



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

DAPHNE DE CAMARGO REIS MELLO

**INTERAÇÕES BIOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS DA
LIGA Ti-35Nb-7Zr OXIDADAS E NÃO OXIDADAS: estudo *in*
*vitro***

2017

DAPHNE DE CAMARGO REIS MELLO

**INTERAÇÕES BIOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS DA LIGA Ti-
35Nb-7Zr OXIDADAS E NÃO OXIDADAS: estudo *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 BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. 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).

Mello, Daphne de Camargo Reis

Interações biológicas e microbiológicas da liga Ti-35Nb-7Zr oxidadas e não oxidadas: estudo in vitro. / Daphne de Camargo Reis Mello. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Luana Marotta Reis De Vasconcellos.

1. Liga Ti-35Nb-7Zr . 2. Biofilmes monotípicos. 3. Osteoblastos. 4. Oxidação. I. De Vasconcellos, Luana Marotta Reis, 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

Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª Adj. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª Drª Sandra Giacomini Schneider

Universidade de São Paulo (USP)

Escola de Engenharia de Lorena

Campus de Lorena

São José dos Campos, 20 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, Criador e Mantenedor da vida! Meu Amigo fiel, Aquele em quem eu mais confio. Obrigada por mais um objetivo alcançado e por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida.

Ao **meu marido**, por me entender como ninguém, pela parceria, amor, paciência e amizade. Obrigada por tornar os momentos estressantes mais leves e até engraçados. Por todas as vezes que você assumiu a direção de nossa família sozinho porque eu precisei me afastar e dedicar tempo extra nesse projeto. Sem você, nada disso seria possível. Obrigada por sempre me ver com olhos tão gentis, você é alguém especial, raro de se encontrar, sou grata a Deus por você em minha vida. Sem sua visão otimista meu caminho teria sido mais difícil. Amo você!

Aos **meus filhos** por trazerem cor, alegria e motivação para minha vida, faço tudo e sonho tudo por eles! Amo vocês mais do que posso entender!

Aos meus **pais** pelo amor, exemplo e apoio. Se estou aqui agora, foi porque antes, eles se esforçaram muito para que eu alcançasse esse objetivo. Obrigada papai porque pude me espelhar em você para trilhar esse caminho. Obrigada mamãe por seu amor, apoio e orações para que eu concluísse essa etapa. Amo vocês!

Aos **meus irmãos** pela torcida, sei que estão felizes e é maravilhoso tê-los por perto (mesmo que geograficamente longe!), amo absurdamente.

Algumas pessoas não encontram em um irmão a amizade de um amigo verdadeiro. Eu fui muito privilegiada por ter as duas pessoas em uma só! **Débora**, você é minha melhor amiga e não existe distância neste mundo que mude isso! Nesses dois anos tão intensos, você foi o ombro amigo e o “puxão de orelha” que eu precisei, muito obrigada! Amo você!

Aos **meus sogros**, minha mais profunda gratidão por todo amor, paciência e tempo com meus filhos. Obrigada sogro por todas as vezes que você abriu mão do seu tempo para se dedicar às crianças. Obrigada sogra por sua disponibilidade infinita de ficar com as crianças todas as vezes que eu precisei me ausentar. Só Deus sabe quantas vezes foram e sou imensamente grata porque sei que neste tempo, meus filhos foram amados e muito bem cuidados por você.

À **Cida**, meu anjo da guarda que me ajuda em casa para que tudo fique em ordem, por todo seu empenho, carinho e cuidado especial com meus filhos, eles tem uma vovó a mais!

Agradeço a querida amiga **Drª Stephanie B. Fernandes Dias**, um verdadeiro presente de Deus para mim! Foi ela a grande incentivadora para que eu buscasse esse sonho. Obrigada amiga, você não faz idéia de como sua amizade foi crucial em minha vida, você chegou em um momento que eu pensava em desistir e graças a sua amizade e influência eu pude buscar novos caminhos.

Agradeço à minha orientadora, querida **Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, pelo carinho, amizade, parceria e dedicação durante todo o desenvolvimento deste projeto. Sempre atenciosa, colaboradora e profissional. Obrigada por acreditar em mim! Obrigada por fazer parte deste momento

especial em minha vida. Foi um prazer e um privilégio aprender com você! Muito além de conhecimento científico, você agregou só coisas boas em minha vida, levarei isso comigo sempre!

Meus sinceros agradecimentos à **Profª Adj. Luciane Dias de Oliveira**, sempre alegre, proativa e dedicada, obrigada pela disponibilidade, atenção e colaboração neste trabalho.

Obrigada a **Profª Drª Sandra Schneider** pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

Obrigada também a querida mestrande **Fábria Z. D'Antolla** por sua colaboração e amizade, por me socorrer nas questões de engenharia!

Agradeço a toda equipe do **DEMAR de Lorena** pela confecção das amostras.

Agradeço à **Drª Gabriela Santana** por compartilhar e ensinar seus conhecimentos, muito obrigada!

Ao **Dr Jonatas Rafael** pela paciência e disponibilidade todas as vezes que eu precisei, minha gratidão a sua pessoa.

A todos os **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal**

Ao **programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal** na pessoa da coordenadora **Profª Drª Ana Lia Anbinder** pela dedicação aos discentes.

À **Universidade Estadual Paulista (Unesp)**, na pessoa do diretor do **Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos**, Prof. Dr. **Estevão Tomomitsu Kimpara** e da vice-diretora Prof^a. Dr^a. **Rebeca di Nicoló**, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

À aluna de iniciação científica **Thais Fernanda Gonçalves** pelo trabalho intenso, confiança e amizade no desenvolvimento deste estudo. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao técnico **Walter Cruz**, pelo auxílio, companhia e carinho.

Aos técnicos **Sérgio Alves** e **Domingos**, pela colaboração.

A todos os funcionários da Universidade Estadual Paulista **Júlio de Mesquita Filho-UNESP**.

A todos os meu **familiares** e **amigos** que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos os **animais** experimentais envolvidos neste trabalho, o meu mais profundo agradecimento e respeito.

“Os mais poderosos intellectos da Terra não podem compreender a Deus. Os homens podem estar sempre a pesquisar, sempre a aprender, e ainda há, para além, o infinito”

ELLEN GOULD WHITE

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Amostras.....	20
3.2 Ensaios Biológicos	24
3.2.1 Cultura Celular	24
3.2.2 Adesão Celular.....	28
3.2.3 Determinação da Viabilidade Celular (Citotoxicidade).....	28
3.2.4 Conteúdo de Proteína Total	30
3.2.5 Atividade de Fosfatase Alcalina.....	31
3.2.6 Formação e Quantificação dos Nódulos de Mineralização	32
3.2.7 Proliferação Celular sobre as Amostras Utilizando o corante Dapi ...	33
3.3 Avaliação da Formação de Biofilme Microbianos	34
3.4 Método de Análise de Resultados	35
4 RESULTADO	36
4.1 Adesão Celular.....	36
4.2 Determinação da Viabilidade Celular (Citotoxicidade)	39
4.3 Conteúdo de Proteína Total	40
4.4 Atividade de Fosfatase Alcalina.....	41
4.5 Formação e Quantificação dos Nódulos de Mineralização	42
4.6 Proliferação Celular sobre as Amostras Utilizando o corante Dapi	44

4.7 Formação de Biofilme	47
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO.....	71

Reis Mello DC. Interações biológicas e microbiológicas da liga Ti-35Nb-7Zr oxidadas e não-oxidadas: estudo *in vitro* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo neste estudo foi avaliar *in vitro* a influência da liga Ti-35Nb-7Zr e de seus elementos básicos, submetidos ou não ao processo de oxidação, na atividade de osteoblastos e na formação de biofilmes monotípicos. As amostras foram confeccionadas com diferentes materiais: a) titânio puro (Ti - controle); b) liga Ti-35Nb-7Zr (L); c) Nb (nióbio); d) Zr (zircônio); e) Ti oxidado (TiO); f) liga Ti-35Nb-7Zr oxidada (LO); g) Nb oxidado (NbO); h) Zr oxidado (ZrO). Previamente ao estudo *in vitro*, todas as amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDS) para observar a topografia de superfície e a presença dos elementos básicos. Células mesenquimais obtidas de fêmures de rato, após diferenciação em osteoblastos foram cultivadas sobre as amostras. Após períodos pré-determinados, foram realizados os testes de citotoxicidade, atividade de fosfatase alcalina, produção de proteína total, formação e quantificação dos nódulos de mineralização adesão e proliferação celular. Para análise da formação dos biofilmes monotípicos, suspensões padronizadas (10^6 céls/mL) com micro-organismos de *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foram cultivados por 24 h sobre as amostras e submetidos ao teste de MTT. Todas as amostras permitiram o espriamento celular. O Nb e Zr exibiram uma adesão celular mais madura com prolongamentos celulares evidenciados. O Ti e a L apresentaram maior viabilidade celular sendo estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,05$). O ZrO apresentou menor viabilidade exibindo diferença estatística com o Ti e a Liga. O NbO expressou maior quantidade de proteína total com diferença estatística da L, Zr e LO ($p < 0,05$) enquanto o Zr exibiu o menor resultado com diferença estatística do Ti, Nb, TiO, NbO e ZrO. Na quantificação da atividade de fosfatase alcalina o Zr apresentou o melhor resultado e foi estatisticamente diferente de todos os demais ($p < 0,05$). O Ti demonstrou menor atividade de fosfatase alcalina diferindo estatisticamente do Nb, Zr e ZrO. O Ti demonstrou o maior resultado na quantificação dos nódulos de mineralização com diferença estatística do NbO e ZrO. O ZrO exibiu menor resultado sendo semelhante estatisticamente ao Zr e ao NbO. Em todos os grupos foram observadas a proliferação celular onde a LO apresentou o maior número de células proliferadas e o ZrO a menor proliferação sendo que não

houve diferença estatística. O elemento Nb, independente da oxidação obteve a menor formação de biofilme para *S. aureus* e *P. aeruginosa* com diferença estatística ($p < 0,05$) do Zr, TiO, LO e NbO para *S. aureus* e Ti para *P. aeruginosa*. O elemento Ti, oxidado ou não, obteve menor formação de biofilme para *C. albicans* e *S. mutans* com diferença estatística de todos para ambos os microrganismos ($p < 0,05$). O Zr apresentou maior formação de biofilme para *S. aureus* com diferença estatística do Ti, Liga, Nb, LO e ZrO. O ZrO demonstrou maior formação de biofilme para *S. mutans* com diferença estatística dos demais ($< 0,05$). Para *C. albicans* a L demonstrou maior aderência de biofilme diferindo estatisticamente dos demais. Concluímos que a liga Ti-35Nb-7Zr apresentou influência positiva na atividade osteoblástica nos testes in vitro bem como na avaliação microbiológica quanto a formação de biofilmes monotípicos podendo ser indicada para o uso biomédico. Sugere-se que a diminuição de quantidade de biofilme observada seja devido a ação do elemento básico Nióbio enquanto que o Zircônio pode ter auxiliado na diferenciação celular. Devido a variedade de resultados encontrados nas amostras oxidadas, mais estudos que abordem a influência desta superfície no comportamento celular de osteoblastos e microbiológicos são necessários.

Palavras-chave: Liga Ti-35Nb-7Zr. Biofilme. Osteoblastos. Oxidação.

Reis Mello DC. *Biological and microbiological interactions of the Ti-35Nb-7Zr alloy it's oxidized and non-oxidized: in vitro study*[dissertation. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in vitro the influence of the Ti-35Nb-7Zr alloy and its basic elements, whether or not subjected to the oxidation process, on the osteoblast activity and on the formation of monotypic biofilms. The samples were made with different materials: a) pure titanium (Ti - control); B) Ti-35Nb-7Zr (A) alloy; C) Nb (niobium); D) Zr (zirconium); E) Oxidized Ti (TiO); F) oxidized Ti-35Nb-7Zr (AO); G) Nb oxidized (NbO); H) Oxidized Zr (ZrO). Prior to the in vitro study, all samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) to observe the surface topography and the presence of the basic elements. Mesenchymal cells obtained from mouse femurs after differentiation into osteoblasts were cultured in the samples. After pre-determined periods, cytotoxicity tests, alkaline phosphatase activity, total protein production, formation and quantification of the mineralization nodules, adhesion and cell proliferation were performed. To analyze the formation of monotypic biofilms, standardized suspensions (10^6 cells / ml) with *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* microorganisms were cultured for 24 h on the samples and submitted to the MTT test. All samples allowed for cell spreading. Nb and Zr exhibited more mature cell adhesion with evidenced cell extensions. The Ti and A presented greater cell viability being statistically different from the others ($p < 0.05$). ZrO presented lower viability exhibiting statistical difference with Ti and A. The NbO expressed the highest amount of total protein with a statistical difference of L, Zr, and AO ($p < 0.05$) while Zr showed the lowest result with a statistical difference of Ti, Nb, TiO, NbO, and ZrO. In the quantification of the alkaline phosphatase activity, the Zr presented the best result and was statistically different from all the others ($p < 0.05$). Ti showed lower alkaline phosphatase activity differing statistically from Nb, Zr, and ZrO. Ti showed the highest result in the quantification of mineralization nodules with a statistical difference of NbO and ZrO. ZrO showed lower result being statistically similar to Zr and NbO. In all groups, cell proliferation was observed where AO had the highest number of proliferated cells and ZrO had the lowest proliferation, and there was no statistical difference. The Nb element, independent of oxidation, obtained the lowest biofilm formation for *S. aureus* and *P. aeruginosa* with a statistical difference ($p < 0.05$) of Zr, TiO, AO and

NbO for S. aureus and Ti for P. aeruginosa. The Ti element, oxidized or not, obtained lower biofilm formation for C. albicans and S. mutans with a statistical difference of all for both microorganisms ($p < 0.05$). The Zr presented higher biofilm formation for S. aureus with a statistical difference of Ti, A, Nb, AO and ZrO. The ZrO showed a higher biofilm formation for S. mutans with a statistical difference of the others ($p < 0.05$). For C. albicans an L showed a higher biofilm adhesion differing statistically from the others. We conclude that the Ti-35Nb-7Zr alloy had a positive influence on the osteoblastic activity in the in vitro tests as well as on the microbiological evaluation regarding the formation of monotypic biofilms and could be used for biomedical use. It is suggested that the decrease in the amount of biofilm observed is due to the action of the basic element Niobium whereas Zirconium may have aided in cell differentiation. Due to the variety of results found in the oxidized samples, further studies that address the influence of this surface on osteoblast and microbiological cell behavior are required.

Keywords: Ti-35Nb-7Zr League. Biofilm. Osteoblasts. Oxidation.

