

BARBARA LOIS MATHIAS DE SOUZA

Modificação da superfície da liga Ti 7,5Mo utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata

Barbara Lois Mathias de Souza

Modificação da superfície da liga Ti 7,5Mo utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica em área de materiais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia do Amaral Escada.

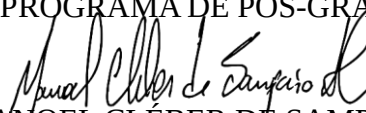
S729m	Souza, Barbara Lois Mathias de Modificação da superfície da liga Ti 7,5Mo utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata / Barbara Lois Mathias de Souza – Guaratinguetá, 2021. 66 f : il. Bibliografia: f. 58-66 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2021. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia do Amaral Escada 1. Materiais biomédicos. 2.Ligas de titânio. 3. Materiais nanoestruturados. 4. Nanopartículas. I. Título. CDU 620.1(043)
-------	--

BARBARA LOIS MATHIAS DE SOUZA

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE
“MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA”

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

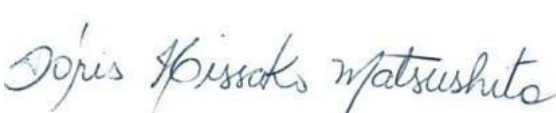
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. MANOEL CLÉBER DE SAMPAIO ALVES
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a Dr.^a ANA PAULA ROSIFINALVES CLARO
Orientador(a)/UNESP-FEG


Prof. Dr. RONALDO SPEZIA NUNES
UNESP- FEG


Prof.^a Dr.^a DORIS HISSAKO MATSUSHITA
Membro Externo

Dezembro 2021

DADOS CURRICULARES

BARBARA LOIS MATHIAS DE SOUZA

NASCIMENTO	27 de Julho de 1995 – Guaratinguetá/SP
FILIAÇÃO	Mauro Sérgio de Souza Elaine Cristine Mathias de Souza
2014/2019	Formação acadêmica Bacharelado em Engenharia de MateriaisUniversidade Estadual Paulista

dedico este trabalho
de modo especial, à Deus e minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e Nossa Senhora por toda benção e toda graça em nossa vidas;

à minha mãe Elaine Cristine Mathias de Souza que com sua fé me deu forças para concluir o mestrado;

ao meu pai Mauro Sergio de Souza por ter me dado suporte e segurança durante os anos de estudos;

ao meu irmão João Pedro Mathias de Souza por todo amor e compreensão durante minha vida acadêmica;

à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro pelo aprendizado;

à minha co-orientadora, Dr^a Ana Lúcia do Amaral Escada pelo apoio e amizade durante esses anos;

ao Prof. Dr. Ronaldo Spezi Nunes, pelo auxílio na execução deste projeto;

à Prof^a Dr^a Doris Hissako Matsushita, pela participação na banca.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - 88882.433468/2019-01.

“Consagre ao Senhor tudo o que você
faz, e os seus planos serão bem-
sucedidos.”

Provérbios 16:3

RESUMO

O titânio e suas ligas destacam-se como biomateriais devido estabilidade química e integração com o osso circundante. As superfícies nanoestruturadas se assemelham à estrutura da matriz óssea, favorecendo a adesão celular. Para um implante bem-sucedido, a integração do tecido deve ocorrer antes da adesão bacteriana. A superfície nanoporosa do substrato — obtida por meio do tratamento alcalino — otimiza o contato osso-implante, e a incorporação de nanopartículas de prata forma um filme nanoestruturado capaz de prevenir a colonização de bactérias. Sendo assim, se faz necessário a modificação da superfície da liga Ti7,5Mo utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata, sendo este o objetivo da pesquisa. A liga Ti7,5Mo foi produzida e posteriormente, realizado o tratamento alcalino em banho termostatzado com solução de NaOH, permitindo a corrosão da camada de TiO₂, resultando na superfície nanoporosa do substrato. Logo após, as amostras foram imersas em solução de AgNO₃ — para incorporação das nanopartículas de prata na superfície nanoporosa — e incubadas em estufa. Em seguida, as amostras foram submetidas à calcinação em forno mufla EDG, com taxa de aquecimento de 5°C/minuto, seguido de resfriamento lento dentro do forno. A análise da superfície foi feita por meio da Perfilometria Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), medida do Ângulo de Contato, Ensaio de viabilidade celular (MTT), Ensaio de adesão celular (Cristal Violeta) e Avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram um filme nanoestruturado semelhante à estrutura da matriz extracelular — superfície nanoporosa do substrato com nanopartículas de prata (AgNPs) — favorecendo a ancoragem mecânica, adesão celular, e apresentando propriedades antimicrobianas que reduzem a formação de biofilme. Além disso, as amostras tratadas apresentaram maior atividade mitocondrial indicando que os materiais não são tóxicos e portanto, apresentam viabilidade celular e aumento da adesão nas células, com menor formação de colônias de bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*.

PALAVRAS-CHAVE: Biomaterial. Titânio. Tratamento alcalino.

ABSTRACT

Titanium and its alloys stand out as biomaterials due to chemical stability and integration with the surrounding bone. The nanostructured surfaces resemble the structure of the bone matrix, favoring adhesion to the cellular structure. For a successful implant, tissue integration must occur well before bacterial adhesion. The replacement nanoporous surface —in the middle of the alkaline treatment — optimizes bone-implant contact, and the incorporation of silver nanoparticles forms a nanostructured film capable of preventing bacterial colonization. Therefore, it is necessary to modify the surface of the Ti7.5Mo alloy using alkaline treatment and silver immobilization, which is the objective of the research. The Ti7.5Mo alloy was produced and subsequently, the alkaline treatment was carried out in a thermostated bath with bath solution, allowing the impression of the TiO₂ layer, resulting in the nanoporous surface of the substrate. Soon after, as a sample, they were immersed in an AgNO₃ solution — for incorporation of surface nanoparticles into the nanoporous surface — and incubated in an oven. Then, they were sent in ovens at 5°C/minute, followed by cycling inside the oven. Surface analysis was performed using Optical Profiling, Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectrum (EDS), Contact Angle Measurement, Cell Viability Assay (MTT), Cell Adhesion Assay (Crystal Violet) angle and Evaluation of antimicrobial activity. anchoring an extracellular matrix nanostructure matrix — surface of the extracellular matrix with silver nanoparticles (AgNPs) — promoting mechanical filming, cell adhesion, antimicrobial properties that provide a biome-forming framework. In addition, as treated variants, they show similarities with mitochondrial activity in that the materials are non-toxic and, therefore, allow for cell viability and increased colony in cells, with less bacterial formation of bacteria in cells, with *S. aureus* and *S. epidermidis*.

KEYWORDS: Biomaterial. Titanium. Alkaline treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação dos biomateriais: Metálico e não metálico	20
Figura 2 – a) Tecido interface implante osso b) Interface infundida	21
Figura 3 – Estrutura cristalina do TiO ₂ : a) Rutilo b) Anatase c) Brookita	21
Figura 4 – Diagrama TTT da liga Ti-Mo com composição Ti15%Mo.....	22
Figura 5 – Comportamento do material a) Hidrofílico b) Hidrofóbico	23
Figura 6 – Representação esquemática da topografia em diferentes escalas	24
Figura 7 – Representação esquemática da molhabilidade da superfície	26
Figura 8 – Representação esquemática da camada de óxido.....	29
Figura 9 – Representação esquemática da interação inicial	31
Figura 10 – Representação esquemática da adsorção e adesão celular	32
Figura 11 – Mudança estrutural na superfície do Ti após NaOH e TT.....	34
Figura 12 – Representação esquemática: Superfície nanoestruturada.....	35
Figura 13 – Representação esquemática: Tecido com AgNPs e ação bactericida	37
Figura 14 – Fluxograma com as etapas do projeto.....	38
Figura 15 – Metais utilizados para o preparo da liga a) Ti b) Mo	39
Figura 16 - a) Forno a arco voltaico utilizado na fusão da liga; b) Interior do forno.....	39
Figura 17 – Forno tubular utilizado no TT homogeneização	40
Figura 18 – a) Liga Ti7,5Mo pós TT homogeneização b) Tarugo.....	40
Figura 19 – Amostra obtida para tratamento da superfície.....	40
Figura 20 - Amostra liga Ti7,5Mo a) Banho ultrassom b) H ₂ O deionizada	41
Figura 21 - Banho termostatizado em Tecnal	41
Figura 22 - a) Recipiente retirado do banho em Tecnal b) Resíduo da solução	42
Figura 23 - a) Amostras em banho ultrassom b) Pré secagem.....	42
Figura 24 - Estufa no laboratório de biomateriais (DMT-UNESP).....	42
Figura 25 - Amostras G1 e G2 separadas para caracterização	43
Figura 26 - a) Massa de AgNO ₃ b) Amostras em estufa.....	43
Figura 27 - a) G1, G2, G3 b) Amostras para caracterização	44
Figura 28 - Gráfico de viabilidade celular liga Ti7,5Mo.....	48
Figura 29 - Gráfico de adesão celular liga Ti7,5Mo.....	49
Figura 30 - Micrografias comparativas da superfície.....	50
Figura 31 – Histograma comparativo das UFC	51
Figura 32 - Microscopia eletrônica de varredura.....	52

Figura 33 – Perfilometria óptica.....	53
Figura 34 – Espectroscopia dispersiva de raio x	55
Figura 35 – Ângulo de contato	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultado da rugosidade média (Ra)	53
Quadro 2 – Medida do ângulo de contato (AC)	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	CONDIÇÕES GERAIS	19
2.1.1	Biomateriais metálicos	20
2.1.2	Titânio e liga Ti7,5Mo	21
2.1.3	Química de superfície	22
2.1.4	Topografia de superfície	23
2.1.5	Molhabilidade de superfície	25
2.2	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	26
2.2.1	Camada de óxido	28
2.2.2	Superfície porosa	29
2.2.3	Adorção de proteína e adesão celular	31
2.2.4	Formação de biofilme	33
2.3	TRATAMENTO ALCALINO	33
2.4	INCORPORAÇÃO DE PRATA	35
3	METODOLOGIA	38
3.1	FLUXOGRAMA	38
3.2	AMOSTRAS DA LIGA TI7,5MO	39
3.2.1	Obtenção da liga	39
3.2.2	Confecção dos discos	40
3.2.3	Preparo da superfície	41
3.3	TRATAMENTO ALCALINO	41
3.4	INCORPORAÇÃO DE PRATA	43
3.5	CALCINAÇÃO	44
3.6	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	44
3.6.1	Teste de viabilidade celular	45
3.6.2	Adesão celular	45
3.6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana	46
3.6.4	MEV e EDS	47
3.6.5	Perfilometria	47

3.6.6	Ângulo de contato	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	48
4.2	ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	49
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	50
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	52
4.5	PERFILOMETRIA ÓPTICA.....	53
4.6	ESPECTROSCOPIA DISPERSIVA DE RAIOS X.....	55
4.7	ÂNGULO DE CONTATO	56
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais usados clinicamente são projetados para suportar diferentes cargas mecânicas e permanecer estável. Os biomateriais devem incluir sinais biológicos, como células adesivas ligantes que aumentam a fixação e os sinais físicos do suporte. Levando-se em consideração as propriedades mecânicas, devem fornecer estabilidade à estrutura física exigida pelo tecido, de forma a suportar trações ou movimentações características ao local de implantação do suporte (LIN, 2020).

O titânio (Ti) e suas ligas apresentam potencial para reparo de tecidos duros devido às suas características mecânicas, resistência à corrosão e boa biocompatibilidade. Além disso, a fixação bacteriana nos implantes de titânio frequentemente resulta em colonização descontrolada e formação de biofilme, que pode prejudicar as funções das células osteogênicas e causar a sua falha (TAO, 2021).

O contato adequado da célula com as superfícies do material e subsequente adesão/disseminação são os primeiros estágios nas interações célula-material (ZAMBUZZI, 2011). Esses eventos iniciais influenciam profundamente a integração dos implantes dentários no tecido do hospedeiro e determinam o sucesso ou falha de uma ampla gama de biomateriais implantados. A importância dessas interações levou a um maior interesse na compreensão da formação óssea, particularmente na adesão e diferenciação dos osteoblastos como um meio de prever a qualidade das respostas biológicas (MILANI, 2010; ZAMBUZZI 2008; DE SOUZA, 2009).

Quando um material é inserido no corpo humano, ocorre uma série de reações em cascata, que podem levar à sua integração. A primeira etapa desse processo é chamada de estabilidade do implante ao osso, mas com o tempo, essa relação perde importância em detrimento de uma segunda etapa: a conexão biológica entre as partes envolvidas. Este processo sugere que fatores como topologia, rugosidade e composição da superfície desempenham um papel importante para um resultado favorável.

Todas essas características poderiam ser conectadas, uma vez que a estrutura e aspereza da superfície são parâmetros primordiais para o perfil de molhabilidade, que mudará a forma como as células ósseas irão se multiplicar na superfície. Além disso, a diferenciação celular está intimamente ligada à composição da superfície, e seu crescimento ocorre principalmente nas lacunas deixadas pela rugosidade (RANGEL, 2020).

A ciência do biomaterial reivindica um revestimento duro, anticorrosivo, antibacteriano, bioativo, poroso e com resistência mecânica suficiente para um implante de suporte de carga artificial durável e bem-sucedido (ROY, 2020). O tratamento alcalino já foi estudado durante estas últimas décadas em superfícies lisas e micro-rugosas. A obtenção de hidrogel de titanato de sódio em titânio após tratamento alcalino tornou-se muito mais popular do que o titânio puro em aplicações odontológicas. Portanto, muitos estudos pesquisaram a influência de parâmetros de processo, como imersão em NaOH em diferentes tempos e temperaturas (VILARDELL, 2018).

As técnicas de modificação de superfície também devem auxiliar na prevenção da formação de biofilme (KURUP, 2021). Uma das principais vantagens dos nano biomateriais à base de prata está associada aos seus efeitos antipatogênicos intrínsecos exibidos contra microrganismos planctônicos e organizados por biofilme. Entre as várias aplicações, o potencial antimicrobiano desempenha um papel crucial, pois está diretamente relacionado à melhoria da saúde humana (KUMAR, 2020).

Em geral, condições de superfície hidrofílica, topografia de superfície estruturada e estruturas porosas podem aumentar a osteointegração do implante. Modificações de superfície como tamanho de poro, porosidade e estrutura afetam fortemente a interação do implante com o tecido circundante e influenciam a osteointegração e a vascularização (ESCADA, 2009; STÄNDERT, 2021)

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal modificar a superfície da liga Ti 7,5Mo utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata, buscando a obtenção de uma superfície antimicrobiana.

1.1.1 Objetivos específicos

Caracterização da superfície por meio das técnicas: Perfilometria Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Ângulo de Contato.

