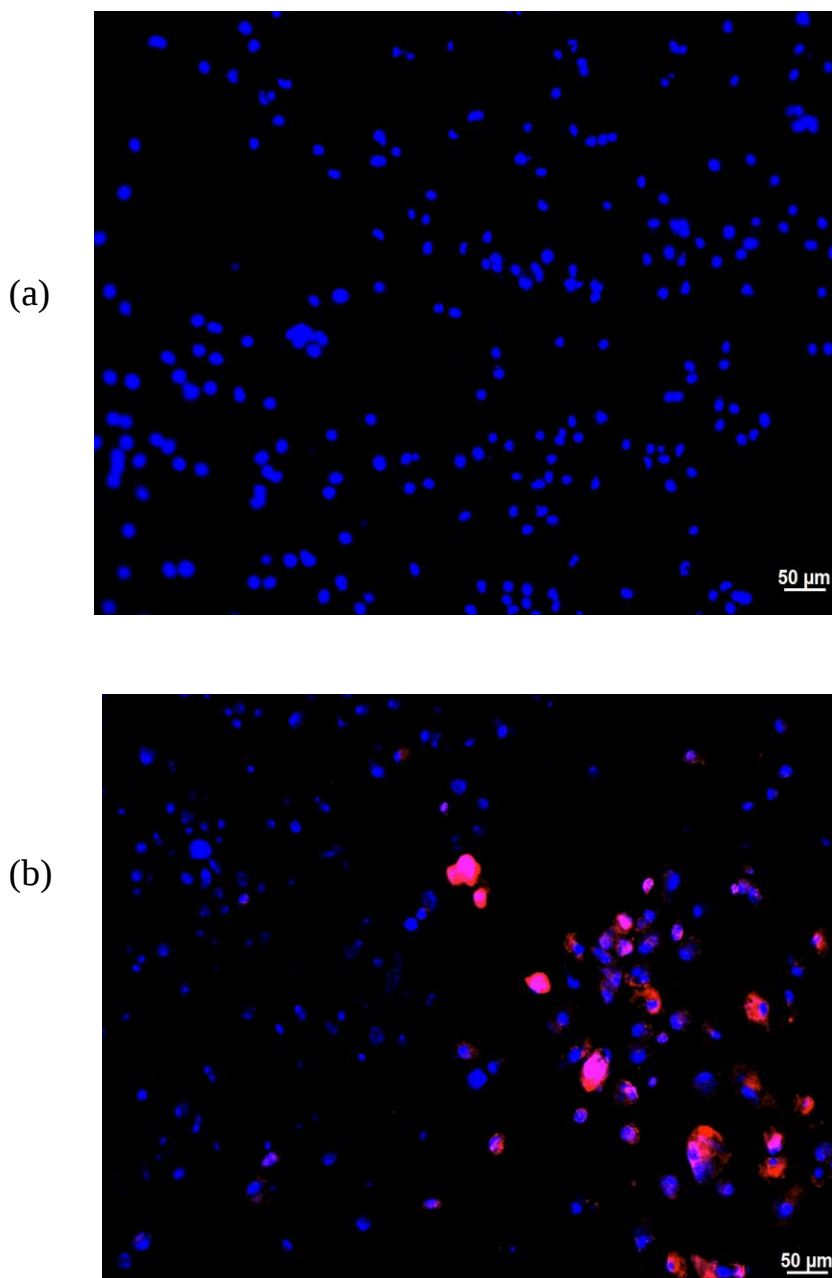
5.5 Adesão celular

Figura 15 - Contagem de células aos quatro e sete dias após a inoculação celular nos corpos de prova de da liga Ti25Ta25Nb3Sn



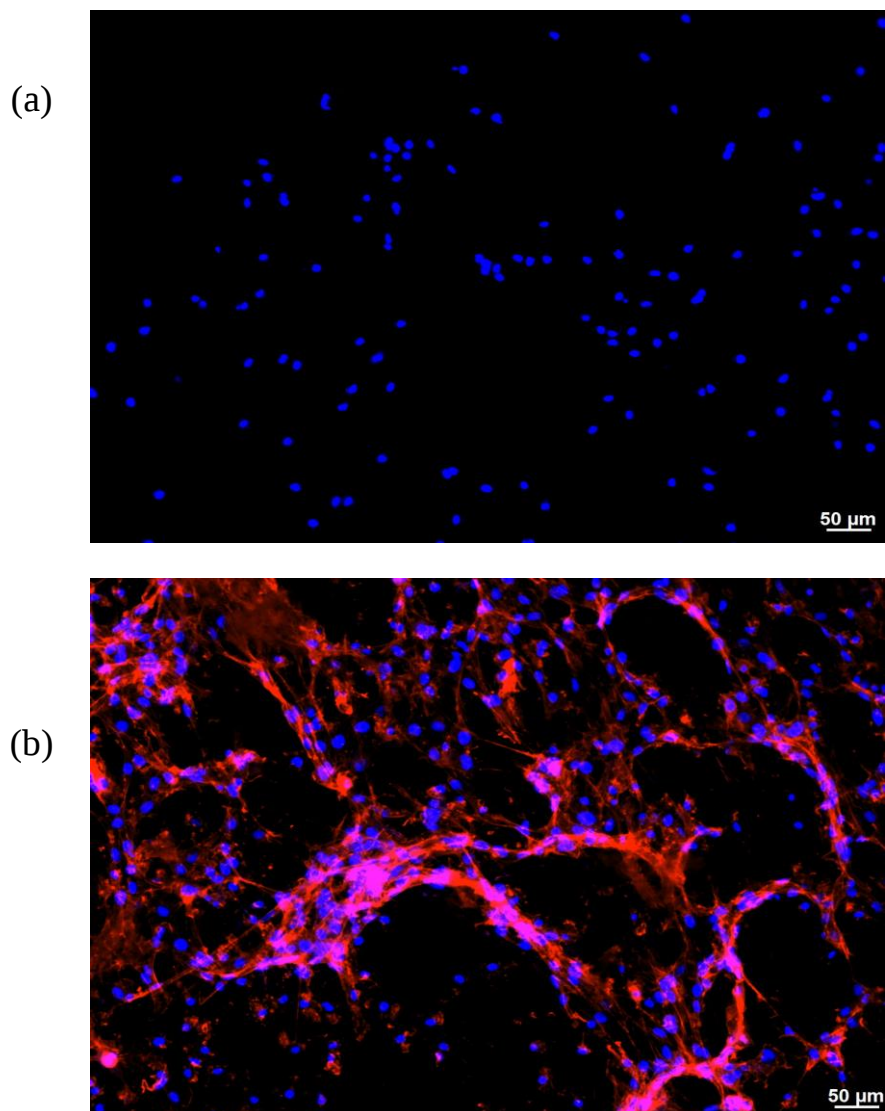
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16-Crescimento de células nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn com superfície lixada aos 4 dias (a) e aos 7 dias (b). Legenda: Coloração foi feita com DAPI (para núcleos, coloração azul) e F - actina (para filamentos (citoesqueleto), coloração vermelha)