1 INTRODUÇÃO

Uma das descobertas mais importantes da Odontologia do século 20 foi o processo da osseointegração (Branemark *et al.*, 1977). Os implantes devem permanecer no corpo humano por longo período e suportar as mesmas cargas que o osso circunjacente, sendo assim, é importante que estes não apenas permitam a osseointegração mas que apresentem características mecânicas similares ao tecido ósseo (Kohavi *et al.*, 2013).

O titânio e suas ligas são os metais mais comumente empregados na área biomédica (Bottino *et al.*, 2009), devido as suas propriedades físico-químicas (Niinomi, 2008a). A grande vantagem das ligas de Ti para o uso biomédico é ser completamente inertes e, portanto, representam uma excelente alternativa para pacientes que têm alergia ou reações tóxicas a vários outros metais (Branemark, 1983; Kasemo, 1983; Schwartz *et al.*, 2007).

O Ti comercialmente puro (Ti-Cp) e a liga Ti-6Al-4V são os materiais mais comumente utilizados. A liga Ti-6Al-4V apresenta excelentes propriedades mecânicas, resistência à corrosão, boa tolerância do tecido e baixo custo, porém, os módulos de elasticidades desses materiais (Ti-Cp=110 GPa; Ti-6Al-4V=120 GPa) são maiores que o módulo de elasticidade do osso (10-30 GPa) (Dewidar *et al.*, 2006; Lemons, Dietsh-Misch, 2006). Essa diferença entre módulos de elasticidade ocasiona um fenômeno conhecido como “Stress Shielding” no qual ocorre interferência não uniforme de tensões entre implante e osso que pode conduzir reabsorção óssea sendo a maior causa de perda do implante (Laheurte *et al.*, 2010; Vasconcellos *et al.*, 2008). Assim, é desejável um material que apresente um módulo de elasticidade o mais próximo possível do osso. O módulo de elasticidade dos implantes pode ser controlado pelo material do qual o implante será fabricado, uma vez que ligas de Ti podem exibir menores

valores que o titânio puro (Bottino *et al.*, 2009). Além do módulo de elasticidade, outros inconvenientes como a biodegradação do Al e do V também desfavorecem a liga Ti-6Al-4V pois os produtos do mesmo podem reagir com os tecidos induzindo a liberação de níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios e osteolíticos, os quais podem causar problemas graves como a perda do implante (Li *et al.*, 2005; Lauherte *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 1997).

As pesquisas estão focando em ligas de titânio β -metaestáveis que exibem biocompatibilidade e adequado módulo de elasticidade (Niinomi *et al.*, 2012). A combinação destes aspectos biológicos e mecânicos das ligas β torna-as candidatas potenciais para aplicações biomédicas, quer seja dental ou ortopédica (Rupp *et al.*, 2014). As ligas tipo β , são obtidas quando uma grande quantidade de elementos estabilizadores é adicionado ao Ti e estão sendo desenvolvidas visando não apenas melhorar a compatibilidade, uma vez que são compostas por elementos não tóxicos ou não alergênicos (Niinomi, 2008b), mas também melhorar a biofuncionalidade exibindo melhores propriedades mecânicas em relação ao osso. A fabricação de ligas de Ti com módulo de elasticidade similar ao do osso cortical tem sido extensivamente pesquisada (Schneider, 2001; Niinomi, 2003; Taddei *et al.*, 2007; Botino *et al.*, 2009) e já é conhecido que as ligas de Ti tipo β exibem menor módulo do que as ligas do tipo $\alpha + \beta$ (Niinomi, 2008a).

As interações com micro-ambientes celulares dos implantes a base de Ti ocorrem apenas com suas interfaces pois o mesmo não se degrada. Propriedades de superfície como sua composição química e topografia de superfície desempenham uma atividade importante na regulação da resposta celular, podendo conduzir a melhor osseointegração (Qianli *et al.*, 2016). O óxido é um composto químico binário formado por átomos de oxigênio com outro elemento em que o oxigênio é o mais eletronegativo. A grande contribuição dos óxidos para a biocompatibilidade de ligas de Ti é a alta resistência à corrosão conferida

por seu óxido. A oxidação de um metal em estado sólido depende da difusão do oxigênio, sendo mais efetiva a altas temperaturas. Quando exposto ao ar o Ti e suas ligas formam espontaneamente uma película contínua aderente cuja interação com os fluídos biológicos a tornam muito biocompátível. Tanto a espessura quanto a composição química da camada de óxidos do titânio exibem importante papel na adsorção de proteínas provenientes dos fluídos biológicos. Contudo, a camada de óxido que se forma espontaneamente sobre a superfície de titânio não é a ideal porque é heterogênea e pouco espessa, dificultando dessa forma a adesão química do implante ao osso (Atkins, Jones., 2001; Casaletto *et al.*, 2001). Elevada biocompatibilidade, isto é, melhor adesão e proliferação celular particularmente em superfícies oxidadas são observadas na liga TiNb (Vandrovcova *et al.*, 2014). Diferente dos outros compostos da liga (Ti e Zr) que estão em dióxido, o Nb está em pentóxido. O Nb apresenta todos os estados de oxidação de +5 a -1, no entanto o estado de oxidação +5 é o mais estável (Lopes *et al.*, 2015).

A cavidade bucal humana é um sistema de crescimento aberto onde ocorre transporte contínuo de microrganismos. Para que estes sobrevivam e causem infecção, a adesão às superfícies bucais e implantes torna-se necessária, podendo causar entre outros problemas a peri-implantite (Romeiro *et al.*, 2011).

Na maior parte dos ambientes naturais e clínicos, os micro-organismos estão agregados numa superfície ou interface aérea/líquida onde crescem em comunidades e se agrupam com substância extracelular composta por proteínas, lipídios e polissacarídeos. Tal existência é denominada de biofilme. A propriedade chave do biofilme é o aumento da resistência antimicrobiana, imunológica, predatória e química. Uma vez estabelecidos, os biofilmes tornam-se altamente tolerantes à remoção e erradicação. Neste ambiente, as células microbianas exibem um fenótipo alterado, particularmente em relação à taxa de crescimento e a transcrição de genes (Percival *et al.*, 2012).

O biofilme desempenha um papel central em doenças orais, incluindo cárie, doença periodontal, infecção endodôntica e candidíase da mucosa. Além disso existem evidências substanciais ligando doença oral e condições sistêmicas incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, prematuridade ou baixo peso ao nascer e artrite reumatóide. Translocação de agentes patogênicos orais tem sido implicada na inalação causando pneumonia e infecções relacionadas com o biomaterial (Ramage *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o biofilme formado na superfície de materiais pode causar deterioração biológica do mesmo. Além da biocompatibilidade e propriedade mecânica, os materiais devem ser avaliados quanto a formação de biofilme na sua superfície, visando a promoção da saúde e seu uso a longo prazo (Nakajo *et al.*, 2014). Os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* são relatados na literatura como causadores e participantes de diversas doenças bucais (Carneiro, 2014; Santos *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002). Apesar de muitos esforços, como condições assépticas, administração de antibióticos pré-operatórios, as infecções associadas aos implantes não podem ser completamente evitadas (Sendi, Zimmerli, 2012; Borens *et al.*, 2012). Portanto, materiais que diminuem a formação de biofilme na sua superfície são desejados para a promoção da saúde bucal bem como o uso a longo prazo (Nakajo *et al.*, 2014). O Ti oxidado foi estudado por apresentar a característica de degradar matéria orgânica conferindo a ele as propriedades autolimpantes e antimicrobianas, ou seja, bactericida (Simões *et al.*, 2007).

A perda do implante a longo prazo é um grande problema necessitando muitas vezes de cirurgia de revisão. Neste contexto, interações adequadas entre o biomaterial e as células osteoblásticas são necessárias. Idealmente essas células devem aderir a superfície do implante, proliferar, diferenciar-se em osteoblastos e produzir matriz extracelular mineralizada, promovendo assim

duradoura fixação óssea do implante (Maik *et al.*, 2008). Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes com a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células funcionais incluindo fibroblástica, adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica (Chuenjitkuntaworn *et al.*, 2016). Na literatura não foram encontrados estudos referentes a influência dos elementos Nb e Zr presentes na liga de Ti-35Nb-7Zr, na atividade osteoblástica obtido de cultura primária, e na formação de biofilme monotípicos *in vitro*.

Este estudo, portanto, visa auxiliar na compreensão e a explorar as características das novas ligas experimentais, analisando a influência dos elementos básicos e da liga no comportamento celular *in vitro*, bem como na formação de biofilme, utilizando-se para isso, diversos parâmetros que se correlacionam e são capazes de fornecer informações mais completas a respeito das novas ligas experimentais.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da liga Ti-35Nb-7Zr e de seus elementos básicos (Ti, Nb, Zr), submetidos a oxidação ou não, na atividade de osteoblastos por meio dos testes de proliferação celular, viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, formação de nódulos de mineralização e na formação de biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia-curso de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, sob o protocolo 006/2016-CEUA-ICT-UNESP (ANEXO A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

3.1 Amostras

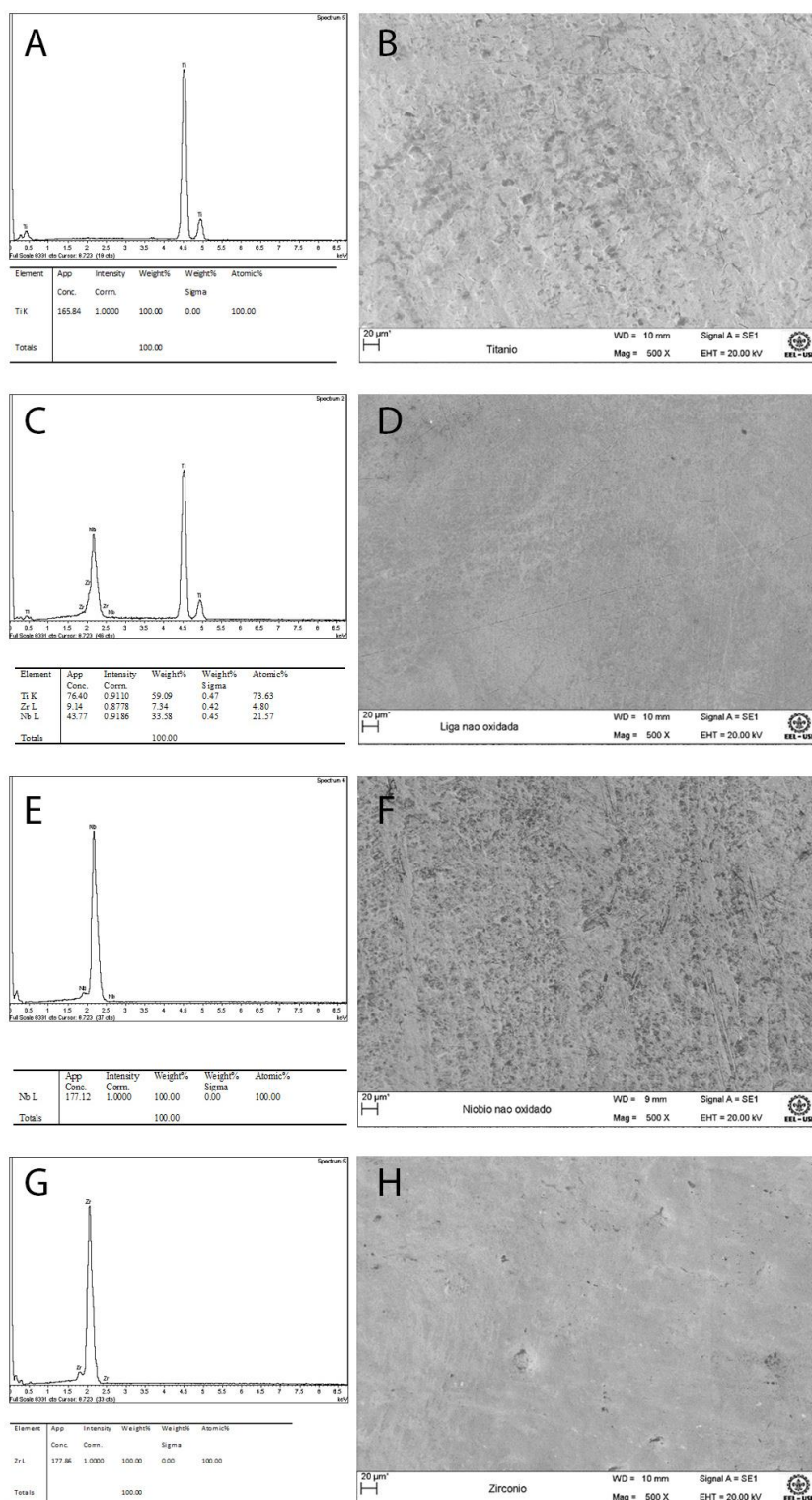
As amostras de Nb e da liga Ti-35Nb-7Zr foram produzidas na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR) sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Sandra Giacomini Schneider. Os elementos puros para a confecção das amostras de Ti e Zr foram adquiridos no mercado comercial da marca Müller Metais Ind. Com. Ltda. Para obtenção da liga Ti-35Nb-7Zr, as chapas de Ti, Nb e Zr foram fundidas em forno de fusão a arco para obtenção do lingote, o qual foi submetido ao encapsulamento e recebeu o tratamento térmico de solubilização (1000°C/2 h-WQ). Posteriormente o lingote foi deformado a frio e foram obtidas as amostras da liga. Todas as amostras foram cortadas em 4 mm de comprimento, 4 mm de largura e 1,5 mm de espessura. Todas as amostras, independente do material, foram submetidas a três lavagens no ultrassom: a primeira com água e detergente, a segunda com acetona e a terceira com álcool isopropílico. A cada etapa de lavagem as amostras foram colocadas na estufa a

60°C por 30 minutos para secagem. Em metade das amostras, foi realizado o procedimento de oxidação, que consistiu em colocar as amostras em barquinhas de alumina e mantê-las no forno a 900°C por 15 minutos. Em seguida, todas as amostras foram retiradas do forno e resfriadas imediatamente em água a 25°C e colocadas na estufa a 60°C por 30 minutos para secagem.

As amostras foram subdivididas em grupos de acordo com o material e a presença ou não de oxidação: a) Ti puro (Ti); b) liga Ti-35Nb-7Zr (L); c) nióbio (Nb); d) zircônio (Zr); e) Ti oxidado (TiO); f) liga Ti-35Nb-7Zr oxidada (LO); g) Nb oxidado (NbO); h) Zr oxidado (ZrO). O Titânio e o Titânio oxidado foram os controles de todos os testes realizados. Foram utilizadas 5 amostras por grupo para os testes celulares (total de 40 amostras) e 8 amostras por grupo para os testes com biofilmes microbianos monotípicos (total de 64 amostras).