Caracterização *in vitro*: Ensaio de viabilidade celular, Ensaio de adesão celular , Avaliação da atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

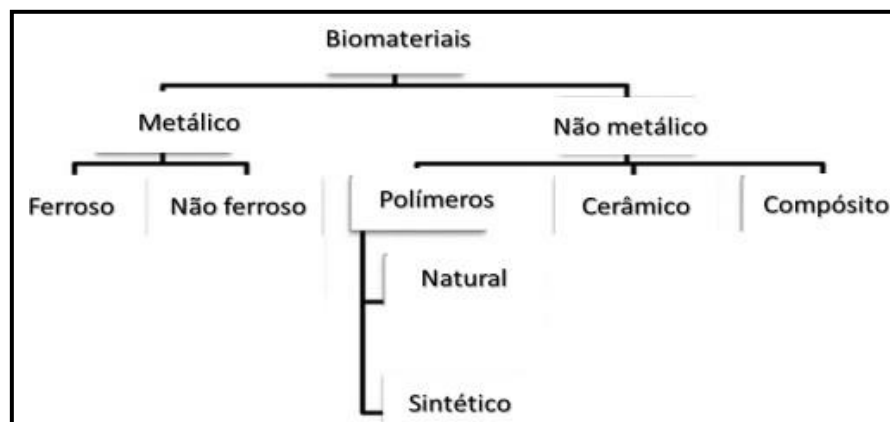
A engenharia de materiais possibilita o desenvolvimento de biomateriais biofuncionais e biocompatíveis. Na ciência dos materiais, um biomaterial é definido como uma substância projetada para que sozinha ou como parte de um sistema complexo possa ser usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (CHEN, 2015).

Para Williams (1987), um biomaterial é um material usado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos. Os dispositivos médicos são definidos como qualquer instrumento pretendido pelo fabricante para ser usado, isoladamente ou em combinação, por seres humanos para diagnóstico, tratamento, suporte ou sustentação da vida. Dessa forma, um biomaterial é um componente de um dispositivo médico. Portanto, são materiais biomédicos implantados (KASUGA, 2010)

Muitos biomateriais usados clinicamente, como implantes de titânio, têm função de suporte estrutural para hospedar o tecido e são projetados para suportar diferentes cargas mecânicas e permanecer estável. Os biomateriais devem incluir sinais biológicos, como células adesivas ligantes que aumentam a fixação e os sinais físicos do suporte. Levando-se em consideração as propriedades mecânicas, devem fornecer estabilidade à estrutura física exigida pelo tecido, de forma a suportar trações ou movimentações características ao local de implantação do suporte (LIN, 2020).

Em aplicações médicas, materiais simples raramente são usados e são comumente integrados em dispositivos como biomateriais. Basicamente, a forma final fabricada, esterilizada e biocompatível de um material usado em biodispositivos é o biomaterial. Cada implante artificial exige alguns requisitos de desempenho com base nas propriedades físicas desse biomaterial. Esses requisitos podem ser categorizados como desempenho mecânico, durabilidade mecânica e propriedades físicas. Embora as categorias de biomateriais sejam bem descritas em vários estudos, uma classificação é fornecida na Figura 1 (ROY, 2020).

Figura 1 - Classificação dos biomateriais: Metálico e não metálico



Fonte: Adaptado de Roy (2020)

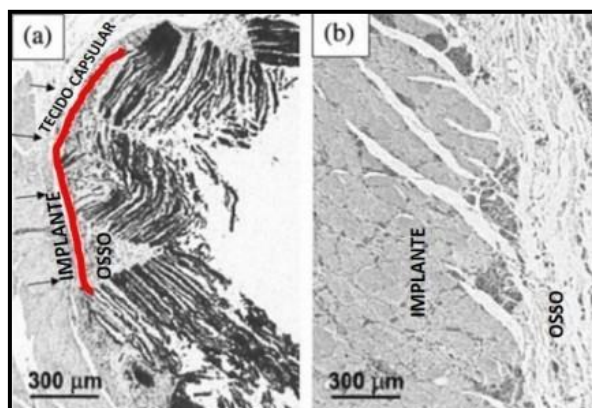
Para Williams (1987), a biocompatibilidade é “a capacidade de um material funcionar com uma resposta apropriada em uma aplicação específica” (ROY, 2020). A biocompatibilidade não inclui apenas as interações químicas do material implantado com o sistema fisiológico do hospedeiro, mas também os impactos físicos do material implantado nos tecidos circundantes (propriedades mecânicas). Uma vez que um biomaterial é projetado para ser usado em contato íntimo com tecido vivo, é essencial que o material implantado não cause efeitos nocivos. Os requisitos para esta biocompatibilidade são complexos e rígidos, variando com aplicações médicas específicas (CHEN, 2015).

2.1.1 Biomateriais metálicos

Um biomaterial metálico ideal deve ter um módulo semelhante ao do osso, excelente resistência à fadiga, corrosão, desgaste e boa capacidade de osseointegração (PIRES, 2015).

Em geral, antes de um dispositivo ser implantado no osso, o corpo forma uma cápsula ao redor em reconhecimento dele como um corpo estranho, Figura 2 (a). Embora seja um mecanismo de defesa perfeitamente natural, a formação do tecido capsular também contribui para a soltura dos implantes permanentes. Para a surpresa dos cirurgiões, os implantes de titânio demonstram integração íntima com o tecido ósseo hospedeiro, conforme representado na Figura 2 (b) (CHEN, 2015).

Figura 2 - a) Tecido na interface implante/osso; b) Interface infundida



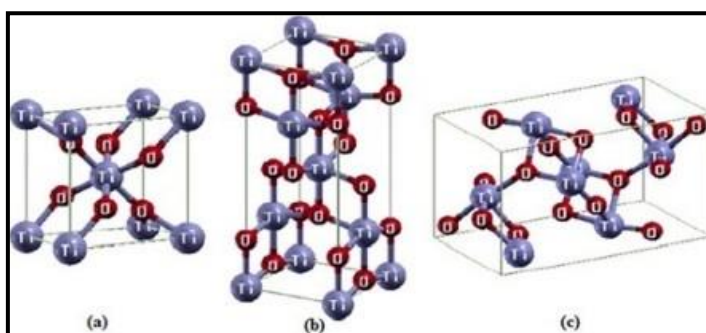
Fonte: Adaptado de Chen (2015)

2.1.2 Titânio e liga Ti7,5Mo

O titânio e suas ligas têm um papel importante na odontologia, bem como em outras áreas da medicina. Um vasto corpo de pesquisas está sendo continuamente realizado para atualizar as propriedades biológicas, mecânicas e químicas do titânio para seu uso ideal como implantes dentários. No entanto, de igual significado é o efeito do ambiente oral dinâmico neste material (PRASAD, 2015).

O titânio é amplamente utilizado em várias aplicações devido à possibilidade de modificar suas propriedades variando a composição do elemento de liga. A microestrutura desempenha um papel crucial quando se fala sobre as propriedades mecânicas dos implantes, como resistência, ductilidade e tenacidade à fratura. Fatores como tratamento térmico, composição química e histórico de produção afetam em grande medida a microestrutura. O controle da microestrutura é importante para garantir o sucesso da produção de ligas de titânio para aplicações específicas, Figura 3.

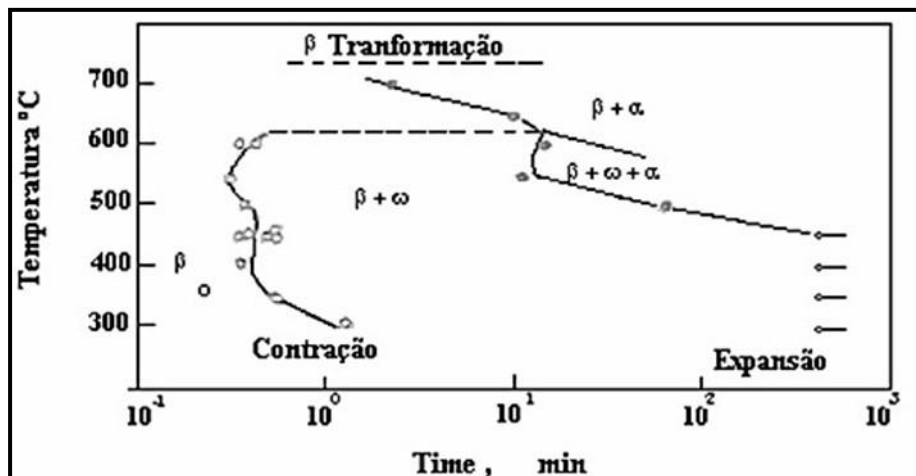
Figura 3 - Estrutura cristalina do TiO_2 : a) Rutilo; b) Anatase; c) Brookita



Fonte: Mohamad (2015)

Segundo Ho *et al*, 1999 a liga Ti-Mo apresenta estrutura cristalina hexagonal. Conforme Collins *et al.*, 2003 o diagrama de fases Ti-Mo possui uma reação monotetóide com uma única fase β estável a alta temperatura, representada por β (Ti, Mo). Na Figura 4 é possível visualizar o diagrama temperatura tempo-transformação para a liga Ti-15Mo.

Figura 4 – Diagrama TTT da liga Ti Mo, com composição de Ti-15%Mo



Fonte: Adaptada do Metals Handbook (2002)

2.1.3 Química de superfície

Um fator essencial, nesse contexto, é como a superfície do material interage com a água. Se a superfície se ligar fortemente com a água, ou seja, se for uma superfície hidrofílica, a proteína com sua cápsula de água considerará a superfície como similar à água. Essa proteína interagirá com o material indiretamente, através da intermediação de uma camada de água, e permanecerá em seu estado conformacional normal.

Se, ao contrário, a superfície repelir ou tiver uma ligação frágil com a água, ou seja, se a superfície for hidrofóbica, a proteína estará mais próxima a formar ligações diretamente com os átomos da superfície, os quais poderão causar então mudanças na forma ou sua desnaturação (KASEMO, 1988).

As células interagem com a camada de biomoléculas e água que estão ligadas à superfície, e a natureza e propriedades das biomoléculas estão determinadas principalmente pela superfície. A natureza da camada de biomoléculas na superfície determinará como as células respondem a ela. Consequentemente, há uma interação célula/superfície medida pela intervenção das camadas de biomoléculas mais água (KASEMO, 1998).

As características químicas superficiais do material e a topografia guiarão a composição da película de proteínas que será incorporada ao implante, direcionando a osteogênese. Em seguida, sobre a superfície do implante, inicia-se a formação de uma matriz óssea na qual ocorre neoformação tecidual e remodelação, criando-se uma interface entre osso e implante, composta por osso novo e velho (DAVIES, 1998).

Portanto, as características químicas das superfícies dizem respeito à energia de superfície e carga. Uma alta energia de superfície representa melhor molhabilidade e maior afinidade por adsorção, e isto determina se o biomaterial é hidrofílico ou hidrofóbico. Implantes com alta energia de superfície devem apresentar osseointegração mais forte, devido à melhor adsorção das proteínas (WENNERBERG, 2013; LANG, 2011) e melhor interação com fluidos biológicos e células (NOVAES, 2010).

Superfícies com alta hidrofiliicidade (como no caso de alta densidade de grupos hidroxila, com ângulos de contato menores que 90°) são capazes de induzir rápida adesão, espalhamento e organização do citoesqueleto de fibroblastos, produção de fibras de colágeno e formação de tecido conjuntivo bem vascularizado (BARTHES, 2020), Figura 5.

Figura 5 – Comportamento do material: a) hidrofílico; b) hidrofóbico



Fonte: Wenzel (1936); Cassie-Baxter (1944)

2.1.4 Topografia de superfície

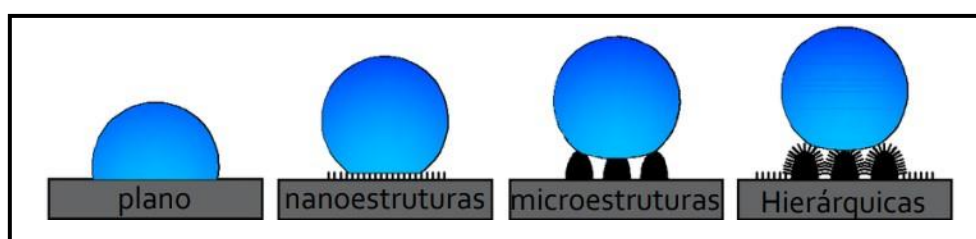
Outro fator que influencia a resposta biológica nos implantes dentários é a topografia da superfície, e vários estudos procuram encontrar qual a rugosidade ideal para a osseointegração (WENNERBERG, 2013; GUPTA, 2010; AVILA, 2009).

O estudo da rugosidade foca-se nos implantes de superfície rugosa, nanorugosa e porosa. Implantes de superfície porosa facilitam a proliferação de células ósseas. Uma pesquisa avaliou a reparação óssea ao redor de implantes de superfície porosa e rugosa, implantados em tíbia de coelho, e concluiu que a superfície porosa contribuiu mais para a osseointegração devido a sua maior superfície de contato (BRENTTEL, 2006).

O estudo em escala nanométrica tem demonstrado ser bastante relevante no contexto da osseointegração, influenciando na adesão celular específica, proliferação e diferenciação (TOMISA, 2011; MCMAHON, 2013).

Características superficiais nanométricas dos implantes afetam, grandemente, as interações celulares. A topografia em nanoescala modifica as propriedades mecânicas individuais das células, interferindo na remodelação, base do citoesqueleto, assim como nas mudanças complexas em membranas celulares (MENDONÇA, 2009). São classificadas como nanoestruturas aquelas com dimensões de 1 a 100 nm. Destaque-se que 500 nm já correspondem a 0,5 μm , Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática da topografia em diferentes escalas



Fonte: Mendonça (2009)

Os implantes tradicionais de Branemark exibiam mínima rugosidade superficial, com 0,5 a 1,0 μm , aproximadamente. Após 1990, achados preconizavam 1,5 μm como superiores em termos de resposta biológica, quando comparados com os usinados (rugosidades inferiores a 1,0 μm), ou ainda, com implantes tratados com spray plasma (superfícies com rugosidade maior do que 2,0 μm).

Idealmente, a rugosidade necessária para formação óssea de qualidade ocorre quando se tem 1,5 μm na superfície do implante (MEIRELLES, 2008).

Um implante usinado, como o Branemark original, é ancorado ao osso por pequenos ingressos do tecido nas pequenas irregularidades da superfície, caracterizando uma adesão biomecânica. Deste modo, a osseointegração é dependente da adesão biomecânica. Outros tipos de superfície com rugosidades moderadas, demonstram uma resposta melhor da osseointegração comparadas às superfícies usinadas. Isto demonstra que a osseointegração depende de um mínimo de rugosidade para que ocorra a adesão biomecânica, e que o grau dessa rugosidade influencia diretamente nessa adesão (ALBREKTSSON, 2004).

Os sinais físicos na forma de topografia de superfície comprovadamente influenciam o comportamento celular em termos de adesão e crescimento. Os biomateriais são combinados com moléculas de sinalização de várias maneiras para influenciar ou controlar o comportamento das células por meio de fatores de crescimento ou pequenas moléculas de drogas.

Padrões topográficos — ondulações na superfície e rugosidade — específicos na superfície de um biomaterial também podem direcionar o comportamento das células para a regeneração do tecido. Vários estudos têm mostrado que a rugosidade da superfície em nanoescala aumenta a adsorção de proteínas, que promove a fixação dos osteoblastos, melhorando a resposta do tecido ósseo. As investigações também mostram que as características da superfície em nano/microescala promovem a diferenciação osteogênica quando comparada a uma superfície lisa (KIM, 2021).