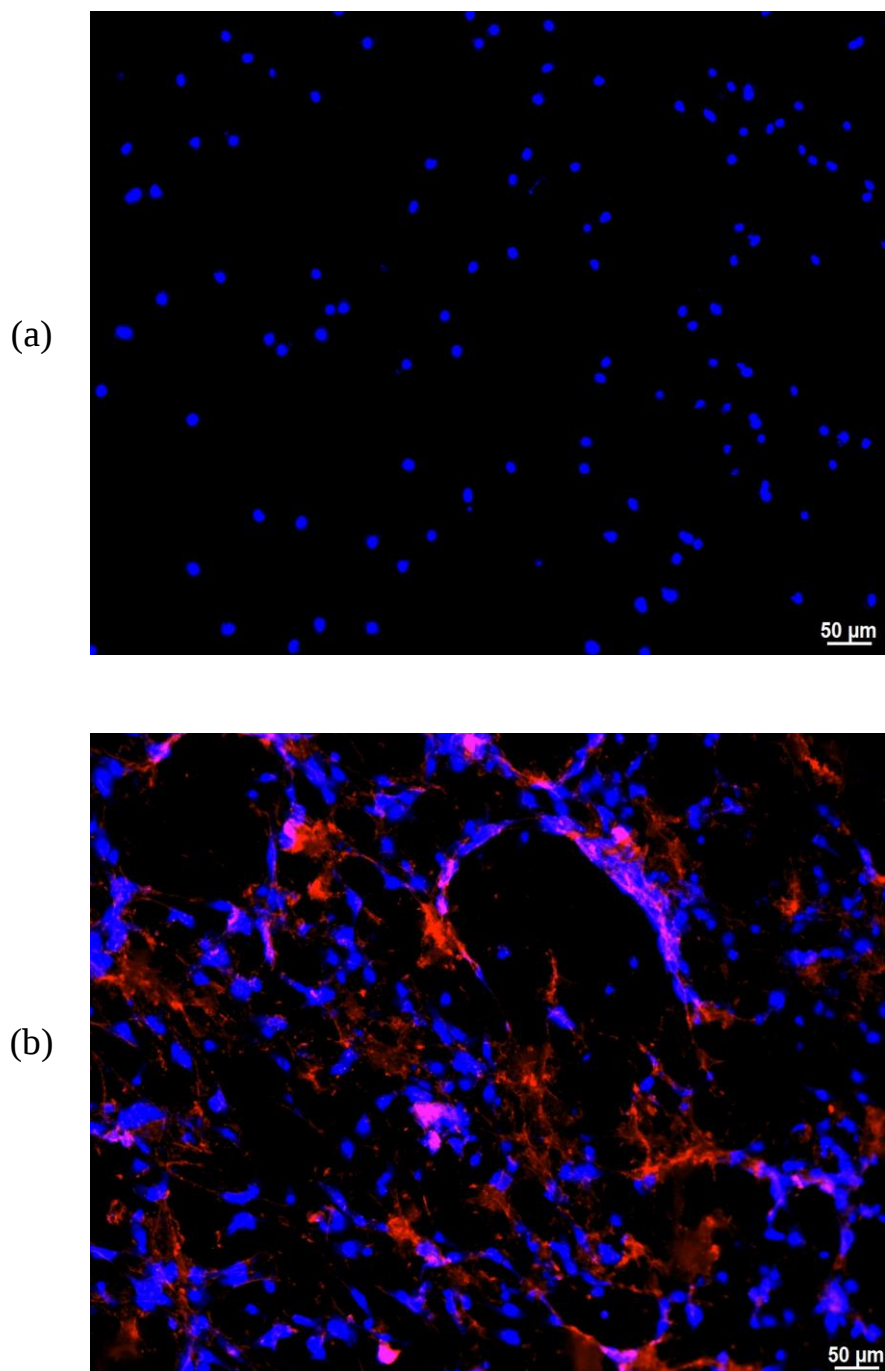
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17-Núcleos de células (azul) e espraio das células (vermelho) nos corpos de prova da liga de $\text{Ti}_{25}\text{Ta}_{25}\text{Nb}_{30}\text{Sn}$ tratada com NaOH 0,5 M, aos 4 dias (a) e aos 7 dias (b)



Fonte: Elaborada pelo autor.

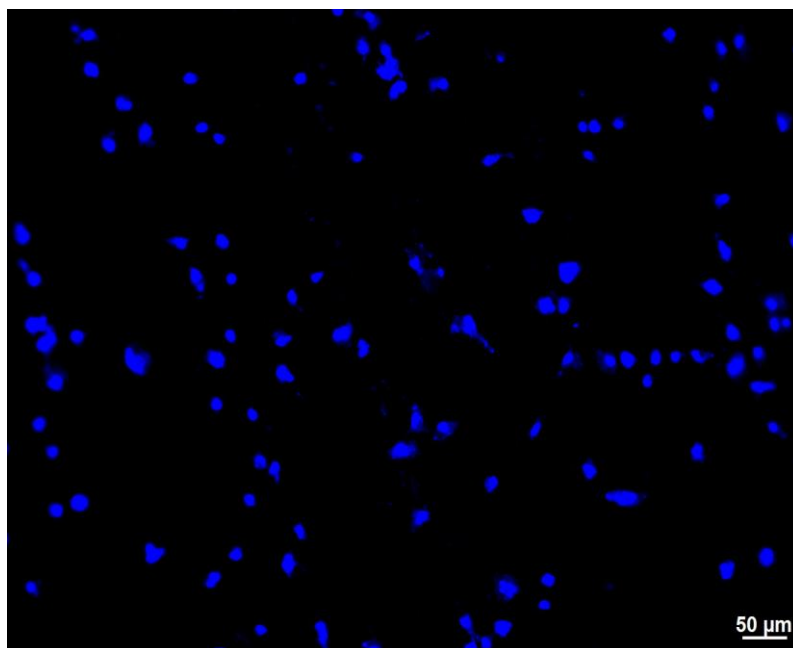
Figura 18 - Núcleos (azul) e prolongamento celular (vermelho) nos corpos de prova da liga de Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH1,0 M, aos 4 dias (a) e aos 7 dias (b)