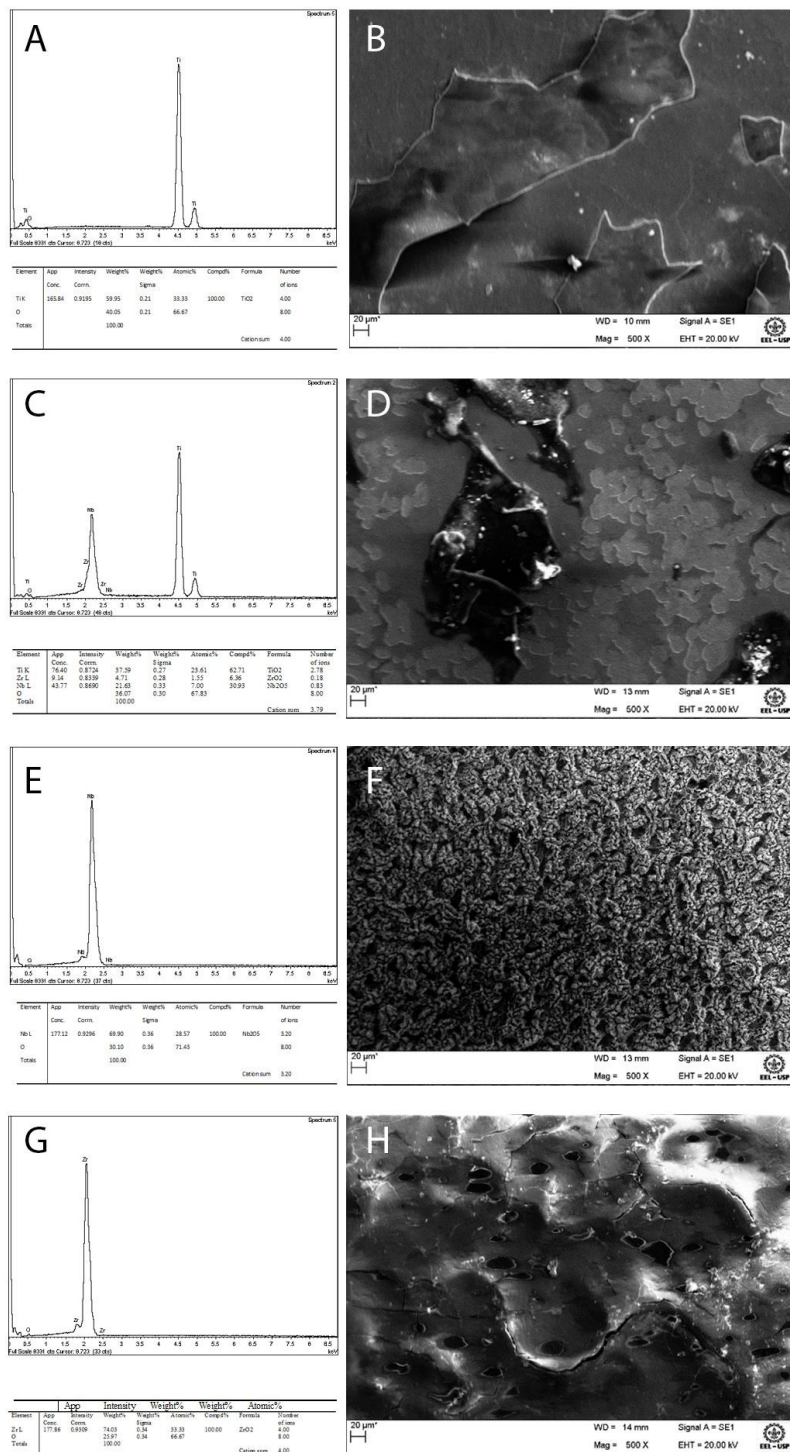
As figuras 1 e 2 a seguir mostram a caracterização das amostras que foi realizada por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil) acoplado com espectrofotômetro com dispersão de energia (EDS) para confirmar a composição da amostra, localizado na Escola de Engenharia de Lorena-EEL USP/Departamento de Engenharia de Materiais-DEMAR. O equipamento opera em alto-vácuo com detector de elétrons secundários em voltagem de 12,5 HV e spot de 4,5.

Figura 1- MEV/ EDS das amostras



Legenda: a /b: Ti; c/d: L; e/f: Nb; g/h: Zr
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2- MEV/EDS das amostras



Legenda: a/b: TiO₂; c/d: ZnO; e/f: NbO g/ h: ZrO

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Ensaios biológicos *in vitro*

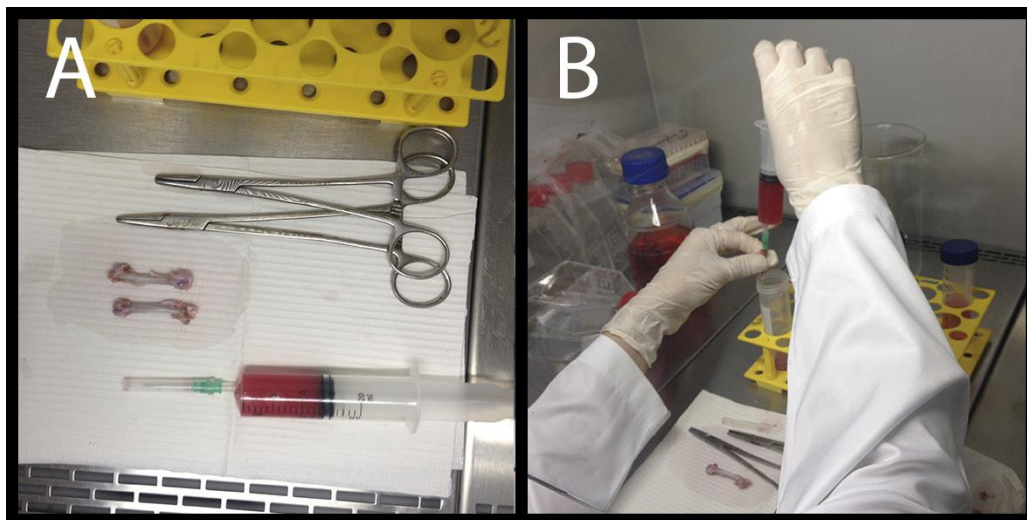
Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

3.2.1 Cultura Celular

Foram utilizados 20 ratos com 3 meses de idade fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp de São José dos Campos. A eutanásia dos animais foi realizada por overdose de anestésico. Os fêmures foram removidos e colocados em solução de meio de transporte composta por meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) e gentamicina (500 µg/ml) (Gibco). A seguir, dentro do fluxo, as células da medula óssea dos fêmures foram isoladas por meio da irrigação da medula óssea dos fêmures com meio total suplementado composto por meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (LGC, Cotia, São Paulo Brasil) e gentamicina (500 µg/ml) (Gibco) e inseridas em tubos tipo falcon de 50 ml (TPP, Switzerland) e depois foram transferidas para garrafa de cultura celular de 250 ml e 75 cm² (TPP, Switzerland) e foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. As células mesenquimais foram selecionadas pela aderência ao poliestireno e expandidas até que as células atingissem a confluência caracterizada pela

ocupação de mais de 80% do frasco, após a confluência foram realizados o plaqueamento celular. Todas as amostras foram esterilizadas em autoclave a 134°C previamente ao plaqueamento. Para este procedimento, inicialmente o meio do frasco de cultura foi aspirado com auxílio de pipeta sorológica e descartado, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado ao frasco 3 ml da solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), para que as células se desprendessem do fundo do frasco. Posteriormente, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6 ml de meio alfa MEM e o conjunto foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 ml (TPP, Switzerland) e centrifugado em 5000 rpm por 5 minutos a 25°C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) com consequente formação do pellet. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio alfa MEM e distribuídas nos poços das placas de 24 poços sobre as amostras (n=5) como podemos ver representado na figura 4. Foi realizado o plaqueamento celular com aproximadamente 20.000 células/poço, sendo que as células foram contadas por meio do contador automático Countess® (Invitrogen, USA). O meio de cultura da placa foi osteogênico, contendo 5 mg/ml de ácido ascórbico (Neon) e 2,16g de beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich ref 50020) e foi trocado a cada dois dias. O desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany). As figuras 3 e 4 demonstram as etapas desse procedimento.

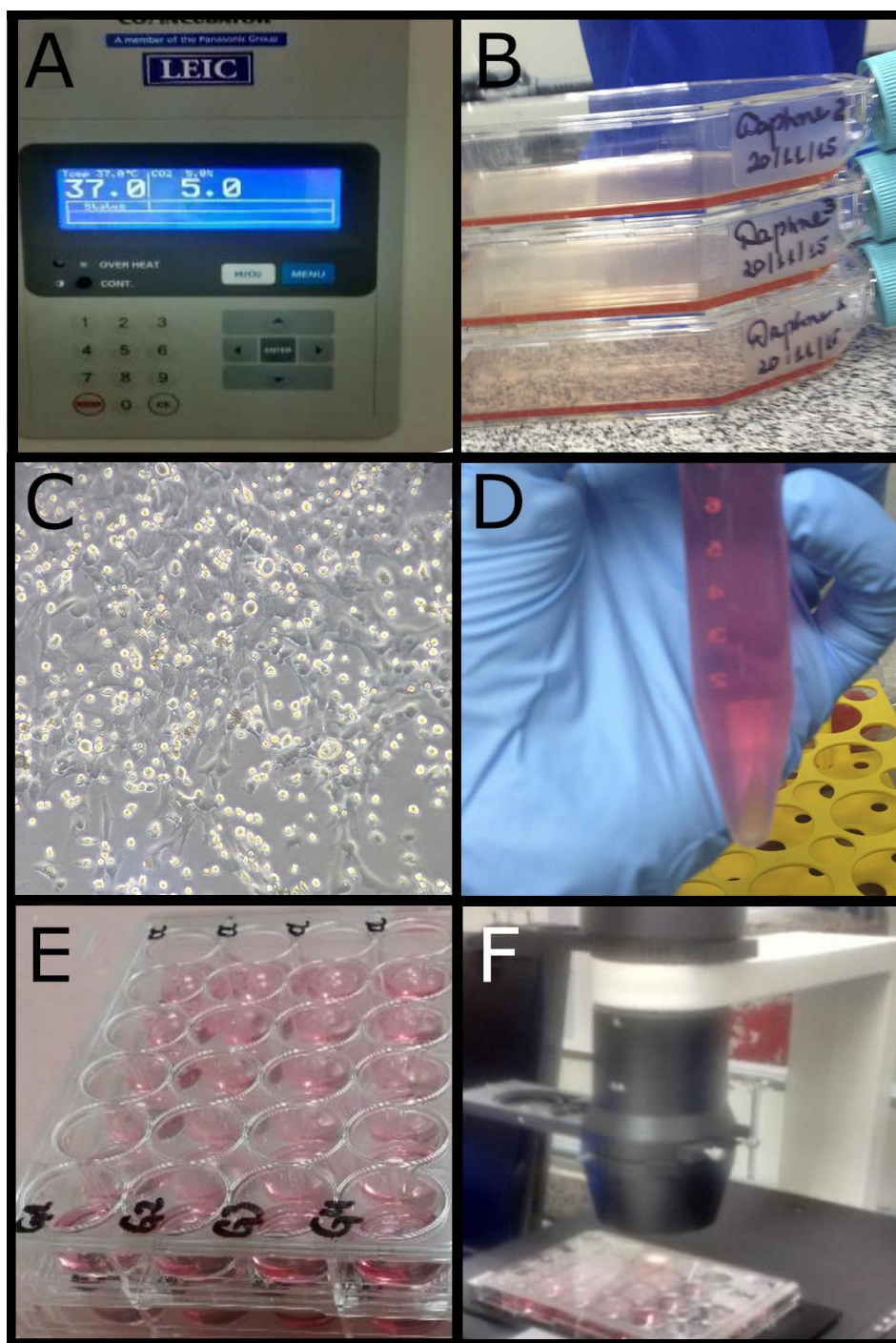
Figura 3- Isolamento celular



Legenda: a) fêmures e meio total suplementado b) irrigação da medula do fêmur para coleta de células mesenquimais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4- Cultura Celular



Legenda: a) estufa com 5% de CO₂; b) garrafas com cultura celular; c) células em cultura; d) pellet formado após centrifugação; e) plaqueamento das células; f) avaliação microscópica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Interação Celular

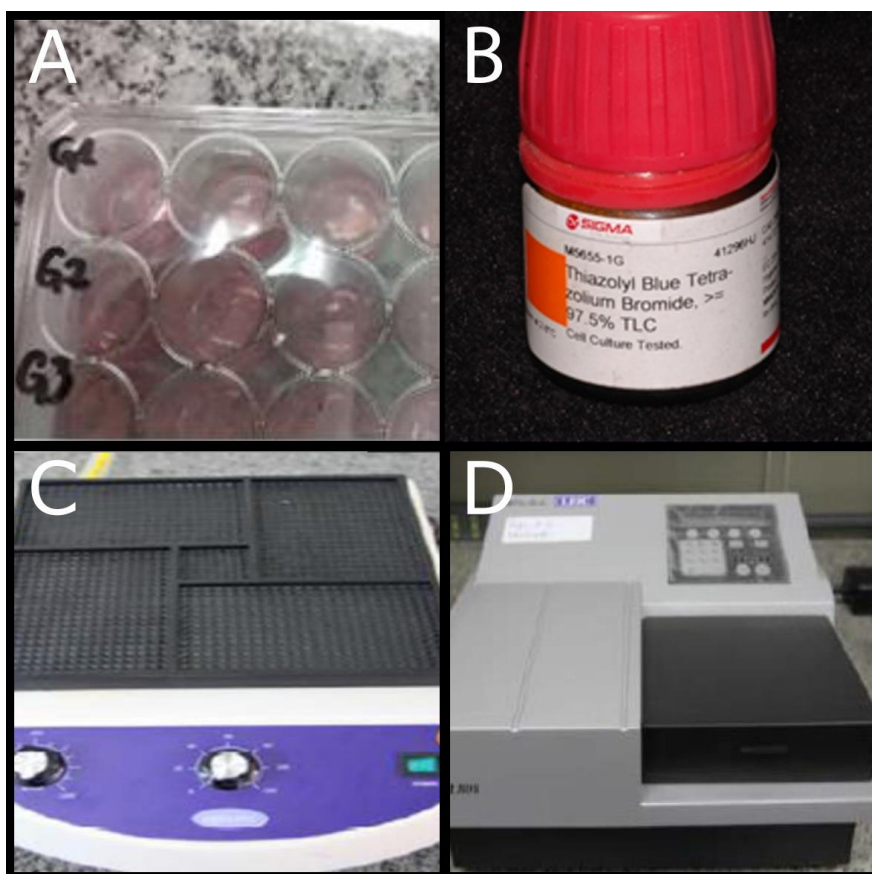
A interação celular foi avaliada por FE-SEM (Field Emission Microscopia Eletrônica de Varredura) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil), após 7 dias de cultura (n=2 para cada grupo experimental). Inicialmente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente com paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida as amostras foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e previamente a análise, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema *sputter*-revestimento.