Para obter um bom compromisso entre a adesão/proliferação osteoblástica e o entrelaçamento osso-implante, evitando aumentar a liberação de íons (resposta pró-inflamatória) o tamanho da rugosidade deve ser em torno de 0,2-2 $\mu\text{m Ra}$.

As superfícies muito lisas são utilizadas para o contato com tecidos moles de acordo com a preferência de fibroblastos e células endoteliais para superfícies com rugosidade abaixo de 0,2 $\mu\text{m Ra}$ (BARTHES, 2020).

De um modo geral o aumento da rugosidade da superfície dos implantes aumenta a molhabilidade da superfície, afetando diretamente a adsorção das proteínas depositadas, além de facilitar não só a estabilidade inicial do coágulo como também a aderência, locomoção e espraiamento das células (osteoblastos, macrófagos, células epiteliais e leucócitos), melhorando a interação biomecânica do implante com tecido ósseo (ÉBER, 2019). Para Elias *et al.* (2008) quanto menor a direcionalidade da rugosidade na superfície do implante, melhor a cinética do processo de neoformação óssea.

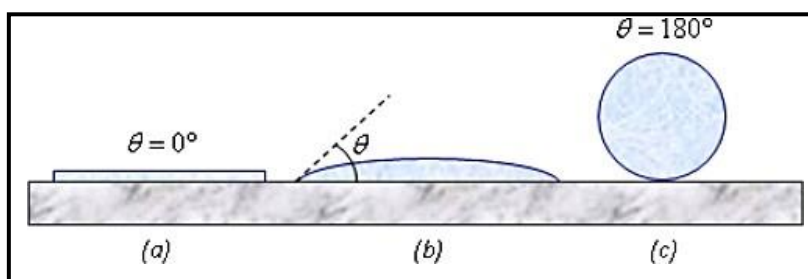
2.1.5 Molhabilidade de superfície

Supostamente, alterações superficiais, notoriamente as químicas, influenciam na energia de superfície e na carga aplicada. Uma alta energia de superfície corresponde a uma melhor molhabilidade, sendo esta uma característica importante na adsorção de proteínas que desencadeiam os fenômenos de neoformação óssea. Também, os implantes que têm alta energia de superfície são conhecidos como mais hidrofílicos (BRANDÃO, 2010).

Devido às diferentes propriedades dos materiais, bem como características mecânicas, como a dureza, os materiais têm que ser tratados de acordo com diferentes procedimentos, para obtenção de uma superfície rugosa. No caso de biomateriais, a molhabilidade da superfície é avaliada principalmente pela medida dos ângulos de contato. Um alto valor indica baixa molhabilidade ou natureza hidrofóbica, e um baixo valor significa alta molhabilidade ou superfície hidrofílica (KAUR, 2019), Figura 7.

A hidrofília/hidrofobicidade da superfície do biomaterial interage com as proteínas séricas promovendo ou inibindo sua adsorção e desnaturação. Um estudo recente mostrou que macrófagos expostos a uma superfície hidrofóbica expressavam marcadores pró-inflamatórios, enquanto a exposição a uma superfície hidrofílica eleva os marcadores anti-inflamatórios (ALVES REZENDE, 2015).

Figura 7 – Representação esquemática da molhabilidade da superfície



Fonte: Burkarter (2010)

2.2 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

A superfície do implante vem recebendo uma maior atenção devido evidências que comprovem seu melhor desempenho clínico frente a modificações. Frequentemente se publica sobre o uso de tratamentos de superfície em implantes para melhorar a resposta do organismo e favorecer a formação óssea adequada para suportar as cargas mastigatórias (MAMALIS, 2013). As características da superfície implicam no complexo processo de osseointegração de diversas formas.

Variadas formas de modificação da superfície lisa (usinada) dos implantes para uma superfície tratada foram desenvolvidas pelas empresas. A superfície tratada tem sua área de contato aumentada, o que permite uma maior interação com o osso e com as células, já que pesquisas comprovaram que é de considerável importância para a osseointegração os eventos celulares e moleculares do período de cicatrização inicial pós-cirúrgico (FIGUEIRA, 2019).

A texturização da superfície dos implantes pode influenciar o processo de osseointegração tanto na diferenciação celular, após a colocação do implante, como na quantidade de matriz óssea calcificada (MISCH, 1999; ZHAO, 2005).

Para Thakral *et al.* (2014), técnicas de texturização nos implantes dentários podem influenciar no estabelecimento da osseointegração, tanto para a diferenciação celular, após a inserção do implante, quanto na matriz óssea calcificada. Ainda conforme Wennerberg e Albrektsson (2009), as superfícies tratadas resultam em um maior contato osso/implante, em relação aos implantes lisos.

As modificações superficiais macro, micro e nanométricas, podem alterar as respostas biomoleculares e celulares *in vitro* e as respostas dos tecidos moles e ósseos *in vivo*. Mesmo que a relevância clínica das estruturas nanométricas ainda não seja amplamente reconhecida, alguns recentes estudos *in vitro* demonstraram a importância das estruturas nanométricas presentes na superfície do implante (JEMAT, 2015).

O tratamento de superfície tem como objetivos: acelerar o crescimento e a maturação óssea para permitir o carregamento imediato, aumentar a estabilidade primária, garantir o sucesso dos implantes quando instalados em regiões que apresentam um osso com menores qualidade e quantidade, obter o crescimento ósseo diretamente na superfície do implante, obter maior área possível de osseointegração, obter contato osso-implante sem a interposição de camadas proteicas amorfas, atrair células osteoblásticas, pré-osteoblásticas e mesenquimais, atrair proteínas de ligação específicas para células osteogênicas (fibronectina) e obter maior concentração possível de proteínas de ligação celular (ELIAS, 2008).

Os processos de tratamento de superfícies podem ser divididos em métodos de adição, quando acrescentam algo à superfície do implante, ou subtração, quando removem parte da camada superficial. Nos métodos chamados de adição, é aplicado à superfície do implante um recobrimento, que pode ser do mesmo material do corpo do implante ou não; enquanto nos métodos de subtração, é removida uma camada da superfície do implante por um processo controlado (GROISMAN, 2005).

Modificações na topografia, energia da superfície e molhabilidade dos implantes, podem modificar a resposta osteoblástica quanto ao número de células adsorvidas na superfície, acelerando a osteogênese e consequentemente a osseointegração e estabilidade secundária (LEE, 2012; ZANIVAN, 2009). Nessa interface relata-se (BRANEMARK, 1969; LEE, 2012) que as mais importantes propriedades de superfície, passíveis de modificação são topografia, química, e molhabilidade.

2.2.1 Camada de óxido

A superfície do implante em contato com o osso tem sido amplamente estudada nos últimos anos. A evolução da qualidade e da rapidez na osseointegração está intimamente ligada ao tratamento de superfície dos implantes dentários (LEE, 2005). Na superfície do implante, ocorre a formação de uma delgada camada de óxido que está associada aos mecanismos de osseointegração. A reação inicial dessa camada de óxido com o microambiente peri-implantar é baseada na adsorção de íons e moléculas, resultando na formação de um filme de proteínas. Essa adsorção ocorre rapidamente após o contato com o sangue, sendo importante considerar que as células não se aderem diretamente no titânio, e, sim, na camada proteica adsorvida na superfície. O fato de o implante encontrar-se imobilizado no osso, estável, propicia uma interação entre as células osteoblásticas e a superfície reativa do titânio. Micromovimentos podem induzir a migração de células indesejadas, ocasionando uma “fibro-integração” e, conseqüentemente, a perda do implante (ALBREKTSSON, 1981).

O filme de TiO_2 formado espontaneamente, tem alta densidade, boa aderência ao substrato, grande resistência à corrosão, estabilidade térmica, baixa solubilidade e nenhuma toxicidade *in vivo*. Porém, as propriedades desse óxido nativo não são as melhores para garantir a resposta celular positivamente integrativa, podendo a osseointegração durar de meses a mais de um ano para se concretizar (DE BRANDÃO, 2013).

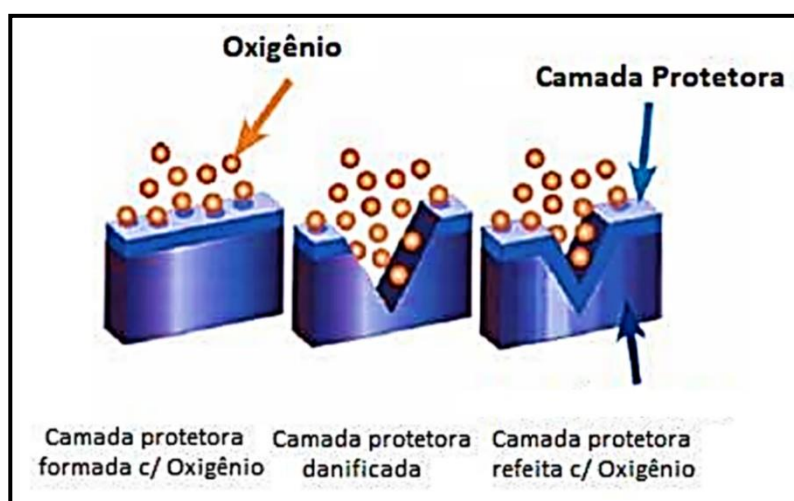
Neste sentido, a ciência tem desenvolvido mecanismos de otimização e controle a integração óssea nos processos de usinagem e tratamentos subsequentes, que determinam características da superfície dos implantes, em especial: composição química (IL SONG PARK, 2013).

Os tratamentos químicos de titânio e suas ligas devem ser ajustados para obter uma camada de óxido de titânio de espessura ideal que permite uma transição gradual das propriedades mecânicas e de corrosão do implante de titânio para as propriedades da camada de óxido superior. Além da melhoria da estabilidade mecânica da camada de óxido, esta abordagem permite a otimização das propriedades biológicas do implante e a formação de uma superfície de óxido/hidróxido de titânio confiável e reproduzível. A oxidação do Ti é caracterizada pela rápida adsorção de oxigênio, seguida por uma absorção mais lenta de oxigênio até que a saturação seja atingida (JOKANOVIC, 2014).

O titânio é um metal muito reativo que deseja sofrer oxidação (ou seja, o Ti deseja corroer). No entanto, quando exposto à água ou ao ar, o Ti metálico puro reage espontaneamente para formar uma fina camada de óxido na superfície. De acordo com essa teoria, a formação da camada de óxido começa com a adsorção de oxigênio em superfícies de titânio puro para criar uma monocamada. A formação desse filme de óxido é referida como passivação, porque a camada de óxido altamente dinâmica subsequentemente age como uma barreira para proteger o Ti metálico subjacente de exposição adicional e reação química (corrosão). Portanto, apesar de ser um metal ativo, o titânio apresenta alta resistência à corrosão devido à presença do filme de óxido (MUHONEN, 2007), Figura 9.

A alta proteção da camada de óxido previne o contato entre o metal e o meio, não havendo contato direto com seus tecidos hospedeiros, somente entre o tecido e a camada de óxido (KASEMO, 1983). A camada passiva da liga se dissolve e isso acelera o processo de corrosão local. A baixa concentração de oxigênio dificulta o reparo da camada de óxido danificada devido à corrosão (ROY, 2020).

Figura 8 – Representação esquemática da camada de óxido



Fonte: Adaptado de Roy (2020)

2.2.2 Superfície porosa

A medida da estabilidade primária do implante com morfologia de superfície rugosa e lisa foi estudada e concluiu-se que implantes rugosos tem taxa de sucesso significativamente mais alta (JAVED, 2011), talvez devido ao aumento da camada de TiO_2 , disponível que é um dos fatores mais importantes no processo de adesão e diferenciação celular (DE BRANDÃO, 2013).

A superfície porosa tem sido considerada como uma boa alternativa para revestimentos rugosos. Estes são destinados a aperfeiçoar a resistência interfacial material-osso, culminando na melhor fixação do implante (BRENTTEL, 2006). Existem numerosas classificações para as superfícies dos implantes que levam em consideração os mais diversos aspectos. Quanto a rugosidade superficial são categorizadas em: minimamente rugosa (0,5-1 μm), medianamente rugosa (1-2 μm) e rugosa (2-3 μm), considerando-se lisa como sendo $< 0,5 \mu\text{m}$ (WENNERBERG, 2000). A rugosidade entre 1-1,5 μm e diâmetro de 4 μm seriam ideais com relação à capacidade de resistir à remoção por cisalhamento (ELIAS, 2008).

Recentemente a nanotecnologia tornou-se tendência, já que por meio de suas nanorugosidades facilita a osseointegração em escala nanométrica, à custa do aumento considerável da área reativa para adesão celular (TOMISA, 2011; MCMAHON, 2013).

Os pesquisadores estão trabalhando com o objetivo de desenvolver uma superfície porosa anticorrosiva, antibacteriana, bioativa, biocompatível e com resistência mecânica suficiente para estabilidade a longo prazo, após a cirurgia. A adesão entre o revestimento e o implante falha devido a mudanças abruptas em várias propriedades na interface. Um revestimento durável deve ter propriedades mecânicas, como adesão suficiente com o andaime do implante, resistência para suportar uma carga e forte o suficiente para evitar desgaste severo. Isso precisa ter algum conjunto de propriedades biológicas, bem como biocompatibilidade e bioatividade. Ao mesmo tempo, o material deve ser anticorrosivo.

Portanto, a principal preocupação é desenvolver um implante com propriedades quase semelhantes às do osso. A presença de porosidade no implante por meio de tratamento químico reduz o problema de incompatibilidade do módulo de elasticidade de forma eficaz e garante uma boa fixação biológica do implante com o tecido circundante. Isso também ajuda na circulação sanguínea, processo de cicatrização e redução do peso total do implante. A camada superior porosa ajuda no crescimento ósseo, enquanto a camada inferior densa mostra alta resistência e integridade contra falha por fadiga (KAUR, 2019). Além disso, se assemelham à estrutura da matriz extracelular e esta morfologia favorece a adesão celular de forma direta e indireta (RANGEL, 2020).

O revestimento superficial pode modificar com eficiência as propriedades dominantes da superfície (por exemplo, liberação de íons ou desgaste), resistência à corrosão e propriedades biológicas sem comprometer as propriedades do material. Os revestimentos aplicados aos implantes ajudam a estimular a bioatividade para que os implantes se fundam com o osso e outros tecidos, garantindo a fixação adequada e a longevidade (CHEN, 2015).

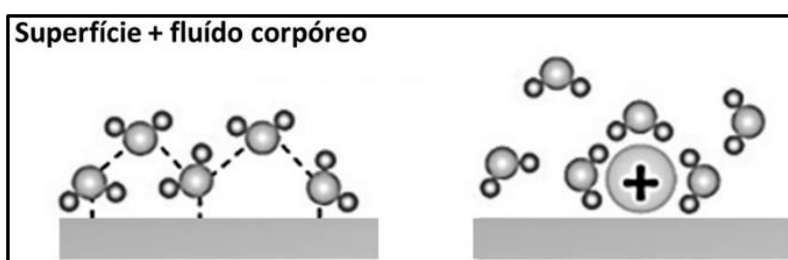
2.2.3 Adsorção de proteína e adesão celular

A resposta biológica circundante ao material implantado é mediada pela interação do implante através de sua superfície e para melhorar ainda mais o sucesso do tratamento, modificações nas superfícies dos implantes têm sido amplamente propostas, uma vez que é o primeiro componente a interagir com o hospedeiro (GEMINI-PIPERNI, 2014).