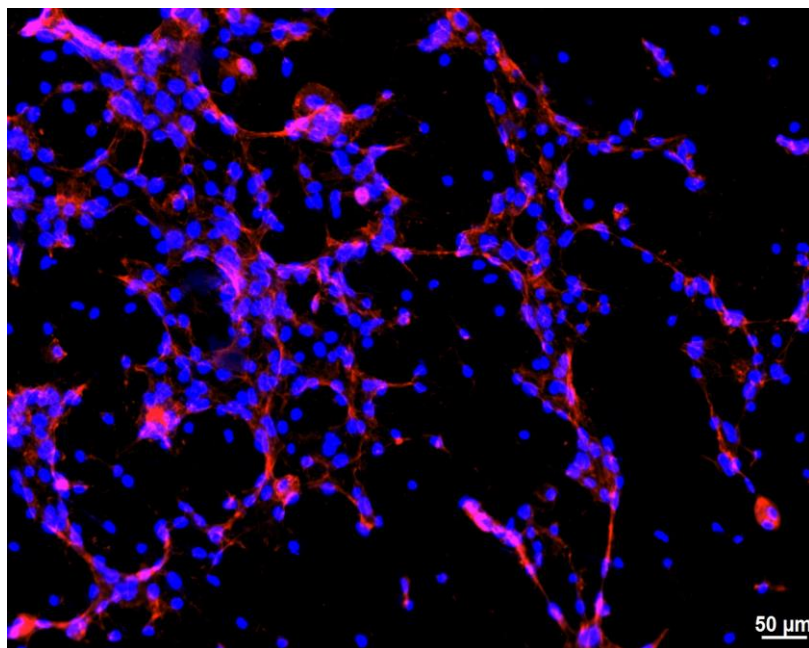
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Núcleo (azul) e prolongamento das células (vermelho) nos corpos de prova da liga de $\text{Ti}_{25}\text{Ta}_{25}\text{Nb}_{30}\text{Sn}$ tratada com NaOH 1,5M, aos 4 dias (a) e aos 7 dias (b)

(a)

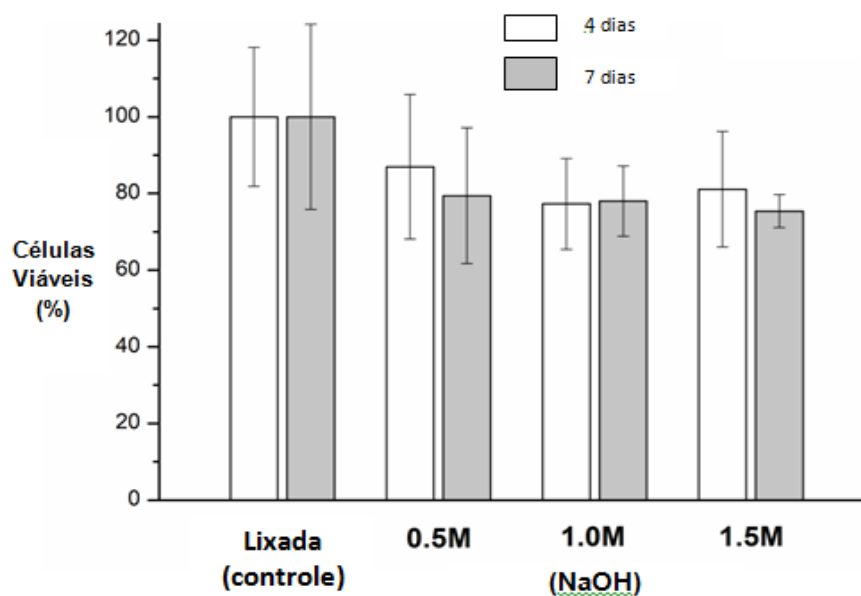


(b)



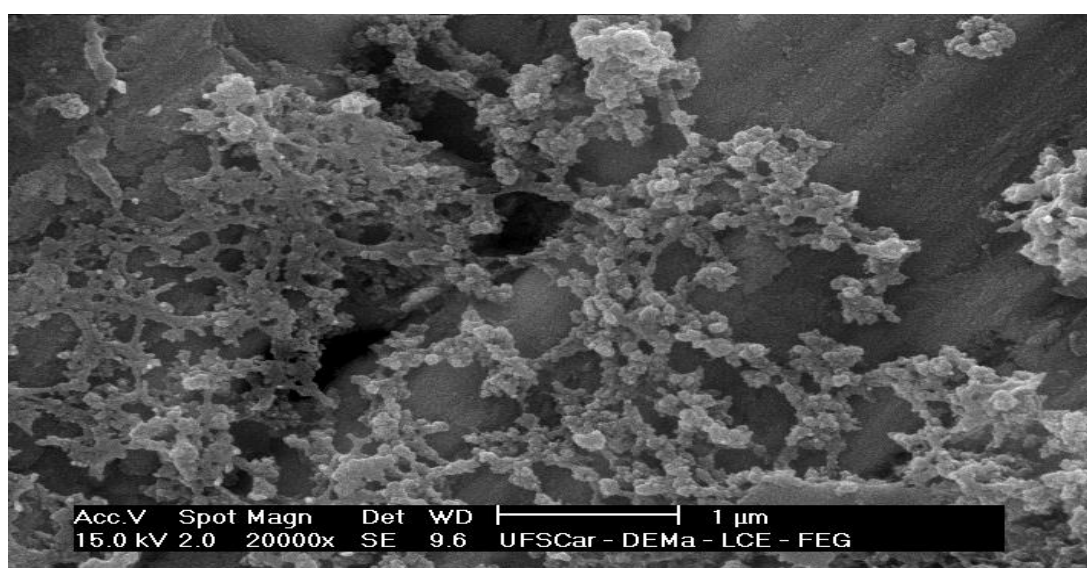
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Viabilidade celular na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn lixada e tratada com NaOH, aos 4 dias e aos 7 dias. (Alamar Blue)



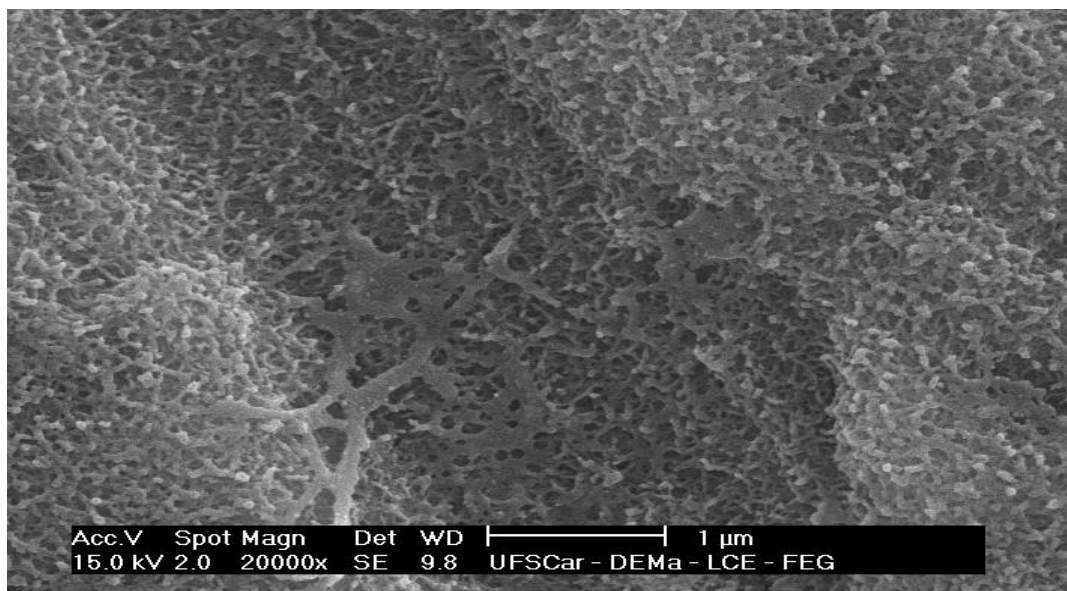
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn lixada, aos quatro dias



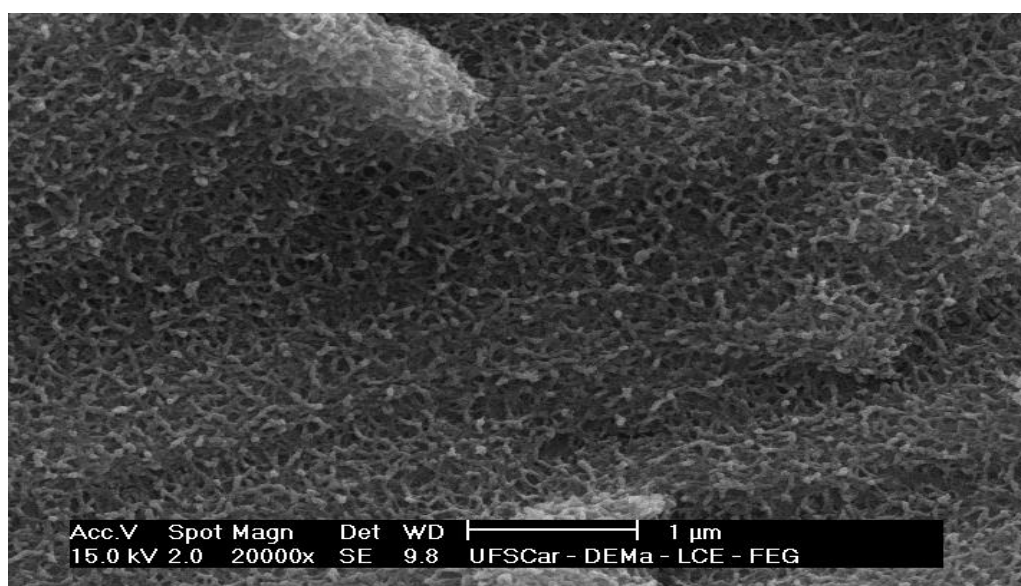
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 0,5M, aos quatro dias



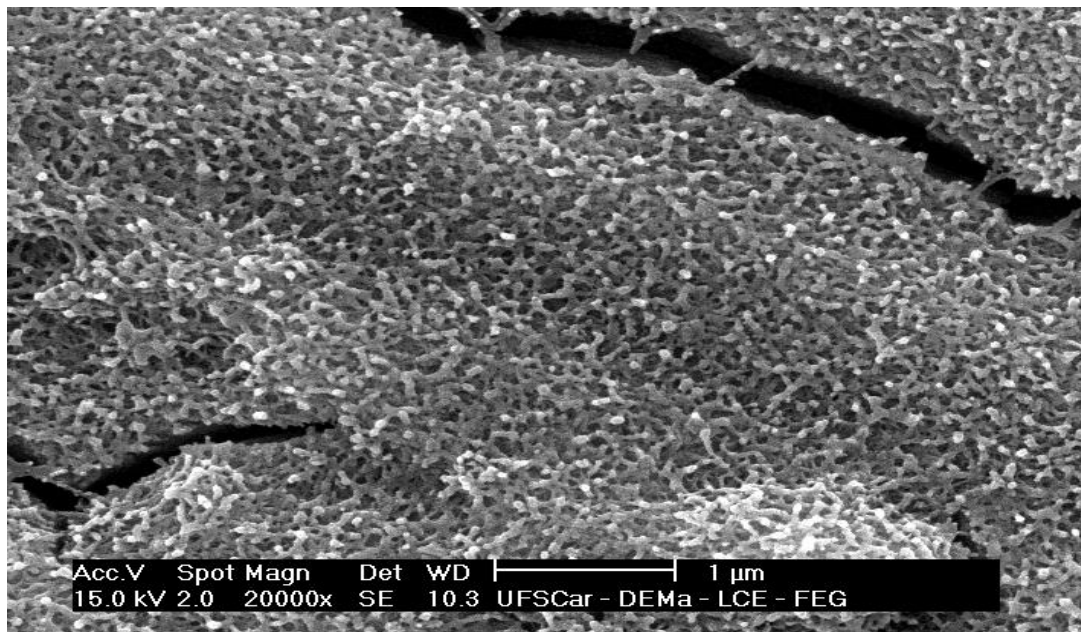
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 1M, aos quatro dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 - Aspecto das células desenvolvidas na superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn tratada com NaOH 1,5M, ao quatro dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Foi formada uma estrutura nanoporosa similar à estrutura do tecido ósseo sem trincas e com poros conectados entre si. Podemos observar que as diferentes molaridades afetaram o tamanho da rede de nanoporos.

Foi observado a mesma morfologia nos trabalhos para a liga binária Ti7,5Mo (Escada, et al., 2010) e para a liga Ti30 Ta (Capellato et al., 2013) mostrando a eficiência da escolha deste parâmetros para esta nova liga.