3.2.3 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Após 7 dias de cultura celular (n=5 para cada grupo experimental), foi realizada a avaliação quantitativa de células viáveis, por meio da exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenilcarboxil] (Sigma Aldrich) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Como controle foi utilizado o Ti puro representado pelo grupo 1. Alíquotas de MTT a 0,5 mg/ml em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução por 1 hora a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 500 µl da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) que permaneceu nos poços por 10 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir a placa foi colocada sob agitação por dez minutos para solubilização completa do

precipitado formado. Alíquotas de 100 μ l foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU) como mostra a figura 5. Os dados foram aferidos como absorbância e expressos em porcentagem sendo que o grupo controle foi considerado 100%.

Figura 5- Estágios do MTT

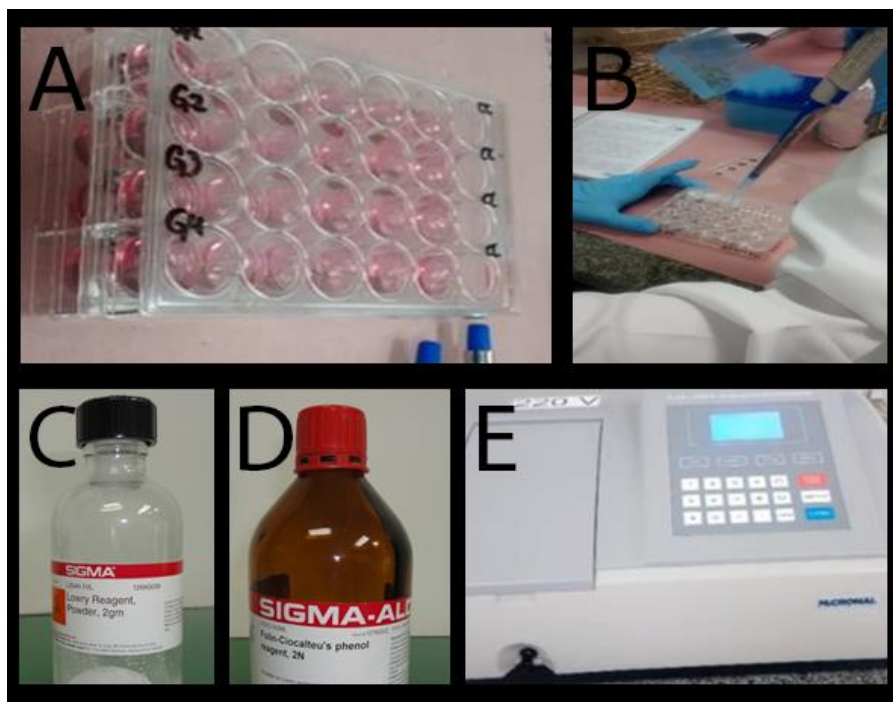


Legenda: a) células em cultura; b) corante MTT; c) agitador orbital; d) espectrofotômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.4 Conteúdo de Proteína Total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 10 dias de cultura (n=5 para cada grupo experimental), de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37°C, e preenchidos com 2 ml de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas. Após 30 minutos, 1 ml da solução de cada poço foi misturada com 1 ml da solução de Lowry (Sigma-Aldrich) e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. A esta mistura acrescentou-se 1ml de reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma-Aldrich) e deixado por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida a 680 nm em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900). O conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/ml. A figura 6 mostra as etapas desse procedimento.

Figura 6- Etapas do teste de Proteína Total



Legenda: a) células em cultura b) lisado de células c) lowry d) folin e) espectrofotômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.5 Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada após 10 dias de cultura celular ($n=5$ para cada grupo experimental), nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). Inicialmente, 50 μ l de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 μ l dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 ml de Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi medida em

espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μmol de timolftaleína/hora/ μg proteína como mostra a figura 7.

Figura 7- Etapas do teste de Fosfatase Alcalina



Legenda: a) células em cultura b) lisado de células c) kit fosfatase Labtest d) espectrofotômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.6 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura (n=5 para cada grupo experimental). Para tanto, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 horas à temperatura ambiente.

Após fixação, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), pH 4,2 por 10 minutos. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio.

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 800 µl de ácido acético 10% foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga com 1,5 ml e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA-095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 85°C sendo posteriormente transferidos para um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K) por 20 minutos e 100 µl dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foram acrescidos 40 µl de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em leitor de microplaca 59 (Biotek – EL808IU, USA), sob o comprimento de onda de 405 nm.

3.2.7 Proliferação celular sobre as amostras utilizando o corante Dapi

Para avaliar a capacidade de proliferação celular, as células-tronco mesenquimais foram cultivadas sobre as amostras (n=5 para cada grupo experimental) por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e as amostras lavadas com PBS (Gibco®) e fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos. As amostras foram lavadas novamente com PBS e foi

adicionado o corante Dapi que permaneceu incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram capturados aleatoriamente 10 campos de cada grupo utilizando o microscópio Axio HBO 100 (Zeiss) sob a objetiva de 20 vezes e os núcleos presentes sobre as amostras foram quantificados utilizando o software Image J® versão 6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.3 Avaliação da formação de biofilmes microbianos

Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Candida albicans* (ATCC 18804), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP.

As cepas foram cultivadas em meio sólido (*Brain Heart Infusion* – BHI para bactérias e levedura) e posteriormente em meio líquido (BHI) por 24 horas cada a 37°C. No caso de *S. mutans*, foi utilizado CO₂ 5%. Em seguida, cada caldo foi centrifugado (2000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* suspenso em solução fisiológica (NaCl 0,9%), padronizadas a 10⁶ céls/ml em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil), de acordo com o comprimento de onda e densidade óptica de cada micro-organismo.

As amostras esterilizadas da liga Ti-35Nb-7Zr e dos seus elementos básicos foram distribuídas em poços de placas de 24 poços (n=08 para cada grupo experimental) com 500 µl de saliva artificial (Byofórmula, São José dos Campos, São Paulo-Brasil). A seguir, as amostras foram colocadas no agitador orbital por 1 hora. Após este período a saliva artificial foi removida e foi adicionado 1 ml/poço de caldo BHI, 1 ml de saliva artificial e 100 µl de

suspensão microbiana padronizada a 10^6 UFC/ml em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil) para que houvesse formação de biofilmes monotípicos de *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *S. mutans* e *C. albicans*.

Após 24 horas de incubação (37°C), as amostras foram transferidas para microplaca, contendo 1 ml de solução fisiológica estéril e foram realizadas lavagens destas amostras por três vezes, no intuito de eliminar células não aderidas ao biofilme. A seguir, a solução fisiológica estéril foi removida e foi adicionado 300 µl de MTT [brometo de 3-4,5-dimetiltiazol] (Sigma Aldrich) na concentração de 0,5 mg/ml de PBS e após 1 h de incubação na estufa a 37°C (estufa de CO₂ 5% para *S. mutans*), sob proteção da luz esta solução foi removida e foram adicionados 300 µl de dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma Aldrich) que permaneceu nos poços por 10 min sob incubação em estufa a 37°C. Pelo mesmo período a placa foi levada para agitação em mesa orbital. Alíquotas de 100 µl de cada poço foram transferidas para placa de 96 poços (Greiner) e em leitor de microplaca ($\lambda = 570$ nm - Biotek EL808IU) foram verificados os valores de absorbância de cada poço.

3.4 Método de análise dos resultados

Todos os ensaios biológicos foram realizados com cinco experimentos técnicos e dois experimentos biológicos independentes. Os ensaios microbiológicos foram realizados com oito experimentos técnicos.

Os dados foram estatisticamente analisados por meio do teste ANOVA 1 fator e quando necessário foi utilizado o teste de comparação múltipla Tukey's. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

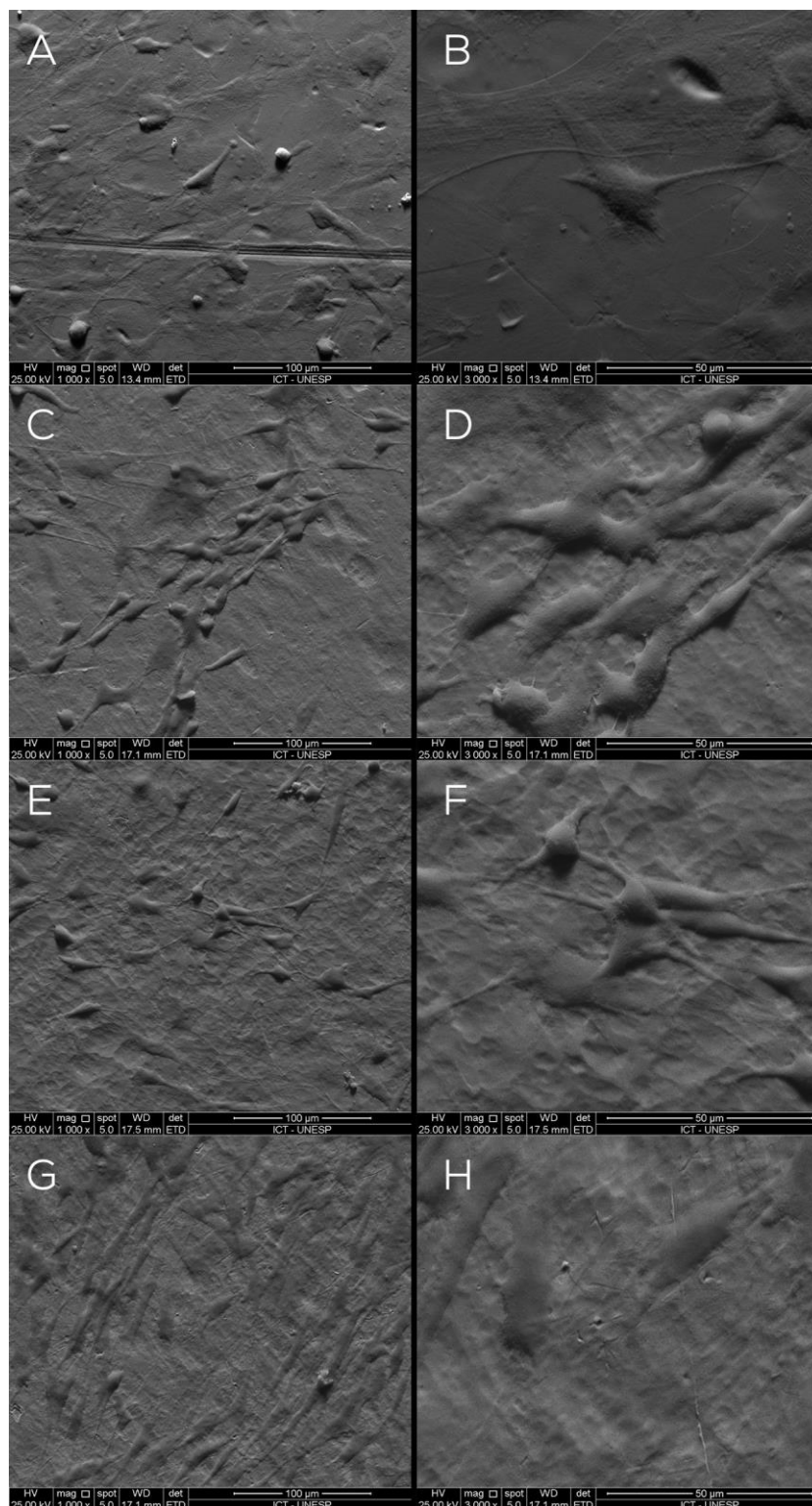
4 RESULTADO

4.1 Interação celular

Após 7 dias de cultura, a interação celular sobre todas as amostras foi observada a MEV.

A figura 8 ilustra o comportamento das células sobre as amostras não submetidas ao processo de oxidação (Ti, L, Nb e Zr) e a figura 9 ilustra o comportamento das amostras submetidas ao processo de oxidação (TiO, LO, NbO e ZrO) respectivamente. Em geral, observou-se que todas as amostras permitiram o espraio celular. Podemos sugerir que as amostras oxidadas (Figura 9) exibiram uma adesão celular mais evidente especialmente nos grupos NbO e ZrO onde podemos observar os prolongamentos das células mais evidenciados.

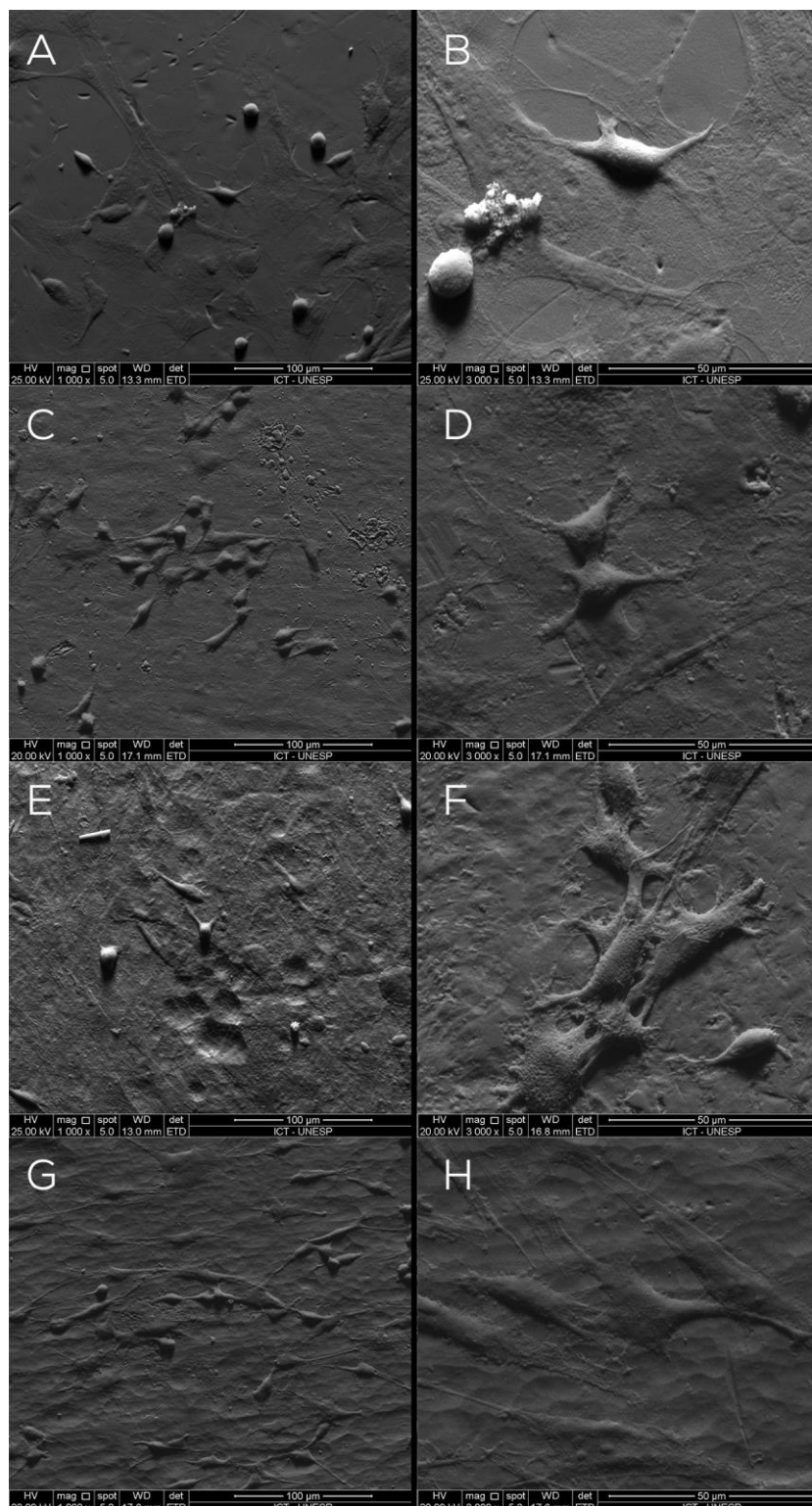
Figura 8-Fotomiografia de MEV



Legenda: a/b:Ti; c/d: L; e/f: Nb; g/h: Zr. Lado esquerdo aumento de 1000x e lado direito aumento de 3000x em todas as figuras.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9- Fotomicrografia de MEV