A primeira etapa dessa resposta aos implantes envolve a adsorção de proteínas, lipídios, açúcares e íons específicos, estabelecendo um revestimento orgânico responsável por orientar o desempenho das células circundantes, levando à ativação de genes específicos. Embora as estruturas em nanoescala sejam fatores de aprimoramento para a osseointegração, as interações interfaciais detalhadas com as células osteogênicas não foram totalmente abordadas. Para compreender essas interações, explora-se a investigação da sinalização celular (GEMINI-PIPERNI, 2014).

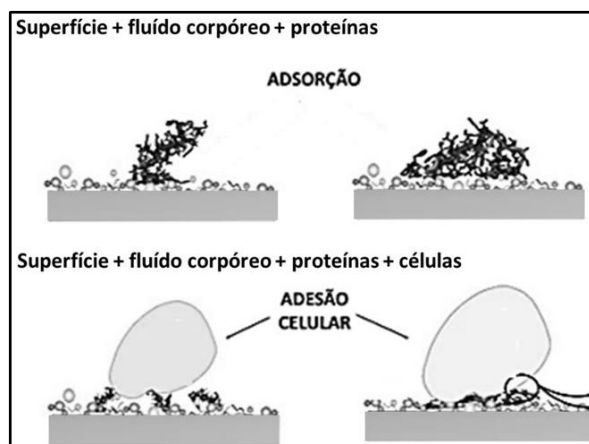
O contato inicial da superfície de titânio ocorre assim que o implante é instalado, devido à presença do coágulo sanguíneo. Para que ocorra a osseointegração é necessário que as células sanguíneas entrem em contato com a superfície do implante. Logo, está associada às respostas celulares que estimulam a formação de osso na superfície do implante. Como há este contato com coágulo do sangue, proteínas presentes, como plaquetas e fibrinogênio, formam uma rede de fibrina na superfície de óxido de titânio (STEGUES, 2014).

Figura 9 – Representação esquemática da **interação inicial**



Fonte: Adaptado de Stegues (2014)

Figura 10 – Representação esquemática da **adsorção e adesão celular**



Fonte: Adaptado de Stegues (2014)

Sequência de eventos que ocorrem na interface tecido-implante. Após a implantação do biomaterial, a sua superfície é condicionada pela adsorção de moléculas de água, íons e açúcares, dentre outras moléculas, que são provenientes do fluido corpóreo. Proteínas são, então, adsorvidas, e as características da superfície do material podem levar à desnaturação ou a manutenção da conformação nativa. A camada de proteínas adsorvidas é responsável por mediar a sequente adesão celular.

As primeiras moléculas que chegam à superfície do implante são as de água, que acabam formando uma camada superficial. Essa camada influencia na adesão de proteínas e moléculas. Posteriormente, proteínas aderem a essa camada de água e atraem as células próximas contidas no biofluido. Quanto mais fortes as ligações entre as moléculas de água e a superfície, mais proteínas serão aderidas e consequentemente mais células. As propriedades da camada de proteína vão determinar os tipos de células que vão interagir com o implante. Com o passar do tempo, devido à adesão de células na camada de proteínas, ocorre a osseointegração (KASEMO, 2002).

2.2.4 Formação de biofilme

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira livre, mas com as bactérias organizadas, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. Os biofilmes são constituídos por células aderentes a uma superfície inerte ou viva. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (KYAW, 2008).

Como a cavidade oral abriga mais de 700 espécies bacterianas diferentes, é provável que os implantes dentários entrem em contato com bactérias orais. Uma superfície ideal de um implante dentário deve facilitar a osseointegração (contato osso-implante) sem atrair células bacterianas. No momento do implante de um dispositivo médico, ocorre uma competição entre uma integração do material ao tecido e a adição da bactéria à superfície do implante, seguido pela formação do biofilme. Dispositivos médicos também podem se beneficiar do tratamento de superfície hidrofílica para reduzir as respostas inflamatórias interfaciais e promover o crescimento ósseo interno (LIN, 2014).

O destino de um implante também depende da resposta inflamatória produzida no corpo. Os implantes de titânio poroso têm recebido muita atenção, porque são capazes de melhorar a incompatibilidade e permitir um intertravamento mecânico, mas ainda são incapazes de fornecer osseointegração suficiente comparável à do osso natural (KAUR, 2019).

Potenciais desvantagens podem resultar da rugosidade de superfície, dentre elas cita-se a maior taxa de formação de biofilme. Nesse contexto, buscando elucidar essa problemática é necessário o estudo e desenvolvimento de tecnologias de superfícies que inibem ou reduzem a adesão bacteriana (TEUGHELS, 2006; DHIR, 2013). As técnicas de modificação de superfície devem auxiliar na prevenção da formação de biofilme (KURUP, 2021).

2.3 TRATAMENTO ALCALINO

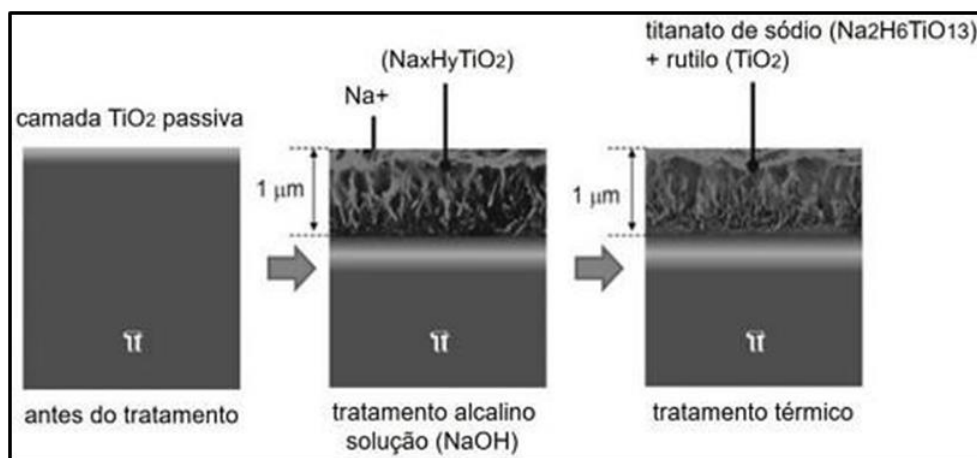
Os tratamentos de superfície mostram-se eficazes na biofuncionalização de ligas de Ti que, de outra forma, são bioinertes. A bioatividade melhorada pode ser causada pela química da superfície modificada, que estimula a formação de apatita (KIM, 1996; KOKUBO, 1996).

O tratamento químico é baseado nas reações químicas que ocorrem na interface entre a superfície do metal e a solução. Os tratamentos alcalinos e térmicos resultam na formação de um osso biologicamente ativo, como uma camada de apatita na superfície da cerâmica bioativa (MAHAPATRO, 2015).

O tratamento alcalino cria uma camada amorfa de titanato de sódio (Figura 11). A liberação de íon Na^+ da camada de titanato de sódio pode contribuir para a formação de grupos Ti-OH , que facilitam a formação de apatita semelhante ao osso (ZHAO, 2010).

O tratamento térmico subsequente (Figura 11) transforma o titânio amorfo em titânio cristalino (anatase e/ou rutilo), que é benéfico para a formação de apatita devido a um arranjo atômico adequado da estrutura cristalina (TAKEMOTO, 2006; NARAYANAN, 2008).

Figura 11 - Mudança estrutural na superfície do Ti após NaOH e tratamentos térmicos



Fonte: Kokubo (2016)

O titânio e a liga Ti 7,5Mo são cobertos com uma camada de óxido de titânio (TiO_2) passiva. Quando esta camada reage com uma solução de NaOH , o $\text{HTiO}_3^+ \cdot n\text{H}_2\text{O}$ incorpora íons Na^+ . Quanto mais espessa a camada de titanato de sódio, mais íons de sódio podem ser liberados. A liberação de íons de sódio acelera a nucleação da apatita, aumentando a concentração de OH^- .

Para um implante bem-sucedido, uma integração do tecido deve ocorrer antes da adesão bacteriana apreciável, evitando assim a colonização no implante. As defesas do hospedeiro não podem prevenir a colonização adicional, uma vez que a adesão bacteriana ocorre antes da integração do tecido.

Um “período decisivo” pós-implantação foi sugerido como o período crítico para a implantação. Durante este período, um implante é particularmente suscetível à colonização e infecção microbiana (WEI, 2002).

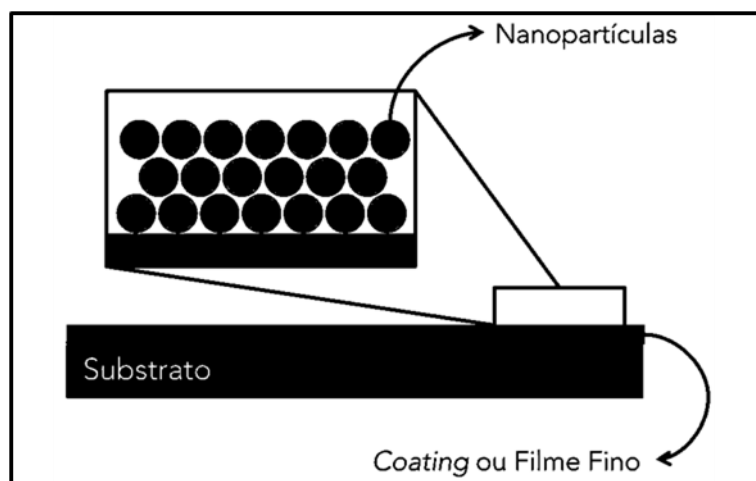
2.4 INCORPORAÇÃO DE PRATA

Huang *et al.* (2014) estudou o efeito das modificações químicas e nanotopográficas nas fases iniciais de osseointegração. Análises das micrografias eletrônicas indicaram a presença de nanoestruturas sobre os implantes quimicamente modificados, constatando a presença de Ti, O₂, C e N em todos os grupos estudados. O torque de remoção foi maior para os implantes com modificações químicas nanotopográficas.

Conclui-se que superfícies nanotopograficamente modificadas produziram uma superfície diferenciada com maior aposição óssea, explicando então os resultados maiores para torque de remoção nessa superfície. Isto vai de acordo com Brandão *et al* (2010), demonstrando que a deposição de nanopartículas associada à nanotopografia potencializa a osseointegração.

O uso potencial de nanomateriais (em termos de superfície nanoestruturada ou nano revestimento funcional) pode resolver vários problemas (por exemplo, resistência à corrosão e adesão bacteriana) pertencentes a implantes convencionais metálicos ou não metálicos. A pesquisa em nanomateriais enfatiza a síntese de nanopartículas de vários tamanhos, formatos e estruturas para as aplicações desejadas, Figura 12.

Figura 12 – Representação esquemática: superfície nanoestruturada



Fonte: Adaptado Rai (2012)

Os íons de prata têm o poder de conter a replicação de bactérias, ao se ligar e desnaturar o DNA bacteriano (RAI, 2012). Os compostos de prata apresentam efeito tóxico sobre algumas bactérias, vírus e fungos, mas sem causar alta toxicidade ao homem. Seus efeitos germicidas podem matar muitos organismos microbianos. Por causa disso, os sais de prata e o próprio metal desempenharam um papel importante no desenvolvimento da medicina. O interesse no uso da prata está sendo redescoberto em uma ampla variedade de aplicações biomédicas, onde pode prevenir o crescimento de microorganismos responsáveis por doenças.

As propriedades antimicrobianas da prata são obtidas pela utilização de sais de prata e complexos em escala nano que se decompõem para liberar íons de prata (Ag^+). A prata metálica é usada em uma série de aplicações cirúrgicas, para dispositivos estruturais, próteses e implantes (CHEN, 2015).

A nanoforma de prata é mais reativa e atravessa as membranas celulares levando à deposição de nanopartículas intracelulares que resultam na disfunção das células (DHAS, 2014). As nanopartículas de prata (AgNPs) podem facilmente penetrar na parede celular microbiana devido ao seu pequeno tamanho (SIDDIQI, 2018). Na síntese química, as AgNPs são obtidas usando sais de nitrato como precursor do metal, os processos de redução são administrados com agentes redutores e agente estabilizador para formar nanopartículas de prata (ZINJARDE, 2012).

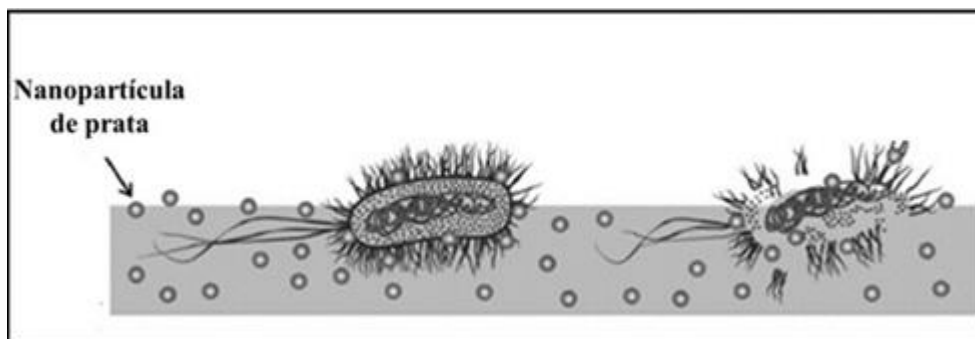
A atividade bactericida das AgNPs é atribuída aos cátions de prata, que possuem o poder de se ligarem especificamente a grupos de proteínas bacterianas, interrompendo sua atividade fisiológica e resultando em necrobiose. AgNPs exercem sua atividade bactericida por meio de um mecanismo “cavalo de Tróia”, uma vez que sua ligação inicial à superfície celular resulta em alteração da permeabilidade e comprometimento da respiração, seguido por penetração da barreira celular e liberação de íons prata metálico (Ag^+) intracelular.

No estudo realizado anteriormente por Claro *et al.* 2018, observou-se que as amostras com Ag exerceram efeito satisfatório para *C. albicans* e *S. aureus*, evitando a formação de biofilmes. O mecanismo de ação antibacteriana da prata pode ocorrer pela liberação de íons de prata ou pelo contato direto da prata com bactérias. A interação eletrostática entre a carga positiva da prata e a carga negativa da membrana bacteriana, Gram-negativa: *S. epidermides*, *S. aureus*, aumenta a permeabilidade da membrana com difusão dos íons Ag^+ nas células.

Uma das principais vantagens dos nanomateriais à base de prata está associada aos seus efeitos antipatogênicos intrínsecos exibidos contra microrganismos planctônicos e organizados por biofilme. Os usos das AgNPs são variados, mas o aspecto mais explorado e desejado é sua capacidade antimicrobiana e anti-inflamatória (KULKARNI, 2014). Entre as várias aplicações, o potencial antimicrobiano desempenha um papel crucial, pois está diretamente relacionado à melhoria da saúde humana (KUMAR, 2020).