De acordo com (Gittens et al., 2016) a topografia da superfície tem um efeito direto sobre a resposta biológica do osso, uma vez que a área que suporta a nova formação óssea contém um alto grau de complexidade estrutural gerada após a reabsorção, incluindo características em micro, submicro e monoescala. Logo, uma superfície que mimetiza esta topografia é muito interessante para aplicação biomédica.

A difração de raios X confirmou a presença de uma camada de titânio amorfo, não apresentando a fase anatase e rutilo. De acordo com (Fujio et al., 2017) estas fases são detectadas para temperaturas acima de 600° C e neste trabalho foi utilizado a temperatura de 300° C devido a excelentes resultados verificados com a liga Ti30Ta. Por esse motivo não houve formação de trincas como é verificado para temperatura acima de 600°C.

A molhabilidade da superfície interfere diretamente na resposta biológica para a osseointegração. Estudos mostraram que o tratamento alcalino modifica a molhabilidade da superfície aumentando seu caráter hidrofílico influenciando a adesão e proliferação celular (Hsu et al., 2016; Fujio et al., 2017).

Para todas as condições avaliadas a superfície tornou-se superhidrofilica, nos mostrando que a modificação da topografia é um fator decisivo para adesão celular e bacteriana.

Nas Figuras 15-19 é possível visualizar as imagens das células coradas com DAPI na liga Ti25Ta25Nb35n após o tratamento alcalino com as diferentes molaridades (0,5M, 1,0M e 1,5M). A viabilidade celular foi verificada pelo teste Alamar Blue. A quantificação do núcleo pelo image J indicou que todas as superfícies promoveram adesão e crescimento celular.

Na condição 0,5M ocorreu um aumento células no 4º dia e no 7º dia houve um aumento maior, mas neste caso, foi possível visualizar agrupamentos e espalhamento celular. O mesmo resultado foi verificado para a condição 1M nos dias 4 e 7, porém houve uma diminuição dos agrupamentos e espraiaamentos das células. Na condição 1,5M foi verificado no 7º dia que as células se espraíram de uma forma diferente das outras molaridades.

A presença de agrupamento das células é muito importante, pois indica uma futura formação de osteoblastos, com isso, nesta análise, as condições com 0,5 M e 1,0 M mostraram melhores resultados.

A análise estatística Log 10 (UFC/mL) não mostrou diferenças entre os grupos quando o microrganismo *S. aureus* ficou em contato com as amostras por 48h ($p>0,05$). Porém, na microscopia confocal, foi possível avaliar que as análises qualitativas não corroboraram com as quantitativas (CFU/mL), é possível verificar a diferença do número e viabilidade dos microrganismos quando comparado com o grupo se tratamento alcalino. Nos grupos 0,5M 1,0M foi possível observar uma redução do *S. aureus* quando comparado com o grupo controle (sem tratamento alcalino). E para os grupos 1,0M e 1,5M é possível observar um grande número de bactérias mortas (em vermelho).

Pucket et al. (2010) mostraram em seus estudos que superfícies nanorugosas de Ti são boas para inibir a adesão bacteriana. Quando comparado

com as superfícies convencionais, os materiais com nanoestruturas mostram excelentes biocompatibilidade devido suas propriedades para aumentar a integração das proteínas, resultando em aumento da adesão celular e crescimento tecidual. Os autores demonstraram que existe relação entre a rugosidade da superfície, a energia e a absorção de proteínas. Uma superfície mais rugosa possui maior energia superficial, o que leva a uma maior absorção de proteínas, o que resulta na diminuição da fixação de bactérias.

Neste trabalho, todas as superfícies mostraram caráter superhidrofílico, as diferenças da morfologia dos nanoporos influenciaram nos estudos *in vitro* (MEV). Portanto, o tratamento alcalino com 1,0M foi mais eficiente, porque teve os melhores resultados para adesão e proliferação celular e redução da adesão bacteriana.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada uma modificação da superfície da liga Ti25Ta25Nb3Sn por meio do tratamento alcalino. Ocorreu uma formação nanoporosa, e os estudos *in vitro* demonstraram a diminuição da adesão bacteriana do *S. aureus* na superfície com 1,0M. Da mesma maneira, ocorreu uma boa adesão e proliferação celular. O desenvolvimento de um material com excelentes propriedades de volume e propriedades de superfícies associados com a diminuição da adesão bacteriana é um material possível para confecção de implantes dentais, promovendo redução de infecção e melhor osseointegração.

REFERÊNCIAS*

Águila-Arcos S, Álvarez-Rodríguez I, Garaiyurrebaso O, Garbisu C, Grohmann E, Alkorta I. Biofilm-forming clinical staphylococcus isolates harbor horizontal transfer and antibiotic resistance genes. *Front Microbiol.* 2017 Oct 16;8:2018. doi: 10.3389/fmicb.2017.02018. eCollection 2017. PubMed PMID: 29085354; PubMed Central PMCID: PMC5650641.

Alla RK, Ginjupalli K, Upadhyaya N, Shammam M, Ravi RK. Surface roughness of implants: a review. *Trends Biomater Artif Organs.* 2011; 25(3):112-8.

Albrektsson T. On long-term maintenance of the osseointegrated response. *Aust Prosthodont J.* 1993;7:15-24. PubMed PMID: 8054223

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson RA. The longterm efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986;1(1):11-25. PubMed PMID: 3527955

Al Mustafa M, Agis H, Muller HD, Watzek G, Gruber R. In vitro adhesion of fibroblastic cells to titanium alloy discs treated with sodium hydroxide. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(1):15-9. doi: 10.1111/clr.12294. Epub 2013 Dec 26.

Al-Nawas B, Hangen U, Duschner HN, Krummenauer F, Wagner W. Turned, machined versus double-etched dental implants in vivo. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2007;9(2):71–8. doi: 10.1111/j.1708-8208.2007.00030.

Alva H, Prasad KD, Prasad AD. Bioseal: the physiological and biological barrier for osseointegrated supported prosthesis. *J Dent Implant.* 2013;3:148-52. doi: 10.4103/0974-6781.118855.

Alves-Rezende MCR, Dekon SFC, Grandini CR, Bertoz APM, Alves-Claro, APR. Tratamento de superfície de implantes dentários: SBF. *Rev Odont Araçatuba.* 2011;32:38-43.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Andrade MCA, Filgueiras MRT, Bastos IN, Ogasawara T. Os efeitos do alumínio e do vanádio na adesão osso-implante de ligas de titânio: estudo teórico. 15º Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Mecânica. Águas de Lindóia, SP. Rio de Janeiro: ABCM; 1999.

Bell BF, Schuler M, Tosatti S, Textor M, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. Clin Oral Implants Res. 2011 Aug; 22(8):865–72. PMC PMID: 21244501

Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. J Clin Periodonto. 2002;29(supplement 3):197–233. PubMed PMID: 12787220

Bergmann CP, Stumpf A. Dental ceramics: topics in mining, metallurgy and materials engineering [e-book] Berlin:Springer-Verlag; 2013.

Bezerra RM, Souza PCRD de, Ramires I, Bottino MA, Guastaldi AC. Microestrutura e resistência à corrosão do Ti c.p. soldado a laser utilizando em prótese sobre implantes. Eclet Quím. 1999;(24):113-24. doi.org/10.1590/S0100-46701999000100009.

Braceras I, De Maetzu MA, Alava JI, Gay-Escoda C. In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009;38(3):274-8. PubMed PMID: 19200692. doi: 10.1016/j.ijom.2008.12.016

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent. 1983;50(3):399–410. PubMed PMID: 6352924

Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis tejido-integradas: la oseointegración en la odontología clínica. Berlin: Quintessenz VerlagsGmbH; 1987. 350 p.

Bollen CM, Papaianno W, Eldere JV, Schepers E, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. Clin Oral Implants Res. 1996 Sep;7(3):201-11. PubMed PMID: 9151584

Bugarin Junior JG, Garrafa V. Bioethics and biosafety: the use of biomaterials in dental practice. *Rev Saúde Pública*. 2007 Apr.; 41(2): 223-8. doi.org/10.1590/S0034-89102007000200007

Buser D, Schenk RK, Steinemann SG, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25(7):889-902. PMID: 1918105. doi 10.1002/jbm.820250708

Capellato P, Riedel NA, Williams JD, Machado JPB, Popat KC, Alves Claro APR. Surface modification on Ti-30Ta alloy for biomedical application. *engineering*. 2013;5:707-13. doi.org/10.4236/eng.2013.59084

Chang Y-C, Ho K-N, Feng S-W, Huang H-M, Chang C-H, Che-Tong Lin C-T, et al. Fibronectin-grafted titanium dental implants: an *in vivo* study. *Biomed Res Int*. 2016; Article ID 2414809, 11 pages. doi.org/10.1155/2016/2414809

Chrcanovic BR, Martins, MD. Study of the influence of acid etching treatments on the superficial characteristics of Ti. *Mat Res*. 2014;17(2);373-80. doi.org/10.1590/S1516-14392014005000042

Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, Sakagami H, Hibino Y, Nakajima H, Shimada J. Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo*. 2010 Jul-Aug;24(4):519-23. PubMed PMID: 20668319.

Cuellar-Flores M, Acosta-Torres LS, Martínez-Alvarez O, Sánchez-Trocino B, Fuente-Hernández JdeLa, Garcia-Garduño R, et al. Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on titanium. *Dent Res J. (Isfahan)* 2016 Nov-Dec 13(6):473–7. PMC; PMCID: PMC5256009

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998 Sep-Oct;11(5):391–401. PubMed PMID: 9922731

De Leonardis D, Garg AK, Pedrazzoli V, Pecora GE. Clinical evaluation of the treatment of class II furcation involvements with bioabsorbable barriers alone or associated with demineralized freeze-dried bone allografts. *J Periodontol*. 1999 Jan;70(1):8-12. PubMed PMID: 10052766. doi: 10.1902/jop.1999.70.1.8

Deng CH, Sun XZ, Gao Y, Luo DS, Liu GH, Huang YP. An experimental study of the culture, isolation and biological characteristics of rat adipose tissue-derived stromal cells in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue*.2008;14(2):99-105. PubMed PMID: 1839171

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep; 8(9):881–90. doi: 10.3201/eid0809.020063.

Escada ALA, Rodrigues Jr D, Machado JPB, Alves Claro APR. Surface characterization of Ti-7,5Mo alloy modified by biomimetic method. *Surf Coat Technol*. 2010;205:383-7. doi: 10.1016/j.surfcoat.2010.06.067

Ferraris S, Spriano S. Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Apr; 61(1):965-78. doi: 10.1177/2041731418789838

Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants: a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011 Oct;32 (28):6692–709. doi: org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078

Fujio M, Komasa S, Nishizaki H, Sekino T, Ozazaki J. Biocompatibility of titanium surface nanostructures following chemical processing and heat treatment. *Front Nanosci Nanotech*. 2017;3(1):1-10. doi: 10.15761/FNN.1000143

García-Contreras R, Kanagawa S, Beppu Y, Nagao T, Sakagami H, Nakajima H, et al. Morphological features of osteoblasts cultured on ultraviolet-irradiated titanium plates. *In Vivo*. 2011Jul-Ago;25(4):649–55. PubMed PMID: 21709009

Geetha M, Singh AK, Asokamani R ,Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants: a review. *Prog. Mat Sci*. 2009 May; 54(3): 397-425. doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004

Gil FJ, Padrós A, Manero JM, Aparício C, Nilsson M, Planell JA. Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopedic and dental implants. *Mater Sci Eng*. 2002Oct;22(1):53-60. doi.org/10.1016/S0928-4931(01)00389-7

Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures:lessons for spine implants. *Acta Biomater.*, 2014 Aug;10(8):3363–71. PubMed PMID: 24721613 PMC 4103432. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.037

Greenstein G, Cavallaro J, Romanos G, Tarnow D. Clinical recommendations for avoiding and managing surgical complications associated with implant dentistry: a review. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8):1317–29. PMID: 18672980. doi: 10.1902/jop.2008.070067.

Gotfredsen K, Nimb L, Hjørtting-Hansen E, Jensen JS, Holmén A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants: an experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1992;3(2):77–84. doi: 10.1034/j.1600-0501.1992.030205.x.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*. 2010; 33(6): 1352-58. doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025

Guridi A, Diederich AK, Aguila-Arcos S, Garcia-Moreno M, Blasi R, Broszat M, et al. New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 May;50:1-11. PubMed PMID: 25746238. doi: 10.1016/j.msec.2015.01.080

Hamouda IM, Enan ET, Al-Wakeel EE, Yousef MK. Alkali and heat treatment of titanium implant material for bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 Jul-Aug;27(4):776-84. PubMed PMID: 22848878

Hanib NH, Hamzah F, Zarina Omar Z, Subuki I. Surface characterization on alkali-heat-treatment on titanium alloy. *Malays J Anal Sci*. 2016; 20 (6):1429 – 36. doi.org/10.17576/mjas-2016-2006-23

Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 1998 Aug; 19(6):1419-23. PubMed PMID: 9794512. doi: 10.1016/s0142-9612(98)00133-1

Hing K. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry. *Int J Appl Ceram. Technol*. 2005;2:184–99. doi.org/10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x

Hsu SK, HoWF, WuSC, Chen YS, Hsu HC. In vitro study of Ti-Nb-Sn alloy surface modified with RGD peptide. *Thin Solid Films*. 2016;620:139-44. doi: 10.1016/j.tsf.2016.09.063

Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(3):1033-41. PubMed PMID:11884830

Huanhuan J, Pengjie H, Sheng X, Binchen W, Li S. The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration. *J Biomat Appl* 2017 Nov;32(5):561-9. doi: 10.1177/0885328217735953. Epub 2017 Oct 12.

Hubsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009 Nov;26(72):432-62. PubMed PMID: 19940912. doi: 10.1038/nature08601

Jain R, Kapoor D. The dynamic interface: a review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Sep-Oct;5(5):354-8. doi: 10.4103/2231-0762.165922. Review. PubMed PMID: 26539385; PubMed Central PMCID: PMC4606597.

Jaramillo CD, Rivera JA, Echevarria A, Obyrne J, Congote D, Restrepo LF. Osteoconductive and osseointegration properties of a commercial hydroxyapatite compared to a synthetic product. *Rev Colomb Cienc Pec*. 2010 Out/Dez; 23(4):471- 83 .

Jayesh RS, Wood MC, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Implants*. 2005 May-Jun; 20(3):425–31. PMID: 15973954

Jayesh RS, Dhinakarsamy V. Osseointegration. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015 Apr];7(Suppl 1):S226–S229. doi: 10.4103/0975-7406.155917.

Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int*. 2015;2015:791725. doi: 10.1155/2015/791725. Epub 2015 Sep 7. Review. PubMed PMID: 26436097; PubMed Central PMCID: PMC4575991.

Jones FH. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Rep*. 2001;42(3–5):75–205. doi.org/10.1016/S0167-5729(00)00011-X

Katahira K, Ogura Y, Gotoh Y, Hayashi T. Draft genome sequences of five rapidly growing *Mycobacterium* species, *M. thermoresistibile*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. canariasense*, *M. brisbanense*, and *M. novocastrense*. *Genome Announc.* 2016;4(3):e00322-16. PMC PMID: 27231354 doi:10.1128/genomeA.00322-16

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.*2005; 26:5474–91. PMID:15860204. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002

Kazek-Kesik A, Leśniak K, Orzechowska BU, Drab M, Wiśniewska A, Simka W. Alkali treatment of anodized titanium alloys affects . *metals* 2018;(8):29. doi:10.3390/met8010029

Kim HM, Miaji F, Kakubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability alkali-treated Ti metal in body environment. *J Ceram Soc Japan.*1997;105(2):111-6.

Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou ME, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, et al. New Ti-Alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: a review. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2908570. doi: 10.1155/2016/2908570. Epub 2016 Jan 14. Review. PubMed PMID: 26885506; PubMed Central PMCID:PMC4738729.

Kobatake R, Doi K, Oki Y, Umehara H, Kowano H, KuboT, et al. Investigation of effective modification treatments for titanium membranes. *Appl Sci.* 2017;7:1022. doi:10.3390/app7101022.

Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Mater.* 1998;46(7):2519-27. doi: 10.1016/S1359-6454(98)80036-0.

Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials.*2003 Jun;24(13):2161-75. doi:10.1016/S0142-9612(03)00044-9 .

Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials.* 2006;27(15):2907-15. PubMed PMID:1448693 doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017

Kolenbrander PE, Anderson RN, Blehart DS. Communications among oral bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2002;66:486–505.

Komasa S, Kusumoto T, Taguchi Y, Nishizaki H, Sekino T, Umeda M, et al. Effect of nanosheet surface structure of titanium alloys on cell differentiation. *J Nanomat*, 2014; Article ID 642527, 11 pages, 2014. doi:10.1155/2014/642527. NCBI PMC120797

Konatu TR. Análise da rota de processamento liga Ti30Ta visando aplicação biomédica [dissertação]. Guaratinguetá (SP): Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá; 2014.

Kubies D, Himmlová L, Riedel T, Chánová E, Balík K, Douderová M, et al. The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiol Res*. 2011;60:95–111. PMID: 20945966

Kurella A, Dahotre NB. Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. *J Biomater Appl*. 2005 Jul;20(1):5-50. Review. PubMed PMID: 15972362.

Lee K, Yoo D. Large-area sodium titanate nanorods formed on titanium surface via. NaOH alkali treatment. *Arch Metall Mater*, 2015;60:1371–4. doi. org/10.1515/amm-2015-0133.

Lind M, Overgaard S, Bünger C, Soballe K. Improved bone anchorage of hydroxypatite coated implants compared with tricalcium-phosphate coated implants in trabecular bone in dogs. *Biomaterials*. 1999 May; 20(9):803-8. doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00216-6

Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Rep*. 2004;47(3–4):49–121. doi: 10.1016/j.mser.2004.11.001

Lou W, Dong Y, Zhang H, Jin Y, Hu X, Liu J, et al. Preparation and characterization of lanthanum-incorporated hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *Int J Mol Sci*. 2015;16:21070–86; PMC doi: 10.3390/ijms160921070

Lyndon J, Boyd BJ, Birbilis N. Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic applications. *J Control Release*. 2014;179:63–75. doi:10.1016/j.jconrel.2014.01.026

Metikos-Hukovic M, Tkalcec E, Kwokal A, Piljac J. An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite. *Surf Coat Technol*. 2003 Feb;165(1-30):40-50. doi: 10.1016/S0257-8972(02)00732-6

Mendes MWD, Ágrede CG, Bressiani AHA, Bressiani JC. Avaliação do recobrimento biomimético em ligas de Ti-27Nb-13Zr. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal: IPEN; 2012 Ago 22-5, Natal.

Milosev I. Surface treatment of titanium with antibacterial agents for implant applications. In: Djokic S.(ed.). *Biomedical and pharmaceutical applications electrochemistry*. Swiça: Spring; 2016. doi: 1-.1007/978-3-31931849-3.

Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar; 38 Suppl 11:203-13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x.

Natali AN, Carniel EL, Pavan PG. Investigation of viscoelastoplastic response of bone tissue in oral implants press fit process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Nov; 91(2):868–75. PubMed PMID: 1967368. doi: 10.1002/jbm.b.31469

Narang S, Narang A, Jain K, Bhatia V. Multiple immediate implants placement with immediate loading. *J Indian Soc Periodontol*. 2014 Sep-Oct;18(5):648–50. doi: 10.4103/0972-124X.142466.

Nemezio MA, Oliveira KMH, Romualdo PC, Queiroz AM, Silva FWGP, Silva RAB, et al. Association between fever and primary tooth eruption: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2017 Jul-Sep;10(3):293–8. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1453.

Nishiguchi S, Nakamura T, Kobayashi M, Kim HM, Miyaji F, Kokubo T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*. 1999;20:491-500.

Nischimoto SK, Nischimoto W, Park S-W, Lee K-M, Kim H-S, Ko J-T, et al. The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jul-Aug;23(4):675-80.

Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Gittens RA, Schneider JM, Haithcock D, Ullrich P, et al. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of

angiogenic factors. *Spine J.* 2013; 13(11):1563–70. doi: 10.1016/j.spinee.2013.03.047

Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Schneider JM, Hyzy SL, Haithcock DA, Ullrich PF, et al. Osteoblasts exhibit a more differentiated phenotype and increased bone morphogenetic protein production on titanium alloy substrates than on poly-ether-ether-ketone. *Spine J.* 2012 Mar;12 (3):265–72. PMC PMID: 22424980;

Olivares-Navarrete R, Hyzy, SL, Slosar PJ, SchineiderJM, Schwartz Z, Boyan, BD. Implant materials generate different peri-implant inflammatory factors. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015 Mar;40(6):399–404. doi: 10.1097/BRS.0000000000000778.

Oliveira LL, Silva KB, Escada ALA, Claro APRA. Caracterização da superfície da liga Ti-Mo após crescimento organizado de nanotubos de TiO₂ via oxidação anódica para aplicações biomédicas. *Arch Health Invest* 2016;5:160-4. doi: org/10.201270/archi.v5i3.1324.

Pattanayak DK, Yamaguchi S, Matsushita T, Kokubo T. Nanostructured positively charged bioactive TiO₂ layer formed on Ti metal by NaOH, acid and heat treatments. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22:1803-12. PubMed PMID:21670996 doi: 10.1007/s10856-011-4372-x

Pinholt EM. Brånemark and ITI dental implants in the human bone-grafted maxilla: a comparative evaluation. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(5):584–92. doi: 10.1034/j.1600-0501.2003.140508.x.

Puckett SD, Taylor E, RaimondoT, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surface and bacterial attachment. *Biomater.* 2010, 31:706-13. doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.081

Quirynen M, Van Der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbuch GI, et al. An in vivo study of the influence of surface roughness of implants on the microbiology of supra and subgingival plaque. *J Dent Res.* 1993 Sep; 72(9):1304-9. PMID: 8395545. doi: 10.1177/00220345930720090801

Romeo E, Storelli S. Systematic review of the survival rate and the biological, technical, and aesthetic complications of fixed dental prostheses with cantilevers on implants reported in longitudinal studies with a mean of 5 years follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(6):39–49. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02551.x

Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: a dental microbial infection. J Nat Sci Biol Med. 2011 Jan-Jun;2(1):71–5. doi: 10.4103/0976-9668.82317.

Seixas MR. Desenvolvimento de uma nova liga quaternária Ti25Ta25Nb3Sn para aplicações odontológicas [tese]. Guaratinguetá (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá; 2015.

Seixas MR, Bortolini Jr C, Pereira JrA, Nakazato RZ, Popat KC, Claro APRA. Development of a new quaternary alloy Ti–25Ta–25Nb–3Sn for biomedical applications. Mat Res Express. 2018;5(2):article id.025402. doi.org/10.1088/2053-1591/aa87c8

Stenport VF, Johansson CB. Evaluations of bone tissue integration to pure and alloyed titanium implants. Clin Implant Dent Relat Res. 2008;10:191–9. PMID: 18241219. doi: 10.1111/j.1708-8208.2007.00077.x

Su Y, Komasa S, Li P, Nishizaki M, Chen L, Terada C, et al. Synergistic effect of nanotopography and bioactive ions on peri-implant bone response. Int J Nanomedicine. 2017;12: 925–34. doi: 10.2147/IJN.S126248.

Tellefsen G, Linder L, Liljeborg A, Johannsen G. The influence of surface roughness of titanium on bacterial accumulation/adhesion *in vitro*. Dentistry. 2016;6(2):1-4. doi: 10.4172/2161-1122.1000361

Toptan F, Alves FC, Pinto AMP, Ponthiaux P. Tribocorrosion behavior of bio-functionalized highly porous titanium. J Mech behavior Biomed mat. 2017 May;69:144–52. doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.01.006

Tossato LTD. Estudos do crescimento anódico de óxidos e da deposição de apatitas sobre a liga biocompatível Ti-13Nb-13Zr [tese]. São Carlos (SP): Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); 2009.

Tsukanaka M , Yamamoto K, Fujibayashi S, Pattanayak DK, Matsushita T, Kokubo T ,et al. Evaluation of bioactivity of alkali and heat-treated titanium using fluorescent mouse osteoblasts. J Bone Miner Metabol. 2013;32(6):660–70. doi: 10.1007/s00774-013-0544-8

Valente FL, Santos LC, Sepúlveda RV, Gonçalves GP, Eleotério RB, Reis ECC, et al. Hydroxyapatite-lignin composite as a metallic implant-bone tissue osseointegration improver: experimental study in dogs. Ciência Rural. 2016 Fev;46(2):324-9. doi: doi.org/10.1590/0103-8478cr20150110

Wang C, Feng Y, Wang D, Zheng Y, Su Z, Fu J, et al. Effect of a hybrid micro/nano-integrated titanium surface on behavior of rat osteoblasts. *J Wuhan Univ Technol-Mater Sci Ed*. 2017 Apr;32(2):459–68. doi: 10.2147/IJN.S39357.

Wong JY, Bronzinho JD, Peterson DR. *Biomaterials* [e-book]. Boca Raton, FL CRC Press; 2013.

Winter W, Klein D, Karl M. Micromotion of dental implants: basic mechanical considerations. *J Med Eng*, 2013; 2013:9 Article ID 265412, 9 pages. doi:10.1155/2013/265412

Yeo I-S. Reality of dental implant surface modification: a short literature review. *Open Biomed Eng J*. 2014 Oct; 8: 114–9. doi.org/10.1155/2013/265412

Yuan K, Chan YJ, Kung KC, Lee TM. Comparison of osseointegration on various implant surfaces after bacterial contamination and cleaning: a rabbit study. *Int J Oral Maxillo Implants*. 2014 Jan/Fev; 29(1):32-40. doi: 10.11607/jomi.2436