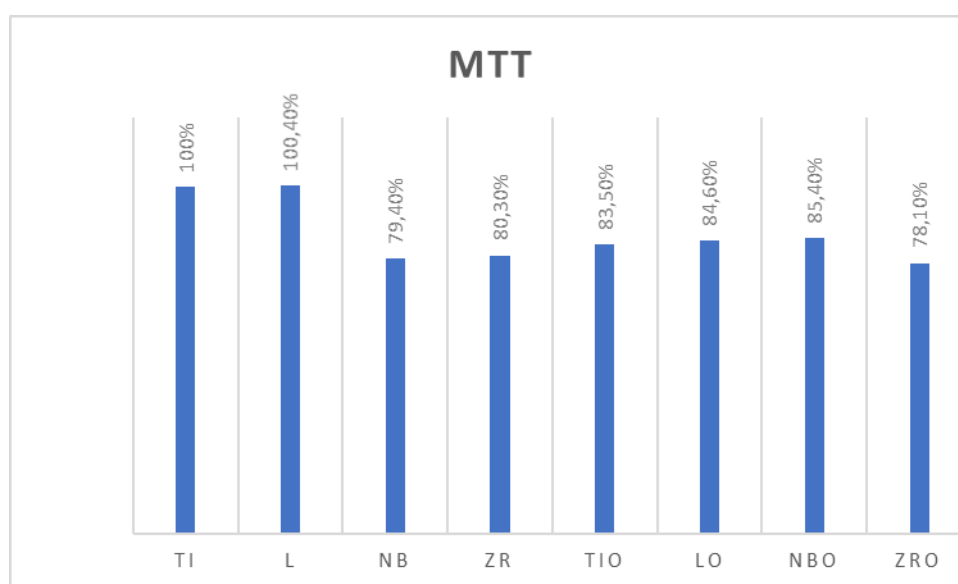
Legenda: a/b: TiO; c/d: LO; e/f: NbO; g/h: ZrO. Lado esquerdo aumento de 1000x e lado direito aumento de 3000x em todas as figuras.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Todas as amostras apresentaram viabilidade celular acima de 70%, sendo considerado satisfatório, segundo a ISO 10993-5 (International Standards Organization, 1992). No gráfico, podemos observar que o Ti (controle) e Liga apresentaram maior viabilidade celular sem diferença estatística entre si, porém a Liga apresentou discreto aumento de células viáveis em relação ao Ti e ambos apresentaram diferença estatística entre os demais ($p < 0,05$). O Zr oxidado demonstrou a menor viabilidade celular, seguido do Nb, porém, não houve diferença estatística entre eles e o Zr, TiO, LO e NbO como podemos observar na figura 10.

Figura 10- Gráfico de viabilidade celular, teste de MTT

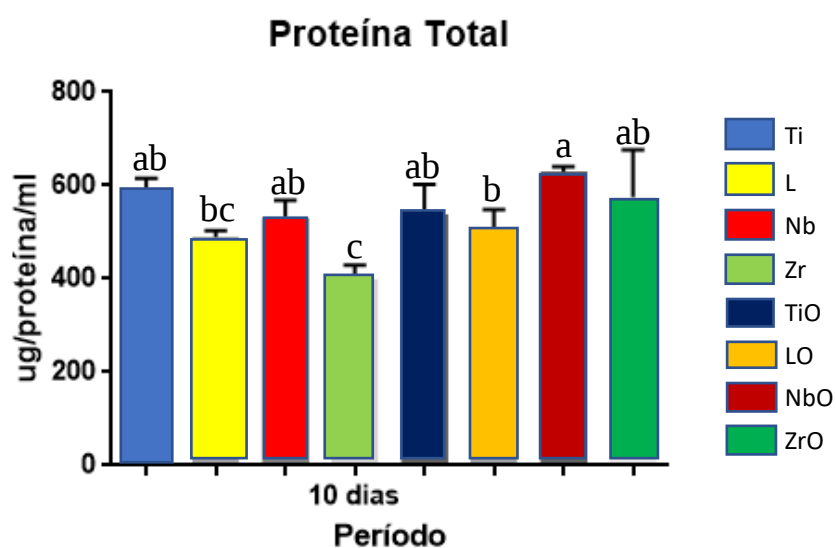


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Conteúdo de Proteína Total

A figura 11 mostra que o NbO apresentou maior expressão de proteína, diferindo estatisticamente da L, Zr e LO. O Zr demonstrou menor expressão de proteína, com diferença estatística entre o Ti, Nb, TiO, NbO e ZrO ($p < 0,05$).

Figura 11- Gráfico representativo do conteúdo de proteína total

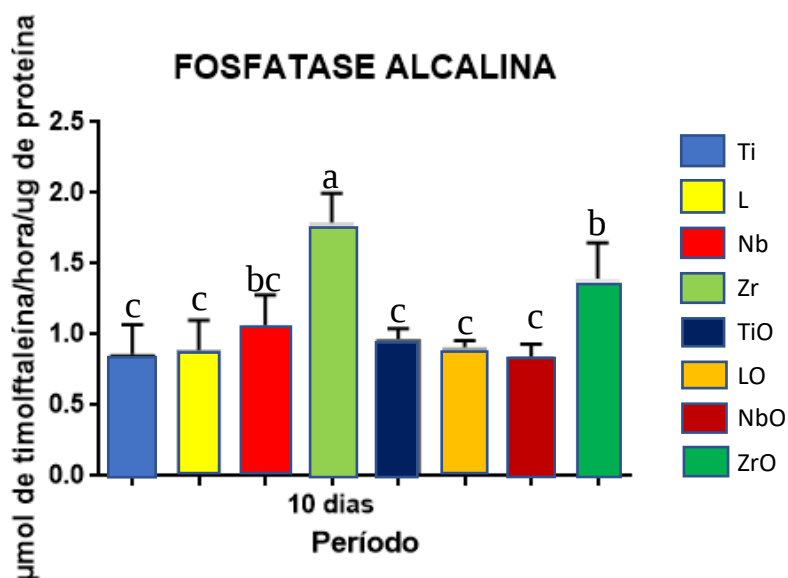


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Conteúdo de Fosfatase Alcalina

O Zr expressou maior atividade de fosfatase alcalina e foi estatisticamente diferente de todos ($p < 0,05$). O Ti apresentou a menor atividade diferindo estatisticamente do Nb, Zr e ZrO. A liga e seus elementos básicos não oxidados se comportaram de maneira similar aos seus análogos oxidados, onde o elemento Zr demonstrou atividade de fosfatase alcalina mais pronunciada, como podemos observar na figura 12.

Figura 12- Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina

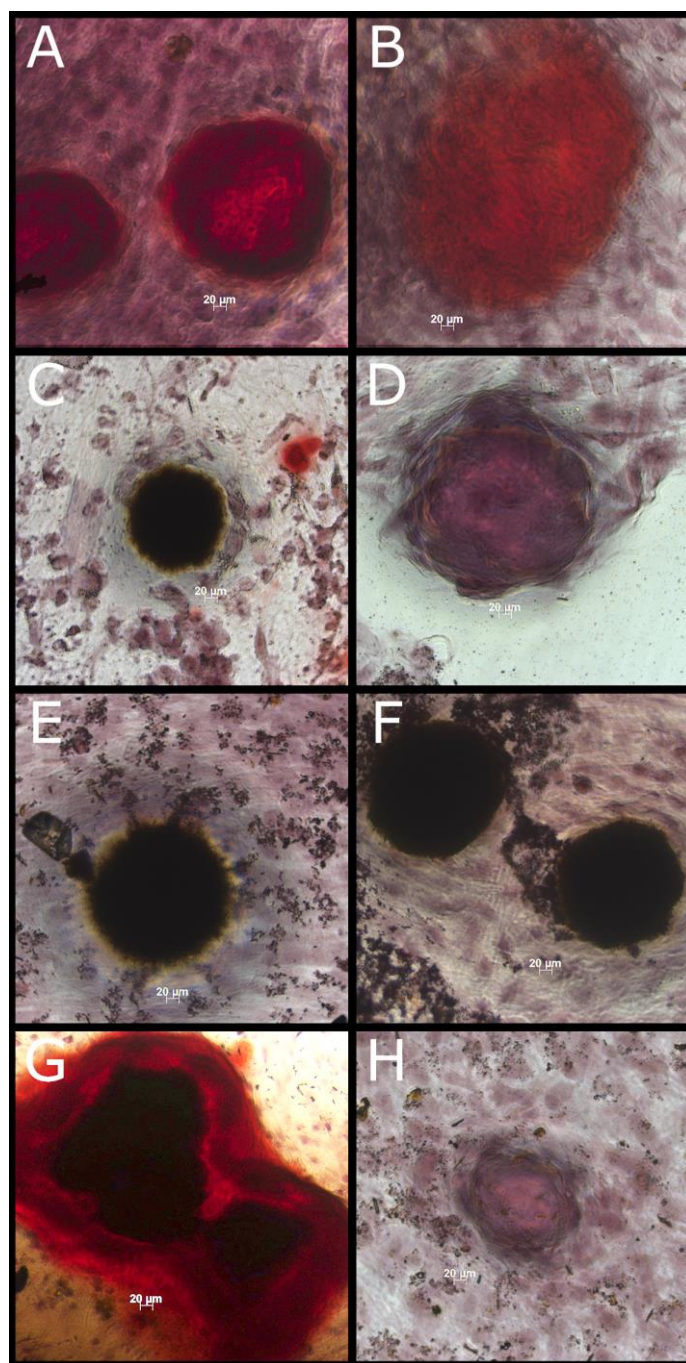


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Formação e quantificação de nódulos de mineralização

Após 14 dias de cultura celular a formação de nódulos de mineralização foi verificada. Foi possível observar a formação de nódulos de mineralização em todas as amostras como demonstra a figura 13.

Figura 13- Fotomicrografias representativas dos nódulos de mineralização.

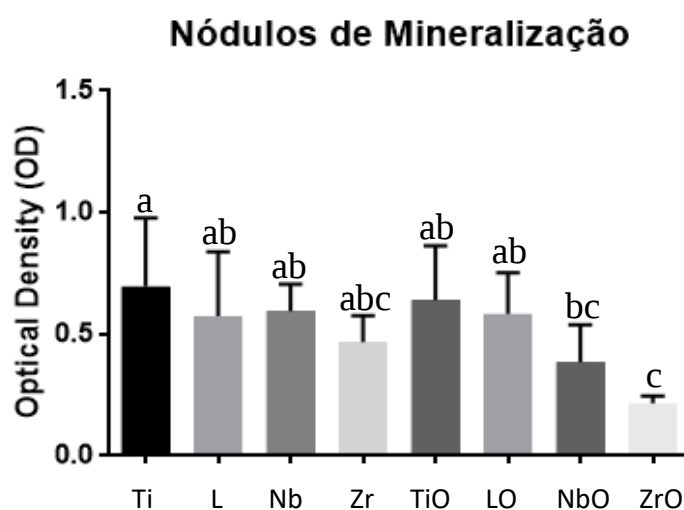


Legenda: a) Ti; b) L c) Nb; d) Zr e) TiO; f) LO; g) NbO; h) ZrO.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 14 mostra que após a quantificação dos nódulos de mineralização, o Ti apresentou o maior resultado, sendo estatisticamente

diferente do NbO e ZrO ($p < 0,05$). O ZrO apresentou o menor resultado sendo semelhante somente com os grupos Zr e NbO.