A incorporação de AgNPs diminui a colonização microbiana (Figura 13) nas peças dentárias e aumenta a saúde bucal. Devido ao seu tamanho diminuto, as AgNPs podem penetrar facilmente na membrana da célula bacteriana, resultando em rápida atividade bactericida.

Figura 13 – Representação esquemática: Tecido com AgNPs e ação bactericida



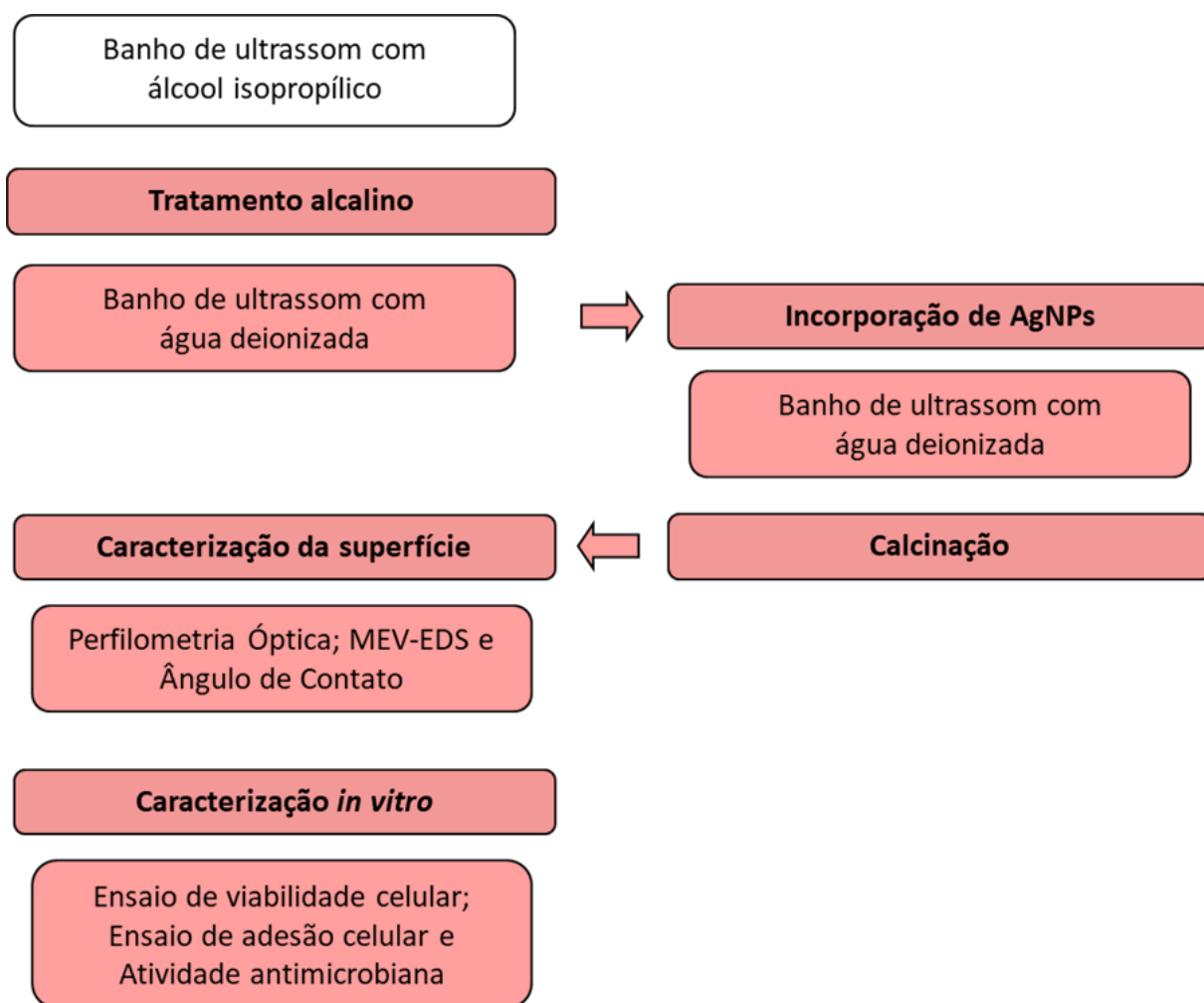
Fonte: Adaptado de Kumar (2020)

O principal desafio no projeto de biomaterial é atingir um grau de complexidade necessário para replicar a matriz extracelular de tecidos naturais para a estimulação adequada da fixação e proliferação celular. Um implante baseado em biomaterial inteligente pode participar ativamente na restauração de tecidos danificados para responder efetivamente aos estímulos de seu ambiente biológico (HOLZAPFEL, 2013). Dessa forma, se faz necessária a modificação da superfície de implantes utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata.

3 METODOLOGIA

3.1 FLUXOGRAMA

Figura 14 - Fluxograma das etapas do projeto de pesquisa



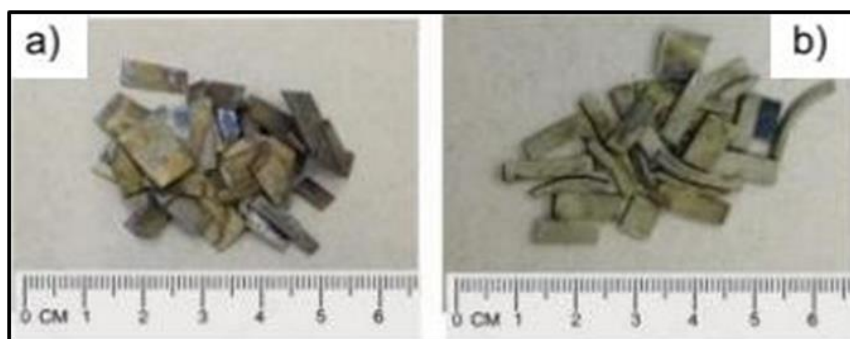
Fonte: Próprio autor

3.2 AMOSTRAS DA LIGA Ti7,5MO

3.2.1 Obtenção da liga

Os lingotes da liga Ti 7,5Mo foram obtidos a partir de chapas de titânio CP e molibdênio, 99,99 % (Figura 15). A pesagem dos elementos foi realizada na balança analítica de acordo com a composição escolhida: Ti 7,5Mo, no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Materiais e Tecnologia (DMT - UNESP).

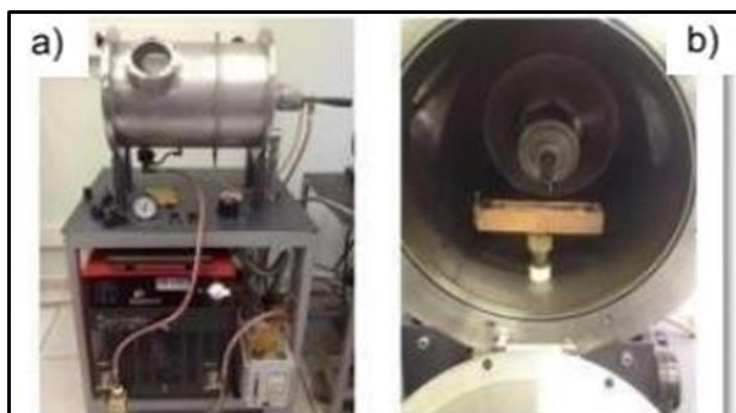
Figura 15 - Metais utilizados para preparo da liga: a) titânio; b) molibdênio



Fonte: Próprio autor

A fusão foi realizada em forno a arco voltaico (Figura 16), com atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado com água. Os materiais foram colocados no cadinho para o processo de purga (retirada do oxigênio e injeção de argônio), após o fechamento da câmara. Para garantir a homogeneização da liga, as amostras foram refundidas cinco vezes.

Figura 16 - a) Forno a arco voltaico utilizado na fusão da liga; b) Interior do forno



Fonte: Próprio autor

O tratamento térmico de homogeneização foi realizado em forno tubular, a 1100°C (Figura 17). Os lingotes foram submetidos a tratamento, após serem encapsulados a vácuo, em tubo de sílica.

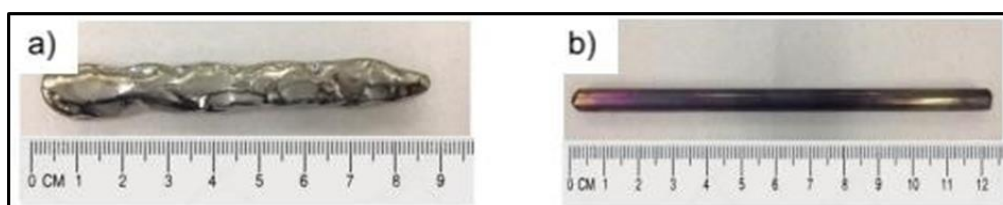
Figura 17 - Forno tubular utilizado no tratamento térmico de homogeneização



Fonte: Próprio autor

Para a obtenção dos tarugos, foi empregado o forjamento rotativo a frio (Figura 18), no Departamento de Materiais e Tecnologia - UNESP.

Figura 18 - a) Liga Ti 7,5Mo após tratamento térmico de homogeneização em forno tubular; b) tarugo após forjamento rotativo a frio (swaging)



Fonte: Próprio autor

3.2.2 Confecção dos discos

Para a obtenção dos discos, os tarugos foram levados à máquina de corte (Isomet 4000) sendo seccionados discos (Figura 19) com 4 mm de espessura e 10 mm de diâmetro.

Figura 19 - Amostra obtida para tratamento da superfície



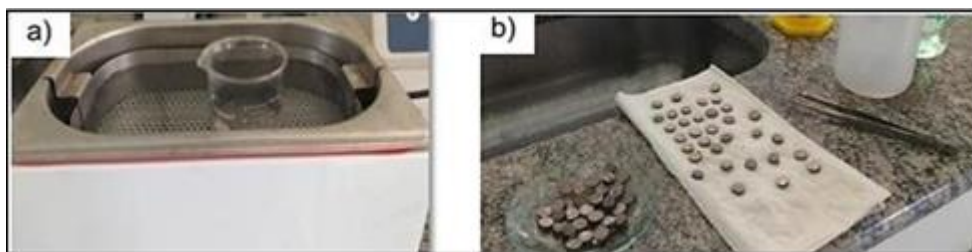
Fonte: Próprio autor

3.2.3 Preparo da superfície

As amostras obtidas foram lixadas a úmido com lixas de SiC, na granulação de 100, no Laboratório de Química do Departamento de Química e Energia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá - UNESP. Em seguida, foram esterilizadas em banho ultrassom com álcool isopropílico por cerca de 5 min, conforme Figura 20 (a), no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Materiais e Tecnologia DMT - UNESP.

Posteriormente, as amostras foram lavadas individualmente com água deionizada, conforme Figura 20 (b) e seguiram para a primeira etapa do tratamento da superfície.

Figura 20 - Amostras liga Ti 7,5Mo: a) em banho ultrassom; b) lavadas H₂O deionizada



Fonte: Próprio autor

3.3 TRATAMENTO ALCALINO

Para a realização do tratamento químico, as amostras foram colocadas em um recipiente plástico contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) com concentração aproximada de 5 mol/L. A solução foi preparada contendo 60 g de NaOH P.A - ACS (micro pérolas) da marca Dinâmica e 300 ml de água deionizada.

Em seguida, o banho termostatzado foi realizado em Tecnal à 80°C por 72 h, conforme representado na Figura 21.

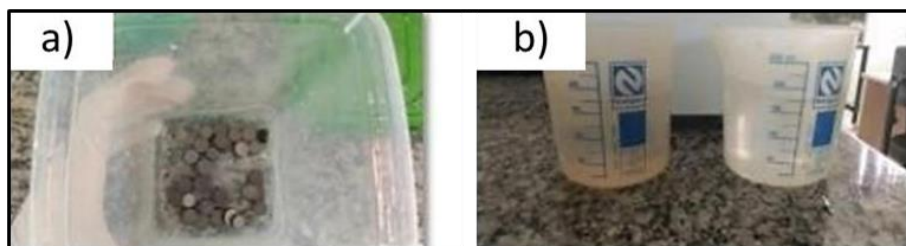
Figura 21 - Banho termostatzado em Tecnal



Fonte: Próprio autor

Na sequência, os recipientes foram retirados, conforme representado na Figura 22 (a) e o resíduo da solução de NaOH foi devidamente descartado, Figura 22 (b).

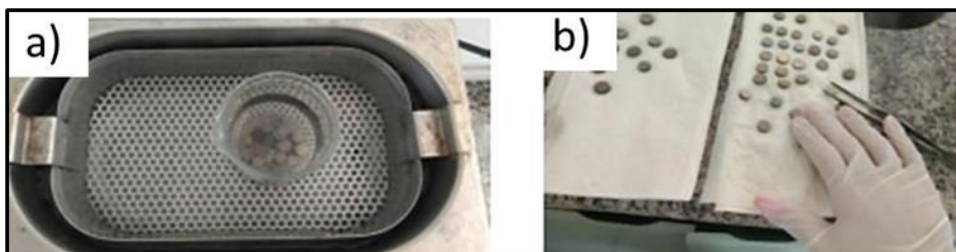
Figura 22 - a) Recipiente retirado do banho em Tecnal; b) Resíduo da solução de NaOH



Fonte: Próprio autor

As amostras foram lavadas em banho ultrassom com água deionizada por 5 min com aquecimento, Figura 23 (a). Em seguida, as amostras foram colocadas separadamente, conforme Figura 23 (b), para pré-secagem antes de ir para a estufa a 60°C, Figura 24.

Figura 23 - a) Amostras em banho ultrassom; b) Amostras separadas para pré secagem



Fonte: Próprio autor

Figura 24 - Estufa no laboratório de biomateriais (DMT-UNESP)



Fonte: Próprio autor

Dessa forma, o grupo 1 (G1) amostras sem tratamento e o grupo 2 (G2) amostras com tratamento alcalino, ficaram prontos para caracterização da superfície, conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25 - Amostras G1 e G2 separadas para posterior caracterização da superfície



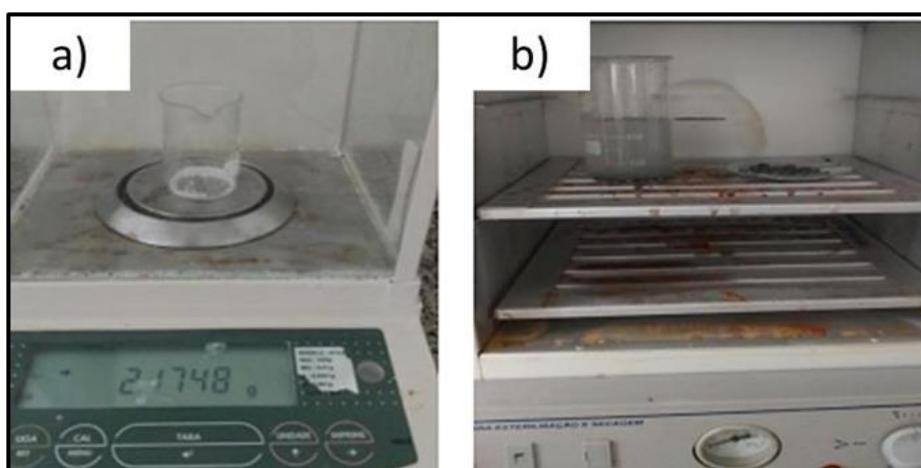
Fonte: Próprio autor

3.4 INCORPORAÇÃO DE PRATA

Para a imobilização de prata nas amostras do grupo 3 (tratamento alcalino e incorporação de prata), os discos foram colocados em um recipiente de vidro contendo solução de nitrato de prata (AgNO_3) na concentração aproximada de $50 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

A solução foi preparada contendo 2,17 g de AgNO_3 da marca Sigma e 250 ml de água deionizada, conforme Figura 26 (a). Em seguida, o recipiente contendo as amostras imersas em solução foi para a estufa a 60°C por 18 h, Figura 26 (b).