Figura14-Gráfico representativo da quantificação dos nódulos de mineralização

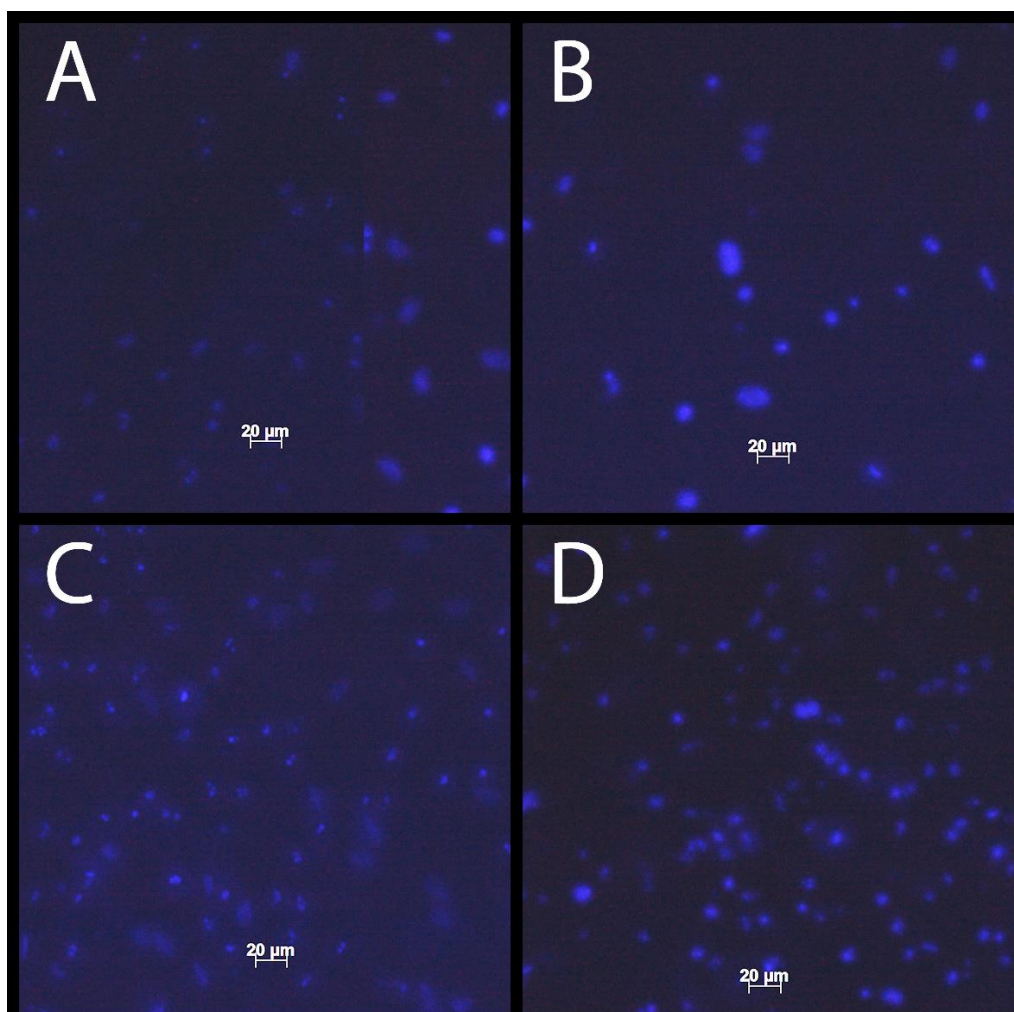


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Proliferação celular sobre as amostras utilizando o corante Dapi

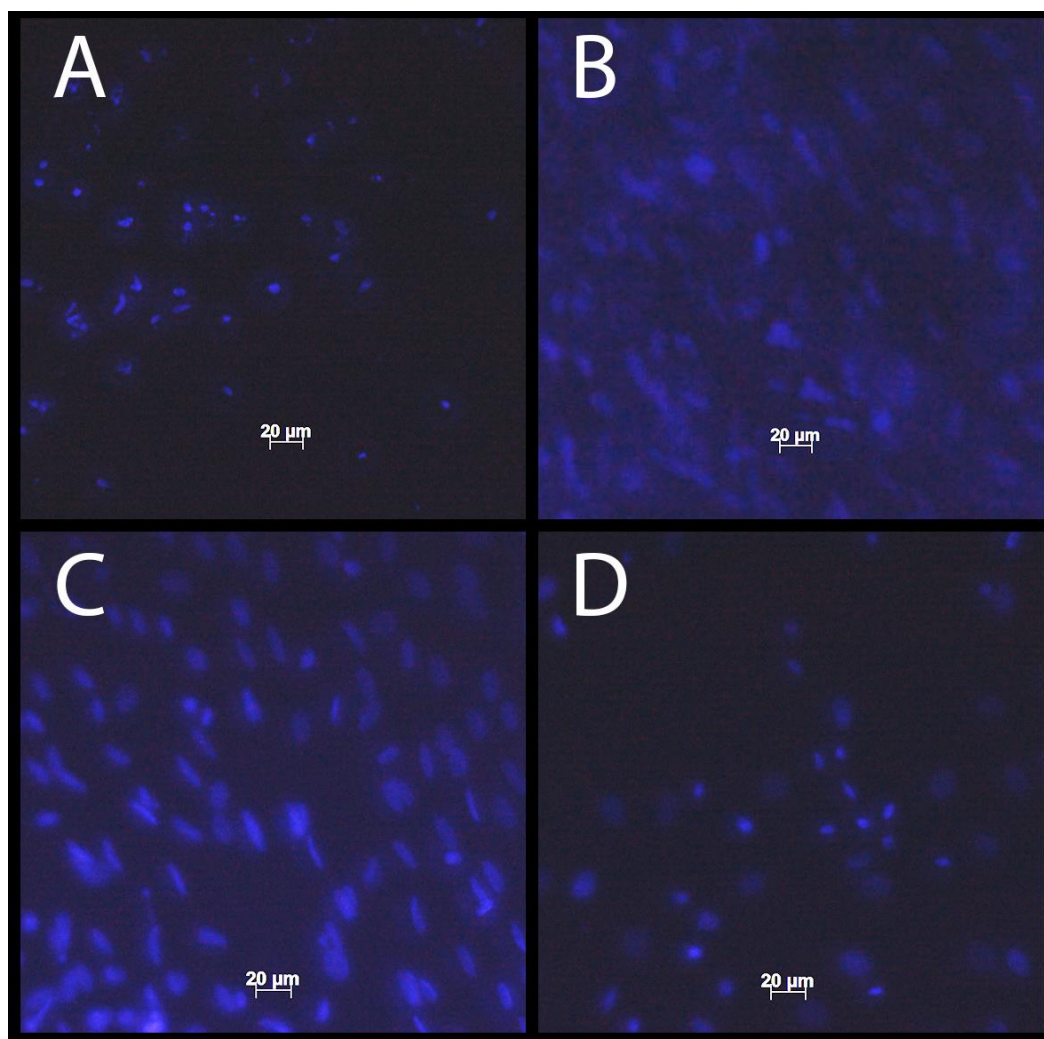
A proliferação celular foi observada após 24 horas de cultura, por meio da contagem dos núcleos corados com Dapi. Em todas as amostras foram observados os núcleos sobre as superfícies (Figura 15 e 16).

Figura 15- Proliferação celular corada por Dapi



Legenda: a) Ti; b) L c) Nb; d) Zr.
Fonte: Elaborado pelo autor.

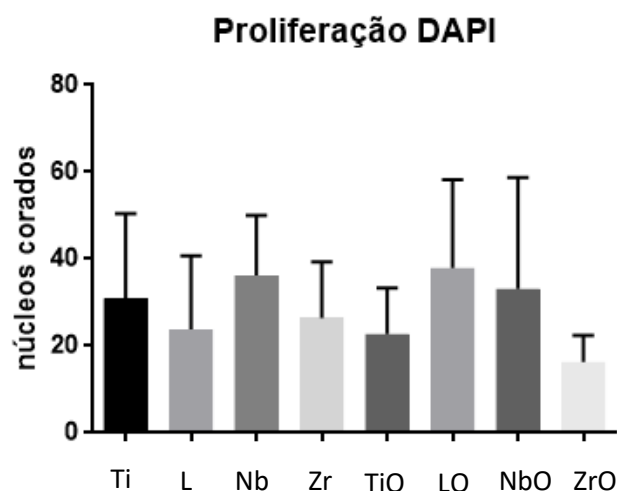
Figura 16- Proliferação celular corada por Dapi



Legenda: a) TiO; b) LO c) NbO; d) ZrO.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a quantificação, a LO apresentou maior proliferação celular. O ZrO exibiu o menor resultado. Não houve diferença estatística.

Figura 17- Gráfico representativo da proliferação celular por Dapi



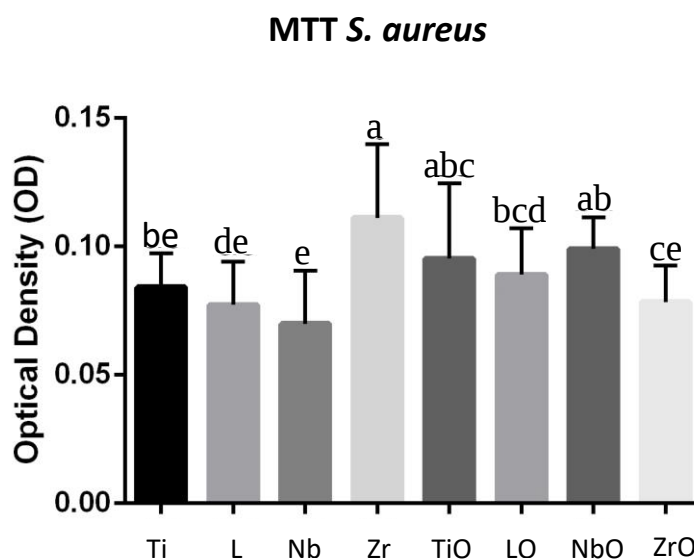
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Formação de Biofilmes

Após 24 horas de cultura, os biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans* e *C. albicans* foram formados e quantificados por MTT.

Os gráficos a seguir ilustram a quantificação de biofilme nas amostras de seus respectivos grupos.

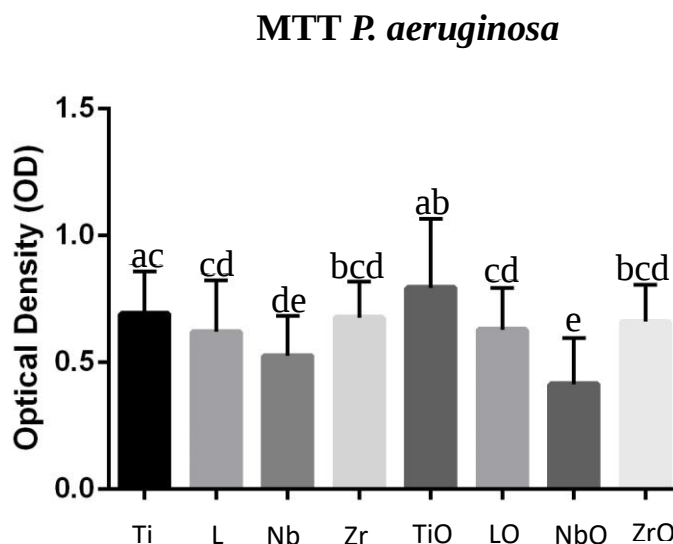
Figura 18- Gráfico representativo da viabilidade de biofilme monotípico de *S. aureus*



Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo Nb exibiu a menor quantidade de biofilme, diferindo estatisticamente dos grupos Zr, Ti oxidado, Liga oxidada e Nb oxidado ($p < 0,05$). O grupo Zr apresentou a maior formação de biofilme diferindo estatisticamente dos grupos Ti, Liga, Nb, Liga oxidada e Zr oxidado. Os elementos básicos de Nb e Zr quando submetidos a oxidação exibiram resultados que diferiram estatisticamente de seus grupos respectivos, não oxidados. Este comportamento não foi observado nos grupos do elemento Ti e na liga.

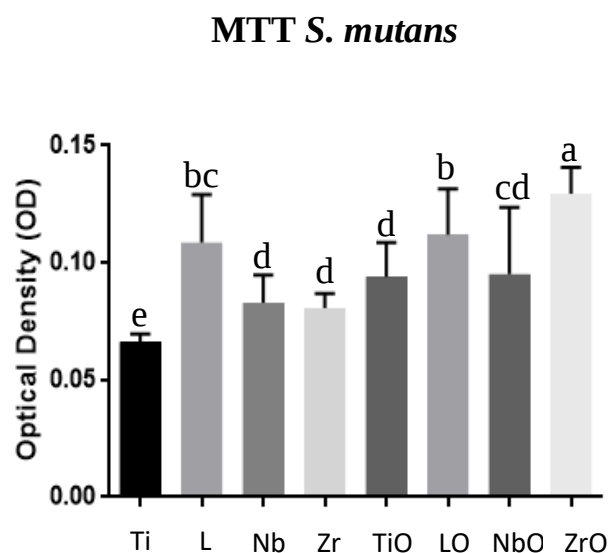
Figura 19- Gráfico representativo de viabilidade de biofilme monotípico de *P. aeruginosa*



Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico da quantificação do biofilme de *P. aeruginosa* observa-se que o Nb independente da superfície oxidada ou não, apresentou os menores valores de biofilme, ambos diferindo estatisticamente do grupo Ti não oxidado ($p < 0,05$). No entanto, o Nb oxidado não diferiu estatisticamente do grupo Nb. O grupo Ti oxidado, demonstrou o maior resultado na formação de biofilme, diferindo estatisticamente dos grupos Liga, Nb, Liga ox e Nb ox; porém, o grupo liga ox apresentou menor quantidade de biofilme quando comparada ao grupo Ti puro oxidado.

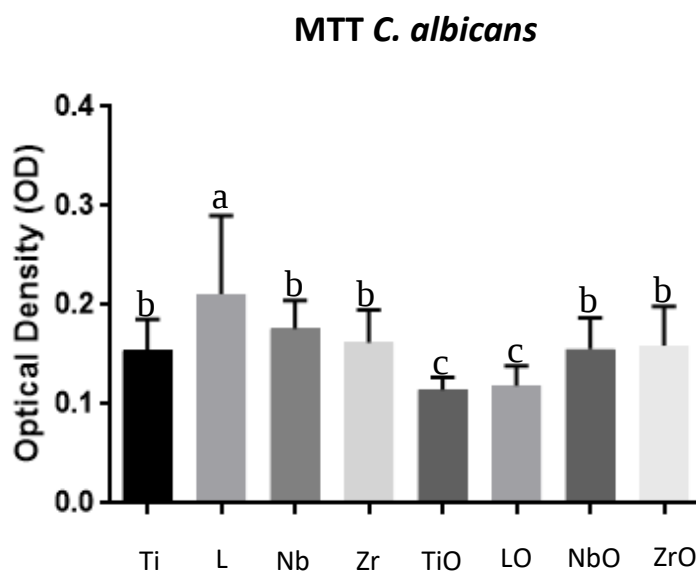
Figura 20- Gráfico representativo de viabilidade de biofilme monotípico de *S. mutans*



Fonte: Elaborado pelo autor

O grupo Ti exibiu a menor formação de biofilme e apresentou diferença estatística com todos os grupos ($p < 0,05$). O grupo zircônio oxidado demonstrou a maior aderência de biofilme, diferindo estatisticamente de todos os grupos ($p < 0,05$). Com exceção do grupo Liga, observa-se no gráfico que as amostras oxidadas apresentaram maior formação de biofilme do que seus análogos não oxidados.

Figura 21- Gráfico representativo de viabilidade de biofilme monotípico de *C. albicans*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando o gráfico podemos ver que o grupo Ti oxidado apresentou a menor formação de biofilme, seguido pelo grupo liga oxidada, porém, esses dois grupos não apresentaram diferença estatística entre si. O grupo Liga demonstrou a maior formação de biofilme com diferença estatística entre os demais grupos ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os implantes intra-ósseos têm sido utilizados para substituição de tecido perdido do corpo humano. Modificações na composição química, forma, tamanho e topografia dos implantes ortopédicos e odontológicos vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, com o objetivo de otimizar o processo de osseointegração, viabilizando-os como forma ideal de tratamento (Niinomi, 2008a; Miura *et al.*, 2011; Niinomi *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013).

O titânio comercialmente puro é utilizado em restritas aplicações ortopédicas e apresenta algumas aplicações dentárias, devido a sua limitada resistência ao cisalhamento (cerca de 500 MPa), valor que não permite sua utilização como um material para ortopedia, que constitui a maior parte do mercado de metal implantes (Long, Rack, 1998).

Ligas de titânio de baixo módulo de elasticidade, adequada resistência à corrosão e não tóxicas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de se reduzir a diferença entre o osso e os biomateriais (Long, Rack, 1998; Niinomi, 1998; Ning *et al.*, 2010). As ligas de titânio têm sido amplamente utilizadas na ortopedia devido às suas propriedades mecânicas superiores ao Ti, biocompatibilidade e resistência à corrosão favorável (Kopova *et al.*, 2016). O objetivo a ser alcançado é a produção de uma liga que reúna as propriedades de baixo módulo de elasticidade, excelente resistência mecânica, boa resistência à corrosão, fácil conformabilidade e ausência de elementos tóxicos (Taddei *et al.*, 2007; Niinomi, 2008a; Santos *et al.*, 2008; Ning *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Ligas de Ti tipo β , compostas de elementos não tóxicos e não alergênicos, tais como o nióbio (Nb), ferro (Fe), molibdênio (Mo), tântalo (Ta) e zircônio (Zr), entre outros, estão sendo desenvolvidas para utilização em implantes biomédicos (Niinomi, 2008b; Ning *et al.*, 2010). As ligas β exibem

grande vantagem sobre outras ligas de titânio uma vez que possuem baixo módulo de elasticidade, que é uma propriedade importante para obter a transferência de carga homogênea entre o implante e o osso, visando evitar o fenômeno do Stress Shielding (Piotrowski *et al.*, 2014). Além de adequada resposta ao tratamento térmico, ductilidade melhorada e alta resistência ao cisalhamento quando comparadas ao Ti (Abdel-Hady *et al.*, 2008).

O nióbio é um elemento metálico não citotóxico que estabiliza a fase β do Ti e aproxima o módulo de elasticidade da liga ao osso (Zhao *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Eisenbarth *et al.*, 2004; Zang *et al.*, 2015).

O zircônio é um elemento metálico biocompatível e isomórfico, apresentando as fases α e β , sendo considerado um elemento neutro (Khan *et al.*, 1999), porém sua adição a liga, melhora a resistência ao cisalhamento e ao alongamento, além de auxiliar na estabilização da fase β (Ning *et al.*, 2010). Ning *et al.* (2010) relataram que a constituição Ti-35Nb-5Zr apresenta adequado módulo de elasticidade 65 GPa, e portanto, grande potencial para aplicações ortopédicas e dentais.

Uma das primeiras ligas ternárias de Ti do tipo β , desenvolvida com baixo módulo foi a liga Ti-13Nb-13Zr (American Society for Testing and Materials, 1996). Esta liga apresenta resistência mecânica da ordem de 1.300 MPa, alta resistência à corrosão e menor módulo de elasticidade do que as ligas de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (Okasaki *et al.*, 1998; Bottino *et al.*, 2009), além de exibir característica de biocompatibilidade e osteocondutora (Bottino *et al.*, 2009). Wang *et al.* 2009 desenvolveram a liga Ti-10Nb-10Zr que apresenta módulo elástico de 5.6 GPa, quando exibem 57% de porosidade, além de excelente ductibilidade e adequada biocompatibilidade quando submetida ao teste de citotoxicidade utilizando células semelhantes a osteoblastos (SaOS₂). Assim, a liga ternária Ti-Nb-Zr apresenta considerável deformação plástica durante teste de compressão, alta tensão de elasticidade e excelente

biocompatibilidade (Ozan *et al.*, 2015), exibindo melhores resultados do que o Ti (Wang *et al.*, 2010; Ozan *et al.*, 2015). Neste estudo avaliamos *in vitro* a liga Ti-35Nb-7Zr, devido as suas adequadas propriedades mecânicas.

Embora o desenvolvimento das ligas seja promissor, a topografia de superfície influencia diretamente o comportamento celular (Sista *et al.*, 2011). Inicialmente Dong e Bell desenvolveram um tratamento térmico simples que melhora a resistência ao desgaste e aumenta a resistência à corrosão do Ti. Esta alteração é devido a modulação da camada de óxido que se forma naturalmente, após o tratamento, esta camada se torna mais espessa e com maior dureza. (Dong, Bell, 2000). Entre as mudanças mais notáveis do titânio após a oxidação térmica está a dureza da camada do óxido (Zimmer, 2011).

Em nosso estudo foi utilizado um tratamento térmico para obter uma superfície oxidada. Tais amostras demonstraram bons resultados na aderência celular, expressão de proteína total e proliferação celular. Kanagaraja *et al.* (2001), sugerem que a espessura da camada de óxido está associada à rugosidade da superfície, desempenham um importante papel na adesão e proliferação celular sobre as superfícies.

Experimentos com culturas celulares providenciam uma ferramenta de sucesso para pesquisas, uma vez que as interações células e matriz com a superfície do biomaterial podem ser avaliadas detalhadamente. Os modelos de cultura permitem condições mais controladas, especialmente em nível celular (Bächle, Kohal, 2004). No presente estudo, a metodologia utilizada para verificar a biocompatibilidade da liga Ti-35Nb-7Zr e seus elementos básicos, submetidos ou não à oxidação, foi baseada em parâmetros *in vitro*, tais como adesão, proliferação e viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e formações nodulares de matriz mineralizada. Esta é uma metodologia consagrada e que foi utilizada em diversos estudos *in vitro* com

objetivos semelhantes (Rosa *et al.*, 2002; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Wang *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2010; Sista *et al.*, 2011).

A biocompatibilidade de um material está intimamente relacionada ao comportamento da célula em contato com o mesmo. Adesão e espalhamento celular correspondem à primeira fase da interação célula/material, a qualidade destas etapas influenciará a proliferação e a diferenciação celular na superfície do implante (Bowers *et al.*, 1992; Anselme, 2000; Rosa, Beloti, 2005; Ning *et al.*, 2010; Sista *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que, no que diz respeito à interação celular, todos os grupos exibiram células aderidas. Observando a MEV, podemos sugerir que os grupos Nb oxidado e Zr oxidado apresentaram adesão pronunciada, com prolongamentos celulares mais evidentes. Esses resultados concordam com Sista *et al.* (2011) que estudando a adesão celular após 4h de cultura, verificaram que a adesão celular foi maior em amostras de titânio-50Zr do que no titânio puro e titânio-50Nb com diferença estatística significativa.

A viabilidade celular foi determinada a partir do teste colorimétrico MTT no período de 7 dias. Esse teste pode fornecer evidências preditivas de biocompatibilidade do material (Donato *et al.*, 2009). O grupo Ti e Liga apresentaram maior viabilidade similar a Donato *et al.* (2009) que também observaram viabilidade celular adequada na liga Ti-13Nb-13Zr, a qual é semelhante à estudada no presente trabalho. Por outro lado, o grupo Zr oxidado demonstrou o menor resultado. Piconi e Maccauro (1999) também observaram inibição do crescimento celular usando zircônia, porém quando comparado com Alumina ou a HA por meio do teste de MTT.

O conteúdo de proteína total representa a capacidade de síntese das células e pode ser considerado parâmetro importante de avaliação da osteogênese *in vitro* (Beloti, Rosa, 2005). No presente estudo, observamos que o Nb oxidado exibiu a maior expressão de proteína, concordando com Andrade *et*

al. (2015) que também observaram maior produção de proteína total no grupo Ti-35Nb poroso. O Zr apresentou o menor resultado, contradizendo a literatura que relata bons resultados de estudos *in vitro* com esse elemento (Depprich *et al.*, 2008, Josset *et al.*, 1999). No entanto, esses estudos utilizaram tipos diferentes de células para avaliar o Zr nos testes *in vitro*. Segundo Franco *et al.* (2010) os resultados da atividade osteoblástica podem variar de acordo com o tipo de célula utilizada. Tal diferença poderia ser resultante da ampla variação fenotípica/genotípica, um aspecto característico das células de cultura primária que foram utilizadas no presente estudo.

De acordo com o estudo de Lincks *et al.* (1998), a fosfatase alcalina é um marcador inicial da diferenciação osteoblástica e quando a atividade desta enzima ocorre em todas as membranas celulares ela é encontrada em maiores quantidades nas células que mineralizam sua matriz, como os osteoblastos. Porém, Simão *et al.* (2007) observaram que o papel da fosfatase alcalina não está claro devido à complexidade no processo de extração e solubilização dessa enzima, presente em tecidos ósseos e/ou cartilagosos. Tal processo pode alterar sua estrutura, sua atividade catalítica e outras propriedades relacionadas à sua função. Em nossos resultados, o grupo Zr obteve a maior expressão de fosfatase. Wey *et al.* (2010) observaram em seus estudos que a liga contendo Zr demonstrou expressiva atividade de fosfatase alcalina quando comparada a liga Ti-6Al-4V. Adicionalmente, Hisbergues *et al.* (2009), reforça em sua revisão de literatura que o Zr tem boa biocompatibilidade e diferenciação com células ósseas de ratos. O grupo Ti demonstrou o menor resultado, concordando com o estudo prévio de Guehenne *et al.* (2008).

A mineralização da matriz é o evento final da formação óssea (Rosa *et al.*, 2008). Em estudos utilizando culturas osteogênicas a mineralização é considerada como parâmetro funcional, e, *in vitro*, reflete o avanço da diferenciação das células (Hoemann *et al.*, 2009). Os resultados mostraram, após

a quantificação dos nódulos de mineralização, que o grupo Ti apresentou o melhor resultado, enquanto o grupo Zr oxidado, a menor quantidade de formação de nódulos. No presente trabalho, a relação fosfatase/mineralização foi inversa, pois o grupo Ti apresentou a menor expressão de fosfatase e o maior resultado após a quantificação dos nódulos de mineralização. Estes resultados estão de acordo com Simão *et al.* (2007) e Hoemann *et al.* (2009), porém contradizem Sugawara *et al.* (2002) que relataram que o aumento na atividade de fosfatase alcalina implica em maior formação de matriz mineralizada.

Quanto à proliferação celular nossos resultados mostraram que todas as amostras permitiram proliferação celular, sendo que o grupo Liga oxidada obteve o maior resultado e o grupo Zr oxidado exibiu o menor resultado, sem diferença estatística entre os grupos. Segundo Xavier *et al.* (2003), não há interferência dos materiais no período inicial de proliferação celular, como foi possível observar em nosso estudo, devido a ausência de diferença estatística entre os grupos.

De maneira geral em nosso estudo, nós observamos que nos testes celulares *in vitro*, a liga Ti-35Nb-7Zr oxidada e não oxidada demonstrou influência positiva sobre a atividade osteoblástica. O Zr apresentou um resultado positivo somente na atividade de fosfatase alcalina. O Nb demonstrou melhor desempenho na adesão celular, expressão de proteína total, produção de nódulos de mineralização e na proliferação celular, quando comparado ao Zr.

A adesão bacteriana às superfícies de biomateriais e a formação de biofilmes são fatores importantes na patogenicidade de microrganismos (Shi Z *et al.*, 2008), sendo importante o estudo do crescimento de microrganismos sobre a superfície dos implantes (Koseki *et al.*, 2014; Zaatreh *et al.*, 2016). Sabendo da preocupação existente no que diz respeito à contaminação de biomateriais, neste estudo nós avaliamos o comportamento microbiológico da liga e de seus elementos básicos oxidados e não oxidados por meio da avaliação

da formação de biofilmes monotípicos microbianos. A escolha dos microorganismos foi baseada na patogenicidade dos mesmos em causar doenças bucais (Carneiro, 2014; Santos *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho, foi adicionado saliva artificial visando reproduzir *in vitro*, as condições químicas em que o implante é submetido *in vivo*, conforme descrito previamente por Gal *et al.* (2000). A metodologia que vem sendo utilizada para avaliar a biomassa de micro-organismos vivos aderidos à superfície de biomateriais é o ensaio de MTT, onde com base na redução do sal tetrazólio amarelo a um formazan púrpura pode-se avaliar o crescimento bacteriano (Brambilla *et al.*, 2005, 2009).

Em nossa avaliação da formação de biofilme de *S. aureus* o grupo Nb apresentou a menor formação de biofilme. Wojcieszak *et al.*, (2016) encontrou resultado aproximado ao avaliar o comportamento do Nb associado a Ag com *S. aureus* em comparação com TiAg. O grupo Zr demonstrou a maior formação de biofilme, contrapondo a literatura, que relata um bom desempenho antimicrobiano do Zr oxidado (Buczynski *et al.*, 2003).

No biofilme de *P. aeruginosa* observamos que, novamente o Nb obteve a menor formação de biofilme. O grupo Nb oxidado se destacou dos demais grupos pela redução na formação de biofilme deste microrganismo. Mediaswasti *et al.* (2012) também observaram bom desempenho do Nb sobre *P. aeruginosa*. Em nosso estudo, podemos destacar que o Nb, independente da superfície oxidada (Nb oxidado) ou não oxidada (Nb não oxidado), promoveu redução na formação de biofilme comparado aos outros grupos do presente estudo, comprovando que este elemento possui propriedades bactericidas. O grupo Ti oxidado apresentou maior formação de biofilme. Gupta *et al.* (2013) encontrou resultado aproximado ao comparar o Ti oxidado com Ti oxidado associado a Ag.

Ao observar os resultados da formação de biofilme de *S. mutans* o grupo Ti obteve a menor formação de biofilme, sugerindo que, para esse microorganismo, o Ti possa exercer uma atividade antimicrobiana. Esta propriedade antimicrobiana pode ser explicada devido a formação de uma fina camada de óxido do Ti que exhibe propriedades anti-corrosivas. Esta camada pode ser um mecanismo importante para resistência ao *S. mutans*, que libera ácidos corrosivos tanto para o esmalte dental como para implantes metálicos (Souza *et al.*, 2013). O grupo Zr oxidado apresentou a maior formação deste biofilme. De maneira geral, as amostras oxidadas acumularam mais biofilme de *S. mutans* que suas análogas não oxidadas, sugerindo que talvez, para esse microorganismo, as alterações na superfície promovidas pela oxidação das amostras tenham contribuído para aderência de biofilme.

No biofilme de *C. albicans*, o grupo Ti oxidado obteve a menor formação de biofilme estando de acordo com Arai *et al.* (2009) que revestiu base de próteses de resina acrílica com TiO_2 e observou que houve redução na formação de biofilme de *C. albicans*. Por outro lado, o grupo Liga obteve a maior formação de biofilme.

De maneira geral, com excessão do biofilme de *Cândida albicans*, a liga demonstrou um bom comportamento com relação a formação dos biofilmes. Já para os elementos básicos, houve uma significativa diversidade nos resultados, porém, o Nióbio obteve a menor formação de biofilme por duas vezes (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) exercendo satisfatoriamente uma ação antimicrobiana bem como o Titânio que independente da oxidação também demonstrou menor formação de biofilme (*S. mutans* e *C. abicans*).