Figura 26 - a) Massa de AgNO_3 ; b) Amostras em estufa com solução de AgNO_3



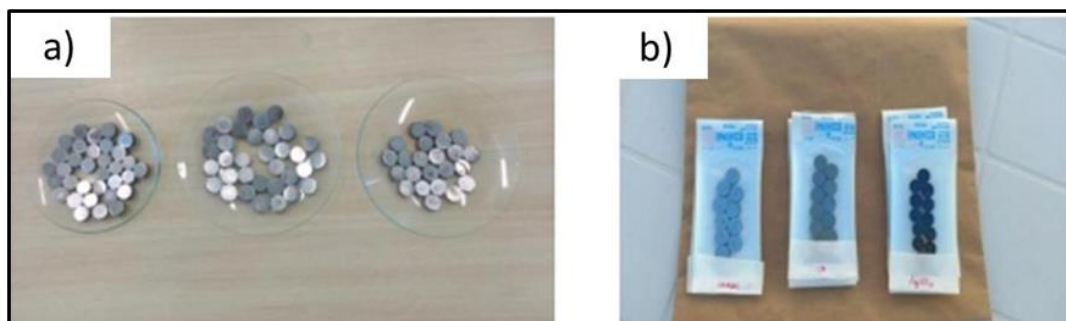
Fonte: Próprio autor

3.5 CALCINAÇÃO

Para obter a transformação da camada amorfa do óxido formado em fase cristalina (cristalizar a camada de TiO_2 nanoestruturado), as amostras do G3 (tratamento alcalino e imobilização de prata) foram submetidas à calcinação em forno mufla EDG, com taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ mantidas por 1 h a 450°C , seguido de resfriamento lento dentro do forno.

Dessa forma, foram obtidos G1, G2, G3 sendo as amostras sem tratamento, com tratamento alcalino e com tratamento alcalino e prata imobilizada, respectivamente, conforme Figura 27.

Figura 27 - a) G1, G2 e G3; b) Amostras preparadas para a caracterização da superfície



Fonte: Próprio autor

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

Após a modificação da superfície com tratamento alcalino e imobilização de prata, foi realizada a caracterização da superfície, por meio do Ensaio de Citotoxicidade Celular (MTT), Ensaio de Adesão Celular (Cristal Violeta), Avaliação da Atividade Antimicrobiana, Perfilometria Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS) e Ângulo de Contato

Cultivo celular:

Pré-Osteoblastos (Mc3t3-E1, subcone 4) foram cultivadas em meio Alpha-MEM suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (FBS) e antibiótico (Penicilina 100 U/mL e Estreptomicina 100 mg/mL) (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂.

3.6.1 Teste de viabilidade celular

Para verificarmos o potencial citotóxico as ligas foram mantidas em meio de cultura por 24 h, seguindo as normas da ISO: 10993. Após o período de condicionamento, o meio foi coletado e suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (FBS) e utilizado para tratar pré-osteoblastos da linhagem MC3t3-E1 subclone 4 pelo período de 24 h. As células. As células foram plaqueadas 24 h antes do tratamento, em placa de 96 poços e na densidade de 5×10^4 células/mL.

Após o tempo determinado de exposição ao meio condicionado, a viabilidade destas células foi medida através do teste de MTT. Onde o meio de cultura foi removido, adicionado o sal Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich #M5455-1G) 1 mg/mL e levado em estufa por 3 h adicionais. Após esse período o meio foi removido e adicionado 0,1 ml de DMSO para solubilização do corante formado por células viáveis. Após, a absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA).

3.6.2 Adesão celular

Os pré-osteoblastos foram plaqueadas com meio condicionado pelas ligas. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/ml. Após 24 h de tratamento, o meio foi removido e a adesão medida pela incorporação de Cristal Violeta. A absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas (leitor multimodo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA).

3.6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

A análise da proliferação bacteriana foi realizada utilizando as cepas de referência [American Type Culture Collection (ATCC)], *S. aureus* e *S. epidermidis* (ATCC 6538). As cepas foram semeadas em ágar cérebro e coração infusão (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. Após, as colônias de microrganismos foram suspensas em solução fisiológica estéril [cloreto de sódio (NaCl) 0,9%] e ajustadas para uma turbidez de 0,5 na escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As amostras foram colocadas em placas de 24 poços com 2 mL de caldo BHI suplementado com sacarose 5 % e inoculadas com 0,1 mL da suspensão bacteriana.

As amostras foram incubadas a 37°C por 48 h, e os meios foram trocados após 24 h. Após esse período, as amostras foram lavadas assepticamente com 2 mL de solução fisiológica estéril e colocadas em tubos com 10 mL de solução fisiológica estéril e sonicadas por 30 s para dispersão dos biofilmes. A suspensão foi considerada com fator de diluição de 10^{-1} e foi diluída com a adição de solução fisiológica estéril a 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37°C. O número de colônias foi contado, calculado em UFC/mL e transformado em log₁₀.

Análise estatística:

Teste de viabilidade e adesão celular: Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Eles foram verificados utilizando One-Way ANOVA (paramétrico) com pós teste de Tukey, a fim de comparar todos os pares de grupos. Neste caso, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo e $p < 0,0001$ considerado altamente significativo. O software utilizado foi GraphPad Prism 7.

Avaliação da atividade antimicrobiana: Todos os resultados quantitativos foram analisados por meio de uma análise de variância (ANOVA). Significância estatística foi considerada em $p < 0,05$. Durante a análise, as variâncias entre cada grupo não foram consideradas iguais e uma abordagem de teste t de duas amostras foi usada para testar a significância entre o G1, G2 e G3. Esta análise foi conduzida usando os dados do Microsoft Office Excel software de análise.

3.6.4 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) produziu imagens de alta ampliação, sendo que a resolução é a transcodificação da energia emitida por elétrons. A análise sobre os elementos foi realizada por meio da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), pois cada elemento tem uma assinatura de absorção e de emissão. Para avaliar a morfologia e composição química da superfície das amostras, foi utilizado o MEV-EDS com canhão de elétrons por emissão por efeito de campo (FEG, marca Tescan, modelo MIRA3, com capacidade de análise de energia dispersiva por raios X, marca Oxford, modelo X-MAX 50, detector de 50 mm²), no INPE, em São José dos Campos – SP.

3.6.5 Perfilometria óptica

A Perfilometria Óptica foi realizada com o objetivo de medir a rugosidade média apresentada, utilizando o Perfilômetro Óptico Veeco, modelo NT1100, no Instituto de Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP.

3.6.6 Ângulo de contato

O Ângulo de Contato se refere ao ângulo que forma a superfície de um líquido ao entrar em contato com um sólido. O valor do Ângulo de Contato depende da relação que existe entre as forças adesivas entre o líquido e o sólido e as forças coesivas do líquido. Para o presente estudo, foi utilizado o Equipamento da marca Krüss da UNESP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

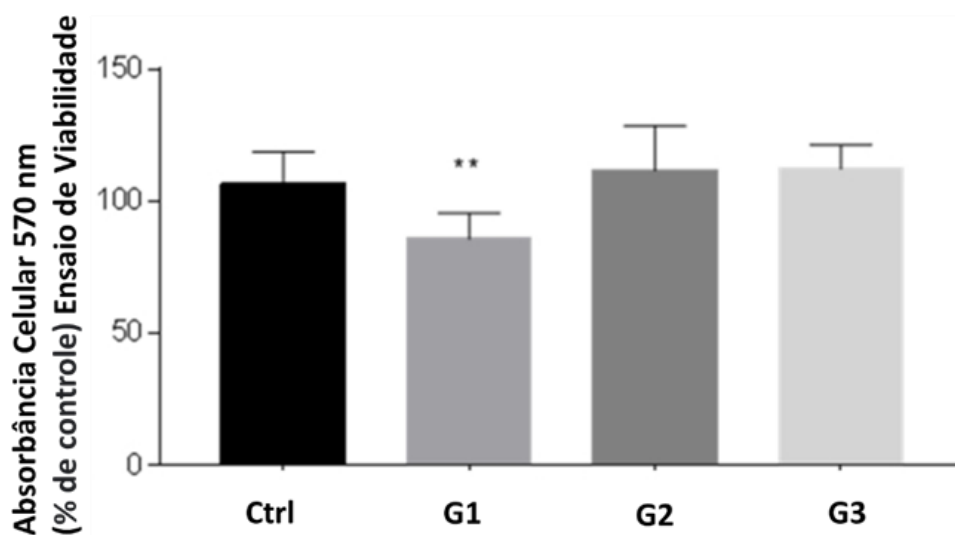
4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

O ensaio de viabilidade celular (MTT) avalia os efeitos citotóxicos que o meio condicionado pelo material induz nas células de pré-osteoblastos (MC3T3-L1), esse efeito é observado por meio da atividade da desidrogenase mitocondrial. Utilizando n=6 e como controle o meio padrão de tratamento para as células Alpha – MEM (Vitrocell), assim representando a porcentagem de células viáveis após o tratamento.

De acordo com os resultados obtidos, apresentaram diferenças estatísticas, em relação ao grupo controle (Ctrl), as amostras sem tratamento, G1 (**p = 0.0099), representado no gráfico (Figura 28) por uma redução na viabilidade celular.

Os grupos com tratamento alcalino, G2 e com prata imobilizada, G3 não apresentaram diferenças significativas, porém, pelo gráfico, é possível observar um aumento na viabilidade celular dos grupos com tratamento alcalino, G2 e com prata imobilizada, G3; indicando que os materiais não são tóxicos ou reduzem a atividade das mitocôndrias.

Figura 28 - Gráfico de viabilidade celular da liga Ti 7,5Mo: a) Ctrl b) G1 c) G2 d) G3



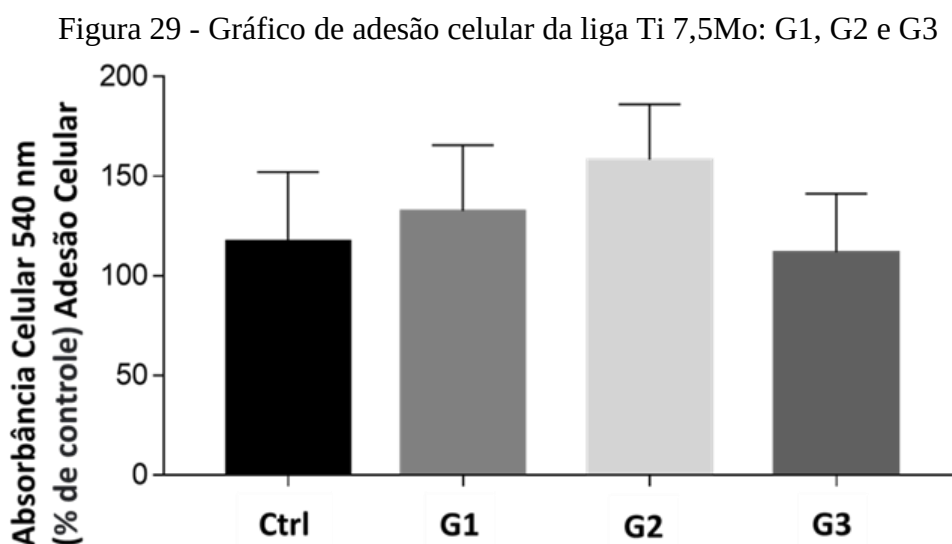
Fonte: Próprio autor

4.2 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR (CRISTAL VIOLETA)

No ensaio de adesão celular as células pré-osteoblastos foram tratadas com meio condicionado das diferentes superfícies de texturização de Ti (o meio condicionado foi preparado conforme recomendado pela ISO 10993-12). As células aderentes foram coradas com Cristal Violeta.

De acordo com os resultados obtidos, apresentaram diferenças estatísticas, em relação ao grupo controle (Ctrl), as amostras com tratamento alcalino, G2, representado no gráfico (Figura 29) por um aumento da adesão celular, indicando a influência dos pré-osteoblastos no com tratamento alcalino, G2. Amostras com morfologia de superfície rugosa, após tratamento alcalino, têm taxa de sucesso significativamente mais alta (JAVED, 2011), devido o aumento da camada de TiO_2 (fator importante no processo de adesão celular).

As amostras com prata imobilizada, G3 não demonstraram diferenças significativas com o grupo controle (Ctrl). Esses resultados nos indicam que os diferentes materiais induzem respostas diferentes de adesão celular nas células quando comparadas ao controle.



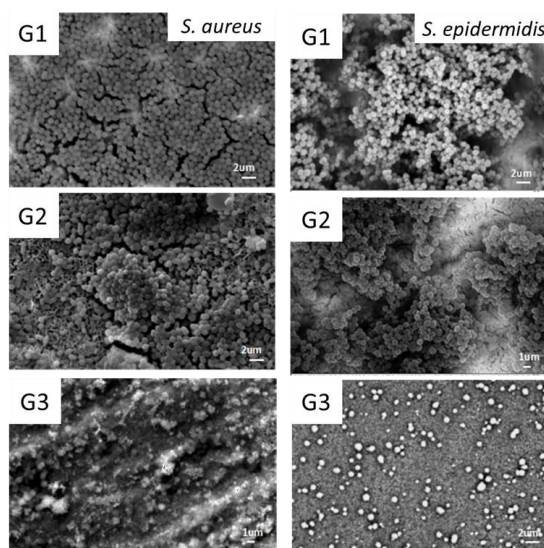
Fonte: Próprio autor

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo da atividade antimicrobiana com microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizado para ilustrar os biofilmes formados nos grupos G1, G2 e G3. Os discos foram fixados pelo tempo de 1 h em glutaraldeído na concentração de 2,0 % e desidratados em várias lavagens de etanol (10, 25, 50, 75 e 90 % por 20 min e 100% por 1 h). As amostras foram secas durante a noite em incubadora bacteriológica à temperatura de 37°C, e posteriormente montadas em tocos de alumínio, com fita de cobre, revestidos com ouro em atmosfera de baixa pressão com aplicador de íon sputter. As topografias de superfície dos biofilmes foram visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss® Evo MA 15).

As micrografias ilustradas na Figura 30 representam a comparação entre os dois tipos de bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* e a superfície das amostras de ambas, avaliadas no grupo sem tratamento, G1; com tratamento alcalino, G2; com prata imobilizada, G3. As bactérias do tipo *S. aureus* não apresentaram diferenças significativas comparando G1 com G2, porém foi observada menor formação de colônias para G3. Deste modo, o filme com prata teve papel significativo em relação à redução da formação de biofilmes por bactérias. Já em relação à *S. epidermidis*, as amostras G2 e G3 apresentaram uma formação de colônias menor quando comparado a *S. aureus*.

Figura 30 - Micrografias comparativas das superfícies da liga Ti 7,5Mo para as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* obtido através da microscopia eletrônica de varredura

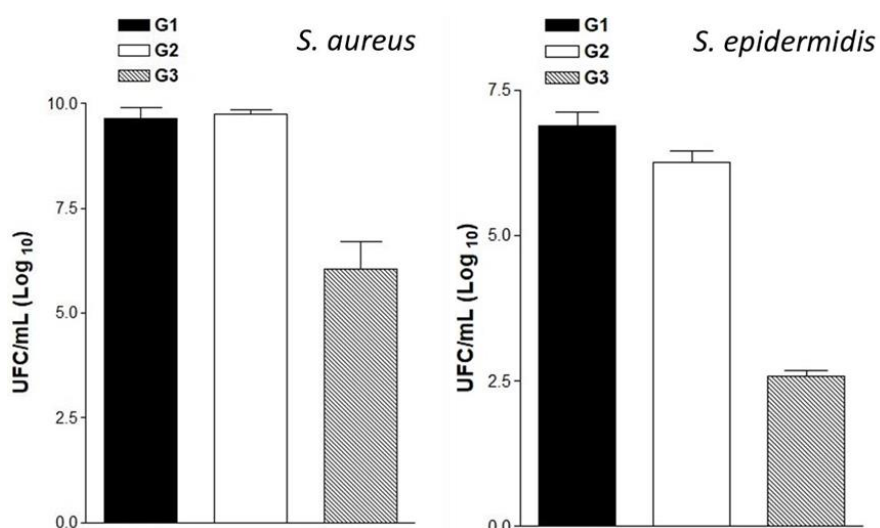


Fonte: Próprio autor

O histograma (Figura 31) representa a comparação entre os dois tipos de bactérias e o comportamento adesivo de ambas, avaliadas na superfície sem tratamento, G1; com tratamento alcalino, G2; com prata calcinada, G3.

Estatisticamente, os valores de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) para a bactéria do tipo *S. aureus* não apresentou diferenças significativas comparando G1 com G2, porém foi observado menor formação de colônias para G3. Deste modo, o filme com prata teve papel significativo em relação à redução de formação de biofilmes por bactérias. Já em relação à *S. epidermidis*, as amostras G2 e G3 apresentaram uma formação de colônias menor quando comparado a *S. aureus*.

Figura 31 - Histograma comparativo das unidades formadoras de colônia (UFC) para as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* obtido através do teste T de Student ($p < 0,05$)



Fonte: Próprio autor

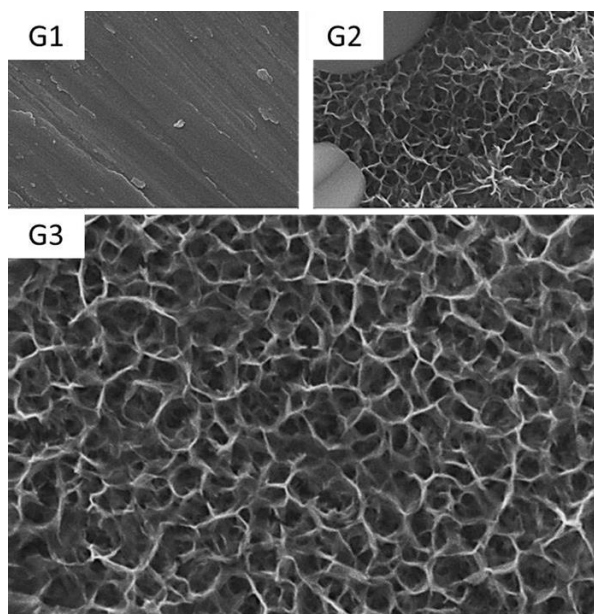
A presença de micro-organismos patógenos e o desenvolvimento de biofilmes ao redor do implante são os principais fatores que desencadeiam respostas pelo organismo, como infecções e inflamação do tecido em recuperação (BESINIS *et al.*, 2017).

A formação de biofilmes ocorre quando o meio biológico oferece condições favoráveis para que as bactérias se multipliquem no envoltório do material implantado. Em particular, as cepas bacterianas que circundam o implante possuem alta resistência a antibióticos, como no caso das gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (DE BREIJ *et al.*, 2016; NUNE *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2016).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Quanto à topografia, os diferentes graus de rugosidade — produzidos pelas diferentes formas de tratamento de superfície — podem ser visualizados por meio microscopia eletrônica (MEV) pelo mecanismo de emissão de elétrons, varrendo a superfície das amostras e gerando as imagens, com ampliação de 50.000 vezes. As amostras sem tratamento, G1 possuem textura de superfície nivelada e, por isso, são consideradas lisas. As amostras com tratamento alcalino, G2 apresentam uma superfície porosa, conferindo uma leve rugosidade, superfície passível de osseointegração. Nas amostras com prata imobilizada e calcinadas, G3 pode-se observar uma superfície que apresenta morfologia heterogênea com a presença de nanopartícula de prata (AgNPs), com pequenas cavitações, variando em tamanho e altura. Também observa-se que essa superfície apresenta maior rugosidade, disponibilizando, assim, uma área de contato osso-implante superior (Figura 32).

Figura 32 - Micrografia obtida por MEV: G1,G2 e G3



Fonte: Próprio autor

Características de superfície em escala nanométrica estimulam e controlam diversos eventos moleculares e celulares na interface tecido/implante, que podem ser observados por diferenças na morfologia, orientação e proliferação celular. Topografias de tamanho nanométrico podem ser úteis para reduzir a adesão de bactérias. Superfícies porosas e ásperas na escala de micrômetro oferecem solução para afrouxamento asséptico, infecções e instabilidade.

4.5 PERFILOMETRIA ÓPTICA

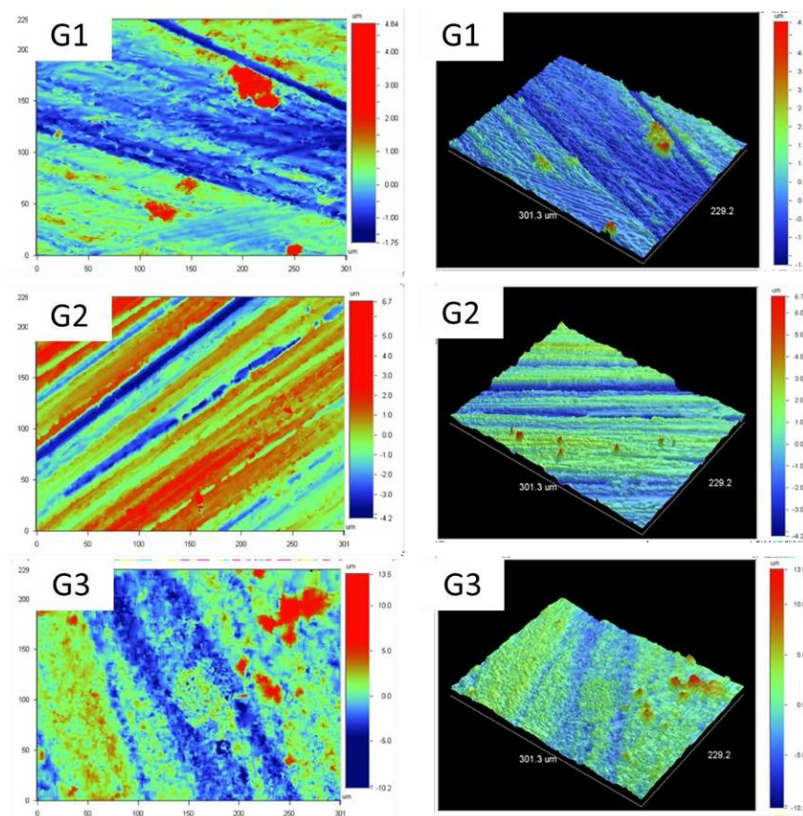
De acordo com os resultados da perfilometria óptica (Figura 33) a medida da rugosidade média (Ra) das amostras sem tratamento, G1 foi de aproximadamente 0,48 μm , as amostras com tratamento alcalino, G2 e prata imobilizada calcinada, G3 resultaram em (Ra) 1,01 μm e 1,52 μm , respectivamente. No Quadro 1 é possível observar os resultados da rugosidade média (Ra) para todos os grupos avaliados.

Quadro 1 - Resultados da rugosidade média (Ra)

Amostra da liga Ti7,5Mo	Rugosidade média (Ra)
Sem tratamento (G1)	0,48 μm
Com tratamento alcalino (G2)	1,01 μm
Com tratamento alcalino e prata imobilizada calcinada (G3)	1,52 μm

Fonte: Próprio autor

Figura 33 - Topografia obtida por Perfilometria 2D e 3D: G1, G2 e G3



Fonte: Próprio autor

Conforme a literatura, para o contato com o tecido ósseo, os tratamentos que induzem rugosidade em microescala (0,2-2 μm) são amplamente usados e clinicamente comprovados para melhorar a osseointegração. Microtopografias com faixas de tamanho da mesma magnitude com dimensões celulares promovem a formação de pontos focais de adesão pelos osteoblastos e deposição óssea. Para se obter um bom compromisso entre a adesão/proliferação osteoblástica e o entrelaçamento osso-implante — evitando aumentar a liberação de íons, a resposta pró-inflamatória e introduzir qualquer elemento que fragiliza a estrutura do implante (menor resistência à fadiga) — o tamanho da rugosidade deve ser em torno de 0,2–2 μm (BARTHESES, 2020).

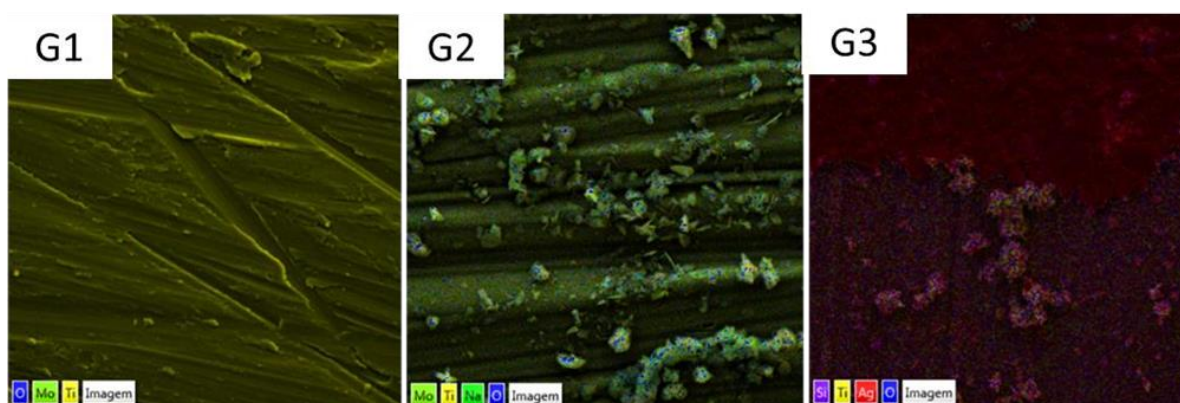
O design físico da superfície de um biomaterial, no que diz respeito à sua rugosidade e padronização, pode ser adaptado para auxiliar na propagação/adesão, proliferação e/ou diferenciação celular. Para osteoblastos e engenharia de tecido ósseo em geral, a rugosidade da superfície de um biomaterial é conhecida por promover a fixação e a diferenciação, apoiando a formação de complexo focal e o acúmulo de matriz extracelular.

As investigações também mostram que as características da superfície em nano/microescala promovem a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais quando comparadas com uma superfície lisa. Além de ajustar a rugosidade da superfície do biomaterial, padrões topográficos específicos na superfície de um biomaterial também podem direcionar o comportamento das células para a regeneração do tecido (KIM, 2021).

4.6 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

Com os resultados obtidos por meio da Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS) (Figura 34) foi possível identificar a presença dos elementos titânio e oxigênio em todas as amostras da liga Ti 7,5Mo. O elemento titânio foi identificado nas amostras sem tratamento, G1 e com tratamento alcalino, G2.

Figura 34 - Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS): G1, G2 e G3



Fonte: Próprio autor

Nas amostras com prata imobilizada e calcinada, G3 o elemento prata metálica (Ag) foi identificado. Ao otimizar a química da superfície dos biomateriais, os eventos que começam com a proteína inicial e a adesão celular, a resposta imune e o comportamento celular podem ser controlados (KIM, 2021).

Fatores como rugosidade, topografia e composição da superfície desempenham um papel importante para um resultado favorável. Todas essas características poderiam ser conectadas, uma vez que a estrutura da superfície e a rugosidade são parâmetros primordiais para o perfil de molhabilidade, o que mudará a forma como as células ósseas se proliferam na superfície.

4.7 ÂNGULO DE CONTATO

Com as amostras sem tratamento, G1 foi obtida medida de ângulo $73,5^\circ \pm 0,4^\circ$. As amostras com tratamento alcalino, G2 resultaram em $1,4^\circ \pm 0,1^\circ$. Para as amostras com prata imobilizada calcinada, G3 a medida foi de $3,2^\circ \pm 0,4^\circ$. Conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Medida do ângulo de contato (AC)

Amostra da liga Ti7,5Mo	Medida de AC
Sem tratamento (G1)	$73,5^\circ \pm 0,4^\circ$
Com tratamento alcalino (G2)	$1,4^\circ \pm 0,1^\circ$
Com tratamento alcalino e prata imobilizada calcinada (G3)	$3,2^\circ \pm 0,4^\circ$

Fonte: Próprio autor

Uma modificação da superfície, alterando a estrutura química da superfície e transformando-a em ativa e hidrofílica, permite uma osseointegração mais rápida e aumenta a estabilidade. Essas superfícies quimicamente ativas e hidrofílicas aumentam a taxa de disseminação celular e o número de células ligadas à superfície, aumentando, também, a velocidade com que produzem fatores reguladores da diferenciação de células de formação óssea (osteoblastos), também diminuindo a atividade de células de destruição óssea (osteoclastos). A vantagem em relação às demais superfícies é a interação celular direta na primeira fase do processo de osseointegração, permitindo que a formação óssea seja iniciada imediatamente e melhorando a estabilidade inicial.

Figura 35 - Perfil de molhabilidade liga Ti 7,5Mo: G1, G2 e G3



Fonte: Próprio autor

5 CONCLUSÕES

A superfície da liga Ti 7,5Mo foi modificada utilizando tratamento alcalino e imobilização de prata, para obtenção de uma superfície bactericida mantendo melhor resposta quanto a adesão celular. Foram realizadas as caracterizações da superfície utilizando as técnicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Perfilometria Óptica, Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Ângulo de Contato. E as caracterizações *in vitro*: Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) e Ensaio de Adesão Celular (Cristal Violeta).

Com as caracterizações da superfície e *in vitro*, foi possível observar: Superfícies nanoestruturadas que se assemelham à estrutura da matriz extracelular, favorecendo a adesão de forma direta e indireta. Rugosidade média 1,52 μm para se obter um bom compromisso entre a adesão/ proliferação osteoblástica e o entrelaçamento osso-implante. Incorporação de AgNPs para diminuir a colonização microbiana e penetrar facilmente na membrana da célula bacteriana. Superfícies com alta hidrofiliabilidade capazes de induzir rápida adesão celular. Maior atividade mitocondrial indicando que os materiais não são tóxicos e portanto, apresentam viabilidade celular e aumento da adesão nas células. Menor formação de colônias de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* para as amostras da liga Ti 7,5Mo contendo prata imobilizada na superfície.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T. *et al.* Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Copenhagen, v. 52, n. 2, p. 155-170, 1981. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/17453678108991776>. Acesso em: 10 maio 2021.
- ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1 review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 17, n. 5, p. 536-46, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15543910>. Acesso em: 05 mar. 2021.
- AVILA, G. *et al.* Implant surface treatment using biomimetic agents. **Implant dentistry**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 17-26, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19212234>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- BARTHES, J. *et al.* Controlling porous titanium/soft tissue interactions with an innovative surface chemical treatment: Responses of macrophages and fibroblasts. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 112, p. 110845, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119348714>. Acesso em: 10 maio 2021.
- BESINIS, A. *et al.* Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 3, p. 327-338, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28281851>. Acesso em: 05 mar. 2021.
- BRANDÃO, M. L. *et al.* Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. **Implantnews**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 95-101, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-556175>. Acesso em: 10 maio 2021.
- BRANEMARK, P.I. *et al.* Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery**, Stockholm, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4924041>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- BRENTEL, A. S. *et al.* Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 14, p. 213-218, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jaos/a/KdgZt969yHXLsX3RGg3mT8p/?lang=en>. Acesso em: 05 mar. 2021.
- CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, Lausanne, v. 87, p. 1-57, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927796X14001077>. Acesso em: 12 maio 2021.

COLLINS, P. C. *et al.* Laser deposition of compositionally graded titanium–vanadium and titanium–molybdenum alloys. **Materials Science and Engineering: A**, Lausanne, v. 352, n. 1-2, p. 118-128, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921509302009097>. Acesso em: 15 jul. 2021.

FIGUEIRA, K.S. Revisão da literatura médica vigente sobre as dificuldades frente a implantoplastia. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, Macapá, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2019. Disponível em: <https://bjih.s.emnuvens.com.br/bjih/article/view/5>. Acesso em: 05 mar. 2021.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 11, n. 5, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9922731>. Acesso em: 10 maio 2021.

DE SOUZA, M. *et al.* A possible mechanism of low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) activity modulation by glutathione action during human osteoblast differentiation. **Archives of oral biology**, Elmsford, v. 54, n. 7, p. 642-650, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19414171>. Acesso em: 15 jul. 2021.

DHAS, T. *et al.* Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 120, p. 416-420, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386142513012018>. Acesso em: 15 jul. 2021.

DHIR, S. Biofilm, and dental implant: The microbial link. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 1, p. 5, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23633764>. Acesso em: 05 maio 2021.

ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; SANTOS, M. V. Modificações na superfície dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica. **ImplantNews**, Porto Alegre, p. 467-476, 2008. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-523871>. Acesso em: 20 fev. 2021.

ELIAS, C. N. *al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 1, n. 3, p. 234-242, 2008. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-the-mechanical-behavior-of-biomedical-materials>. Acesso em: 10 maio 2021.

ESCADA, Ana Lúcia do Amaral. **Preparação de superfície bioativa na Liga Ti-7,5Mo para uso em Odontologia**. 2009. Dissertação (mestrado Engenharia Mecânica.) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Guaratinguetá, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94456?show=full>. Acesso em: 20 fev. 2021.

GEMINI-PIPERNI, S. *et al.* Kinome profiling of osteoblasts on hydroxyapatite opens new avenues on biomaterial cell signaling. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 111, n. 9, p. 1900-1905, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24668294>. Acesso em: 18 mar. 2021.

GROISMAN, M.; VIDIGAL-JR, G. M. Tipos de superfícies de implantes. Periodontia e Implantodontia-Atuação clínica baseada em evidências científicas. **Sobrape**, Belo Horizonte, v. 14, p. 1-14, 2005. Disponível em: <https://bjhs.emnuvens.com.br/bjhs/article/view/12>. Acesso em: 01 fev. 2021.

GUPTA, A. *et al.* Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. **Indian journal of dental research**, v. 21, n. 3, p. 433, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20930358>. Acesso em: 15 jun. 2021.

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be. A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22820527>. Acesso em: 05 mar. 2021.

JAVED, F. *et al.* Implant surface morphology and primary stability is there a connection. **Implant dentistry**, Baltimore, v. 20, n. 1, p. 40-46, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278526>. Acesso em: 05 jun. 2021.

JEMAT, A. Surface Modifications and their effects on titanium dental implants. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-11, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26436097>. Acesso em: 18 maio. 2021.

JOKANOVIĆ, V. *et al.* Investigations of corrosion on the surface of titanium substrate caused by combined alkaline and heat treatment. **Corrosion Science**, Oxford, v. 82, p. 180-190, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010938X14000298>. Acesso em: 30 jul. 2021.

KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 3, n. 4, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3254346>. Acesso em: 18 mar. 2021.

KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. **The Journal of prosthetic dentistry**, Saint Louis, v. 49, n. 6, p. 832-837, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6576138>. Acesso em: 10 jun. 2021.

KASEMO, B. Biological surface science. **Surface science**, Amsterdam, v. 500, n. 1-3, p. 656-677, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003960280101809X>. Acesso em: 12 maio 2021.

KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. **Journal of biomedical materials research**, Hoboken, v. 22, n. S13, p. 145-158, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3209600>. Acesso em: 20 jul. 2021.

KASUGA, T. Coatings for metallic biomaterials. In: WOODHEAD PUBLISHING SERIES IN BIOMATERIALS. **METALS for biomedical devices**. Woodhead Publishing, 2010. p. 260-282. Disponível em: Acesso em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780081026663/metals-for-biomedical-devices>. 04 fev. 2021.

KAUR, M.; SINGH, K. Review on titanium and titanium-based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 102, p. 844-862, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118338232>. Acesso em: 01 jun. 2022.

KIM, H. S.; KUMBAR, S. G.; NUKAVARAPU, S. P. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. **Current Opinion in biomedical engineering**, v. 17, p. 100260, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S246845112030057X>. Acesso em: 15 dez. 2021.

KIM, H. M. *et al.* Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. Journal of Biomedical Materials Research: An Official **Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, Hoboken, v. 32, n. 3, p. 409-417, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8897146>. Acesso em: 10 mar. 2021.

KOKUBO, T. *et al.* Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. **Journal of the American Ceramic Society**, Westerville, v. 79, n. 4, p. 1127-1129, 1996. Disponível em: <https://ceramics.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1151-2916.1996.tb08561.x> Acesso em: 08 jun. 2021.

KOKUBO, T.; YAMAGUCHI, S. Novel bioactive materials developed by simulated body fluid evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys. **Acta biomaterialia**, v. 44, p. 16-30, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706116304007>. Acesso em: 09 mar. 2021.

KULKARNI, N.; MUDDAPUR, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. **Journal of Nanotechnology**, p. 1-8, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jnt/2014/510246>. Acesso em: 16 jun. 2021.

KURUP, A.; DHATRAK, P.; KHASNIS, N. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical dental applications: A review. **Materials Today: Proceedings**, v. 39, p. 84-90, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320346174>. Acesso em: 15 dez. 2021.

LANG, N. P. *et al.* Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. **Clinical oral implants research**, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 349-356, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21561476>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LEE, J. H.; OGAWA, T. The biological aging of titanium implants. **Implant dentistry**, Baltimore, v. 21, n. 5, p. 415-421, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22968574>. Acesso em: 21 fev. 2021.

LEE, J. H. *et al.* Effect of implant size and shape on implant success rates: a literature review. **The Journal of prosthetic dentistry**, Saint Louis, v. 94, n. 4, p. 377-381, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16198176>. Acesso em: 21 fev. 2021.

LIN, L. *et al.* Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214031X13000491>. Acesso em: 05 maio 2021.

LIN, X. *et al.* Mechano-active biomaterials for tissue repair and regeneration. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 59, p. 227-233, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1005030220304862>. Acesso em: 21 mar. 2021.

MAHAPATRO, A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 55, p. 227-251, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26117759>. Acesso em: 21 fev. 2021.

MALAGUTI, J. G.; MALLAGUTI, F. I. Implantes adjacentes nas posições dos incisivos centrais maxilares: caso clínico com 18 meses em função. **ImplantNewsPerio**, São Paulo, p. 258-269, 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-847149>. Acesso em: 08 maio 2021.

MAMALIS, A.; SILVESTROS, S. Modified titanium surfaces alter osteogenic differentiation: a comparative microarray-based analysis of human mesenchymal cell response to commercial titanium surfaces. **Journal of Oral Implantology**, Lawrence, v. 39, n. 5, p. 591-601, 2013. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/joi/article/39/5/591/7246/Modified-Titanium-Surfaces-Alter-Osteogenic>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MCMAHON, R. E. *et al.* Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 101, n. 2, p. 387-397, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23281143>. Acesso em: 05 jun. 2021.

MEIRELLES, L. *et al.* The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 23, n. 4, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18807559>. Acesso em: 05 jul. 2021.

MENDONCA, G. *et al.* Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 24, n. 2, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19492635>. Acesso em: 05 jul. 2021.

MILANI, R. *et al.* Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 109, n. 5, p. 957-966, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/32399>. Acesso em: 20 mar. 2021.

MISCH, C. E. Implant design considerations for the posterior regions of the mouth. **Implant dentistry**, Baltimore, v. 8, n. 4, p. 376-386, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10709483>. Acesso em: 01 maio 2021.

MOHAMAD, M. *et al.* A density functional study of structural, electronic, and optical properties of titanium dioxide: Characterization of rutile, anatase and brookite polymorphs. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 31, p. 405-414, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369800114007185>. Acesso em: 03 jul. 2021.

MUHONEN, V. *et al.* The effect of oxide thickness on osteoblast attachment and survival on NiTi alloy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v. 18, n. 5, p. 959-967, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17221314>. Acesso em: 07 mar. 2021.

NARAYANAN, R. *et al.* Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 85, n. 1, p. 279-299, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853421>. Acesso em: 08 fev. 2021.

NOVAES J. R. *et al.* Influence of implant surfaces on osseointegration. **Brazilian dental journal**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 6, p. 471-481, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26647927>. Acesso em: 18 jul. 2021.

NUNE, K. C. *et al.* Cellular response of Staphylococcus aureus to nanostructured metallic biomedical devices: surface binding and mechanism of disruption of colonization. **Materials Technology**, Vienna, v. 32, n. 1, p. 22-31, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10667857.2015.1112572>. Acesso em: 10 maio 2021.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/th7gjVpvdpthnctYbhtFznN>. Acesso em: 07 mar. 2021.

PRASAD, S. *et al.* Biomaterial properties of titanium in dentistry. **Journal of Oral Biosciences**, v. 57, n. 4, p. 192-199, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1349007915001061>. Acesso em: 20 jun. 2021.

RAI, M. K. *et al.* Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 112, n. 5, p. 841-852, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22324439>. Acesso em: 02 fev. 2021.

RANGEL, A. L. R. *et al.* Nanostructured titanium alloy surfaces for enhanced osteoblast response: A combination of morphology and chemistry. **Surface and Coatings Technology**, Lausanne, v. 383, p. 125226, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/199828>. Acesso em: 09 maio 2021.

REZENDE, M. C. R. *et al.* O papel da adsorção de proteínas na osseointegração. **Archives of health investigation**, v. 4, n. 3, 2015. Disponível em: <https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/903>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ROY, S. Functionally graded coatings on biomaterials: a critical review. **Materials Today Chemistry**, v. 18, p. 100375, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S246851942030135X>. Acesso em: 30 jul. 2021.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-28, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29452593>. Acesso em: 07 mar. 2021.

STANDERT, V. *et al.* Antibiotic-loaded amphora-shaped pores on a titanium implant surface enhance osteointegration and prevent infections. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 8, p. 2331-2345, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X21000165>. Acesso em: 10 dez. 2021.

STEGUES, Estevan Marçal da Silveira. **Tratamento de Superfícies de Implantes Osseointegráveis em Titânio: Revisão da Literatura**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Cirurgia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

TAKEMOTO, M. *et al.* Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, n. 30, p. 6014-6023, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15885769>. Acesso em 05 maio 2021.

TAO, B. *et al.* Osteoimmunomodulation mediating improved osteointegration by OGP-loaded cobalt-metal organic framework on titanium implants with antibacterial property. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 423, p. 130176, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894721017617>. Acesso em: 15 dez. 2021.

TEUGHEL, W. *et al.* Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical oral implants research**, Copenhagen, v. 17, n. S2, p. 68-81, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968383>. Acesso em: 07 fev. 2021.

THAKRAL, G. K. *et al.* Nanosurface—the future of implants. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 5, p. ZE07, 2014.

TOMSIA, A. P. *et al.* Nanotechnology approaches for better dental implants. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, Lombard, v. 26, n. Suppl, p. 25, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21464998>. Acesso em: 10 mar. 2021.

VILARDELL, A. M. *et al.* In-vitro study of hierarchical structures: Anodic oxidation and alkaline treatments onto highly rough titanium cold gas spray coatings for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 91, p. 589-596, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117328278>. Acesso em: 30 jun. 2021.

WEI, M. *et al.* Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 20, n. 1-2, p. 125-134, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849310200022X>. Acesso em: 10 maio 2021.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical oral implants research**, Copenhagen, v. 20, p. 172-184, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19663964>. Acesso em: 05 mar. 2021.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 3, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10874798>. Acesso em: 08 jan. 2021.

WENNERBERG, A. *et al.* Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. **American journal of dentistry**, San Antonio, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24073534>. Acesso em: 09 mar. 2021.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. In: CONSENSUS CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS, 1986, Chester, England. **Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England**. Amsterdam, Elsevier Science Limited, 1987.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Intracellular signal transduction as a factor in the development of “smart” biomaterials for bone tissue engineering. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 108, n. 6, p. 1246-1250, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21351075>. Acesso em: 20 jul. 2021.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Biological behavior of pre-osteoblasts on natural hydroxyapatite: A study of signaling molecules from attachment to differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 97, n. 2, p. 193-200, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21394897>. Acesso em: 01 dez. 2021.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Modulation of Src activity by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblast differentiation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Basel, v. 22, n. 5-6, p. 497-506, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088431>. Acesso em: 18 mar. 2021.

ZANIVAN, D. S. *et al.* Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. **Revista ImplantNews**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 39-46, 2009. Disponível em: <https://site.titaniumfix.com.br/Upload/Arquivos/Cientifico/Analise-da-superficie-de-fratura-de-implante-osseointegrado....pdf>. Acesso em: 24 fev. 2021.

ZHAO, C. *et al.* Osteoinduction of porous titanium: A comparative study between acid-alkali and chemical-thermal treatments. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 95, n. 2, p. 387-396, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20878923>. Acesso em: 07 fev. 2021.

ZHAO, G. *et al.* High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 74, n. 1, p. 49-58, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15924300>. Acesso em: 30 jun. 2021.

ZINJARDE, S. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, n. 1, p. 74-74, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285677528_Bio-inspired_nanomaterials_and_their_applications_as_antimicrobial_agents. Acesso em: 04 jul. 2022.