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a liga Ti-35Nb-7Zr apresentou influência positiva na atividade osteoblástica nos testes *in vitro* bem como na avaliação microbiológica quanto a formação de biofilmes monotípicos, podendo ser indicada para o uso biomédico. Sugere-se que a diminuição de biofilme observada é resultante da ação do elemento básico Nióbio; enquanto que o Zircônio pode ter auxiliado na diferenciação celular. Devido a variedade de resultados encontrados nas amostras oxidadas, mais estudos que abordem a influência desta superfície no comportamento celular de osteoblastos e no comportamento microbiológico, são necessários.

REFERÊNCIAS*

Abdel-Hady M, Hinoshita K, Fuwa H, Murata Y, Morinaga M. Change in anisotropy of mechanical properties with β -phase stability in high zr-containing ti based alloys. *Mat Sci and Eng*. 2008; 480(1):167-74.

American Society for Testing and Materials. ASTM STP1272: mechanical and tribological properties and biocompatibility of diffusion hardened Ti-13Nb-13Zr: a new titanium alloy for surgical implants. West Conshohocken (PA): ASTM International; 1996. 18p.

Andrade DP, Vasconcellos LMR, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELSS, Prado RF, et al. Titanium–35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: in vitro study. *Mat Sci and Eng C*. 2015;56:538-544.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(7):667-81. Review.

Arai T, Ueda T, Sugiyama K, Sakurai T. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *J Oral Rehabil*. 2009;36(12): 902-8.

Atkins P, Jones L. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman; 2001.

Bächle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Dec;15(6):683-92. Review.

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J*. 2005 Jan;16(2):156-61.

* 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 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Borens O, Corvec S, Trampuz A. Diagnosis of periprosthetic joint infections. *Hip Int.* 2012;22 Suppl 8:S9-14.

Bottino MC, Coelho PG, Henriques VAR, Higa OZ, Bressiani AHA, Bressiani JC. Processing, characterization, and in vitro in vivo evaluations of powder metallurgy processed Ti-13Nb-13Zr alloys. *J Biomed Mater Res.* 2009;88(3):689-96.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(3):302-10.

Brambilla E, Cagetti MG, Fadini L, García-Godoy F, Strohmenger L. Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization. *Am J Dent.* 2005;18:173-6.

Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, García-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater.* 2009;25:1067-72.

Branemark PI, Hansson BO, Adel R, Breine U, Indström LJ, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw: experience from a 10 year period. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1977;16:1-132.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental back-ground. *J Prosthet Dent.* 1983;50(3):399-410.

Buczynski BW, Kory MM, Steiner RP, Kittinger TA, Ramsier RD. Bacterial adhesion to zirconium surfaces. *Colloids Surf B.* 2003;30(1):167-75.

Carneiro HL. Avaliação de propriedades de superfície da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta submetida à anodização e seus efeitos na adesão bacteriana [dissertação]. Araraquara (SP): Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

Casaletto MP, Ingo GM, Kaciulis S, Mattogno G, Pandolfi L, Scavia G. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Appl Surf Sci.* 2001;172(1):167-77.

Chuenjitkuntaworn B, Osathanon T, Nowwarote N, Supaphol P, Pavasant P. The efficacy of polycaprolactone hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2016(1)264–71.

Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmam HP, et al. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med*. 2008;4(1):29.

Dewidar MM, Yoon HC, Lim JK. Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process. *Metals Mater Int*. 2006;12(3):193-206.

Dong H, Bell T. Enhanced wear resistance of titanium surfaces by a new thermal. *J Wear*. 2000;238(2):131-7.

Donato TAG, Almeida LH, Nogueira RA, Niemeyer TC, Grandini CR, Caram R, et al. Cytotoxicity study of some Ti alloys used as biomaterial. *Mat Sci and Eng*. 2009; 29 (4):1365-69.

Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J. Biocompatibility of stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*. 2004;25(26):5705-13.

Franco RL, Chiesa R, Beloti MM, Oliveira PT, Rosa AL. Human osteoblastic cell response to a Ca- and P-enriched titanium surface obtained by anodization. *J Biomed Mater Res A*. 2010;88(4):841-8.

Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta*. 2000;53(6):1103-15.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004;329:77–84.

Guo Y, Chen D, Cheng M, Lu W, Wang L, Zhang X. The bone tissue compatibility of a new Ti₃₅Nb₂Ta₃Zr alloy with a low young's modulus. *J Mol Med*. 2013;31(3):689-97.

Gupta K, Singh RP, Pandey A, Pandey A. Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S aureus*, *P aeruginosa* e *E coli*. *Beilstein J Nanotechnol*. 2013;4:345-51.

Guehennec LL, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008;4:535-43.

Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res Part B. Appl Biomater.* 2009;88(2): 519–29.

Hoemann CD, El-Gabalawy, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol.* 2009;57:318-23.

International Standards : Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res.* 1999;47:481-93.

Kanagaraja S, Wennerberg A, Eriksson C, Nygren H. Cellular reactions and bone apposition to titanium surfaces with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation. *Biomaterials.* 2001 Jul;22(13):1809-18.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implant: surface science aspects. *J Prosthet Dent.* 1983;49(6):832-7.

Khan MA, Williams RL, Williams DF. The corrosion behavior of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. *Biomaterials.* 1999;20:631-7.

Kohavi D, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Sela MN. An in vivo method for measuring the adsorption of plasma proteins to titanium in humans. *Biofouling.* 2013;29(10):1215-24.

Kopova I, Stráský J, Harcuba P, Landa M, Janecek M , Bacáková L. Newly developed Ti–Nb–Zr–Ta–Si–Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility. *Mat Sci and Eng.* 2016; 60:230-8.

Koseki H, Yonekura A, Shida T, Yoda I, Horiuchi H, Morinaga Y. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *Plos One.* 2014;9(10):1–8.

Laheurt P, Prina F, Eberhardt A, Gloriart T, Wary M, Patoor E. Mechanical properties of low modulus beta titanium alloys designed from the electronic approach. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2010;3(8):565-73.

Lemons JE, Dietsh-Misch F. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Santos; 2006.

Li JP, Li SH, Van Blitterswijk CA, Groot K. A novel porous Ti6Al4V: characterization and cell attachment. *J Biomed Mater Res*. 2005;73(2):223-33.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998;19(23):2219-32.

Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement- a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;18(19):1621-39.

Lopes OF, Mendonça VR, Silva FBF, Paris EC, Ribeiro C. Niobium oxides: an overview of the synthesis of Nb₂O₅ and its application in heterogeneous photocatalysis. *Quim Nova*. 2015;38(1):106-17.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1951):265-75.

Maik S, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, et al. Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(1):448-58.

Martins CAS, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presence of staphylococcus spp and candida spp in the human oral cavity. *Braz J Microbiol*. 2002;33:236-40.

Mediaswanti K, Truong VK, Hasan J, Li Y, Wen C, Ivanova EP, et al. Fabrication of Ti₁₄Nb₄Sn alloys for bone tissue engineering applications. *Key Eng Mater*. 2012;520:214-9.

Miura K, Yamada N, Hanada S, Jung TK, Itoi E. The bone tissue compatibility of a new Ti–Nb–Sn alloy with a low Young's modulus. *Acta Biomater*. 2011;7(5):2320-6.

- Nakajo K, Takahashi M, Kikuchi M, Takada Y, Okuno O, Sasaki A, et al. Inhibitory effect of Ti-Ag alloy on artificial biofilm formation. *Dent Mater J*. 2014;33(3):389–439.
- Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mat Sci and Eng A*. 1998 Mar;243:231-6.
- Niinomi M. Fatigue performance and cytotoxicity of low rigidity titanium alloy, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr. *Biomaterials*. 2003;24(16):2673- 83.
- Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008a;1:30-42. Review.
- Niinomi M. Metallic biomaterials. *J Artif Organs*. 2008b;11(3):105-10.
- Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2012; 8(11):3888–903.
- Ning C, Ding D, Dai K, Zhai W, Chen L. The effect of Zr content on the microstructure, mechanical properties and cell attachment of Ti-35Nb-xZr alloys. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):1-8.
- Okasaki Y, Rao S, Tateishi T, Ito Y. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new titanium alloys without Al and V. *Biomaterials*. 1998;19:1197-215.
- Ozan S, Lin J, Li Y, Ipek R, Wen C. Development of Ti–Nb–Zr alloys with high elastic admissible strain for temporary orthopedic devices. *Acta Biomaterialia*. 2015;20:176–87.
- Park YJ, Song YH, An JH, Song HJ, Anusavice KJ. Cytocompatibility of pure metals and experimental binary titanium alloys for implant materials. *J Dent*. 2013;41(12):1251-8.
- Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen*. 2012;20:647–57.
- Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999;20:1-25.

Piotrowski B, Baptista AA, Patoor E, Bravetti P, Eberhardt A, Laheurte P. Interaction of bone–dental implant with new ultra low modulus alloy using a numerical approach. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 May;38:151-60.

Qianli H, Tarek AE, Xujie L, Ranran Z, Xing Y, Zhijian S. SaOS-2 cell response to macro-porous boron-incorporated TiO₂ coating prepared by micro-arc oxidation on titanium. *Mat Sci and Eng*. 2016;67:195–204.

Ramage G, Culshaw S, Jones B, Williams C. Are we any closer to beating the biofilm: novel methods of biofilm control. *J Contin Educ Health Prof*. 2010; 23:560–6.

Rogers SD, Howie DW, Graves SE, Pearcy MJ, Haynes DR. In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J Bone Joint Surg Br*. 1997;79:311-5.

Romeiro RL, Correia CP, Lepesqueur L, Feitosa PC, Jorge AOC. In vitro adherence of streptococcus mutans in dental implants with a smooth surface or treated. *Braz J Periodontol*. 2011;21(3):86-90.

Rosa AL, Beloti MM, Noort RV, Hatton AV, Devlin AJ. Surface topography of hidroxiapatite affects ROS17 2,8 cells response. *Pesqui Odontol Bras*. 2002 Nov;16(3):209-15.

Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J*. 2005;16(3):225-30.

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, Oliveira PT, Rosa AL. Chromic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):205-11.

Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, et al. A review on the wettability of dental implant surfaces i: theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):2894-906.

Santos DR, Pereira MS, Cairo CAA, Graça MLA, Henriques VAR. Isochronal sintering of the blended elemental Ti-35Nb alloy. *Maters Sci Engin A*. 2008;472(1-2):193-7.

Santos SSF, Loberto JCS, Martins CAP, Jorge AOC. Prevalence and in vitro sensibility of the enterobacteriaceae and pseudomonads isolated from the oral

cavity and periodontal pockets in patients with chronic periodontitis. *Pós-Grad Rev Odontol.* 2002;5(2):74-83.

Schneider SG. Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2001.

Schwartz FH, Novaes AB Jr, Castro LM, Rosa AL, Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Impl Res.* 2007;18(3):333-44.

Sendi P, Zimmerli W. Diagnosis of periprosthetic joint infections in clinical practice. *Int J Artif Organs.* 2012;35:913–22.

Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W. Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86:865–72.

Simão AM, Beloti MM, Rosa AL, Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell Bio Int.* 2007;31(11):1405-13.

Simões LGP, Araujo AL, Minozzi DT, Longo E. Aço inox bactericida. *R. Esc. Minas Ouro Preto.* 2007; 60(1): 101-8.

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Feb;97:27-36.

Souza JCM, Ponthiaux P, Henriques M, Oliveira R, Teughels W, Celis JP, et al. Corrosion behaviour of titanium in the presence of streptococcus mutans. *J Dent.* 2013;41:528-34.

Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Mar;88(3):262-9.

Taddei EB, Henriques VAR, Silva CRM, Cairo CAA, Bottino MC. Ensaio de citotoxicidade e influência do tratamento de solubilização na microestrutura da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para potenciais aplicações ortopédicas. *Rev Materia.* 2007;12(1):120-7.

Vandrovcova M, Jirka I, Novotna K, Lisa V, Frank O. Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 Cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy. PLoS ONE 2014;9(6): e100475.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YRC. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. Mater Res. 2008;11(3):275-80..

Wang BL, Li L, Zheng YF. In vitro cytotoxicity and hemocompatibility studies of Ti-Nb, Ti-Nb-Zr and Ti-Nb-Hf biomedical shape memory alloys. Biomed Mater. 2010;5(4):044102.

Wang X, Li Y, Xiong J, Hodgson PD, Wen C. Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications. Acta Biomater. 2009;5(9):3616-24.

Wei H, Chuang A, Zheng Cao, Liaw PK. Biocompatibility study of zirconium-based bulk metallic glasses for orthopedic applications. JOM. 2010; 41(A):1726.

Wojcieszak D, Mazur M, Kaczmarek D, Mazur P, Szponar B, Domaradzki J, et al. Influence of the surface properties on bactericidal and fungicidal activity of magnetron sputtered Ti–Ag and Nb–Ag thin films. Mater Sci Eng C. 2016;62:86-95.

Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J Dent. 2003;31(3):173-80.

Xiong J, Li Y, Hodgson PD, Wen C. In vitro osteoblast-like cell proliferation on nano-hydroxyapatite coatings with different morphologies on a titanium niobium shape memory alloy. J Biomed Mater Res A. 2010 Dec;95(3):766-73.

Zaatreh S, Wegner K, Strauß M, Pasold J, Mittelmeier W, Podbielski A, et al. Co- culture of S epidermidis and human osteoblasts on implant surfaces: an advanced in vitro model for implant-associated infections. PLoS One. 2016;11(3):e0151534.

Zhang S, Cheng X, Yao Y, Wei Y, Han C, Shi Y, Wei Q, Zhang Z. Porous niobium coatings fabricated with selective laser melting on titanium substrates: preparation, characterization, and cell behavior. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015;53:50-9.

Zhao D, Chang K, Ebel T, Qian Ma, Willumeit R, Yan M. Microstructure and mechanical behavior of metal infection molded Ti- Nb binary alloys as biomedical material. J Mechanical Behav Biomed Materials. 2013;(28):171-82.

Zimmer GC. Influência da oxidação térmica sobre as propriedades de fadiga da liga Ti-6Al-4V [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



CERTIFICAMOS, que o protocolo intitulado " **Avaliação da liga Ti-35Nb-7Zr e de seus elementos básicos sobre a atividade osteoblástica e a formação de biofilme: Estudo in vitro** " registrado com o nº **006 /2016-CEUA-ICT-UNESP** , sob a responsabilidade da Profa. Dra. **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaboradora a mestranda Daphne de Camargo Reis Mello, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 12/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/08/2016 a 28/10/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo (Wistar)
Nº de Animais	20
Peso/Idade	400 grs/90 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP


Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora