

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS / CAMPUS DE BAURU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

ORISSON PONCE GOMES

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPERFÍCIES DE FILMES FINOS DE TiO_2 E
SUA RESPOSTA BIOLÓGICA**

Bauru

2019

ORISSON PONCE GOMES

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPERFÍCIES DE FILMES FINOS DE TiO_2 E
SUA RESPOSTA BIOLÓGICA**

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

Bauru

2019

Gomes, Orisson Ponce.
INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SUPERFÍCIES DE FILMES
FINOS DE TiO_2 E SUA RESPOSTA BIOLÓGICA / Orisson Ponce
Gomes, 2019. 104 f.: il.

Orientador: Paulo Noronha Lisboa Filho.

Dissertação (Mestrado)– Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências, Bauru, 2019

1. Dióxido de Titânio. 2. Funcionalização. 3. Biomateriais. 4. Proteínas.
I. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade
de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de ORISSON PONCE GOMES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 28 dias do mês de março do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Seção Técnica de Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, Prof. Dr. ANDRE LUIS DE JESUS PEREIRA do(a) Universidade Federal da Grande Dourados, Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI do(a) Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de ORISSON PONCE GOMES, intitulada **Interação de Proteínas em Superfícies de Filmes Finos de TiO₂**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO


Prof. Dr. ANDRE LUIS DE JESUS PEREIRA


Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

obs: A banca sugeriu o título "Interação de Proteínas em superfícies de Filmes Finos de TiO₂ e sua Resposta Biológica"

AGRADECIMENTO

À minha família, Elizete, Orisson, Lívia, Leandro, Octávio, por acreditarem em mim, aceitarem e apoiarem minhas escolhas, por todo amor, carinho, paciência, incentivo e dedicação para comigo, por terem sido peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou. Aos meus amigos Samuel, Alexssandre, Guilherme, Giovanni, Lucas pelos conselhos, companhia, paciência e discussões.

Ao prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação, inúmeras discussões e ensinamentos, por sempre acreditar e enxergar o lado bom de qualquer situação.

Aos companheiros, ex-companheiros e amigos de laboratório Luciana, Erika, Larisa, Roberto, Bruna, Leonardo, Odair, Carolina, Marcela pelas discussões extremamente produtivas, pelas inúmeras ajudas e pelos momentos de descontração que tornaram o ambiente de trabalho mais agradáveis. Em especial a Erika, Luciana e Larisa que contribuíram de maneira incomparável na minha formação profissional. A todos os colegas do POSMAT/UNESP pelo apoio e troca de experiências que contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi e seus alunos pelo suporte, disponibilidade na execução dos testes biológicos, que trouxeram resultados de grande importância nesse trabalho.

Ao Nilton, Humberto e Lucas pelos incansáveis ensinamentos sobre o sputtering, pelos conselhos, apoio e suporte.

À Profa Elidiane pelas medidas de ângulo de contato e energia de superfície que foram fundamentais para o andamento do projeto.

Ao Marcio pelas medidas de DRX e AFM.

Ao Fenelon e Larissa pelas medidas de DRX.

Ao Williams pela assistência em diversos momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através da bolsa concedida no país (processo n.º 2016/22186-7), vinculada ao projeto temático CEPID (processo n.º 2013/07296-2). Além disso, agradeço à FAPESP pelo financiamento dos projetos do grupo (processo n.º 2014/20471-0 e 2017/15035-5), os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

GOMES, O. P. **Interação de Proteínas em Superfícies de Filmes Finos de TiO₂ e Sua Resposta Biológica**, 2019, 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - FC - UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho, Bauru, 2019.

RESUMO

O dióxido de titânio (TiO₂) nanoestruturado tem sido empregado como modificador de superfície em implantes médicos, promovendo melhoria na resistência à biocorrosão do material e aumento da bioatividade, apresentando resultados promissores na interação com o tecido vivo. Apesar da biocompatibilidade deste óxido ser reconhecida, ainda existem muitos aspectos dos mecanismos de adesão entre as proteínas e a superfície do material que não são totalmente compreendidos. Quimicamente, a superfície desses óxidos é principalmente terminada por grupos -OH que podem ser prontamente funcionalizados. Essa funcionalização química ou simplesmente uma alteração física da superfície do material, pode melhorar a interação do óxido com o ambiente biológico. Além disso, dióxido de titânio pode ter o número de grupos hidroxila aumentado por indução física sob exposição a luz ultravioleta. Embora os grupos gerados por esse processo sejam termodinamicamente menos estáveis, o número maior de sítios ativos disponíveis para serem ligados às moléculas orgânicas pode resultar em uma funcionalização mais eficiente. Nesse trabalho são apresentados os estudos conformacionais de adsorção de três moléculas bifuncionais diferentes, ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e ácido 3-(4-aminofenil)propiônico (APPA), que atuam como espaçadoras no processo de imobilização de proteína nas superfícies fisicamente hidroxiladas dos filmes de TiO₂. Os filmes de TiO₂ foram crescidos sobre substratos de titânio metálico grau IV através da técnica *Reactive RF Magnetron Sputtering*. Resultados obtidos por XPS mostraram maior eficiência na imobilização da molécula de APTMS sobre a superfície hidroxilada de TiO₂ em relação às moléculas de MPA e APPA. Além disso, a molécula de APTMS também apresentou resultados satisfatórios na imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA). Resultados referentes aos testes de viabilidade, adesão celular e expressão dos genes relacionados à adesão celular após contato direto com células ósseas mostraram melhor interação da superfície modificada pela imobilização da BSA quando intermediada pela molécula de APTMS. As células ósseas em contato direto com essa superfície apresentaram maior expressão dos genes relacionados ao estágio inicial da diferenciação osteoblástica com

relação às células em contato direto com a superfície cuja albumina foi imobilizada diretamente à superfície de TiO₂. Resultados obtidos através da zimografia também corroboraram com os apresentados por expressão gênica, dado o envolvimento das MMP2 e MMP9 no processo de diferenciação osteoblástica.

Palavras-chave: Sputtering; dióxido de titânio; hidroxilação; funcionalização; biomateriais; proteínas

GOMES, O. P. **Protein Interaction on TiO₂ Thin Films Surfaces and Their Biological Response**, 2019, 104 f. Dissertation (Graduate Program in Materials Science and Technology) - FC - UNESP, under the guidance of Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho, Bauru, 2019.

ABSTRACT

Nanostructured titanium dioxide (TiO₂) has been used as a surface modifier in medical implants, promoting improved biocorrosion resistance of the material and increased bioactivity, presenting promising results in the interaction with the living tissue. Despite the biocompatibility of this oxide is recognized, there are still many aspects of the adhesion mechanisms between the proteins and the material surface that are not completely understood. Chemically, the surface of these oxides is mainly terminated by -OH groups which can be readily functionalized. This chemical functionalization or simply a physical modification of the material surface can improve the interaction between the oxide and the biological environment. In addition, titanium dioxide may have the number of hydroxyl groups increased by physical induction under exposure to ultraviolet light. Although this hydroxylation process is less stable, it is possible to increase the number of active sites for a more efficient functionalization. Although the groups generated by this process are thermodynamically less stable, the greater number of active sites available to bound to organic molecules can result in a more efficient functionalization. In this work, the adsorption conformational studies of three different bifunctional molecules, 3-mercaptopropionic acid (MPA), 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and 3-(4-aminophenyl) propionic acid (APPA), are presented. These molecules act as spacers in the protein immobilization process on the physically hydroxylated surfaces of TiO₂ films. The TiO₂ films were grown on grade IV metallic titanium substrates by Reactive RF Magnetron Sputtering technique. XPS results showed greater efficiency in the immobilization of APTMS molecule on the hydroxylated surface of TiO₂ in comparison to MPA and APPA molecules. In addition, the APTMS molecule also showed satisfactory results in the immobilization of bovine serum albumin (BSA) protein. Results regarding viability tests, cell adhesion and expression of genes related to cell adhesion after direct contact with bone cells showed better interaction of the surface modified by the immobilization of BSA when intermediated by APTMS molecule. Bone cells in direct contact with this surface showed greater expression of the genes related to the initial stage of osteoblastic differentiation with respect to cells in direct contact with the surface whose albumin was immobilized directly on TiO₂ surface. Results obtained by zymography

also corroborated with those presented by gene expression, given the involvement of MMP2 and MMP9 in the process of osteoblastic differentiation.

Keywords: Sputtering; TiO₂; hydroxylation; functionalization; biomaterials; proteins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01: Meios de adsorção de proteínas nas superfícies de óxidos metálicos (MeOx): interações hidrofílicas (I), recobrimento hidrofóbico (II), adesão iônica (III), ligação covalente (IV), ligação covalente com a presença de espaçador (V) e acoplamento de anticorpo específico (VI).....	20
FIGURA 02: Número de artigos sobre titânio publicados a cada cinco anos.....	23
FIGURA 03: Estruturas cristalinas das fases rutila e anatase do TiO ₂	24
FIGURA 04: Estrutura cristalina da fase brookita do TiO.....	25
FIGURA 05: Processo de formação dos grupos hidroxila na superfície do dióxido de titânio.....	25
FIGURA 06: Esquema do processo de fotocatalise de TiO ₂	27
FIGURA 07: Ilustração esquemática do processo de formação de hidroxilas (hidroxilação) por fotoindução.....	28
FIGURA 08: Diferentes grupos utilizados na modificação de superfícies hidroxiladas de óxidos.....	29
FIGURA 09: Monocamadas auto-organizadas são formadas pela simples imersão de um substrato em uma solução composta de um material surfactante ativo. A força motriz para a espontânea formação das monocamadas em 2D incluem a formação de ligações químicas entre as moléculas e a superfície, além de interações intermoleculares.....	30
FIGURA 10: Principais aplicações das monocamadas auto-organizadas nas áreas biológicas, físicas e químicas.....	30
FIGURA 11: Estruturas das moléculas bifuncionais MPA, APTMS e APPA e suas representações em 3D.....	32
FIGURA 12: Formação e estrutura de um polipeptídeo, onde os termos aa são diferentes aminoácidos e R _n são suas respectivas cadeias laterais.....	33
FIGURA 13: Estrutura de uma proteína na forma de fitas e estruturas secundárias mais comuns, sendo elas a hélice alfa e folha beta.....	34
FIGURA 14: Visão geral das estruturas hierárquicas e função da proteína.....	35
FIGURA 15: Interações entre íon e superfície.....	38
FIGURA 16: Esquema do processo de sputtering dentro da câmara de deposição.....	39
FIGURA 17: (a) Foto da câmara de sputtering onde foram crescidos os filmes; (b) Desenho esquemático da configuração atual do interior da câmara de deposição: 1- alvo (cátodo); 2- ímãs permanentes; 3-sistema de resfriamento do alvo; 4- shield; 5- isolante elétrico; 6- cabo	

de rádio frequência (RF); 7-obturador (shutter); 8- pinças; 9-substratos; 10- porta-substratos; 11- sistema de aquecimento dos substratos; 12- admissão dos gases; 13- sistema de vácuo.....	40
FIGURA 18: Representação do caminho óptico em um microscópio óptico confocal.....	41
FIGURA 19: Esquema representativo da difração de raios X em um cristal.....	42
FIGURA 20: Diagrama das tensões atuantes em uma gota séssil, sendo elas tensão superficial do líquido (γ_{LV}), tensão superficial do sólido (γ_{SV}) e a tensão interfacial sólido-líquido (γ_{SL}).....	45
FIGURA 21: Esquema da formação de uma gota séssil durante uma medida de ângulo de contato.....	45
FIGURA 22: Diagrama esquemático simplificado de um goniômetro.....	46
FIGURA 23: Diagrama esquemático de um processo de fotoionização de um elétron 1s que ocorre no XPS	47
FIGURA 24: Espectro fotoelétrico do chumbo superposto sobre uma estrutura eletrônica esquemática do átomo de chumbo para ilustrar que cada orbital dá origem as linhas desse espectro.....	48
FIGURA 25: Estruturas do MTT e formazan após redução pela NADH desidrogenase, que é uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna das células.....	49
FIGURA 26: Estrutura química do cristal violeta.....	50
FIGURA 27: a) Diagrama do primeiro ciclo de uma reação de PCR, onde passa pelos estágios de desnaturação (D), anelamento (A) e extensão (E); b) Extensão do primer por uma DNA polimerase. O primer anela com uma sequência na cadeia da fita de DNA da amostra (após desnaturação) e a enzima DNA polimerase completa a fita de DNA iniciada pelo primer utilizando os nucleotídeos (dNTPs). Como resultado, são obtidas duas cópias de um trecho específico amostra do DNA utilizado e esse número cresce exponencialmente a cada ciclo; c) Representação do ciclo térmico durante uma reação de PCR.....	52
FIGURA 28: Esquema simplificado das etapas realizadas na zimografia em gel.....	54
FIGURA 29: Discos de titânio grau IV utilizados como substratos.....	55
FIGURA 30: Disposição dos substratos de titânio no porta-substratos.....	56
FIGURA 31: Câmara UV utilizada para hidroxilação das amostras.....	57
FIGURA 32: Imagens de contorno das amostras a) S1AL; b) S2AL; c) S1PL; d) S2PL; e) S1PLTiO ₂ ; f) S2PLTiO ₂ . As abreviações AL e PL significam antes do lixamento e pós lixamento, respectivamente. Para as amostras lixadas com filme crescido, foi acrescentado	

TiO ₂ na frente do nome (S1PLTiO ₂ , por exemplo). É possível observar uma uniformização na superfície das superfícies das amostras após o processo de lixamento.....	64
FIGURA 33: Difractogramas de amostras utilizando as condições para obtenção da fase rutilo. É possível observar picos de difração referentes à planos cristalinos da fase rutilo do TiO ₂ e da fase alfa do titânio.....	65
FIGURA 34: Gráficos de refletância para o substrato de Ti e para o substrato de Ti com filme de TiO ₂ crescido sobre ele. O ponto indicado pela seta indica o valor de <i>band gap</i> do TiO ₂ na fase rutilo e para a região utilizada para a estimativa de espessura, os máximos (m) indicam ordens de interferência par e os mínimos (m+1) indicam ordens de interferência ímpar.....	66
FIGURA 35: Valores de ângulo de contato e energia de superfície para as amostras expostas em lâmpada UV para os tempos t = 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos. Na legenda, A _c se refere ao ângulo de contato e ES se refere à energia de superfície.....	68
FIGURA 36: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂	69
FIGURA 37: Espectro de alta resolução O 1s da amostra de TiO ₂	69
FIGURA 38: Espectro de alta resolução Ti 2p da amostra de TiO ₂	70
FIGURA 39: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com MPA.....	70
FIGURA 40: Espectro de alta resolução O 1s da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com MPA.....	71
FIGURA 41: a) Espectro de alta resolução S 2p da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com MPA e b) possível interação entre as moléculas de MPA e a superfície de TiO ₂ , baseado no espectro de alta resolução do enxofre.....	72
FIGURA 42: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APTMS.....	73
FIGURA 43: a) Espectro de alta resolução O 1s, b) espectro de alta resolução N 1s, c) espectro de alta resolução Si 2p da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APTMS e d) possíveis interações entre as moléculas de APTMS e a superfície de TiO ₂ , baseado nos espectros de alta resolução.....	74
FIGURA 44: Eficácia da reação de silanização em diferentes tipos de superfícies. Nota-se que o TiO ₂ apresenta eficácia relativamente alta.....	75
FIGURA 45: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APPA	75

FIGURA 46: a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APPA e d) possível interação entre as moléculas de APPA e a superfície de TiO ₂ , baseado nos espectros de alta resolução.....	76
FIGURA 47: Possíveis interações do ácido carboxílico com a superfície de TiO ₂	77
FIGURA 48: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com BSA.....	77
FIGURA 49: a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com BSA e d) possível interação entre as moléculas de BSA e a superfície de TiO ₂ , baseado nos espectros de alta resolução.....	79
FIGURA 50: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APTMS e BSA.....	80
FIGURA 51: a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APTMS e, posteriormente, BSA e d) possível interação entre as moléculas de APTMS, BSA e a superfície de TiO ₂ , baseado nos espectros de alta resolução.....	81
FIGURA 52: Espectro <i>survey</i> da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APPA e BSA.....	82
FIGURA 53: a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO ₂ após processo de funcionalização com APPA e, posteriormente, BSA e d) possível interação entre as moléculas de APPA, BSA e a superfície de TiO ₂ , baseado nos espectros de alta resolução.....	83
FIGURA 54: Resultados referentes aos ensaios de a) viabilidade celular por MTT e b) adesão celular por Cristal Violeta após contato direto por 3 horas.....	85
FIGURA 55: Resultados referentes a expressão dos genes relacionados à adesão celular, são eles a) Integrina $\alpha 1$, b) Integrina $\beta 1$, c) Fak, d) Src e e) Cofilina.....	87
FIGURA 56: Resultados referentes a expressão dos genes relacionados ao início da diferenciação osteoblástica, são eles a) Runx 2, b) Osterix (Otx), c) Fosfatase alcalina (Alp), d) Sialoproteína óssea (Bsp) e e) Osteocalcina (Otc).....	88
FIGURA 57: Modelo proposto de regulação coordenada da diferenciação e proliferação de osteoblastos durante a formação óssea pela sinalização da Otx e Wnt/Beta-catenina. Ihh é o iniciador da ossificação endocondral. Os progenitores biopotenciais que expressam Runx 2 podem se diferenciar em osteoblastos ou condrócitos. Em seguida, as células se diferenciam	

em pré-osteoblastos, onde o Runx 2 desempenha um papel essencial. No próximo passo, os pré-osteoblastos diferenciam-se em osteoblastos maduros, num processo em que o Otx desempenha um papel crítico. A sinalização de Wnt/ β -catenina tem um papel essencial na diferenciação de osteoblastos e na proliferação de osteoblastos. A inibição da atividade de sinalização Wnt/ β -catenina pela Otx constitui um possível mecanismo para a proliferação de osteoblastos..... 89

FIGURA 58: Resultados referentes a atividade enzimática das MMPs por zimografia, são elas a) MMP2 após 3 horas, b) MMP9 após 3 horas, c) MMP2 após 72 horas, d) MMP9 após 72 horas e e) bandas de degradação pelas MMP2 e MMP9..... 90

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Parâmetros utilizados para o crescimento da camada de titânio.....	56
TABELA 02: Parâmetros utilizados para a deposição dos filmes de TiO ₂ na fase rutilo.....	56
TABELA 03: Sequências de iniciadores de expressão gênica e condições do ciclo de PCR..	61
TABELA 04: Valores da rugosidade média dos substratos antes, depois do processo de lixamento e após deposição do filme de TiO ₂ . As abreviações AL e PL significam antes do lixamento e pós lixamento, respectivamente. Para as amostras lixadas com filme crescido, foi acrescentado TiO ₂ na frente do nome (S1PLTiO ₂ , por exemplo).....	63

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

α -MEM: meio mínimo essencial com modificação alfa

Alp: fosfatase alcalina

APPA: 3-(4-aminofenil)propiónico

APTMS: 3-aminopropiltrimetoxisilano

Bsp: sialoproteína óssea

DRX: difração de raios X

Fak: quinase de adesão focal

FBS: soro fetal bovino

MMP: metaloproteases de matriz

MPA: ácido 3-mercaptopropiónico

Otc: osteocalcina

Otx: osterix

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

SAM: camadas auto organizadas

Ti: titânio

TiO₂: dióxido de titânio

UV: ultravioleta

XPS: espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Biomateriais	21
2.2 Titânio (Ti)	22
2.3 Dióxido de Titânio (TiO₂)	24
2.4 Propriedade Fotocatalítica e Hidrofilicidade Fotoinduzida do Dióxido de Titânio	26
2.5 Monocamadas Auto-Organizadas (SAM) e Funcionalização do TiO₂ com Moléculas Orgânicas	28
2.6 Proteína	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAIS E TÉCNICAS	38
4.1 Técnica de Deposição por <i>Reactive RF Magnetron Sputtering</i>	38
4.2 Técnica de Caracterização	40
4.2.1 <i>Microscopia Óptica Confocal</i>	40
4.2.2 <i>Difração de Raios X (DRX)</i>	41
4.2.3 <i>Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis)</i>	43
4.2.4 <i>Ângulo de Contato e Energia de Superfície</i>	44
4.2.5 <i>Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)</i>	44
4.2.5 <i>Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)</i>	46
4.3 Técnica para Avaliação do Desempenho Biológico	49
4.3.1 <i>Redução do MTT</i>	49
4.3.2 <i>Cristal Violeta</i>	49
4.3.3 <i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)</i>	50
4.3.4 <i>Zimografia</i>	53
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	55

5.1 Preparo do Substrato	55
5.2 Deposição dos Filmes de TiO₂	55
5.3 Hidroxilação Física da Superfície	57
5.4 Funcionalização	57
5.4.1 <i>Funcionalização com Moléculas Bifuncionais</i>	58
5.4.1.1 <i>Funcionalização com Ácido 3-Mercaptopropiônico (MPA)</i>	58
5.4.1.2 <i>Funcionalização com 3-Aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)</i>	58
5.4.1.3 <i>Funcionalização com Ácido 3-(4-Aminofenil)Propiônico (APPA)</i>	58
5.4.2 <i>Funcionalização com Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA)</i>	58
5.5 Cultivo Celular e Testes Biológicos	59
5.5.1 <i>Redução do MTT</i>	60
5.5.2 <i>Cristal Violeta</i>	60
5.5.3 <i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)</i>	61
5.5.4 <i>Zimografia</i>	62
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
6.1 Microscopia Óptica Confocal	63
6.2 Difração de Raios X	64
6.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível	66
6.4 Ângulo de Contato e Energia de Superfície	67
6.5 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X	68
6.5.1 <i>Filme de TiO₂</i>	68
6.5.2 <i>Filme de TiO₂ Funcionalizado com MPA</i>	70
6.5.3 <i>Filme de TiO₂ Funcionalizado com APTMS</i>	72
6.5.4 <i>Filme de TiO₂ Funcionalizado com APPA</i>	75
6.5.5 <i>Filme de TiO₂ Biofuncionalizado com BSA</i>	77
6.5.6 <i>Imobilização da BSA por APTMS sobre Filme de TiO₂</i>	79
6.5.7 <i>Imobilização da BSA por APPA sobre Filme de TiO₂</i>	82
6.6 Testes Biológicos	84
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial em decorrência dos avanços da medicina traz como consequência direta a demanda para o desenvolvimento de inovações na área de medicina regenerativa e de órgãos artificiais. Em particular, a área de implantes ortopédicos e odontológicos têm apresentado um rápido desenvolvimento, considerando o mercado projetado de aproximadamente 6 bilhões de dólares para estes tipos de implantes até o ano de 2020 (LEONI, 2016).

Atualmente, os implantes utilizados em odontologia ou cirurgia ortopédica são majoritariamente produzidos a partir de materiais metálicos, sendo o titânio puro e/ou suas ligas os mais comumente empregados. Apesar deste amplo uso, ainda existem sérios problemas associados às questões de biocompatibilidade e frequente incidência de infecções, sendo estas as causas primárias de falhas e rejeições dos implantes (DEL POZO, PATEL, 2009; INZANA, 2016).

Se a adesão de bactérias na superfície dos implantes ocorrer antes da regeneração do tecido, os mecanismos de defesa do organismo não conseguem prevenir a colonização destas bactérias. Assim, inibir a adesão destas bactérias é fundamental para a prevenção das infecções, uma vez que a colonização destas pode acarretar na formação de biofilmes, que são extremamente resistentes às reações do sistema imunológico e à tratamentos com antibióticos no pós-operatório (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Uma das estratégias para aumentar a biocompatibilidade, gerar maior osteogênese e evitar infecções é modificar a superfícies destes implantes.

A manipulação da superfície envolve um grande número de procedimentos experimentais a nível de modificação das superfícies e interfaces para o estudo das interações entre o *bulk* e o modificador da superfície. Estas podem promover melhoria na resistência à biocorrosão do material e aumento da bioatividade dos óxidos, apresentando resultados promissores na interação com o tecido, pois a biocompatibilidade é determinada por processos químicos que ocorrem na interface entre a prótese e o tecido vivo (SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013).

Os materiais que compõem os implantes apresentam propriedades relacionadas à sua função como boas propriedades mecânicas. Porém, muitas vezes, não apresentam uma boa biocompatibilidade, ou seja, não contribuem na integração com os tecidos adjacentes da área implantada (SILVA-BERMUDEZ; MUHL; RODIL, 2013). O desempenho biológico destes materiais e outras propriedades como resistência à biocorrosão, inércia química e bioatividade

podem ser melhorados pela modificação de suas superfícies, sendo que os óxidos metálicos têm apresentado bons resultados na interação com proteínas, o qual é o processo inicial para que haja interação do ambiente biológico com o material (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Apesar da biocompatibilidade destes óxidos ser reconhecida, ainda se requer muito estudo para compreender os mecanismos de adesão destas proteínas. Quando um material entra em contato com fluidos fisiológicos, ocorre primeiramente uma adsorção espontânea de moléculas de água e íons na sua superfície e, em seguida, as proteínas são adsorvidas (SILVA-BERMUDEZ; MUHL; RODIL, 2013). O perfil destas proteínas, as quais farão interação com as células, depende das propriedades físico-químicas da superfície do óxido metálico. Diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para avaliar a resposta biológica de revestimentos de óxidos metálicos. Tais ensaios demonstram que a biocompatibilidade e as propriedades de biocorrosão dependem da composição, espessura, homogeneidade e porosidade do material.

O dióxido de titânio tem sido empregado em vários estudos como modificador de superfície, pois apresenta elevada dureza, alta constante dielétrica e grande estabilidade química (YU et al., 2011; ZORBA, CHEN, MAO, 2010; CHEN, HUANG, PERNG, 2013). Os recobrimentos que apresentam alta resistência mecânica são importantes, pois as falhas apresentadas resultam de distintos mecanismos de desgaste. Em um estudo, Ochsenbein et al. (2008) observou que a camada de óxido de titânio apresentou uma adesão e proliferação celular adequada. No entanto, na exposição de longo prazo a um ambiente biológico, o óxido nativo fino (5-6 nm) não conseguiu proteger o material da corrosão que, por outro lado, um revestimento de dióxido de titânio mais espesso e homogêneo (100 nm) aumentou significativamente a resistência à biocorrosão de longo prazo do Ti, mostrando resposta celular semelhante. Além disso, em termos de hemocompatibilidade, Werner et al. (2013) avaliou que a camada de óxido nativo era, em geral, menos hemocompatível em comparação com uma camada mais espessa de TiO₂ e mais homogênea.

Os filmes finos de TiO₂ podem ser preparados por vários métodos, como processos sol gel (PARK; KANG, 2008), feixe de íons (MARTIN, 1986), *sputtering* reativo (KUSANDO; KINBARA, 2000), evaporação por feixe de elétrons (YANG et al., 2008), deposição por vapor químico (WILLIAMS; HESS, 1983), deposição metal por vapor químico (WON et al., 2001), deposição de vapor químico de plasma aumentado (NAKAMURA et al., 2003), deposição por RF *magnetron sputtering* (MENG; ANDRITSCHKY; DOS SANTOS, 1993), dentre outros. Todos os métodos levam à formação de diferentes estruturas cristalinas e a superfície depende fortemente das condições de preparação empregadas.

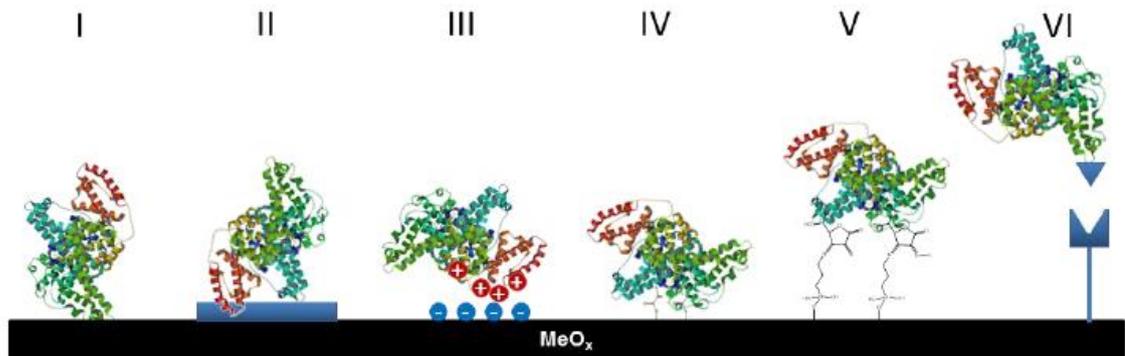
Entre estes, o método de deposição por RF *magnetron sputtering* reativo fornece um controle preciso sobre a composição e morfologia da superfície através do ajuste das condições de deposição. As propriedades do TiO₂, dependem fortemente da microestrutura e da fase cristalográfica (rutilo, anatase ou brookita) obtidos. Em geral, têm-se a formação de filmes com alta uniformidade, aderência e dureza elevada, o que os torna atraentes para utilização em implantes biomédicos.

Quimicamente, a superfície desse óxido (TiO₂), é principalmente terminada por grupos -OH que podem ser prontamente funcionalizados por várias moléculas, contendo diferentes grupos funcionais, como ácidos carboxílicos, e outros derivados como ésteres, cloretos ácidos, sais de carboxilato, etc (HANAWA, 2011). A presença dos grupos hidroxilas na superfície do óxido tende a levar a formação de ligações covalentes com um grupo funcional específico do composto orgânico, através de reações de condensação (LOVE et al., 2005; PUJARI et al., 2014). Esses grupos -OH da superfície e as cargas elétricas formadas pela dissociação desempenham um papel importante na ligação com polímeros, proteínas e imobilização de moléculas orgânicas (HANAWA, 2011). Estudos têm sugerido que a quantidade de grupos -OH na superfície de TiO₂ influencia a atividade fotocatalítica e a hidrofiliabilidade do filme (SIMONSEN; LI; SØGAARD, 2009).

As proteínas podem se adsorver na superfície do óxido metálico diretamente ou por meio de agentes ligantes. Elas apresentam um grande potencial para adsorver em quase todos os tipos de interface, cuja característica é conferida pelos aminoácidos que as constituem, de modo que estas moléculas biológicas podem apresentar simultaneamente regiões hidrofóbicas, polares não carregadas e polares carregadas em sua superfície. Assim, as interações podem ser devido à hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, interações iônicas ou pela formação de ligações covalentes com um grupo funcional específico da molécula (SJÖSTRÖM et al., 2013; KILLIAN, 2013).

Frequentemente, as moléculas ligantes atuam como espaçadores, concedendo maior liberdade estérica à proteína, o que por sua vez permite uma maior atividade específica. No processo de interação, um dos grupos orgânicos do ligante interage com a superfície do óxido e o outro grupo orgânico do ligante interage com a proteína, modificando a interface química entre a superfície do TiO₂ e o ambiente biológico (KILLIAN, 2013). Exemplos de imobilização de proteínas são apresentados na Figura 01.

Figura 01 – Meios de adsorção de proteínas nas superfícies de óxidos metálicos (MeO_x): interações hidrofílicas (I), recobrimento hidrofóbico (II), adesão iônica (III), ligação covalente (IV), ligação covalente com a presença de espaçador (V) e acoplamento de anticorpo específico (VI)



Fonte: KILLIAN, 2013.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais

O uso de biomateriais se dá desde a Idade Antiga. Existem registros do uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 AC) e de intestino de gatos, na Europa durante a Idade Média, além de substitutos ósseos feitos de madeira. Há também registros de dentes artificiais feitos de conchas pelos maias (600 AC), de ferro pelos franceses e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas (PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015; RATNER, 2013). Embora seu uso seja datado há milhares de anos atrás, é provável que o termo que hoje reconhecido como “biomaterial” tenha sido firmado através dos primeiros simpósios de biomateriais da Universidade de Clemson, no final da década de 1960 e início da década de 1970. O sucesso científico desses simpósios levou a formação da *Society for Biomaterials* (SFB), em 1975 (RATNER, 2013).

A definição de um biomaterial vem sendo tratada por vários autores, em diferentes formas ao longo dos anos. Atualmente, a definição mais aceita desse termo é a empregada pela *American National Institute of Health*, que descreve o biomaterial como “qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas, sendo sintéticas ou de origem natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”. Entretanto, essa definição não inclui materiais como bráquetes ortodônticos e instrumento cirúrgicos (BERGMANN; STUMPF, 2013).

Dos diversos tipos de matérias-primas existentes para a produção de biomateriais, a classe dos metais destaca-se pelas suas propriedades mecânicas, como alta resistência à fadiga e fratura, além de uma biocompatibilidade adequada no caso do titânio, por exemplo. Entende-se que a biocompatibilidade de um material é uma propriedade que surge de componentes físicos, químicos, biológicos, médico e de *design* (BRAYBROOK, 1997). Isso implica na habilidade de desempenhar sua função com uma resposta adequada no paciente para uma aplicação específica (WILLIAMS, 1999). Então, um material biocompatível deve possuir tais propriedades (HEIMANN, 2002):

- Resistência, rigidez, dureza superficial e resistência ao desgaste;
- Capacidade de armazenamento a longo prazo, resistência a corrosão e resistência à ataques químicos por fluidos fisiológicos;
- Resposta não inflamatória;
- Não tóxico, não carcinogênico e não incitar reações alérgicas ou imunológicas;

- Densidade apropriada;
- Boa manufacturabilidade.

Os biomateriais metálicos têm sido principalmente utilizados como componentes estruturais, visando à substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos, que são constantemente submetidos à altas cargas de tração e compressão. Dentre as aplicações mais comuns dos metais, incluem-se fios, parafusos e placas para fixação de fraturas, implantes dentários e próteses para substituição de articulações (SUMITA, HANAWA, 2004; POIERN, BRUNDAVANAM, FAWCETT, 2012). Os metais mais utilizados como biomateriais são os grupos dos aços inoxidáveis, as ligas à base de cobalto-cromo, as ligas de titânio e o titânio comercialmente puro, sendo este último o material de estudo nesse trabalho (HOLZPFEL et al., 2013; SUMITA, HANAWA, 2004).

2.2 Titânio (Ti)

O elemento titânio foi primeiramente descoberto em 1790 por um mineralogista inglês chamado William Justin Gregor. Ao investigar os minérios na região de Cornualha, Gregor descobriu um minério até então desconhecido, que foi nomeado de *menaccanite*, em homenagem ao vale *Menaccan*, local onde foi encontrado. Poucos anos depois, em 1795, um químico alemão chamado Martin Heinrich Klaproth encontrou um minério que continha um suposto novo elemento o qual ele nomeou de *titanium* (titânio). Mais tarde, ao analisar o minério *menaccanite*, Klaproth descobriu que o elemento descoberto por ele era o mesmo já descoberto por Gregor. O título de primeiro descobridor foi então concebido a Gregor. Entretanto, Gregor não fazia distinção do minério para o metal e, para evitar ambiguidade, o nome do elemento foi mantido como *titanium* (RUSSELL, 1955).

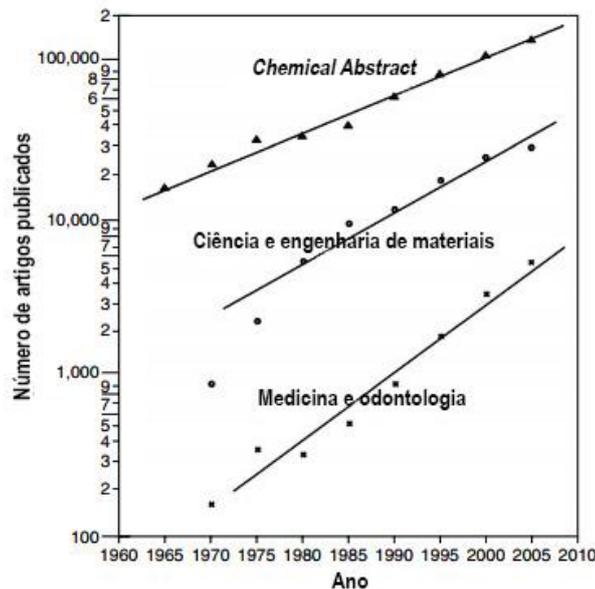
O titânio é um material alotrópico que em temperatura ambiente apresenta estrutura hexagonal compacta (HC), conhecida como fase α . Abaixo dos 882 °C a estrutura HC é mantida e, além dessa temperatura, sofre uma mudança de fase para uma estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), conhecida como fase β . Este metal também pode ser ligado com outros elementos químicos, como ferro (Fe), alumínio (Al) e vanádio (V). Uma das ligas mais conhecidas e utilizadas como biomaterial é a liga Ti6Al4V (PARK; LAKES, 2007).

Devido a sua baixa densidade em relação à maioria dos metais, alta força específica (no que se refere a uma alta relação força-peso), baixo módulo de elasticidade e apropriada resistência a corrosão, o titânio e suas ligas se tornaram materiais importantes para a indústria aeroespacial no começo da década de 1950. Com o passar dos anos, houve grande interesse

não somente para a aplicações industriais, mas também para aplicações médicas e dentárias. Este material é um dos poucos que recebe igual atenção tanto da área engenharia/industrial, quanto da área médica/odontológica (OSHIDA, 2012).

A popularidade do titânio e suas ligas na área médica e odontológica pode ser reconhecida através de vários artigos encontrados na literatura. De acordo com a Figura 02 é possível observar três retas crescentes do total de artigos acumulados a cada cinco anos. A primeira linha de cima representa o número de todos os artigos acumulados pela *Chemical Abstracts*. Nela, os artigos contados estão espalhados em diversas áreas, como refinamento, metalurgia, medicina, odontologia, bioengenharia, engenharia, industrias, química pura e engenharia química. A segunda reta resulta das áreas limitadas a ciência dos materiais nos campos da engenharia e médica/odontológica. A terceira reta restringe-se apenas à área médica/odontológica, a qual também possui um crescimento exponencial em publicações ao longo dos anos (OSHIDA, 2012).

Figura 02 – Número de artigos sobre titânio publicados a cada cinco anos



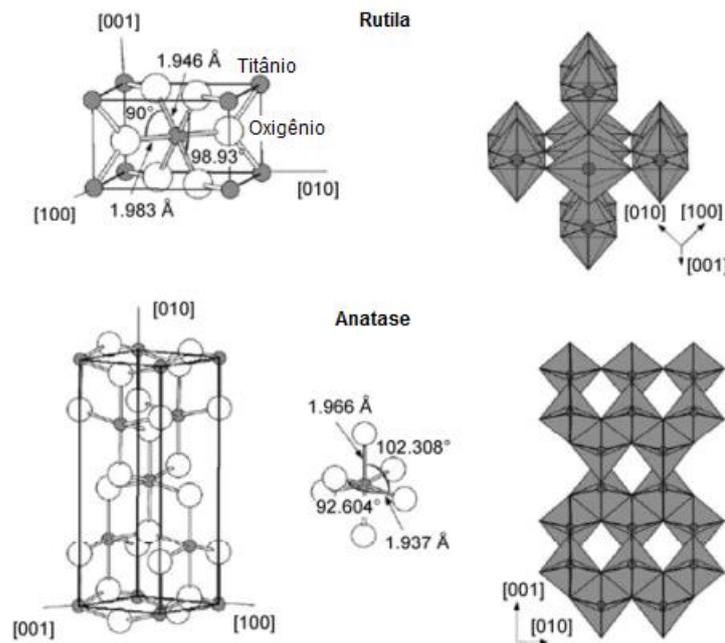
Fonte: adaptado de OSHIDA, 2012.

Embora o titânio apresente propriedades mecânicas satisfatórias e melhor biocompatibilidade quando comparado a outros metais utilizados como biomaterial, seu desempenho biológico e outras propriedades como maior resistência à biocorrosão, inércia química e bioatividade podem ser melhorados pela modificação de superfície (HANAWA, 2011).

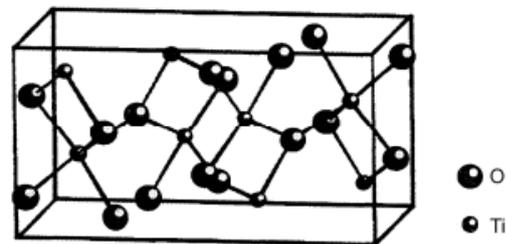
2.3 Dióxido de Titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO₂) é um óxido que pertence à família dos óxidos metálicos de transição e suas fases cristalográficas mais conhecidas são: anatase, brookita e rutilo. A fase rutilo é a mais abundante na natureza e isso se deve a sua maior estabilidade termodinâmica. Esta fase possui uma estrutura tetragonal com dois átomos por célula unitária. A fase anatase também possui uma estrutura tetragonal, porém a distorção do octaedro (TiO₆) é um pouco maior e os padrões de agrupamento das cadeias octaédricas são diferentes, conforme pode ser observado na Figura 03 abaixo (MITAL, MANOJ, 2011; TONIATO, 2011). Esta fase possui quatro átomos por célula unitária e apresenta maior atividade fotocatalítica. A fase brookita (Figura 04) pertence ao sistema cristalino ortorrômbico com oito átomos por célula unitária. Dentre as três fases, ela possui a maior célula unitária (MO; CHING, 1995).

Figura 03 – Estruturas cristalinas das fases rutilo e anatase do TiO₂



Fonte: adaptado de MITAL e MANOJ, 2011.

Figura 04 – Estrutura cristalina da fase brookita do TiO_2 

Fonte: MO e CHING, 1995.

Por possuir *band gap* de 3,2 eV para anatase, 3,02 eV para rutila e 2,96 eV para brookita, o TiO_2 é denominado um semicondutor de *band gap* largo. Sua banda de valência é composta por orbitais 2p de oxigênio hibridizado com orbitais 3d do titânio e sua banda de condução possui apenas os orbitais 3d do titânio (MITAL; MANOJ, 2011).

A superfície desse e outros óxidos podem reagir com moléculas de água e formar grupos hidroxila. No caso do dióxido de titânio, essa reação ocorre de maneira imediata não só em solução aquosa, mas também com a umidade presente no ar que entra em contato com sua superfície. Esses grupos hidroxilas contém grupos OH terminais e grupos OH de pontes em quantidades iguais, como esquematizado na Figura 05 (HANAWA, 2011).

Figura 05 – Processo de formação dos grupos hidroxila na superfície do dióxido de titânio



Fonte: adaptado de HANAWA, 2011.

Os grupos hidroxilas na superfície podem se dissociar em soluções aquosas e formar cargas elétricas. A formação de cargas negativas ou positivas devido a essa dissociação depende fortemente do pH da solução. Para cada tipo de superfície existe um dado valor de pH cujas cargas positivas e negativas estão balanceadas. Esse valor de pH é chamado de ponto de carga zero, do inglês *point of zero charge* (pzc). O pzc é um valor único para cada tipo de óxido e é um indicador que mostra propriedades ácidas ou básicas do mesmo. O

dióxido de titânio apresenta pzc de 5,3 para a fase rutilo e 6,2 para a fase anatase. Em outras palavras, a superfície da anatase apresenta caráter ácido para valores de pH abaixo de 6,2 e caráter básico para valores de pH acima desse valor. Esses grupos de hidroxilas na superfície do material e as cargas formadas pela dissociação dos mesmos desempenham um papel importante na ligação com polímeros e na imobilização de moléculas. Portanto, a concentração de grupos hidroxila na superfície e o pH são fatores que devem ser levados em consideração (HANAWA, 2011).

2.4 Propriedade Fotocatalítica e Hidrofilicidade Fotoinduzida do Dióxido de Titânio

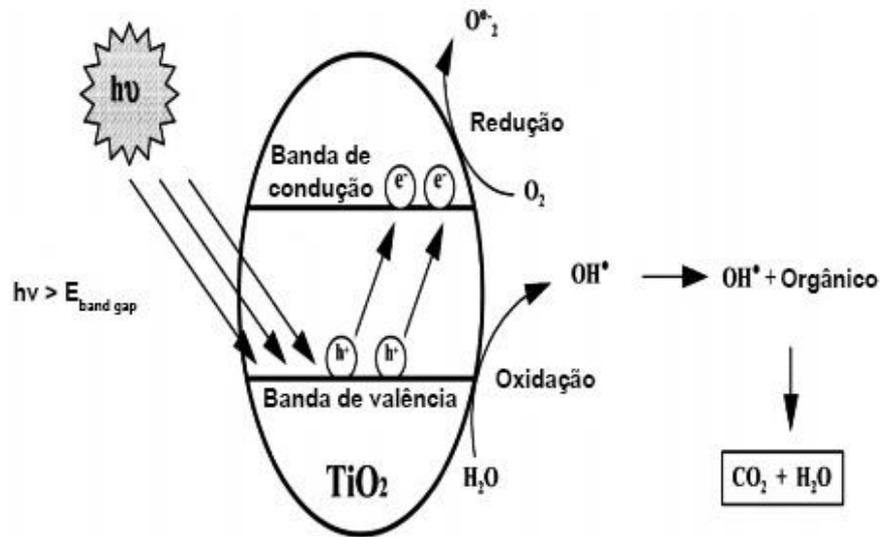
Quando uma superfície de TiO_2 é irradiada com fótons de energia superior à energia de *band gap* (ultravioleta para o caso do TiO_2 anatase), são gerados elétrons (e^-) e buracos (h^+). Os buracos da banda de valência e elétrons da banda de condução que foram fotogerados podem se recombinar, liberando calor ou podem se mover para a superfície do TiO_2 . Se os elétrons e buracos migram para a superfície, eles podem reagir com espécies adsorvidas (HASHIMOTO; IRIE; FUJISHIMA, 2005). Na superfície há geralmente moléculas de vapor de água adsorvidas que, na interação com o buraco, reage formando um radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$):



Já o átomo de oxigênio apresenta alta afinidade pelos elétrons que migram para a superfície. Como resultado, o oxigênio atmosférico adsorvido na superfície do TiO_2 é reduzido, se transformando em superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$):



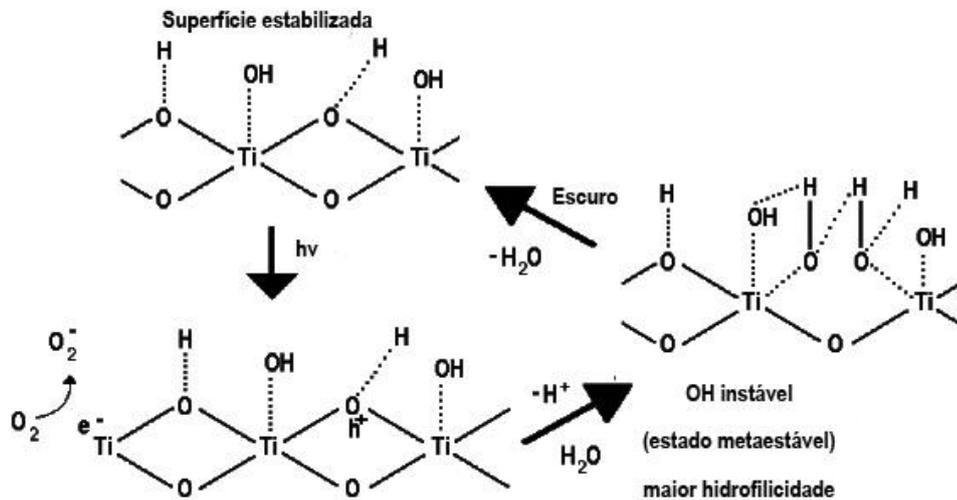
O radical hidroxila juntamente com outros oxidantes (como o superóxido) são altamente reativos e podem oxidar componentes orgânicos, transformando-os em água e CO_2 (Figura 06). Essa propriedade fotocatalítica do TiO_2 tem sido objeto de estudo, atraindo grande atenção em aplicações voltadas para a purificação de ambientes aquáticos ou atmosféricos, bem como a produção de superfícies autolimpantes (HASHIMOTO; IRIE; FUJISHIMA, 2005).

Figura 06 – Esquema do processo de fotocatalise do TiO_2 

Fonte: adaptado de WEI et al., 2007.

Como dito anteriormente, ao formar elétrons e buracos, estes podem se recombinar liberando energia na forma de calor ou migrar para a superfície do TiO_2 podendo reagir com moléculas adsorvidas nessa superfície. Entretanto, há também a possibilidade de uma pequena parte dos buracos reagirem com o TiO_2 , ocasionando quebras de ligações entre os átomos titânio e o oxigênio pela coordenação de moléculas de água presentes na superfície. As moléculas de água coordenadas liberam um próton para compensação de carga levando à formação de um novo grupo $-\text{OH}$. Esse processo aumenta o número de grupos $-\text{OH}$ presentes na superfície (Figura 07). Entretanto, essas novas hidroxilas produzidas pela irradiação são termodinamicamente menos estáveis do que as hidroxilas formadas naturalmente e sua energia de superfície é maior. Como consequência, essa maior energia de superfície também confere maior hidrofiliabilidade, processo conhecido como hidrofiliabilidade fotoinduzida (HASHIMOTO; IRIE; FUJISHIMA, 2005). Diversos grupos funcionais podem reagir e se ligar à essas hidroxilas, levando à formação de multi ou monocamadas moleculares. Na área de biomateriais isso pode ser utilizado através da funcionalização dessas superfícies com biomoléculas para melhorar a biocompatibilidade e bioatividade do material, uma vez que estas dependem das interações que ocorrem entre a superfície do material e o ambiente biológico.

Figura 07 – Ilustração esquemática do processo de formação de hidroxilas (hidroxilação) por fotoindução

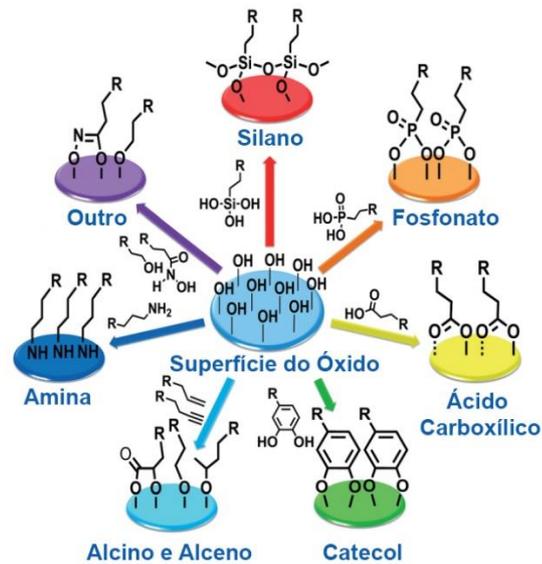


Fonte: adaptado de HASHIMOTO, IRIE e FUJISHIMA, 2005.

2.5 Monocamadas Auto-Organizadas (SAM) e Funcionalização do TiO_2 com Moléculas Orgânicas

A superfície do dióxido de titânio e de alguns outros óxidos metálicos é terminada por grupos hidroxila que tornam possível a ligação com outras moléculas. Diversos grupos funcionais podem interagir e se ligar com essas hidroxilas terminais por meio de reações de condensação (LOVE et al., 2005; PUJARI et al., 2014) levando à formação de mono ou multicamadas. As moléculas utilizadas nesses procedimentos de modificação ou funcionalização da superfície dos óxidos normalmente possuem em uma de suas extremidades um grupo funcional que apresenta afinidade pela superfície. Dos grupos funcionais mais utilizados, destacam-se o silano, ácido carboxílico, tiol, amina e álcool (PUJARI et al., 2014). Na Figura 08 estão dispostos alguns exemplos de grupos funcionais que possuem afinidade pelas superfícies hidroxiladas e podem ser utilizados no processo de funcionalização de superfície, mais especificamente na formação de monocamadas auto-organizadas.

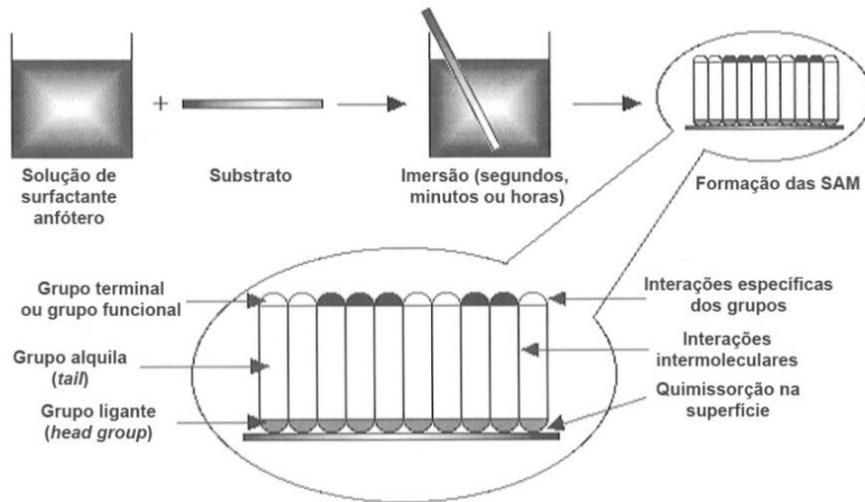
Figura 08 – Diferentes grupos utilizados na modificação de superfícies hidroxiladas de óxidos



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

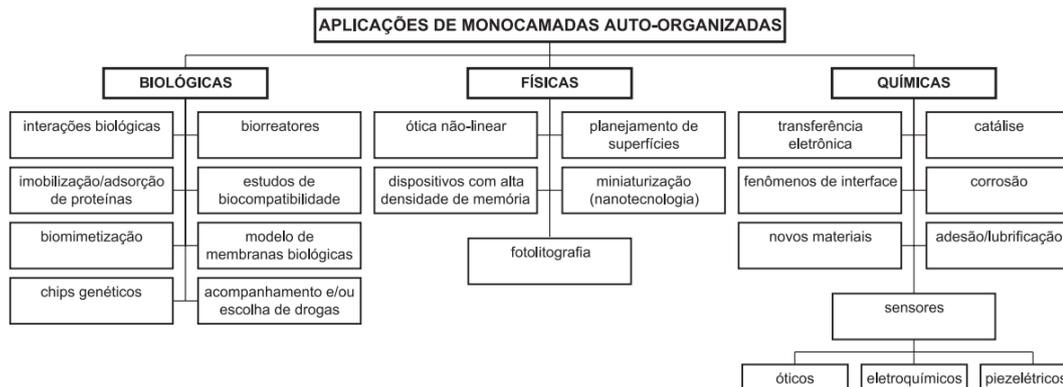
As monocamadas auto-organizadas (SAM) são conjuntos moleculares ordenados que se formam pela adsorção de um surfactante ativo sob a superfície de um sólido (ULMAN, 1996). Essa modificação de superfície apresenta um alto grau de organização, estabilidade e reprodutibilidade. A formação das monocamadas ocorre de maneira espontânea (Figura 09), após imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas surfactantes anfóteras (derivados de alquila, álcoois, aminas, tióis, etc). A adsorção das moléculas é resultado da afinidade do grupo ligante (*head group*), que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato e a força motriz para a organização das mesmas se origina a partir das interações intermoleculares dos grupos alquil (*tail*), do tipo hidrofóbicas (Van de Waals, por exemplo). O grupo terminal pode apresentar funções específicas à sua aplicação (MANDLER, TURRYAN, 1995; ULMAN, 1996). A gama de aplicações das SAM é ampla (MANDLER; TURRYAN, 1995), podendo abranger áreas biológicas, físicas e químicas, como mostrado na Figura 10.

Figura 09 – Monocamadas auto-organizadas são formadas pela simples imersão de um substrato em uma solução composta de um material surfactante ativo. A força motriz para a espontânea formação das monocamadas em 2D incluem a formação de ligações químicas entre as moléculas e a superfície, além de interações intermoleculares



Fonte: adaptado de ULMAN, 1996.

Figura 10 – Principais aplicações das monocamadas auto-organizadas nas áreas biológicas, físicas e químicas

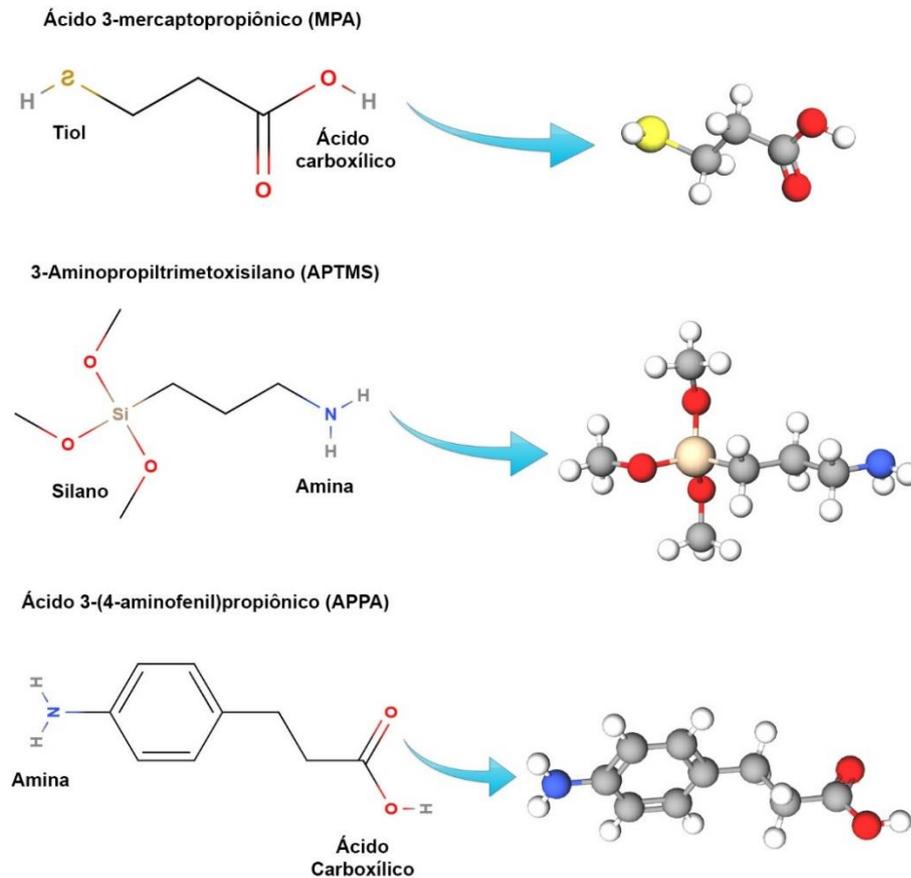


Fonte: FEIRE et al., 2003.

No desenvolvimento de biomateriais, a funcionalização da superfície por meio de biomoléculas pode melhorar a biocompatibilidade do material, pois a adsorção de proteínas após a implantação do mesmo é uma etapa de grande importância na integração do implante com o ambiente biológico, uma vez que as proteínas são responsáveis por induzir as subsequentes etapas de adesão e proliferação celular (ABDOLMALEKI, MALLAKPOUR, BORANDEH, 2011; WANG et al., 2015). Através da modificação ou funcionalização da superfície, é possível controlar a molhabilidade do material (PESEK; MATYSKA, 1997), energia de superfície (RYU et al., 2005), adesão de proteínas (LIU; CHU; DING, 2010), liberação de drogas (SKORB; ANDREEVA, 2013) e a interação das células com o mesmo (SAFONOV et al., 2014). Dessa maneira, além de promover adequada biocompatibilidade, é possível que o material também desempenhe atividade biológica designada à sua aplicação.

No enfoque desse trabalho, as monocamadas auto-organizadas são utilizadas como espaçadoras no processo de imobilização de proteínas. Para tanto, é necessário que as moléculas utilizadas possuam simultaneamente um grupo ligante com afinidade pelas hidroxilas da superfície do TiO_2 e um grupo terminal com afinidade pelas moléculas de proteína utilizadas. Portanto as moléculas bifuncionais, ou seja, que apresentam dois grupos funcionais, um em cada extremidade de sua cadeia, são candidatas adequadas para esse tipo de procedimento. No processo de funcionalização da superfície do dióxido de titânio desse trabalho foram estudados os aspectos de adsorção e a análise conformacional de três moléculas bifuncionais, sendo elas o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e ácido 3-(4-aminofenil) propiônico (APPA). Na Figura 11 estão apresentadas essas moléculas e seus respectivos grupos funcionais.

Figura 11 – Estruturas das moléculas bifuncionais MPA, APTMS e APPA e suas representações em 3D



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

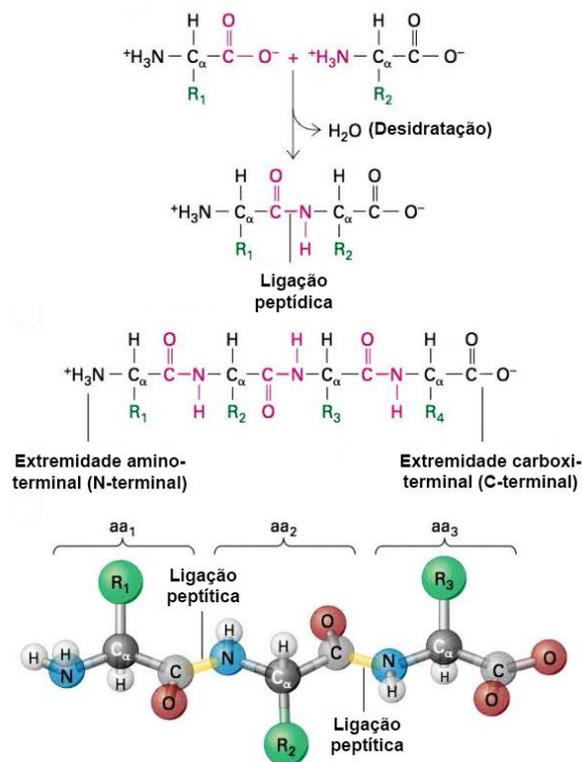
2.6 Proteína

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes presentes nos sistemas vivos, representando cerca de 50 a 80% do peso seco das células. Elas são compostas por uma combinação de até 22 aminoácidos e apresentam uma grande variedade estrutural devido ao número de possibilidades de sequências dos aminoácidos (MORAES et al., 2013). A estrutura das proteínas pode ser dividida em quatro diferentes níveis de organização, chamadas de estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.

A sequência linear dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas determina a estrutura primária das proteínas (Figura 12). Essas ligações peptídicas são decorrentes de reações que resultam na perda de água (desidratação). Os polímeros lineares formados por aminoácidos são denominados polipeptídios, que possuem uma extremidade aminoterminal

livre e uma extremidade carboxiterminal livre (LODISH et al., 2014). Em condições fisiológicas, o grupo carboxila tende a ser desprotonado, perdendo um íon de hidrogênio, resultando numa carga negativa. O grupo amina tende a se ligar com um íon de hidrogênio, resultando em uma carga positiva. Esse fenômeno é o mais provável de ocorrer em condições fisiológicas e a denominação para essa molécula que, embora seja neutra, mas possua cargas opostas em suas extremidades é chamada de *zwitterion*.

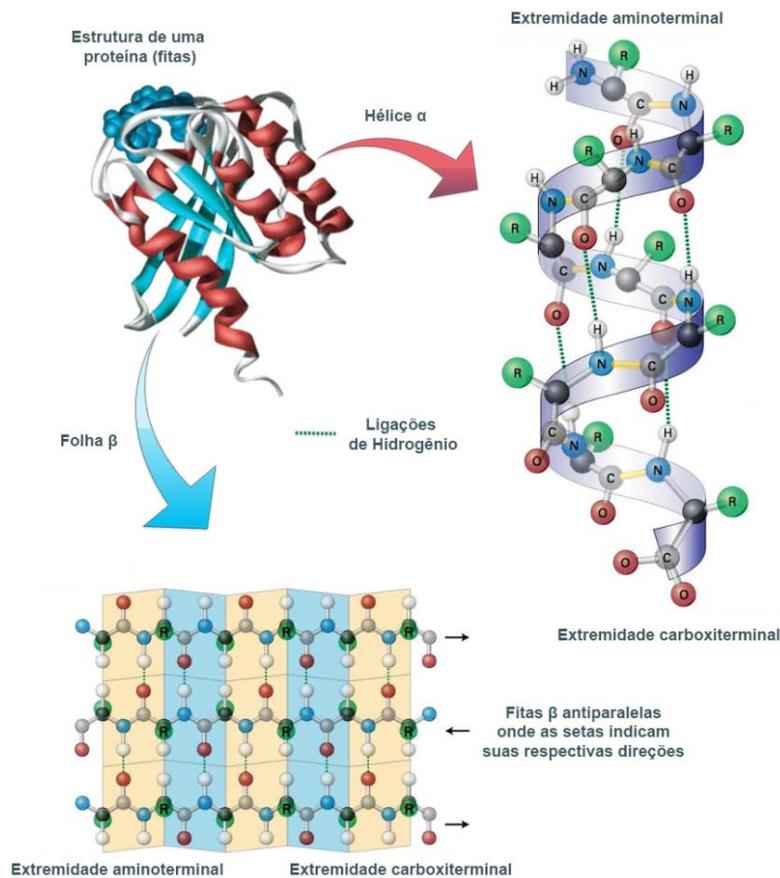
Figura 12 – Formação e estrutura de um polipeptídio, onde os termos aa são diferentes aminoácidos e Rn são suas respectivas cadeias laterais



Fonte: adaptado de LODISH et al., 2014.

As estruturas secundárias correspondem a arranjos espaciais estáveis de segmentos de uma cadeia polipeptídica unidos por ligações de hidrogênio entre os agrupamentos amida e carbonila da cadeia principal que, frequentemente, possuem padrões estruturais repetitivos (LODISH et al., 2014). As principais estruturas secundárias são a hélice alfa, folha beta (Figura 13).

Figura 13 – Estrutura de uma proteína na forma de fitas e estruturas secundárias mais comuns, sendo elas a hélice alfa e folha beta



Fonte: adaptado de LODISH et al., 2014.

A estrutura terciária corresponde à conformação total de uma cadeia polipeptídica, ou seja, as cadeias laterais também estão envolvidas nesse tipo de estrutura, podendo atribuir características hidrofílicas ou hidrofóbicas a uma proteína, além de outros tipos de propriedades. Diferentemente das estruturas secundárias, que são estabilizadas apenas por ligações de hidrogênio, a estrutura terciária é estabilizada por interações hidrofóbicas entre cadeias laterais apolares, junto com ligações de hidrogênio envolvendo as cadeias laterais polares e agrupamentos amino e carboxila da cadeia polipeptídica. As propriedades químicas das cadeias laterais dos aminoácidos ajudam a definir a estrutura terciária, além de trazer consequências importantes para a função e regulação das proteínas (LODISH et al., 2014; MORAES et al., 2013).

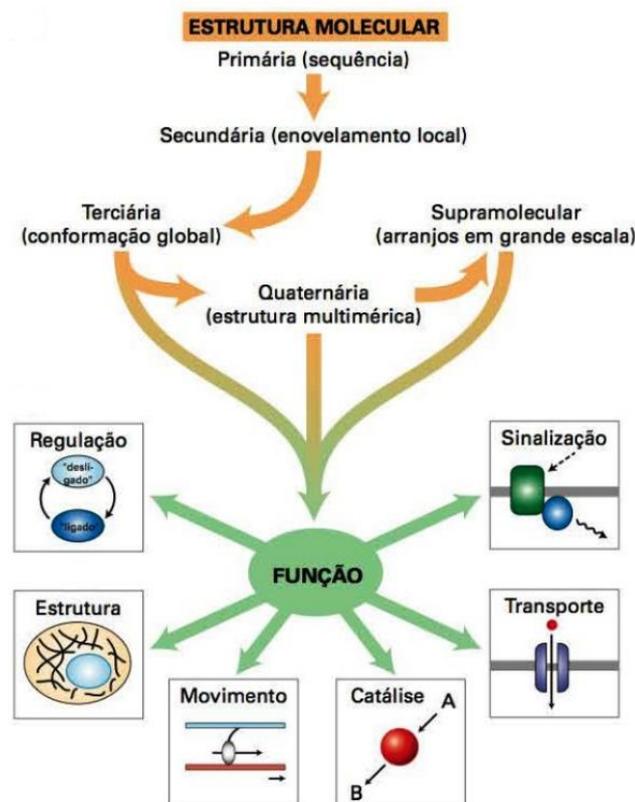
A estrutura quaternária refere-se ao arranjo espacial entre duas ou mais cadeias polipeptídicas com as estruturas terciárias definidas. A natureza da interação entre as diferentes cadeias é do tipo não covalente, podendo gerar desde um dímero (duas cadeias) até

um oligômero (mais de duas cadeias). Portanto, apenas proteínas que possuem duas ou mais cadeias polipeptídicas apresentam estrutura quaternária (MORAES et al., 2013).

Juntamente com as propriedades químicas características das cadeias laterais de seus aminoácidos, a conformação da proteína determina sua função (Figura 14). Essa função pode ser (LODISH et al., 2014):

- Estrutural – organização do genoma, das organelas, do citoplasma, de complexos proteicos e de membranas no espaço tridimensional;
- Reguladora – controle da atividade proteica;
- Sinalizadora – monitoramento do ambiente e transmissão de informação;
- Transportadora – transporte de pequenas moléculas e íons através de membranas;
- Catalisadora – catálise de reações químicas (por enzimas);
- Motora – geração de força para o movimento.

Figura 14 – Visão geral das estruturas hierárquicas e função da proteína



Fonte: adaptado de LODISH et al., 2014.

Um dos principais eventos na interação dos implantes com o tecido circundante é a adsorção das proteínas do sangue e proteoglicanos na superfície dos mesmos (HEALY;

DUCHEYNE, 1992). Essa etapa é crucial pois, como dito na sessão anterior, ela determina as etapas subsequentes de adesão e proliferação celular (ABDOLMALEKI, MALLAKPOUR, BORANDEH, 2011; WANG et al., 2015). Portanto, a imobilização de determinados tipos de proteína sob a superfície de biomateriais pode torná-los mais adequados em termos de biocompatibilidade e eventual bioatividade, dependendo do tipo de proteína utilizada. Para garantir adesão celular, posterior proliferação e não desencadear respostas imunológicas indesejadas, as proteínas mais empregadas são aquelas que apresentam interação com células do tecido conjuntivo, como osteoblastos e com os constituintes do plasma, como plaquetas e leucócitos (SIN et al., 2015). Dentre elas, a albumina é reconhecida como um principal componente do sangue e a mais abundante do sistema circulatório (AMEEN et al., 1996). Quando imobilizada na superfície do material, essa proteína pode desempenhar um papel na bioatividade e promover melhora na resistência à corrosão do implante (ANBAZHAGAN et al., 2016; D'ELIA et al., 2017; HÖHN et al., 2017), sendo esta a proteína de estudo no presente trabalho.

Entre outras proteínas, a vitronectina e fibronectina podem ser empregadas para promover adesão celular (SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013). O fibrogênio está envolvido no processo de hemocompatibilidade e está relacionado com processos de homeostase e promoção da adesão celular *in vitro* (CACCIAFESTA et al., 2000; WANG et al., 2015). Proteínas relacionadas ao sistema imunológico como a lisozima e algumas globulinas também podem ser empregadas. Essas proteínas controlam a resposta imunológica de um material estranho ao ambiente biológico, diminuindo as chances de rejeição do implante (WILSON et al., 2005). Há também o uso de proteínas estruturais, como o colágeno, que são relevantes no processo de interação entre tecidos conjuntivos e a superfície de biomateriais (LI et al., 2016). Fatores de crescimento, como os BMPs (*bone morphogenetic proteins*) e TGF β (*transforming growth factor beta*), são conhecidos por promoverem um efeito osteoindutivo (LINKHART et al. 1996; URIST, 1965) e, portanto, podem ser empregados para promover osseointegração sob a superfície de implantes (CHEN et al., 2012; PISKOUNOVA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de uma nova geração de superfícies de base de Ti bio-multifuncional para implantes osseointegradores, fazendo avançar o conhecimento científico sobre diferentes técnicas de modificação de superfície, a fim de se obter superfícies biologicamente seletivas, promovendo simultaneamente uma adequada adesão de células osteoblásticas e minimizando as possibilidades de colonização por microrganismos indesejados, juntamente com alta resistência à corrosão e à tribocorrosão.

3.2 Objetivos Específicos

Crescer filmes finos de TiO_2 na fase rutilo sobre substratos de titânio metálico grau IV, utilizando a técnica *Reactive RF magnetron sputtering* e posterior caracterização dos mesmos.

Avaliar o efeito da hidrofiliabilidade fotoinduzida nas superfícies dos filmes de TiO_2 e estabelecer o melhor tempo de exposição dessas superfícies em luz ultravioleta nos critérios de maior molhabilidade e energia de superfície para uma otimização do processo de funcionalização das superfícies.

Estudar os aspectos de adsorção e as conformações espaciais das moléculas bifuncionais (espaçadoras) MPA, APTMS e APPA nas superfícies hidroxiladas de TiO_2 utilizando a técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).

Funcionalizar a superfície do TiO_2 com a proteína albumina de soro bovino (BSA) diretamente sobre a superfície do óxido e sobre os grupos bifuncionais.

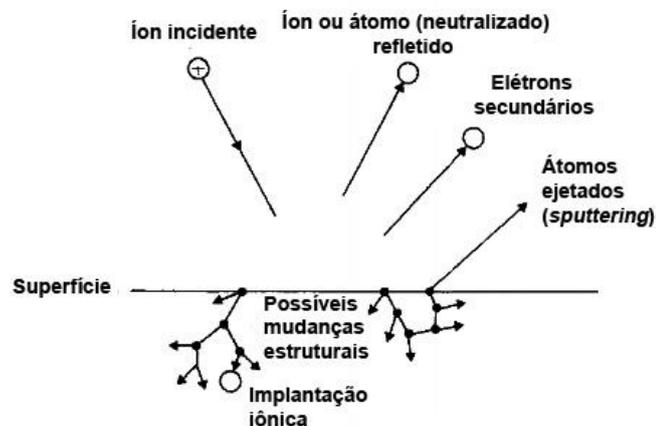
Analisar a resposta biológica de células ósseas quando em contato direto com as superfícies modificadas, bem como a influência que as moléculas bifuncionais utilizadas na imobilização da BSA sobre a superfície do TiO_2 podem desempenhar, por meio de testes de adesão, viabilidade, proliferação e diferenciação celular.

4 MATERIAIS E TÉCNICAS

4.1 Técnica de Deposição por *Reactive RF Magnetron Sputtering*

A técnica de deposição física de filmes conhecida como *sputtering* é apresentada na Figura 15, onde estão mostradas as interações decorrentes da incidência de um íon sobre a superfície de um dado material. Como pode ser observado, a incidência de um íon sobre a superfície do material pode acarretar na reflexão do mesmo, com a probabilidade deste íon ser neutralizado durante o processo. Há a possibilidade dessa interação causar a ejeção de um elétron, conhecido como elétron secundário. Este íon também pode penetrar e permanecer no material (implantação iônica) e/ou pode desencadear uma série de colisões entre os átomos do alvo, possivelmente levando a ejeção de um desses átomos. Essa ejeção dos átomos do alvo pela colisão de um átomo ionizado é conhecida como *sputtering* (CHAPMAN, 1980). O impacto do íon com o material pode ocasionar alguns rearranjos estruturais no material colidido (formação de vacâncias ou átomos intersticiais, por exemplo).

Figura 15 – Interações entre íon e superfície

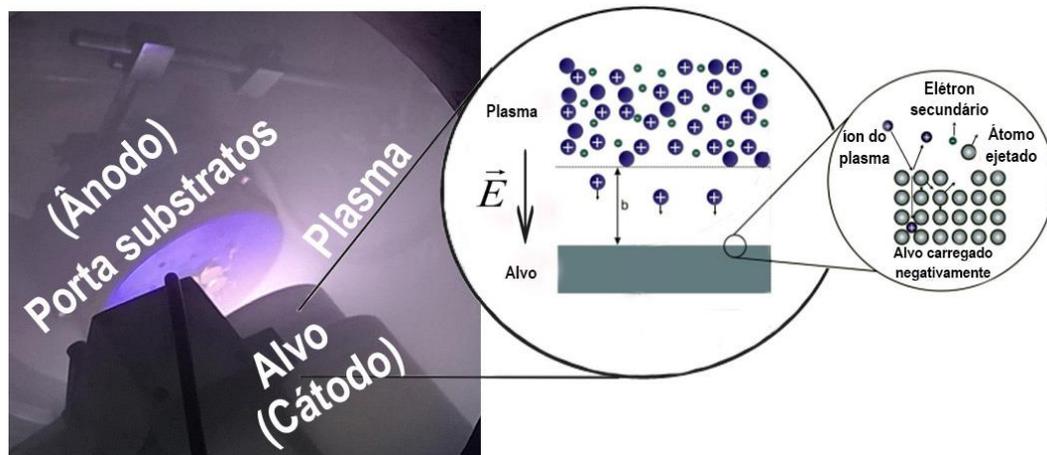


Fonte: adaptado de CHAPMAN, 1980.

Resumidamente, o processo de deposição por *reactive RF magnetron sputtering* ocorre da seguinte maneira: o alvo (cátodo) é bombardeado por íons energéticos que são produzidos por excitação elétrica de um gás. O processo de excitação eletrônica ocorre na região do plasma, gerado devido a diferença de potencial aplicada entre o cátodo e ânodo sob baixa pressão, onde estão presentes elétrons, íons e espécies neutras. No processo de bombardeamento ocorre a ejeção dos átomos da superfície do material do alvo e também a ejeção de elétrons secundários, como representado na Figura 16. Os átomos ejetados

atravessam o plasma atingindo o substrato (ânodo) e, ao longo de consecutivas ejeções, ocorre crescimento do filme sob o substrato. Os elétrons secundários ejetados ficam aprisionados na região do plasma, contribuindo no processo de ionização das moléculas do gás utilizado. Esse aprisionamento ocorre através da presença de um campo magnético, por isso o nome *magnetron* (KELLY, ARNELL, 2000; SMITH, 1995).

Figura 16 – Esquema do processo de sputtering dentro da câmara de deposição



Fonte: adaptado de SMITH, 1995.

Nesse trabalho foram utilizados alvo e substratos de titânio metálico Grau 4. Para a geração do plasma e bombardeamento iônico foi utilizado o argônio como gás. Por se tratar de um processo de *sputtering* reativo, onde nesse caso ocorre a oxidação do titânio, também foi utilizado o gás oxigênio para o crescimento dos filmes de TiO_2 . O equipamento utilizado (Figura 17) foi um sistema comercial *Kurt J. Lesker*, composto por uma câmara de alto vácuo de aço-inox, que possui um analisador de gases residuais, gerador de rádio frequência (RF) e um sistema de bombeamento turbomolecular (1000 L/s). O aquecimento dos substratos foi feito por intermédio de um controlador eletrônico de temperatura que atinge $\sim 900^\circ\text{C}$. A rádio frequência (13,56 MHz) foi aplicada para reduzir efeitos de carga elétrica acumulada em alvos isolantes. Os parâmetros de deposição estão dispostos na seção 5.2.

Figura 17 – (a) Foto da câmara de sputtering onde foram crescido os filmes; (b) Desenho esquemático da configuração atual do interior da câmara de deposições: 1- alvo (cátodo); 2- imãs permanentes; 3-sistema de resfriamento do alvo; 4- shield; 5- isolante elétrico; 6- cabo de rádio frequência (RF); 7-obturador (shutter); 8- pinças; 9-substratos; 10- porta-substratos; 11- sistema de aquecimento dos substratos; 12- admissão dos gases; 13- sistema de vácuo



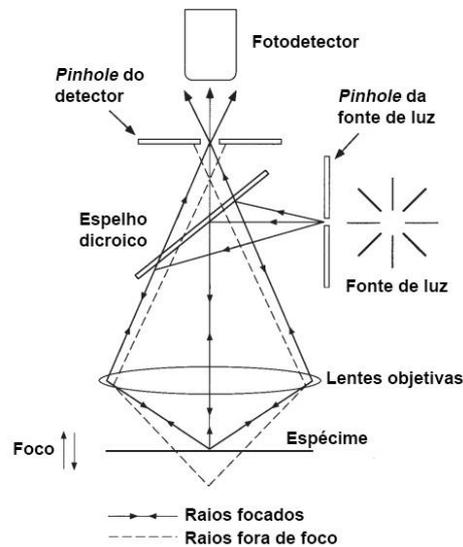
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

4.2 Técnica de Caracterização

4.2.1 Microscopia Óptica Confocal

A microscopia óptica permite a obtenção de informações a respeito da natureza física de superfícies, tais como rugosidade, forma e volume da amostra. Nessa técnica, um conjunto de lentes formam um cone de luz (laser) em uma profundidade predeterminada da amostra em estudo. Ao mudar o ponto focal sem alterar a profundidade, é possível iluminar todo o plano em estudo (ponto a ponto). Quando a luz retorna pelo mesmo caminho óptico, ela é separada e passa por um pequeno orifício chamado *pinhole*, o qual separa a luz do ponto focado e elimina a luz emitida por pontos fora de foco (Figura 18). Deste modo, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores, apenas a luz dos pontos em foco é registrada. Os sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador que, então, constrói imagens bidimensionais extremamente precisas. Já a construção de imagens tridimensionais se dá pela obtenção de sucessivas imagens de diferentes planos da amostra (TRINO, 2014; PADDOCK, 1999).

Figura 18 – Representação do caminho óptico em um microscópio óptico confocal



Fonte: adaptado de PADDOCK, 1999.

Os dados de microscopia óptica confocal analisados nesse trabalho foram obtidos pelo microscópio DCM 3D (Leica). Para as medidas de rugosidade, foram selecionadas áreas de $636,61 \times 477,25 \mu\text{m}^2$ com resolução total de 500 vezes de aumento, com precisão de 200 nm. As medidas realizadas geram uma imagem tridimensional e um gráfico da rugosidade superficial da amostra.

4.2.2 Difração de Raios X (DRX)

Para a determinação das fases cristalinas e verificação de possíveis fases secundárias, provenientes da síntese do material em estudo, foi utilizada a técnica de difração de raios X (DRX). Essa técnica também pode fornecer informações sobre a composição, estrutura, tamanho médio dos cristalitos, fração cristalizada e parâmetros de rede.

Nos sólidos cristalinos, os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Quando os raios X incidem sobre uma estrutura cristalina, ocorre o fenômeno da difração. Uma vez que esses raios difratam, eles podem sofrer interferência construtiva e destrutiva, formando um padrão de difração (CULLITY, 2001). A análise desse padrão é feita através de um gráfico do ângulo de incidência *versus* intensidade. Embora o fenômeno da difração de raios X em sólidos e o respectivo uso no estudo das propriedades estruturais dos sólidos requeira um tratamento mais profundo, uma maneira simples, porém adequada de entender o fenômeno é pela Lei de Bragg (Equação 3), a qual estabelece a relação entre o ângulo de

difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina):

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (3)$$

Onde:

n = número inteiro

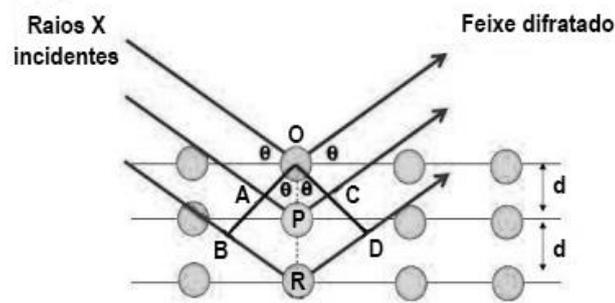
λ = comprimento de onda dos raios X incidentes

d = distância interplanar

θ = ângulo de difração.

Na Figura 19 é possível observar um esquema representativo da difração de raios X em um cristal. Nessa figura, a soma das distâncias $AP + PC$ é um múltiplo inteiro do comprimento de onda incidente.

Figura 19 – Esquema representativo da difração de raios X em um cristal



Fonte: CARACELLI, 2008.

Além disso, de acordo com o triângulo OPC, as distâncias AP e PC são iguais a $d \cdot \sin(\theta)$. Matematicamente, temos:

$$AP + PC = n \cdot \lambda \quad (4) \quad \text{e} \quad AP = PC = d \cdot \sin(\theta) \quad (5)$$

Substituindo as equações, temos, portanto:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta) \quad (6)$$

Para que a difração de raios X possa ser utilizada na análise de uma fase cristalina, é necessário que a equação acima seja satisfeita (Lei de Bragg). Essa lei impõe uma

correspondência entre o comprimento de onda (λ) e o ângulo (θ) e é uma consequência direta da periodicidade da rede cristalina. Para os ângulos que satisfazem essa equação, têm-se interferências construtivas e, para os outros ângulos, têm-se interferências destrutivas (CULLITY, 2001).

Os difratogramas das amostras em estudo foram obtidos à temperatura ambiente em um difratômetro da marca Rigaku, modelo MiniFlex 600, da UNESP de Bauru, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), operando a 40 kV e corrente de 15 mA. As medidas foram realizadas na geometria Bragg-Brentano theta-2theta numa faixa de 20 a 80°, a uma taxa de 10 °/min e passo de 0,004 °.

4.2.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A espectroscopia na região do UV-Vis é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de materiais semicondutores. Ao incidir ondas eletromagnéticas monocromáticas (em um determinado comprimento de onda), não polarizadas e perpendiculares à superfície da amostra, é possível medir o quanto de luz foi absorvida pela mesma. A intensidade de luz antes de passar pela amostra é denominada I_0 e a intensidade de luz que atravessa a amostra é denominada I . A razão entre I e I_0 é denominada transmitância, que é geralmente expressa em porcentagem (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). Além disso, também é possível obter valores de refletância e absorbância do material. No caso da refletância, o espectrômetro mede a intensidade de luz refletida de uma amostra (I), e, geralmente, compara com a intensidade de luz refletida de um material de referência (I_0). A razão I/I_0 é chamada de refletância, e é geralmente expressa em porcentagem (R%).

A espessura e o índice de refração do filme a ser caracterizado podem ser obtidos a partir das franjas de interferência de seu espectro de transmitância e cálculos pelo método de Cisneros (1998). Para determinar o índice de refração do filme é necessário conhecer a transmitância nas ordens ímpares e os índices de refração tanto do meio incidente quanto do substrato. Dada uma região de comprimento de onda onde o filme é transparente, usa-se a seguinte equação (TONIATO, 2013):

$$T_{\text{ímpar}} = \frac{4 \cdot n_0 \cdot n_1^2 \cdot n_2}{(n_0^2 + n_1^2) \cdot (n_1^2 + n_2^2)} \quad (7)$$

Onde:

$T_{\text{ímpar}}$ = valor da transmitância nos vales do espectro de transmissão

n_0 = índice de refração do ar

n_1 = índice de refração do filme

n_2 = índice de refração do substrato

Para a obtenção da espessura do filme, são utilizadas as seguintes equações (CISNEROS, 1998):

$$m = \frac{4 \cdot n_1 \cdot d}{\lambda_m} \quad (8)$$

E:

$$m \cdot \lambda_m \approx (m + 1) \cdot \lambda_{(m+1)} \quad (9)$$

Onde:

m = ordem de interferência (número inteiro)

λ_m = valor do comprimento de onda (em nanômetros) para cada extremo de interferência

n_1 = índice de refração do filme

d = espessura do filme (em nanômetros)

As equações 8 e 9 também podem ser utilizadas para estimar espessuras de filmes através medida de refletância. No caso do filme de TiO_2 sob substrato de titânio, dentro das regiões de comprimento de onda utilizadas para o cálculo, os máximos são referentes à ordem de interferência ímpar ($m+1$) e os mínimos são referentes à ordem de interferência par (m).

Os espectros obtidos no modo refletância foram obtidos pelo espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 1050, numa faixa de comprimento de onda de 250 a 2500 nanômetros.

4.2.4 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

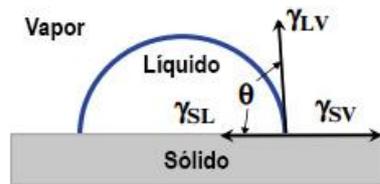
A ideia de molhabilidade foi primeiro descrita por Young (1805) dois séculos atrás. De maneira simples, a molhabilidade da superfície de um sólido por um líquido pode ser quantitativamente descrita pelo perfil de uma gota líquida, mais especificamente pelo ângulo tangencial na interface sólido-líquido-ar. Esse ângulo de contato θ é definido como o ângulo de Young ou ângulo de contato estático. Ele é resultado do equilíbrio mecânico entre três tensões superficiais (Figura 20): tensão superficial do líquido (γ_{LV}), tensão superficial do sólido (γ_{SV}) e a tensão interfacial sólido-líquido (γ_{SL}). Essas três tensões se relacionam de acordo com a equação de Young:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{LV} \cdot \cos(\theta) + \gamma_{SL} \quad (10)$$

Ou:

$$\cos(\theta) = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad (11)$$

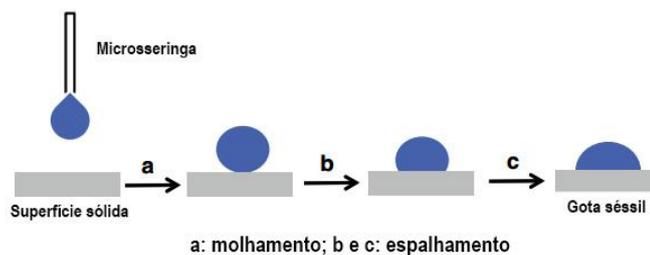
Figura 20 – Diagrama das tensões atuantes em uma gota séssil, sendo elas tensão superficial do líquido (γ_{LV}), tensão superficial do sólido (γ_{SV}) e a tensão interfacial sólido-líquido (γ_{SL})



Fonte: adaptado de LAW e ZHAO, 2016.

A medida de ângulo de contato, portanto, tem sido uma ferramenta indispensável para a caracterização de superfícies e estudos de molhabilidade devido à sua simplicidade e versatilidade. O método da gota séssil é o mais amplamente utilizado para tal medição. Esse método é realizado em atmosfera de laboratório aberto, onde uma gota de volume conhecido é suavemente depositada sobre a superfície do material sólido em estudo por meio de uma microseringa. Para que as medidas sofram menor interferência possível, o líquido utilizado para o teste deve possuir o maior grau de pureza e o aparato utilizado deve estar em uma mesa nivelada e livre de vibração, de maneira que a gota não seja afetada por qualquer tipo de ruído vibracional. Após a gota entrar em contato (molhar) a superfície do material, a mesma se espalha, conforme representado na Figura 21.

Figura 21 – Esquema da formação de uma gota séssil durante uma medida de ângulo de contato

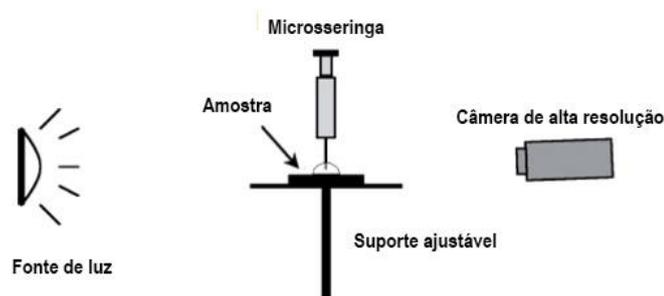


Fonte: adaptado de LAW e ZHAO, 2016.

Como regra geral, deve-se permitir que a gota se estabilize para atingir seu estado estático final antes de tomar qualquer medida. Para líquidos comuns, como água, hexadecano e diiodometano, o tempo necessário para estabilização da gota é de menos de um segundo. O ângulo de contato é obtido pelo ajuste de curva do perfil da gota através de softwares específicos (LAW; ZHAO, 2016). Essa técnica é realizada por meio de aparelhos conhecidos como goniômetros.

Basicamente, os goniômetros são compostos por um suporte ajustável, localizado entre uma fonte de luz e uma câmera de alta resolução (Figura 22). Além disso, um sistema de dosagem líquida acoplado a microseringa é utilizado para padronizar o volume da gota. Ao realizar medidas de ângulo de contato com líquidos polares e apolares, cujos valores de tensão superficial dos mesmos sejam conhecidos, é possível estimar a energia de superfície de um dado sólido, também conhecida como tensão interfacial ou superficial. Essa estimativa também é realizada pelo mesmo software que determina os ângulos de contato. A energia de superfície é de grande importância quando se trata do estudo de superfícies, uma vez que esta pode indicar a capacidade de uma superfície em interagir espontaneamente com outros materiais, formando por exemplo, novas ligações (CALLOW et al., 2005). As medidas de ângulo de contato e energia de superfície desse trabalho foram obtidas pelo goniômetro Ramé-Hart 100-00. Como líquido polar e apolar foram utilizados água e diiodometano, respectivamente.

Figura 22 – Diagrama esquemático simplificado de um goniômetro



Fonte: adaptado de HOLLANDER, 2004.

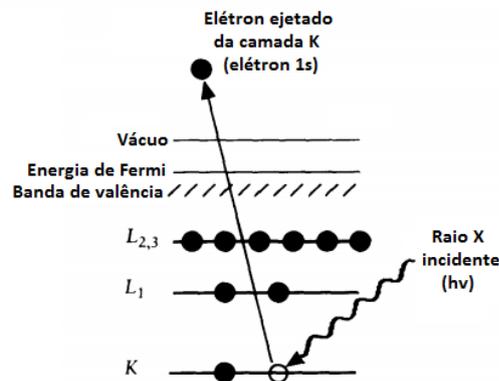
4.2.5 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) é uma técnica que pode ser utilizada para a investigação de

superfícies. Esta técnica fornece informações sobre a composição elementar, permite a determinação de estados de oxidação e a realização de análises quantitativas (KILLIAN, 2013).

Baseia-se numa forma especial de fotoemissão, na ejeção de um elétron de caroço após a excitação do mesmo por um fóton de raio X de energia $h\nu$ (WATTS; WOLSTENHOLME, 2003), conforme a Figura 23. As energias dos fotoelétrons emitidos são então analisadas pelo espectrômetro de elétron (detector) e os dados são apresentados em um gráfico de intensidade *versus* energia (espectro do fotoelétron induzido pelo raio X).

Figura 23 – Diagrama esquemático de um processo de fotoionização de um elétron 1s que ocorre no XPS



Fonte: adaptado de WATTS e WOLSTENHOLME, 2003.

A energia cinética (EC) do elétron é a quantidade experimental medida pelo espectrômetro. Entretanto, essa energia é dependente da energia do fóton do raio X utilizado. A energia de ligação do elétron (EL) é o parâmetro que especificamente identifica o elétron, tanto em termos do elemento ao qual pertence quanto em termos do nível de energia atômica. A relação entre os parâmetros envolvidos numa medida de XPS são:

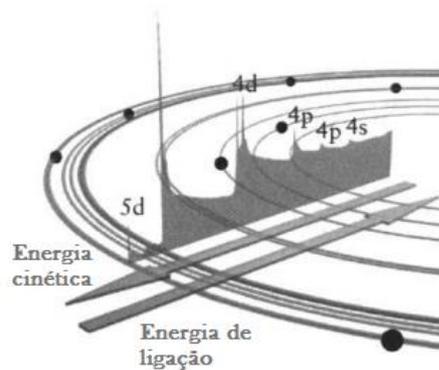
$$EL = h\nu - EC - W \quad (12)$$

Onde $h\nu$ é a energia do fóton, EC é a energia cinética do elétron e W é a função trabalho do espectrômetro. As três quantidades do lado direito da equação acima são conhecidas ou mensuráveis. Portanto, é uma simples questão de calcular a energia de ligação do elétron. Na prática, essa tarefa será realizada pelo controle eletrônico ou sistema de dados

associado ao espectrômetro e o operador simplesmente seleciona uma escala de energia cinética ou de ligação mais adequada (WATTS; WOLSTENHOLME, 2003).

O espectro fotoelétrico indica a estrutura eletrônica de um elemento com bastante precisão, uma vez que todos os elétrons com uma energia de ligação menor que a energia do fóton estarão apresentadas no espectro. Isso é ilustrado na Figura 24, onde o espectro de XPS do chumbo é sobreposto sobre a representação dos orbitais dos elétrons. Os elétrons que foram excitados e ejetados do material sem perda de energia contribuem para os picos característicos no espectro. Aqueles que sofrem espalhamento inelástico e sofrem perda de energia contribuem para o *background* do espectro (WATTS e WOLSTENHOLME, 2003).

Figura 24 – Espectro fotoelétrico do chumbo superposto sobre uma estrutura eletrônica esquemática do átomo de chumbo para ilustrar que cada orbital dá origem as linhas desse espectro



Fonte: adaptado de WATTS e WOLSTENHOLME, 2003.

As medidas de XPS foram realizadas em um espectrômetro da marca Kratos (AXIS-165), usando uma fonte monocromática de raios X de Al K α . Cada amostra foi analisada num ângulo de 54.7°, definido como o ângulo de emissão relativo à superfície. A resolução da energia era de 0.45 eV. A energia de passo dos espectros survey foi de 80 eV e dos espectros individuais de alta resolução foi de 20 eV.

Com o objetivo de corrigir efeitos de carregamento, a energia de ligação do pico C 1s foi normalizada em 284.8 eV e em alguns casos a energia de ligação do pico Ti 2p $_{3/2}$ foi normalizada em 458.8 eV. O pacote computacional CasaXPS foi utilizado para o estudo e análise das composições químicas de superfície das amostras preparadas.

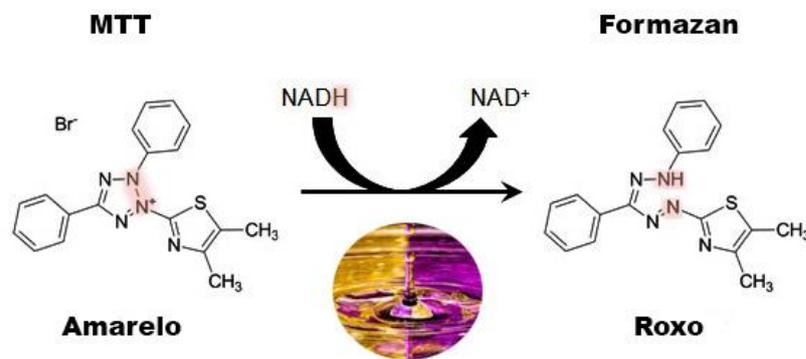
4.3 Técnica para Avaliação do Desempenho Biológico

4.3.1 Redução do MTT

O ensaio de redução do MTT é um método colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade e/ou proliferação celular e se baseia na medição da atividade mitocondrial de células metabolicamente viáveis. Nele, é empregado o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, sal de MTT, que é amarelo e solúvel em água. Ao ser reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial de células metabolicamente viáveis, ocorre a formação de cristais formazan roxos e insolúveis em água.

A quantidade de MTT formazan produzido pode ser determinada espectroscopicamente ao solubilizar o composto em um solvente adequado. Entretanto, esse ensaio não consegue distinguir entre um efeito citotóxico (morte celular) e um efeito citostático (crescimento celular reduzido) (PLUMB, 2004; RISS et al., 2016). Portanto, o ensaio por cristal violeta deve ser realizado de maneira complementar aos ensaios de MTT.

Figura 25 – Estruturas do MTT e formazan após redução pela NADH desidrogenase, que é uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna das células



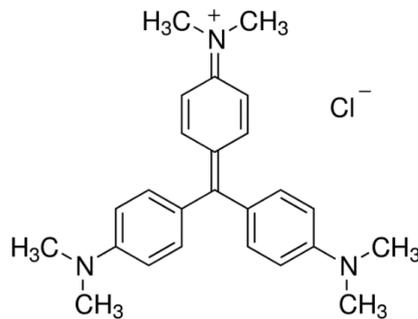
Fonte: adaptado de RISS et al., 2016.

4.3.2 Cristal Violeta

Complementarmente ao ensaio de redução do MTT, essa técnica colorimétrica é utilizada para avaliar a viabilidade e/ou proliferação por meio da adesão celular. Células aderentes destacam-se das placas de cultura celular ou de materiais durante a morte. Essa característica pode ser utilizada para quantificação indireta da morte celular e para determinar diferenças na proliferação após estimulação com agentes potencialmente citotóxicos. Um método simples para a detecção de células aderidas é através da coloração das mesmas com o

corante cristal violeta (cloreto de hexametilpararosanilina), que se liga às proteínas e DNA. Células que sofrem morte celular, perdem sua aderência e são subsequentemente perdidas da população de células aderidas, reduzindo a intensidade da coloração de cristal violeta em uma cultura. Dessa forma, após a remoção das células mortas, a quantidade de células viáveis pode ser determinada espectroscopicamente, de acordo com a intensidade da coloração do cristal violeta (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

Figura 26 – Estrutura química do cristal violeta



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma evolução do método PCR, isso porque ela permite realizar a quantificação do fragmento de DNA amplificado a cada ciclo, dispensando a eletroforese. Seu princípio se baseia na duplicação de cadeias de DNA repetidas vezes, gerando quantidade do material suficiente para realizar diversas análises. Com apenas um único fragmento de DNA é possível reproduzir milhões de cópias. Portanto, o objetivo dessa técnica é fabricar quantidade suficiente da região de interesse do DNA, de modo que possa ser analisada e utilizada (MCPHERSON; MØLLER, 2006). Sua aplicação compreende várias áreas como identificação genética, medicina forense, análises clínicas, diagnóstico de doenças, controle de qualidade industrial, entre outros.

Assim como a replicação de DNA em um ser vivo, essa técnica requer uma enzima DNA polimerase que reconstrua novas fitas de DNA usando as existentes como moldes. A DNA polimerase tipicamente utilizada nessa técnica, é chamada de *Taq polimerase*, obtida a partir de uma bactéria resistente ao calor da qual ela foi isolada (*Thermus aquaticus*). Seu grande uso se deve a alta estabilidade ao calor, uma vez que a técnica de qPCR ou PCR passa por estágios de aquecimento para desnaturar a amostra de DNA (MCPHERSON; MØLLER, 2006).

Além da enzima DNA polimerase, essa técnica requer a presença dos *primers*, amostra de DNA e os nucleotídeos que formam DNA (dNTPs). Os *primers* são uma sequência curta de nucleotídeos que fornecem um ponto de partida para a síntese do trecho de DNA a ser copiado, que identificam/marcam o trecho de interesse. Em uma reação de PCR ou qPCR, o pesquisador determina a região do DNA que será copiada através dos primers escolhidos. Pelo menos dois *primers* são necessários para que o processo ocorra, sendo eles complementares a cada uma das fitas de DNA. Os *primers* se ligam à molécula de DNA por pareamento de bases complementares e, a partir deste momento, a DNA polimerase completa a sequência da fita iniciada pelos *primers* (Figura 27b). De maneira simplificada, o processo de cópia do trecho de DNA através dessa técnica ocorre em três etapas. Na primeira etapa (Desnaturação), ocorre o aquecimento para que ocorra a separação as fitas de DNA (quebra das ligações de hidrogênio). Uma vez separadas as fitas, o sistema resfria a reação para que os *primers* possam se ligar às sequências complementares do DNA da amostra (segunda etapa – Anelamento). Na terceira e última etapa (Extensão), a temperatura é elevada novamente para que a DNA polimerase complete as fitas a partir de onde os *primers* se ligaram, sintetizando assim trechos das fitas de DNA iniciadas pelos *primers* utilizando os nucleotídeos (dNTPs), de acordo com as regras de pareamento de bases. Ao final dessas três etapas, completa-se um ciclo (Figura 27a). São, em geral, realizados de 25 a 35 ciclos, a fim de se obter milhões de cópias do trecho de DNA (MCPHERSON; MØLLER, 2006).

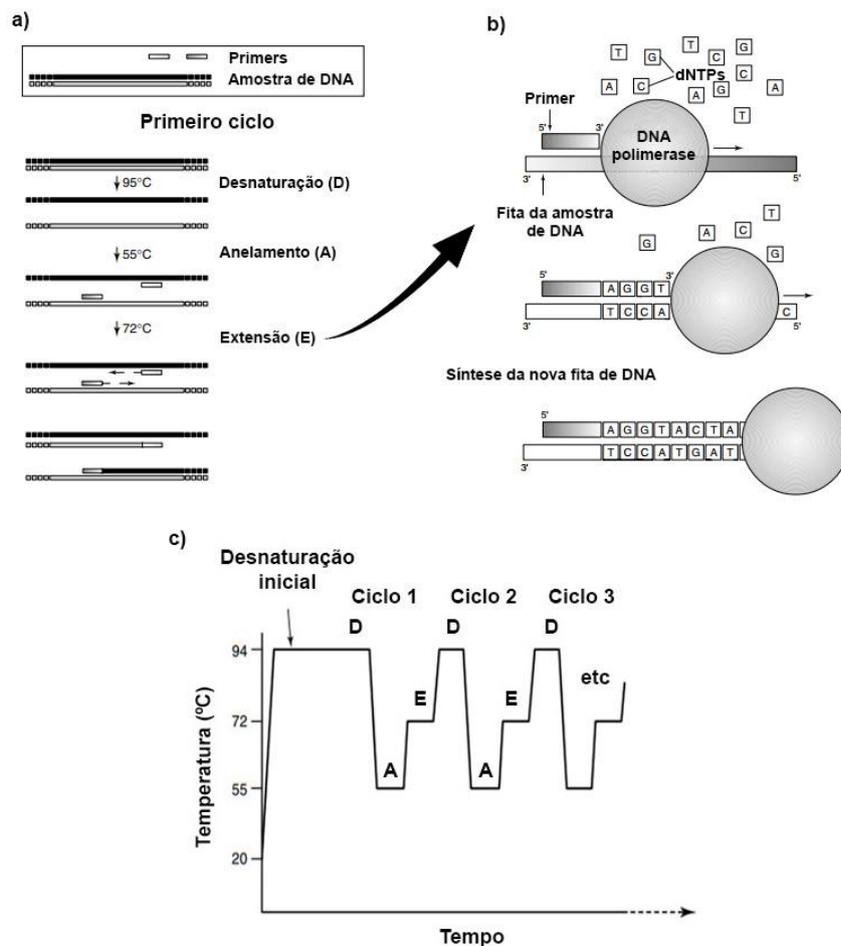
Como dito anteriormente, essa técnica permite quantificar a cada ciclo os fragmentos de DNA copiados. Essa detecção ocorre por meio de um sensor fotossensível acoplado ao equipamento. Além dos componentes essenciais para a amplificação de trechos de DNA, são utilizadas moléculas que podem ser específicas (ex: *SYBR Green*) ou não específicas (ex: *TaqMan*) ao trecho de DNA copiado. Estas moléculas emitem luz em determinados comprimentos de onda que são detectadas pelo sensor e a quantidade de cópias é proporcional à intensidade de luz emitida (MCPHERSON, MØLLER, 2006; GINZINGER, 2002).

Outra importante ferramenta que pode ser realizada pelo qPCR é a transcrição reversa. A partir dela é possível medir/analisar a expressão de um determinado gene, seja de uma célula ou um vírus RNA. Nesse caso, ao invés da amostra de DNA, é utilizado o RNA mensageiro (mRNA), que é submetido ao processo de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA). Esse processo ocorre por intermédio da enzima transcriptase reversa, que copia o mRNA, produzindo uma das fitas do cDNA e a enzima RNase degrada a fita de RNA. Em seguida, a DNA polimerase monta a segunda fita do cDNA. A partir desse

momento, é obtido o cDNA e este passará pelo ciclo anteriormente dito de amplificação do trecho de DNA (MCPHERSON, MØLLER, 2006; GINZINGER, 2002).

As soluções foram colocadas em placas de 96 poços e analisadas em um leitor de PCR em Tempo Real da marca *Applied Biosystems*, modelo *QuantStudio 3*, do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular da UNESP, campus de Botucatu.

Figura 27 – a) Diagrama do primeiro ciclo de uma reação de PCR, onde passa pelos estágios de desnaturação (D), anelamento (A) e extensão (E); b) Extensão do primer por uma DNA polimerase. O primer anela com uma sequência na cadeia da fita de DNA da amostra (após desnaturação) e a enzima DNA polimerase completa a fita de DNA iniciada pelo primer utilizando os nucleotídeos (dNTPs). Como resultado, são obtidas duas cópias de um trecho específico amostra do DNA utilizado e esse número cresce exponencialmente a cada ciclo; c) Representação do ciclo térmico durante uma reação de PCR



Fonte: Adaptado de MCPHERSON e MØLLER, 2006.

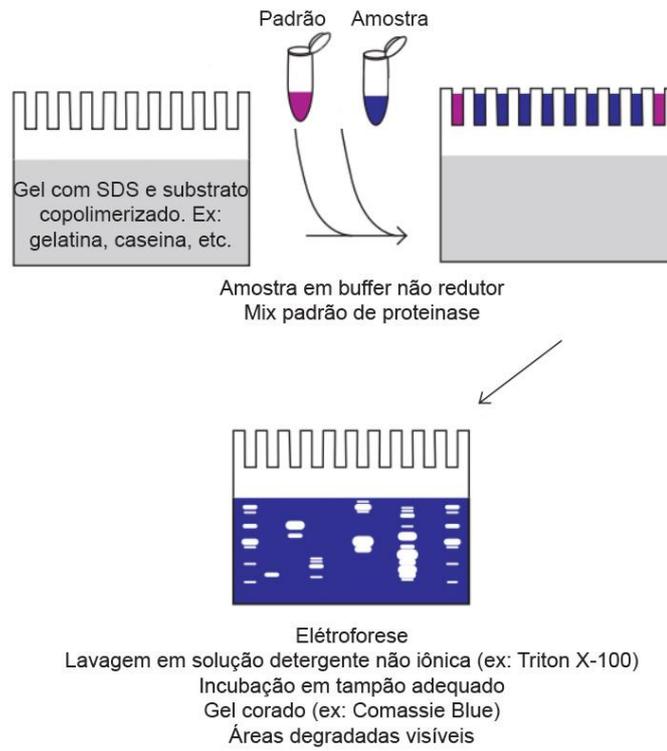
4.3.4 Zimografia

A zimografia é uma técnica proteômica eletroforética que permite a visualização do número e tamanho aproximado de enzimas em amostras biológicas com base na degradação de um substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese. Entende-se por eletroforese como o termo usado para descrever o movimento de partículas em um gel ou fluido dentro de um campo elétrico relativamente uniforme de modo a separá-las, geralmente por peso molecular.

A técnica consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, copolimerizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e com o substrato preferencial da enzima em análise. A zimografia com substrato de gelatina é uma técnica amplamente usada no estudo de metaloproteases, especialmente as metaloproteases de matriz (MMPs), que são uma família de endopeptidases zinco-dependentes e atuam como importantes reguladores dos processos fisiológicos, como a angiogênese, morfogênese e reparação tecidual (PAGE-McCAW et al., 2007; GHAJAR et al., 2008). Ao desnaturar as enzimas e gerando a todas elas uma mesma carga elétrica por meio da ação do SDS e outros componentes, a aplicação de uma corrente elétrica possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação pela diferença de peso e/ou tamanho (SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005; KUPAI et al., 2010).

Após esse processo eletroforético, as enzimas são renaturadas pela remoção do SDS através da lavagem do gel com uma solução de um detergente não iônico, como o Triton-X100 (LA ROCCA et al., 2004; FIETZ et al., 2008; ROOMI et al., 2012). Uma vez que as enzimas são renaturadas, o gel que as contém é incubado em um tampão adequado, em condições de tempo e temperatura pré-determinadas, de acordo com o protocolo utilizado. Durante esse período de incubação, as proteases renaturadas degradam o substrato copolimerizado no gel em uma zona ao redor de sua posição de eletroforese. Estas zonas são visualizadas ao corar o gel com *Comassie Blue*, onde o gel inteiro fica azul e as áreas de digestão aparecem como zonas transparentes. As proteases são então identificadas comparando as áreas diferidas com os padrões de peso moléculas e/ou fazendo testes de inibição com inibidores específicos a certas classes de proteases (LA ROCCA et al., 2004; SNOEK-VAN BEURDEN, VON DEN HOFF, 2005; KUPAI et al., 2010).

Figura 28 – Esquema simplificado das etapas realizadas na zimografia em gel



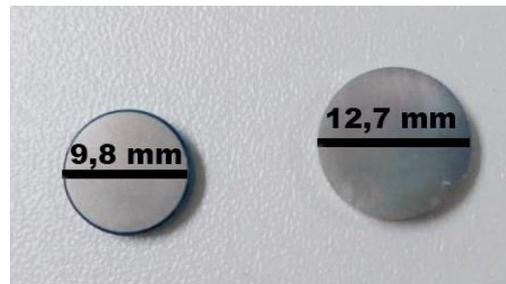
Fonte: adaptado de VANDOOREN, 2013.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Preparo do Substrato

Nesse trabalho, foram utilizados discos de titânio grau IV com 2,0 mm de espessura e 9,8 mm de diâmetro como substratos para as etapas de caracterização do material. Para os ensaios biológicos foram utilizados discos de titânio grau IV com 3,0 mm de espessura e 12,7 mm de diâmetro como substratos. Como os testes biológicos, de maneira geral, dependem de uma análise estatística cuja confiabilidade dos resultados é proporcional à área de superfície da amostra onde células são cultivadas, optou-se por utilizar substratos maiores (Figura 29). Com o intuito de uniformizar a superfície dos substratos, os mesmos foram lixados em uma politriz (Arotec Aropol-2V). As lixas utilizadas foram lixas d'água de granulometria 320, 400, 600 e 800 mesh, respectivamente. Ao final do lixamento, os substratos foram inseridos no ultrassom (UNIQUE – USC-700) durante 30 minutos, sendo que, desse total, ficaram 10 minutos imersos em água deionizada, 10 minutos em álcool isopropílico e 10 minutos em água deionizada, respectivamente. Tal processo tem como objetivo a remoção da sílica da lixa nos substratos.

Figura 29 – Discos de titânio grau IV utilizados como substratos



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

5.2 Deposição dos Filmes de TiO₂

Os filmes de TiO₂ foram crescidos pela técnica *reactive RF (Radio Frequency) magnetron sputtering*, utilizando um sistema comercial *Kurt J. Lesker*. Para melhor uniformização da superfície dos substratos, uma camada de titânio foi crescida sobre os mesmos para então dar início ao crescimento dos filmes de óxido (Tabela 1). Baseado em trabalhos anteriores e em Mráz (2011), o crescimento de filmes na fase rutilo com espessura

entre 500 nm e 1 μm de espessura, foram obtidos utilizando os parâmetros dispostos na Tabela 2, abaixo.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para o crescimento da camada de titânio.

Temperatura do porta-substrato ($^{\circ}\text{C}$)	Fluxo de Oxigênio (sccm)	Fluxo de Argônio (sccm)	Potência de RF (W)	Pressão total (torr)	Tempo de deposição (min)
600	0,0	40,0	290	$2,3 \times 10^{-3}$	10

Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para a deposição dos filmes de TiO_2 na fase rutilo.

Temperatura do porta-substrato ($^{\circ}\text{C}$)	Fluxo de Oxigênio (sccm)	Fluxo de Argônio (sccm)	Potência de RF (W)	Pressão total (torr)	Tempo de deposição (min)
600	4,0	40,0	290	$2,3 \times 10^{-3}$	710

Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Os substratos foram dispostos no porta-substratos conforme a Figura 30. Embora haja um espaço relativamente grande para colocar um maior número de substratos, apenas 6 substratos foram dispostos para cada deposição. O crescimento dos filmes se dá de forma radial, onde as maiores taxas estão próximas ao centro e decaem conforme a distância do centro aumenta. Por esta razão os substratos foram dispostos de maneira circular e próximos ao centro.

Figura 30 – Disposição dos substratos de titânio no porta-substratos

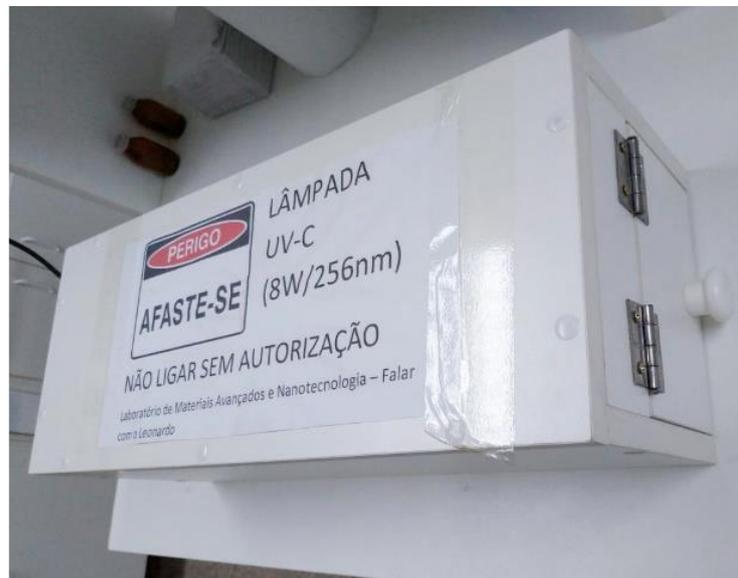


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

5.3 Hidroxilação Física da Superfície

Após o crescimento dos filmes de TiO_2 , um conjunto de amostras foi submetido a testes de hidroxilação física. Esse procedimento consistiu em expor amostras à luz ultravioleta por meio de uma lâmpada ($P = 8 \text{ W}$, $\lambda = 256 \text{ nm}$) em uma câmara preparada de maneira artesanal (Figura 31) por tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, sendo o tempo 0 minutos o tempo controle, sem exposição. Logo após os respectivos tempos de exposição das amostras, foram realizadas medidas de ângulo de contato para avaliar variações na hidrofobicidade/hidrofilicidade e posterior cálculo das energias de superfície. Tais medidas foram realizadas em triplicatas, ou seja, a cada 15 minutos, três amostras foram retiradas da câmara UV e levadas ao goniômetro. Os resultados foram dispostos na seção 6.4. e as funcionalizações foram realizadas com as amostras expostas por 30 minutos, que foi o melhor resultado para ângulo de contato e energia de superfície em um menor tempo.

Figura 31 – Câmara UV utilizada para hidroxilação das amostras



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

5.4 Funcionalização

Nesse item são apresentadas as metodologias para a funcionalização com moléculas bifuncionais e proteínas. No presente trabalho, as moléculas bifuncionais são utilizadas como moléculas espaçadoras entre a superfície do biomaterial e a proteína. Portanto, ao

funcionalizar uma determinada proteína na presença de uma molécula espaçadora, entende-se que foi realizada primeiro uma funcionalização com uma das moléculas bifuncionais descritas abaixo e, em seguida, uma funcionalização com proteína.

5.4.1 Funcionalização com Moléculas Bifuncionais

5.4.1.1 Funcionalização com Ácido 3-Mercaptopropiônico (MPA)

O procedimento consistiu na imersão das amostras com filme de TiO₂ em solução de MPA (Sigma-Aldrich, ≥99%), a uma concentração de 3 mM (pH 3), por um período de uma hora. Após esse período, as amostras foram imersas em água Milli-Q por um minuto (para cada lavagem). Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes, e em cada uma das vezes, a água foi trocada. Ao final, as amostras foram levadas ao dessecador (ADVINCULA, 2005; MARTINS, 2003).

5.4.1.2 Funcionalização com 3-Aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)

O procedimento consistiu na imersão das amostras com filme de TiO₂ em solução de APTMS (Sigma-Aldrich, 97%) em etanol anidro a uma concentração de 3 mM por um período de uma hora. Após esse período, as mesmas foram imersas em etanol anidro (para lavagem). Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes, em cada vez o etanol anidro foi trocado. Ao final, as amostras foram levadas ao dessecador.

5.4.1.3 Funcionalização com Ácido 3-(4-Aminofenil)Propiônico (APPA)

O procedimento consistiu na imersão das amostras com filme de TiO₂ em solução de APPA (Sigma-Aldrich, 97%) em etanol anidro a uma concentração de 2 mM por um período de cinco minutos. Após esse período, as mesmas foram imersas em etanol anidro (para lavagem). Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes, em cada vez o etanol anidro foi trocado. Ao final, as amostras foram levadas ao dessecador.

5.4.2 Funcionalização com Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA)

O procedimento consistiu na imersão das amostras em solução de BSA (Sigma-Aldrich, ≥96%) em tampão fosfato-salina, abreviado do inglês PBS (*Phosphate Buffered Saline*), a uma concentração de 0,40 mg/mL, por um período de 6 horas. Após esse período, as mesmas foram imersas em água Milli-Q (para lavagem) a fim de remover as proteínas não

ligadas e os sais do PBS (ADVINCULA, 2005; MARTINS, 2003). Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes, em cada vez a água foi trocada. Ao final, as amostras foram levadas ao dessecador.

5.5 Cultivo Celular e Testes Biológicos

No presente trabalho foram utilizadas células pré-osteoblasticas (linhagem MC3T3-E1), obtidas a partir de camundongos. As células foram cultivadas em α -MEM (meio mínimo essencial com modificação alfa) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) (NUTRICEL, Campinas) e mantidas numa incubadora a 37 °C e à atmosfera de 5% de CO₂. Passagens sub-confluentes foram tripsinizadas e usadas em todos os experimentos deste estudo.

Os grupos utilizados para os testes biológicos foram: Ti, TiO₂, TiO₂+BSA e TiO₂+APTMS+BSA. Os substratos de Ti também passaram pelos processos de lixamento, a fim de evitar interferências nos resultados devido a diferença de rugosidade entre os grupos. Apenas a molécula bifuncional APTMS foi utilizada, uma vez que apresentou maior intensidade de detecção de suas componentes, além da formação de ligações covalentes com a superfície hidroxilada do filme de TiO₂ (seção 6.5.6.). Os tempos de contato direto dos grupos com as células pré-osteoblásticas foram de 3 horas para testes de adesão e viabilidade celular, 72 horas para análise de expressão gênica referente ao estágio inicial da diferenciação osteoblástica e, para a análise da atividade enzimática por zimografia, foram utilizados os tempos de 3 e 72 horas. Tais tempos foram previamente definidos com base na literatura (CHEN et al., 2018; DA COSTA FERNANDES et al., 2017; GAPSKI, MARTINEZ, 2017; ZAMBUZZI et al., 2008).

Os valores médios e desvio padrão obtidos para cada teste foram calculados e foi realizado o one-way ANOVA (tipo de erro alfa ajustado para 0,05) quando necessário, com teste de comparações múltiplas de Turkey e análise não paramétrica, usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Todos os protocolos utilizados foram estabelecidos pelos alunos do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Molecular do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, sob a colaboração do Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi.

5.5.1 Redução do MTT

A solução de MTT foi preparada a partir do sal do composto (Sigma-Aldrich, $\geq 97,5\%$) em meio (α -MEM) sem soro, a uma concentração de 1 mg do sal para cada 1 mL de soro.

As células cultivadas foram semeadas nas superfícies dos quatro grupos em placas de 24 poços ($5,5 \times 10^4$ células/mL) e mantidas na incubadora por um período de 3 horas. Após esse período de 3 horas, as amostras foram transferidas para uma nova placa de 24 poços e a solução de MTT foi adicionada a cada poço. Em seguida, as amostras foram colocadas novamente na estufa e deixadas em repouso por mais um período de 3 horas. Ao fim desse período, o meio contendo a solução de MTT foi retirado e foi adicionado álcool absoluto em cada poço para a solubilização do corante azul formado pelas células viáveis. Por fim, esse meio solubilizado foi transferido para uma placa de 96 poços, além de adicionar uma coluna extra (apenas com álcool) para servir como referência. Essa placa de 96 poços foi levada ao leitor de microplaca (SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) e a absorvância dos grupos foi medida no comprimento de onda de 570 nanômetros (MOSMANN, 1983). Nesse ensaio, foi utilizado um n experimental igual a 9 para cada grupo.

5.5.2 Cristal Violeta

A solução de Cristal Violeta foi preparada a partir do pó do composto (Sigma-Aldrich, $\geq 90\%$) em água destilada, a uma concentração de 0,1 % em massa (g) do pó em relação ao volume (mL) de água destilada (ex: 0,04 g de cristal violeta em 40 mL de água destilada).

As células cultivadas foram semeadas nas superfícies dos quatro grupos em placas de 24 poços ($5,5 \times 10^4$ células/mL) e mantidas na incubadora por um período de 3 horas. Após esse período de 3 horas, as amostras foram transferidas para uma nova placa de 24 poços e os poços contendo as amostras foram lavados duas vezes com PBS morno. Após a lavagem, as células sobre as amostras foram fixadas em solução de etanol absoluto com ácido acético (3:1; v/v) em cada poço e a placa foi mantida em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Ao fim desse período, a solução foi aspirada e adicionou-se a solução de cristal violeta para cada poço. Em seguida, placa foi novamente mantida em repouso por 10 minutos. Passado esse tempo, o excesso de corante foi removido por decantação e lavado duas vezes com água destilada e o corante foi extraído com ácido acético a 10% (v / v). Por fim, o meio corado foi transferido para uma placa de 96 poços, além de adicionar uma coluna extra (apenas com ácido acético 10%) para servir como referência. Essa placa de 96 poços foi levada ao leitor de

microplaca (SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) e a absorvância dos grupos foi medida no comprimento de onda de 540 nanômetros (BEZERRA et al., 2017). Nesse ensaio, também foi utilizado um n experimental igual a 9 para cada grupo.

5.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

As células foram cultivadas nas superfícies dos quatro grupos estudados durante os períodos de tempo de 3 e 72 horas (3 dias). O mRNA total foi extraído utilizando o kit Ambion TRIzol Reagent (Life Sciences - Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e tratado com DNase I (Invitrogen, Carls-band, CA, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações para o estudo do padrão de expressão dos possíveis genes envolvidos no processo de adesão e princípio da diferenciação osteoblástica foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (*Primers*) mostrados na tabela 3. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes tendo como controles internos, os genes GAPDH, β -ACTINA e 18S. *Primers* e detalhes estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequências de iniciadores de expressão gênica e condições do ciclo de PCR

Gene (ID)	Primer	5'- 3' Sequência	Condições da Reação
GAPDH (14433)	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	TGCCTGCTTC ACCACCTTCT	
18S (19791)	Forward	CGCTATCTGACTCGCTG	95 °C - 15 s; 53°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	GGAAGGTTCTAGTCAGG	
Beta Actina (11461)	Forward	TCTTGGGTATGGAATCCTGTG	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	AGGTCTTTACGGATGTCAACG	
Quinase de Adesão Focal (Fak) (14083)	Forward	TCCACCAAAGAAACCACCTC	95 °C - 15 s; 60°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	ACGGCTTGACACCCTCATT	
Src (17977)	Forward	TCGTGAGGGAGAGTGAGAC	95 °C - 15 s; 60°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	GCGGGAGGTGATGTAGAAAC	
Cofilina (12631)	Forward	CAGACAAGGACTGCCGCTAT	95 °C - 15 s; 60°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	TTGCTCTTGAGGGGTGCATT	
Integrina-β1 (16412)	Forward	CTGATTGGCTGGAGGAATGT	95 °C - 15 s; 60°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	TGAGCAATTGAAGGATAATCATAG	
Integrina-α1	Forward	CTGATTGGCTGGAGGAATGT	95 °C - 15 s; 60°C -

(109700)	Reverse	TGAGCAATTGAAGGATAATCATAG	30 s; 72 °C - 30 s
Runx 2 (12393)	Forward	GGACGAGGCAAGAGTTTCA	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	TGGTGCAGAGTTCAGGGAG	
Osterix (Otx) (170574)	Forward	CCCTTCCCTCACTCATTTC	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	CAACCGCCTTGGGCTTAT	
Osteocalcina (Otc) (12097)	Forward	AGACTCCGGCGCTACCTT	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG	
Fosfatase Alcalina (ALP) (11647)	Forward	GAAGTCCGTGGGCATCGT	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	CAGTGCGGTTCCAGACATAG	
Sialoproteína Óssea (Bsp) (103993)	Forward	GTACCGGCCACGCTACTTTCT	95 °C - 15 s; 63°C - 30 s; 72 °C - 30 s
	Reverse	GTTGACCGCCAGCTCGTTTT	

Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

5.5.4 Zimografia

No presente trabalho, as proteínas analisadas por essa técnica foram as MMP2 e MMP9 para tempos de 3 e 72 horas. Depois de executar o circuito experimental de contato direto com as quatro diferentes superfícies (grupos), o meio de cultura condicionado foi coletado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min para evitar detritos celulares e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (HARTREE, 1972). Em seguida, aplicou-se 150 µg de proteína em um gel de poliacrilamida a 12% contendo 4% de gelatina. A atividade gelatinolítica das proteínas envolvidas foi determinada através da renaturação das mesmas utilizando solução aquosa de Triton X-100 (2% p / v) 40 min sob agitação à 37 °C, e tampão de proteólise (Tris-CaCl₂) incubado por 18 h também a 37 °C. Em seguida, o gel foi corado com Azul de Coomassie (solução de corante R-250 a 0,05%) durante 3 h e, após esse período de tempo, o gel foi lavado numa solução de metanol a 30% (v / v) e ácido acético glacial a 10% (v / v). A ausência de coloração foi obtida nas regiões do gel onde houve exatamente a atividade gelatinolítica (bandas) de MMP2 (~ 62 kDa) e MMP9 (~ 84 kDa). Essas bandas foram, então, analisadas usando o software ImageJ (Bethesda, MD) (LEFEBVRE et al., 1991).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Microscopia Óptica Confocal

Dois substratos (S1 e S2) de titânio comercialmente puro foram separados e suas rugosidades médias (R_a) foram medidas em três pontos diferentes, antes, depois do processo de lixamento e após o crescimento do filme de TiO_2 . As rugosidades médias foram calculadas a partir da média aritmética das alturas ao longo de uma reta diagonal de $795.64 \mu m$ traçada em cada uma das imagens topográficas. Tais valores estão dispostos na Tabela 4.

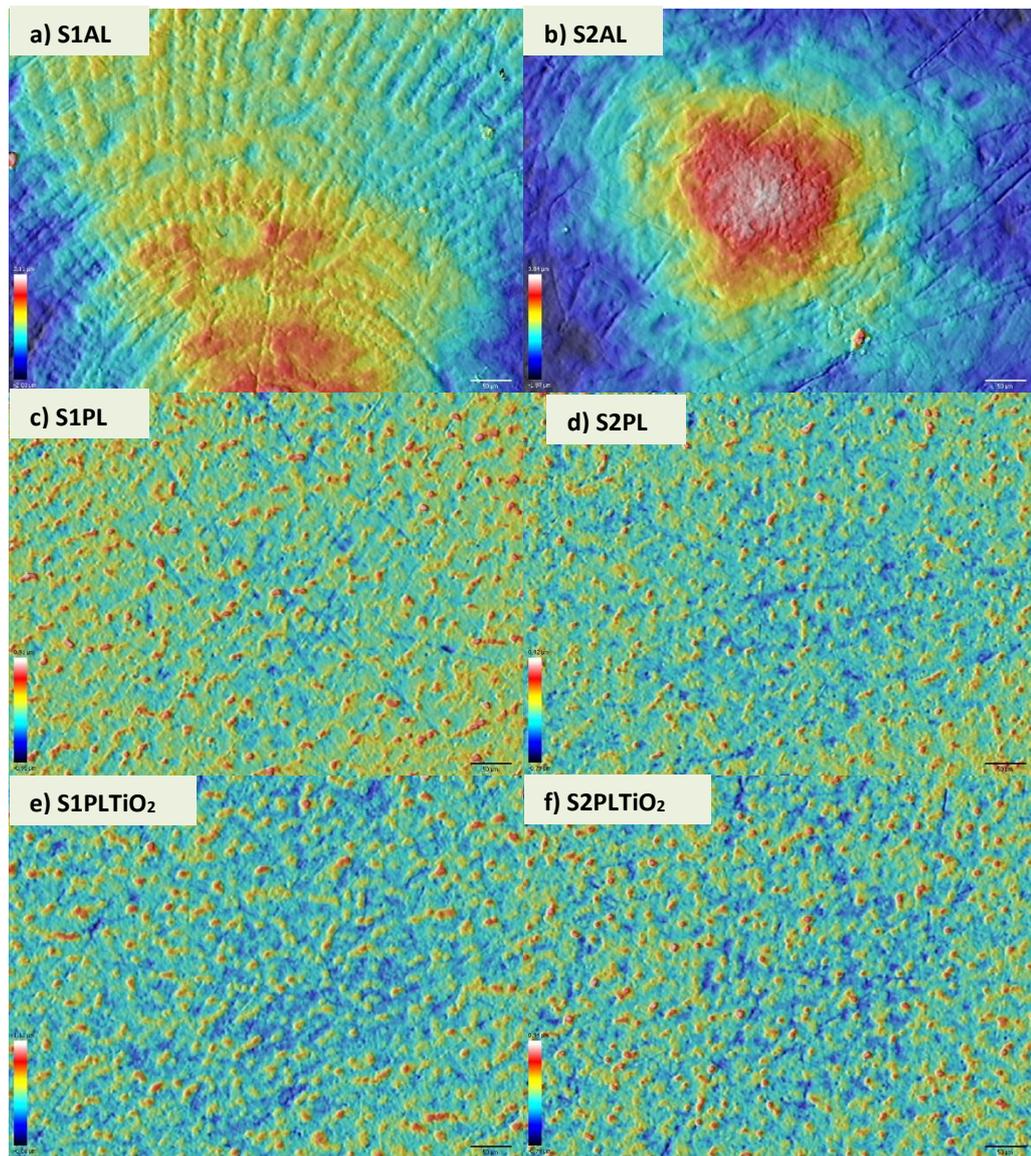
A partir dos dados é possível observar que antes do processo de lixamento os substratos apresentaram grande diferença de valores de rugosidade de um ponto a outro. Após o processo de lixamento, notou-se uma uniformização da superfície dos mesmos. Para ambos os substratos, houve um aumento da rugosidade média após a deposição do filme de TiO_2 . É possível que o crescimento do filme não tenha acompanhado totalmente a topografia do substrato, de modo que a diferença entre vales e picos tenha aumentado, ocasionando tal aumento na rugosidade média. Apesar desse aumento, pode-se afirmar que tais valores de rugosidade apresentam boa uniformidade, quando comparados aos valores apresentados pelos substratos antes do processo de lixamento. Além disso, de acordo com o trabalho de Ponsonnet et al. (2003), esses valores de rugosidade estão dentro do limite ($0,08 - 1,00 \mu m$) onde apresentam uma adequada proliferação celular. Além da importância da rugosidade, também é necessário levar em consideração características como energia de superfície e molhabilidade. Tais características de superfície também foram estudadas nesse trabalho e os resultados estão apresentados na seção 6.4.

Tabela 4 - Valores da rugosidade média dos substratos antes, depois do processo de lixamento e após deposição do filme de TiO_2 . As abreviações AL e PL significam antes do lixamento e pós lixamento, respectivamente. Para as amostras lixadas com filme crescido, foi acrescentado TiO_2 na frente do nome (S1PL TiO_2 , por exemplo)

	R_a (nm) Ponto 1	R_a (nm) Ponto 2	R_a (nm) Ponto 3	Média (nm)
S1AL	200	328	333	287 ± 75
S2AL	196	1045	356	532 ± 451
S1PL	121	122	125	123 ± 2
S2PL	121	123	100	115 ± 13
S1PL TiO_2	172	140	151	154 ± 16
S2PL TiO_2	157	135	148	147 ± 11

Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 32 – Imagens de contorno das amostras a) S1AL; b) S2AL; c) S1PL; d) S2PL; e) S1PLTiO₂; f) S2PLTiO₂. As abreviações AL e PL significam antes do lixamento e pós lixamento, respectivamente. Para as amostras lixadas com filme crescido, foi acrescentado TiO₂ na frente do nome (S1PLTiO₂, por exemplo). É possível observar uma uniformização na superfície das superfícies das amostras após o processo de lixamento



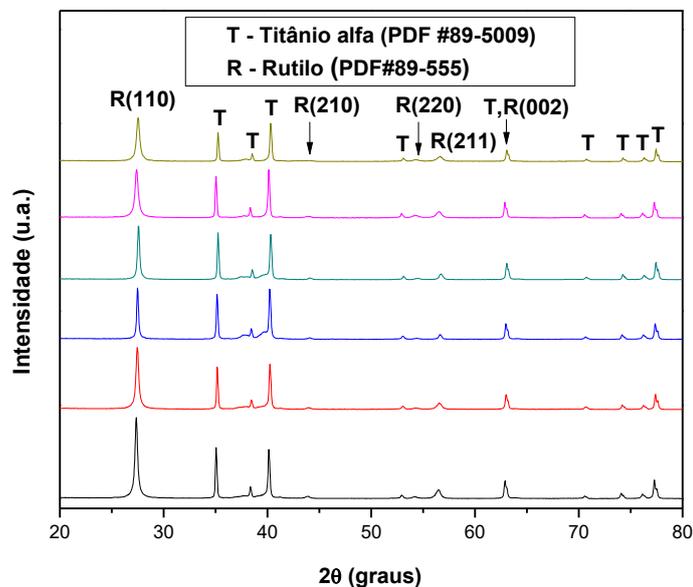
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.2 Difração de Raios X

A Figura 33 mostra os difratogramas das diversas amostras provenientes de diferentes deposições realizadas nesse trabalho, nas condições descritas na Tabela 2. Para o filme de TiO₂ foi possível observar apenas a presença da fase rutilo (R). A fase alfa do titânio metálico

(Ti) está relacionada com o substrato. Uma vez que, para TiO_2 , a profundidade de penetração da radiação $\text{CuK}\alpha$ para uma energia de 8,06 keV é de aproximadamente 20 μm . Portanto, é coerente observar a presença da fase referente ao substrato nos difratogramas (BIRKHOLZ, 2006). Além disso, também foi possível observar que todos os padrões de difração apresentaram diferentes intensidades e orientações, indicando que os filmes crescidos são policristalinos.

Figura 33 – Difratogramas de amostras utilizando as condições para obtenção da fase rutilo. É possível observar picos de difração referentes à planos cristalinos da fase rutilo do TiO_2 e da fase alfa do titânio



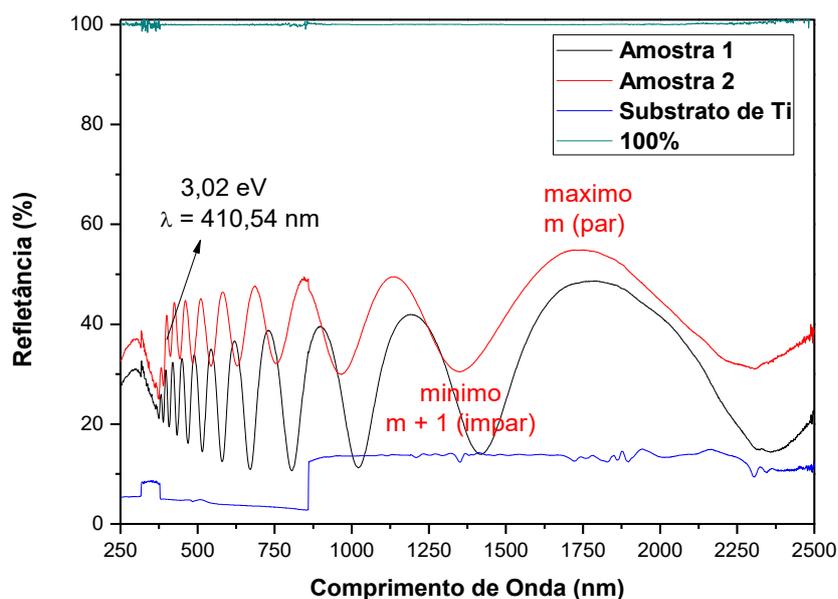
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

A presença da fase rutilo é de grande importância, pois esta apresenta menor atividade de oxidação de moléculas orgânicas sob a superfície, quando comparada à fase anatase. Uma vez que o presente trabalho tem como um de seus objetivos a imobilização de moléculas bifuncionais e proteínas sob a superfície do filme de TiO_2 , a oxidação e degradação dessas é indesejável. Essa menor atividade de oxidação da fase rutilo se deve à menor distância entre os átomos de titânio da estrutura cristalina. Dessa forma, os buracos aprisionados interagem com os átomos de titânio formando estruturas do tipo Ti-OO-Ti que não são ativas para a oxidação de compostos orgânicos (KAKUKA; NOSAKA; NOSAKA, 2015).

6.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível

A Figura 34 apresenta os espectros de refletância de um substrato de Ti e de dois substratos de Ti com filmes de TiO₂ crescidos sobre eles. Através do método de Cisneros (1998) para refletância, a média das espessuras estimadas dos filmes foi de, aproximadamente, 738 (± 37) nanômetros. Esse valor de espessura, em comparação com uma camada de óxido nativo sob a superfície de TiO₂ oferece um significativo aumento na resistência à biocorrosão de longo prazo do material, como relatado por Ochsenbein (2008) e colaboradores. Os valores de comprimentos de onda utilizados para o cálculo estão dentro da região onde o filme é transparente. Dessa maneira, os índices de refração apresentam menor variação entre um máximo e um mínimo e as franjas de interferências apresentam menor distorção, quando comparadas às próximas do valor de $\lambda = 410,54$ nm, referente ao band gap do TiO₂ na fase rutilo (3,02 eV), onde o óxido passa a absorver mais intensamente a luz emitida. Tais precauções foram tomadas a fim de se obter uma estimativa mais próxima do valor real de espessura do filme.

Figura 34 – Gráficos de refletância para o substrato de Ti e para o substrato de Ti com filme de TiO₂ crescido sobre ele. O ponto indicado pela seta indica o valor de *band gap* do TiO₂ na fase rutilo e para a região utilizada para a estimativa de espessura, os máximos (m) indicam ordens de interferência par e os mínimos (m+1) indicam ordens de interferência ímpar



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

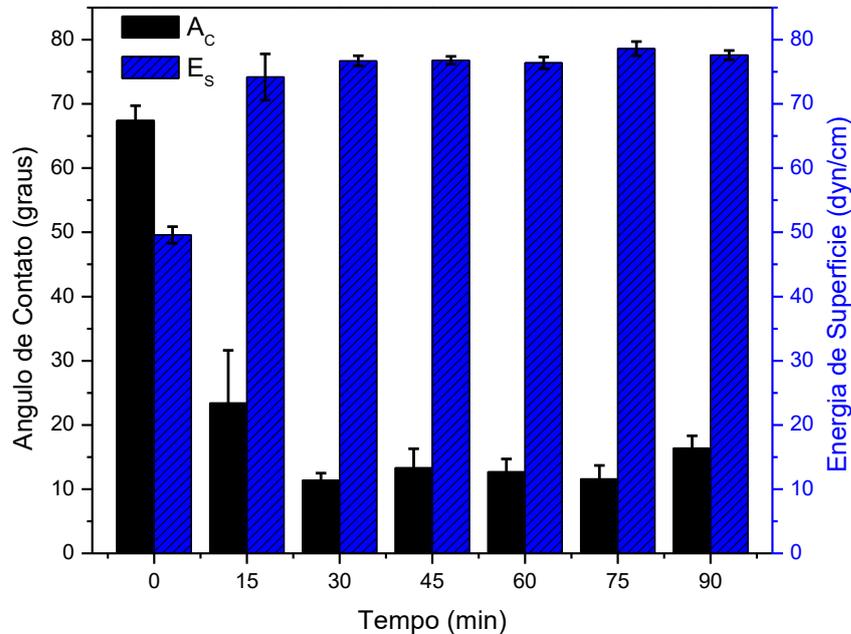
6.4 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

A Figura 35 apresenta os valores de ângulo de contato (A_c) e energia de superfície (E_s) para diferentes amostras expostas à radiação UV nos tempos $t = 0, 15, 30, 45, 60, 75$ e 90 minutos. Para cada tempo foram realizadas três medidas de ângulo de contato com água (como líquido polar) e diiodometano (como líquido apolar). A partir das medidas realizadas com estes dois líquidos, os valores de energia de superfície foram, então, calculados. Pela imagem, foi possível observar que os menores valores de ângulo de contato foram para os tempos $t = 35$ e 75 minutos ($11,4^\circ$ e $11,6^\circ$, respectivamente). Os maiores valores de energia de superfície também foram para esses tempos ($76,7$ dyn/cm e $78,6$ dyn/cm, respectivamente).

Ao comparar os valores de ângulo de contato de $t = 0$ (sem exposição) com qualquer valor de tempo de exposição das amostras sob radiação UV, foi possível notar uma grande diferença, onde a superfície passa de intermediária ($67,4^\circ$) para hidrofílica (valores abaixo de 30°), com aumento significativo na energia de superfície. Isso se deve à propriedade fotocatalítica do TiO_2 , descrita anteriormente, que resulta em maior número de hidroxilas disponíveis na superfície após exposição à radiação UV. Como os valores de ângulo de contato e energia de superfície para os tempos de 30 e 75 minutos foram próximos e o desvio padrão para o tempo de 75 minutos foi maior, optou-se por utilizar o tempo de exposição de 30 minutos como padrão para o preparo e posterior funcionalização da amostra com as moléculas bifuncionais e/ou proteínas.

A energia de superfície pode indicar a capacidade de uma superfície em interagir espontaneamente com outros materiais, formando novas ligações, por exemplo. Portanto, os resultados apresentados foram satisfatórios, uma vez que valores maiores de energia de superfície são desejáveis para melhor interação com as moléculas bifuncionais e a proteína albumina de soro bovino (BSA). Além disso, segundo Hallab et al. (2001), demonstraram que há uma correlação entre a energia de superfície, capacidade de adesão celular e posterior proliferação celular. Com relação a molhabilidade, foi mostrado que superfícies hidrofílicas apresentam maior capacidade de adesão e proliferação celular (RUARDY et al., 1995; GEORGI et al., 1996; WEBB et al., 1998). Os estudos viabilidade, adesão e proliferação celular estão apresentados na seção 6.6.

Figura 35 – Valores de ângulo de contato e energia de superfície para as amostras expostas em lâmpada UV para os tempos $t = 0, 15, 30, 45, 60, 75$ e 90 minutos. Na legenda, A_c se refere ao ângulo de contato e E_s se refere à energia de superfície



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.5 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X

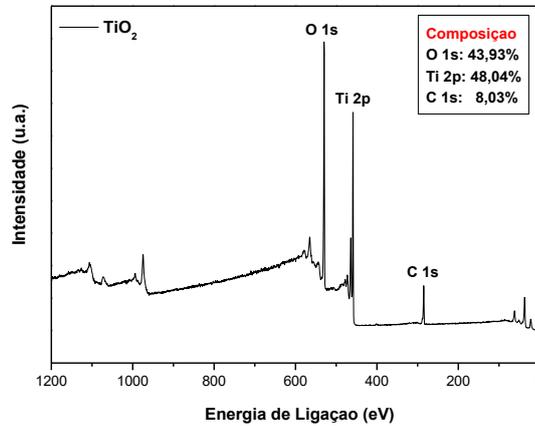
A técnica de XPS foi utilizada com o objetivo de analisar a química da superfície dos grupos estudados, além da conformação das moléculas para, assim, avaliar a efetividade dos processos de funcionalização. Os resultados de cada grupo estudado foram apresentados separadamente nas seções a seguir. Nos espectros de alta resolução foram indicados os valores de desvio padrão residual (DPR) como fator de qualidade dos *fittings* realizados.

6.5.1 Filme de TiO_2

Um espectro *survey* representativo da amostra de dióxido de titânio crescido sob substrato de titânio metálico grau IV (controle) pode ser observado na Figura 36. A composição elementar superficial da amostra indicada na figura, mostra ainda a presença de

carbono. Considera-se que este sinal está relacionado com o carbono proveniente de contaminantes presentes na atmosfera, como o CO₂ adsorvido na superfície da amostra.

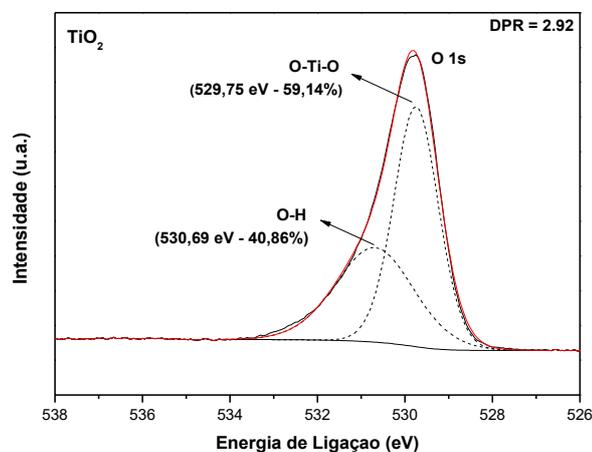
Figura 36 – Espectro *survey* da amostra de TiO₂



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

A Figura 37 mostra o espectro O 1s para a amostra de referência, onde foi possível observar duas contribuições (picos). A contribuição majoritária em 529,75 eV refere-se à ligação O-Ti-O para o TiO₂. Uma contribuição em 530,69 eV foi relacionada à ligação O-H, que está associada a presença dos grupos hidroxila presentes na superfície do óxido, como discutido na seção 2.3. Tais grupos podem atuar como pontos de ancoragem para a formação de mono ou multicamadas das moléculas orgânicas bifuncionais pelo processo de funcionalização da superfície do óxido (TRINO et al., 2018).

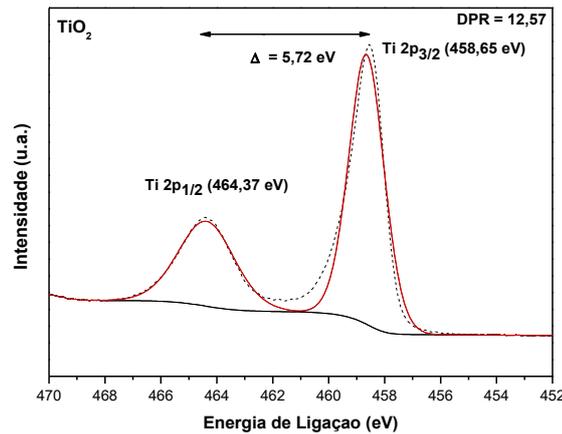
Figura 37 – Espectro de alta resolução O 1s da amostra de TiO₂



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

O espectro do Ti2p pode ser visto na Figura 38. Também foi possível observar que a diferença entre os sinais do Ti 2p^{1/2} e Ti 2p^{3/2} é próxima de 6 eV, o que é consistente com o estado Ti⁴⁺ da ligação no TiO₂.

Figura 38 – Espectro de alta resolução Ti 2p da amostra de TiO₂

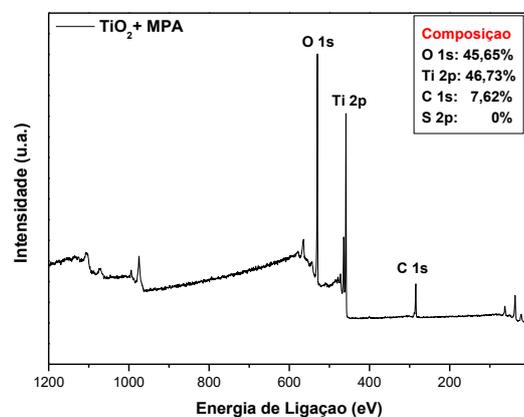


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.5.2 Filme de TiO₂ Funcionalizado com MPA

A Figura 39 apresenta o espectro *survey* para a amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com MPA descrito na seção 5.4.1.1. Embora a molécula bifuncional possua enxofre em sua composição, não houve detecção deste elemento químico. O sinal do carbono pode estar relacionado a eventuais contaminações e à molécula de MPA.

Figura 39 – Espectro *survey* da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com MPA

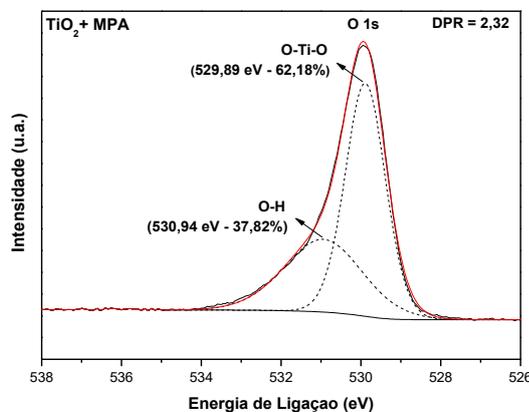


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

O espectro de alta resolução O 1s está apresentado na Figura 40. Assim como na amostra de referência (TiO_2), foi possível observar a presença de duas contribuições, sendo uma referente a ligação O-Ti-O, em 529,29 eV e outra referente ao oxigênio nas ligações Ti-OH, em 530,94 eV. Ao comparar com a amostra antes do processo de funcionalização, notou-se um pequeno decréscimo no número de hidroxilas disponíveis na superfície do óxido que pode estar relacionado à ligação de uma pequena parte delas com a molécula bifuncional MPA.

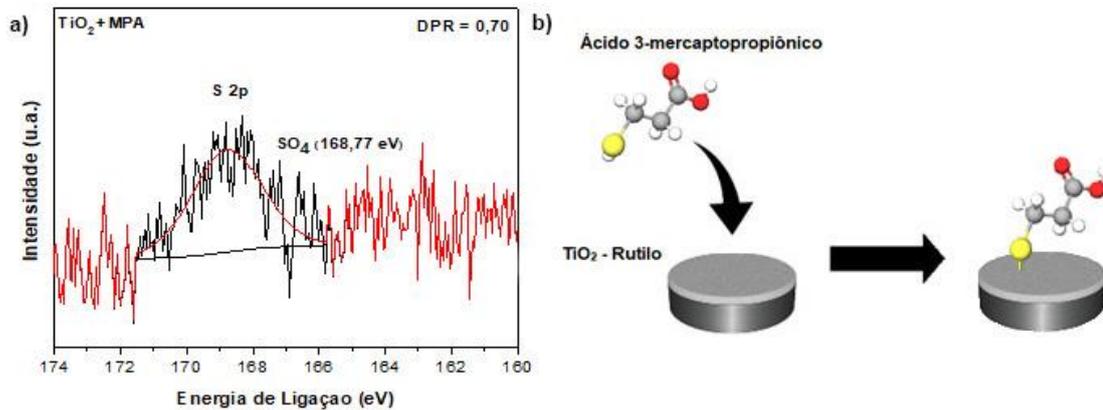
Complementarmente, a Figura 41a) apresenta o espectro de alta resolução S 2p, onde há uma contribuição em 168,77 eV. Essa contribuição refere-se à ligação SO_4 do enxofre. Como este tipo de ligação não está presente na molécula de MPA é provável que algumas moléculas tenham se ligado aos átomos de oxigênio do TiO_2 pelo grupo tiol, como representado na Figura 41b).

Figura 40 – Espectro de alta resolução O 1s da amostra de TiO_2 após processo de funcionalização com MPA



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 41 – a) Espectro de alta resolução S 2p da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com MPA e b) possível interação entre as moléculas de MPA e a superfície de TiO₂, baseado no espectro de alta resolução do enxofre

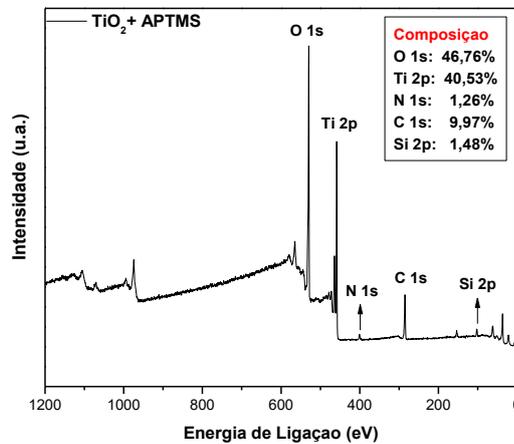


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.5.3 Filme de TiO₂ Funcionalizado com APTMS

Na Figura 42 é possível observar o espectro *survey* da amostra de dióxido de titânio após o procedimento de funcionalização com a molécula bifuncional APTMS descrito na sessão 5.4.1.2. Além dos átomos de titânio, oxigênio e carbono também detectados nos espectros anteriores, nesse é possível observar a presença dos átomos de nitrogênio e silício, que fazem parte da molécula bifuncional APTMS. Os espectros de alta resolução O 1s, N 1s e Si 2p estão dispostos na Figura 43 a), b) e c), respectivamente. A partir deles foi possível confirmar a adesão do APTMS na superfície do TiO₂.

Figura 42 – Espectro *survey* da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com APTMS



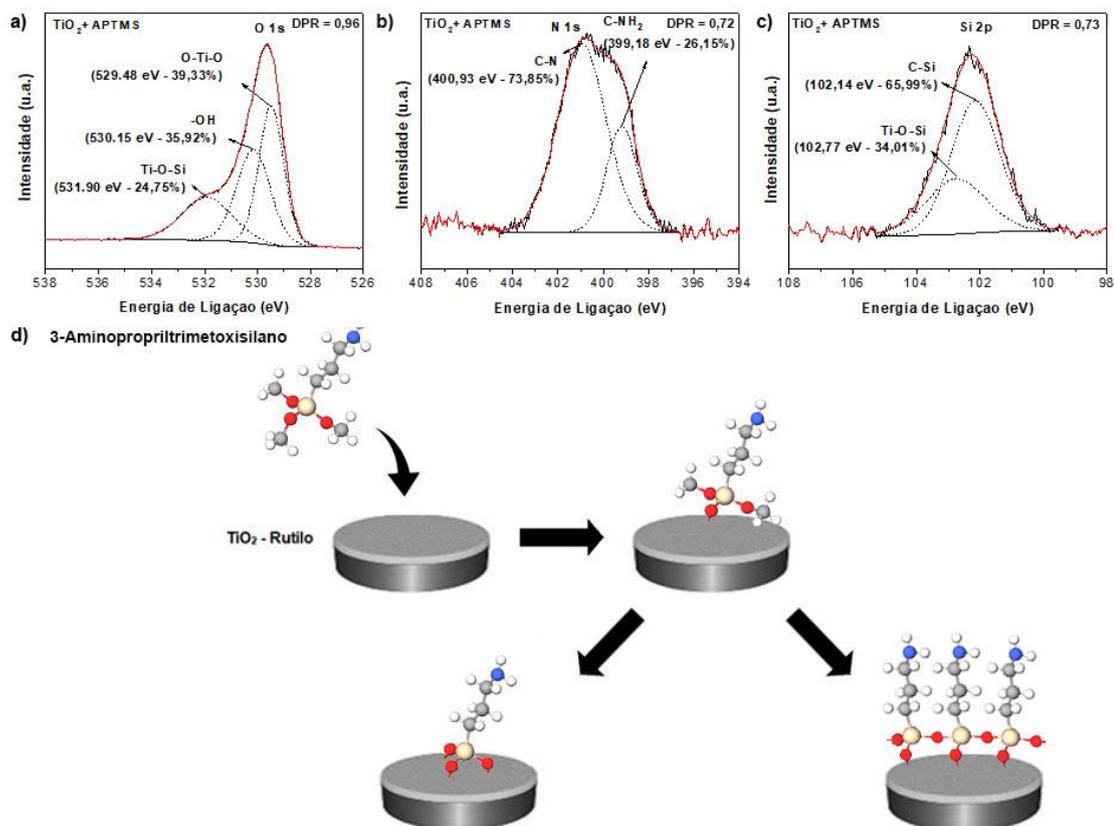
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

No espectro de alta resolução O 1s (Figura 43 a), é possível observar três contribuições. A contribuição em 529,48 eV se refere à ligação O-Ti-O do dióxido de titânio e a contribuição em 530,15 eV se refere aos grupos hidroxila. Na terceira contribuição, em 531,90 eV, é possível observar que houve a adesão da molécula de APTMS com a superfície do dióxido de titânio pelo grupo silano, uma vez que ela se refere à ligação Ti-O-Si. É possível que parte das moléculas tenham se ligado ao dióxido de titânio pelos três átomos de oxigênio enquanto que uma outra parte tenha se ligado ao óxido por apenas um átomo de oxigênio e se ligado à outras moléculas de APTMS pelos outros dois átomos de oxigênio. Essas hipóteses estão representadas na Figura 43d. Há também a possibilidade intermediária, onde dois átomos de oxigênio se ligam ao óxido e apenas um átomo de oxigênio se liga à uma molécula de APTMS próxima.

A ligação entre as moléculas de APTMS pelo grupo silano e o substrato estabiliza a monocamada formada sob a superfície do TiO₂ e essa reação é conhecida como silanização (PUJARI et al., 2014). Tal resultado é coerente com os apresentados pela literatura, onde normalmente, a silanização é feita sobre superfícies hidroxiladas. De acordo com a Figura 44, é possível observar que essa reação apresenta uma eficácia relativamente alta na superfície do TiO₂.

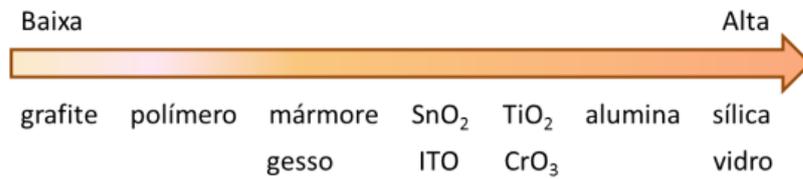
No espectro de alta resolução N 1s (Figura 43b) é possível observar duas contribuições referentes à molécula de APTMS, uma referente ao grupo amina (NH_2) em 399,18 eV e outra referente à ligação C-N em 400,93 eV. Como não há nenhuma outra contribuição do tipo Ti-N, é possível afirmar que houve uma interação preferencial da molécula de APTMS com a superfície do TiO_2 , onde ocorreu o acoplamento da molécula bifuncional pelo grupo silano, deixando o grupo amina livre (SONG; HILDEBRAND; SCHMUKI, 2010). Complementarmente, é possível observar uma contribuição referente à ligação Ti-O-Si no espectro de alta resolução Si 2p (Figura 43c) em 102,77 eV esta que também foi detectada no espectro de alta resolução O 1s. Nesse espectro de alta resolução também foi observada uma outra contribuição em 102,14 eV, relacionada à ligação C-Si da molécula de APTMS.

Figura 43 – a) Espectro de alta resolução O 1s, b) espectro de alta resolução N 1s, c) espectro de alta resolução Si 2p da amostra de TiO_2 após processo de funcionalização com APTMS e d) possíveis interações entre as moléculas de APTMS e a superfície de TiO_2 , baseado nos espectros de alta resolução.



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 44 – Eficácia da reação de silanização em diferentes tipos de superfícies. Nota-se que o TiO_2 apresenta eficácia relativamente alta

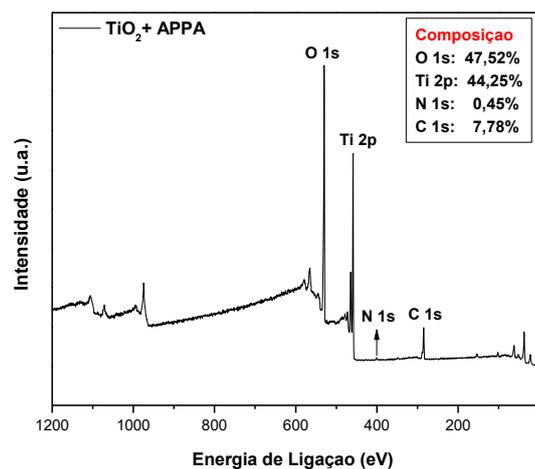


Fonte: Adaptado de PUJARI et al., 2014.

6.5.4 Filme de TiO_2 Funcionalizado com APPA

Na Figura 45 é possível observar o espectro *survey* da amostra de dióxido de titânio após o procedimento de funcionalização com a molécula bifuncional APPA, descrito na sessão 5.4.1.3. Embora a contribuição do nitrogênio seja pequena, os espectros de alta resolução C 1s, O 1s e N 1s trazem fortes indícios da presença da molécula de APPA sob a superfície do TiO_2 .

Figura 45 – Espectro *survey* da amostra de TiO_2 após processo de funcionalização com APPA

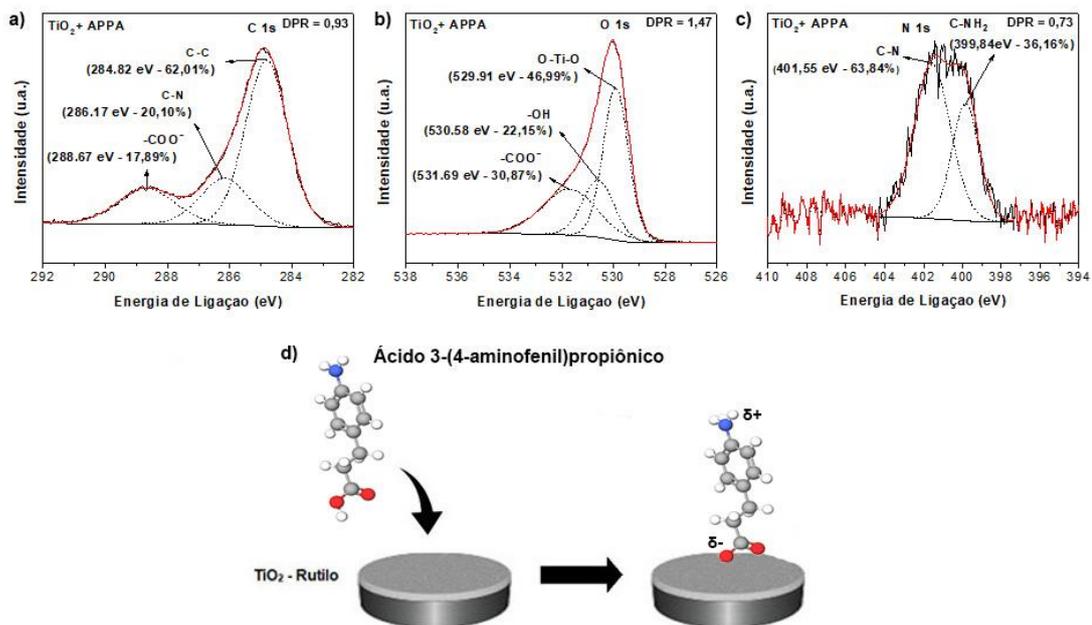


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

O espectro de alta resolução C 1s é apresentado na Figura 46a. Nele, é possível observar três contribuições, uma em 284,82 eV referente à ligação C-C, outra em 286,17 eV referente à ligação C-N e outra em 288,67 eV referente à ligação -COO-. Todas

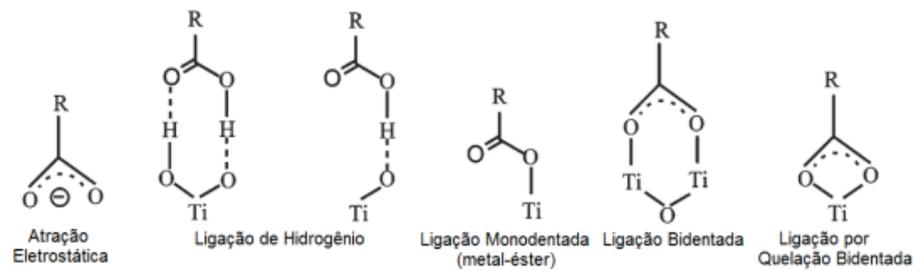
essas ligações estão presentes na molécula de APPA. A última, em especial, se refere ao grupo funcional ácido carboxílico na forma zwitteriônica, que favorece a adsorção deste grupo na superfície do dióxido de titânio (ATAMAN et al., 2011; FLEMING et al., 2008; WILSON, DOWLER, IDRIS, 2011). Através do espectro de alta resolução O 1s (Figura 46b), também é possível observar a contribuição desse grupo funcional, em 531,52 eV. Além dessa contribuição, é possível observar mais duas, sendo uma referente a ligação O-Ti-O em 529,82 eV e outra referente às hidroxilas terminais presentes na (530,59 eV) superfície do óxido. No espectro de alta resolução N 1s (Figura 46c) é possível observar duas contribuições, sendo uma referente a ligação C-N (401,55 eV) e a outra referente ao grupo amina (399,84 eV), podendo estar em sua forma zwitteriônica $-NH_3^+$. Como não há nenhuma ligação do tipo N-Ti, é possível que a molécula de APPA esteja interagindo eletrostaticamente com a superfície do TiO_2 pelo grupo $-COO^-$. Tal hipótese é representada por Qu et al. (2010) como uma das possíveis formas de interação do grupo carboxila sob a superfície do dióxido de titânio, como apresentado na Figura 47.

Figura 46 – a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO_2 após processo de funcionalização com APPA e d) possível interação entre as moléculas de APPA e a superfície de TiO_2 , baseado nos espectros de alta resolução



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 47 – Possíveis interações do ácido carboxílico com a superfície de TiO_2

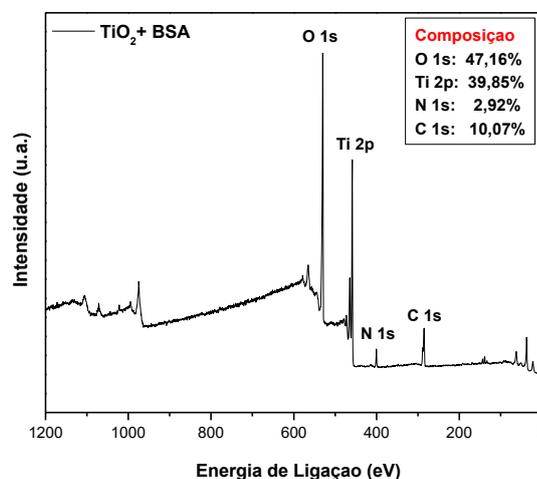


Fonte: QU et al., 2010.

6.5.5 Filme de TiO_2 Biofuncionalizado com BSA

Na Figura 48 é possível observar o espectro *survey* da amostra de TiO_2 após o procedimento de funcionalização com a proteína BSA, descrito na sessão 5.4.2. Sua composição está de acordo com os principais componentes da proteína (C, N e O) e com os componentes do óxido (Ti e O). A contribuição da porcentagem de carbono e nitrogênio são relativamente maiores que as apresentadas pelos grupos funcionalizados apenas com as moléculas espaçadoras (as que possuem nitrogênio), o que é coerente, uma vez que a molécula de albumina é muito maior, seja em tamanho ou em número de átomos de nitrogênio por molécula.

Figura 48 – Espectro *survey* da amostra de TiO_2 após processo de funcionalização com BSA.



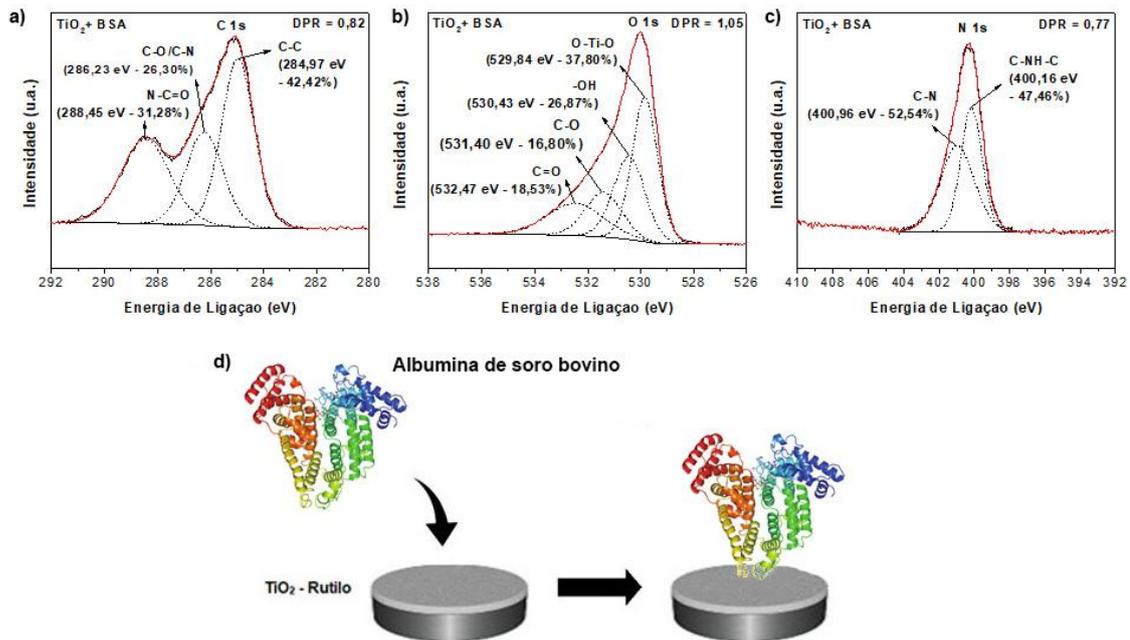
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

O espectro de alta resolução C 1s é apresentado na Figura 49a). Nele é possível observar três contribuições, uma em 284,97 eV referente à ligação C-C, outra em 286,23 eV referente à ligação C-O/C-N e outra em 288,45 eV referente à ligação N-C=O resultante das ligações peptídicas formadas pelos aminoácidos (TIDWELL et al., 2001). Todas essas ligações estão presentes na molécula de BSA, sendo a ligação C-O referente a ligações de cadeias laterais dos aminoácidos.

Através do espectro de alta resolução O 1s (Figura 49b), é possível observar a presença de quatro contribuições, sendo duas delas referentes a estrutura da BSA, uma 532,47 eV referente a ligação C=O e outra em 531,40 eV referente a ligação C-O. Referente ao dióxido de titânio, há uma contribuição O-Ti-O em 529,82 eV e outra referente às hidroxilas terminais (530,59 eV) presentes na superfície do óxido. No espectro de alta resolução N 1s (Figura 49c) é possível observar duas contribuições, sendo uma referente a ligação C-N (400,96 eV) e a outra referente ao grupo amina (400,16 eV), entretanto, trata-se de um grupo amina secundária, resultante das ligações entre os aminoácidos.

Embora nenhum tipo de ligação explícita entre a cadeia polipeptídica e a superfície do óxido estejam presentes, o processo de lavagem após imersão do substrato em solução de BSA garante que as moléculas não ligadas fossem removidas. Portanto, é provável que as moléculas de proteínas estejam ligadas, sejam através dos grupos carboxi ou amino terminais ou até mesmo pelas cadeias laterais.

Figura 49 – a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com BSA e d) possível interação entre as moléculas de BSA e a superfície de TiO₂, baseado nos espectros de alta resolução.

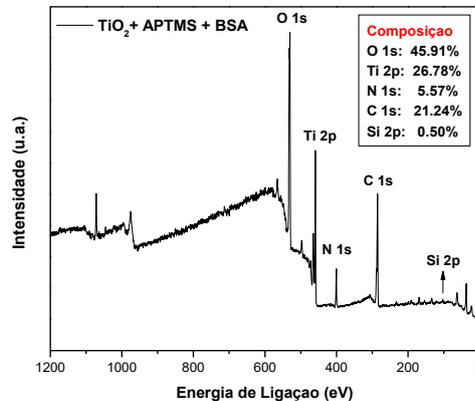


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.5.6 Imobilização da BSA por APTMS sobre Filme de TiO₂

Na Figura 50 é possível observar o espectro *survey* da amostra de TiO₂ após o procedimento de funcionalização com APTMS, seguido do processo de funcionalização com a proteína BSA, descrito nas sessões 5.4.1.2. e 5.4.2., respectivamente. A composição está de acordo com os principais componentes do APTMS e da BSA (C, N, O e Si) e com os componentes do óxido (Ti e O). As contribuições das porcentagens de nitrogênio e carbono foram maiores do que as porcentagens apresentadas pela funcionalização direta da proteína sob a superfície do óxido. Devido ao aumento das contribuições detectadas de carbono e nitrogênio, é possível observar uma contribuição menor de titânio detectada, quando comparada às dos grupos TiO₂ + APTMS e TiO₂ + BSA, podendo indicar maior eficiência na formação da monocamada de BSA na presença de APTMS como espaçador.

Figura 50 – Espectro *survey* da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com APTMS e BSA



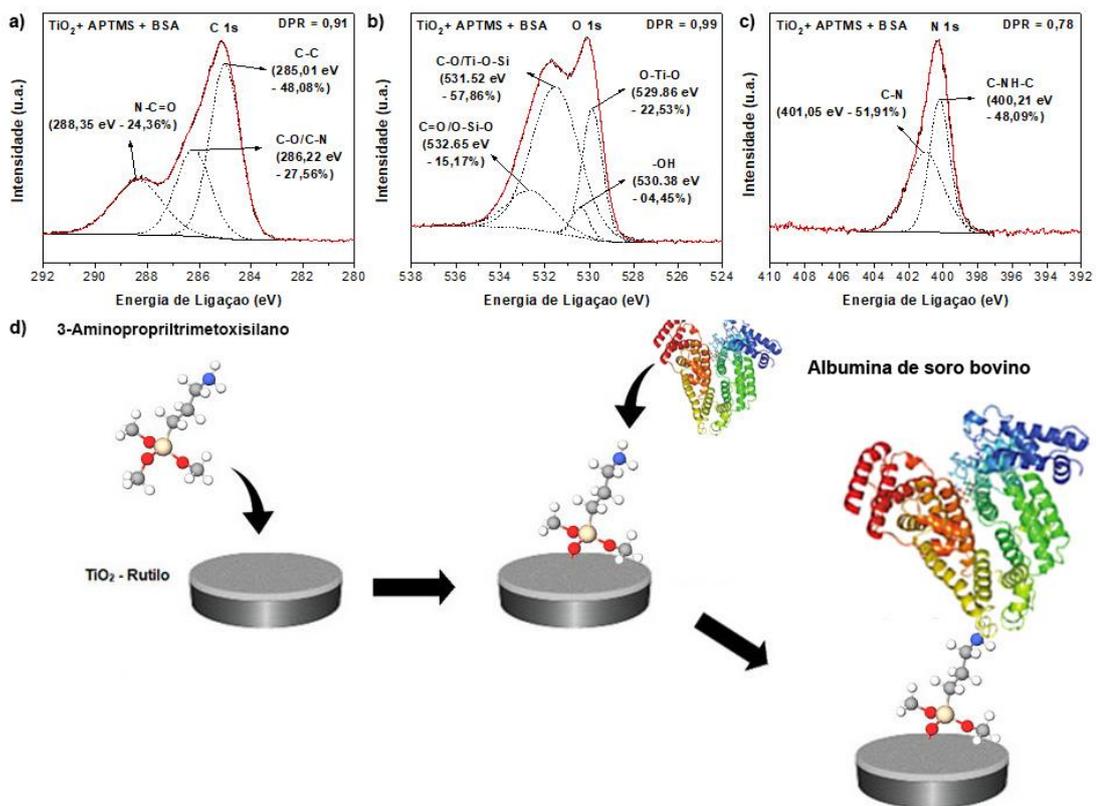
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Como as moléculas de BSA são muito maiores que as moléculas de APTMS e a composição dos elementos de ambas são semelhantes, os espectros de alta resolução apresentam dados, em sua grande maioria, referentes às ligações químicas das moléculas de BSA e da superfície do filme de TiO₂. Nota-se, portanto, uma grande semelhança nesses espectros, quando comparados com os apresentados na sessão anterior.

No espectro de alta resolução C 1s (Figura 51a) é possível observar três contribuições, uma em 285,01 eV referente à ligação C-C, outra em 286,22 eV referente à ligação C-O/C-N e outra em 288,35 eV referente à ligação N-C=O, sendo estas contribuições referentes às ligações presentes na BSA, exceto C-N também presente na APTMS. Através do espectro de alta resolução O 1s (Figura 51b), é possível observar a presença de quatro contribuições, sendo uma em 532,65 eV referente a ligação C=O ou O-Si-O, em 531,52 eV referente a ligação C-O ou T-O-Si, uma contribuição O-Ti-O em 529,86 eV e outra referente às hidroxilas terminais (530,38 eV) presentes na superfície do óxido. Nota-se uma considerável redução na contribuição do grupo hidroxila, podendo indicar uma maior eficiência na formação da monocamada de APTMS + BSA. Esta hipótese está em concordância com os dados apresentados pelo espectro *survey*, que também sugerem essa maior eficiência. No espectro de alta resolução N 1s (Figura 51c) é possível observar duas contribuições, sendo uma referente a ligação C-N (401,55 eV) e a outra referente ao grupo amina (399,84 eV). Como as moléculas de APTMS se ligaram à superfície hidroxilada do TiO₂ pelo grupo silano,

os resultados sugerem que sua ligação com as moléculas de BSA ocorreu pelo grupo terminal (amina). Entretanto, devido ao tamanho e complexidade dessa proteína, não é possível dizer especificamente qual região da proteína se ligou ao grupo amina da molécula de APTMS. Embora nenhum tipo de ligação explícita entre a cadeia polipeptídica e a superfície do óxido estejam presentes, o processo de lavagem após imersão do substrato em solução de BSA garante que as moléculas não ligadas fossem removidas.

Figura 51 – a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com APTMS e, posteriormente, BSA e d) possível interação entre as moléculas de APTMS, BSA e a superfície de TiO₂, baseado nos espectros de alta resolução

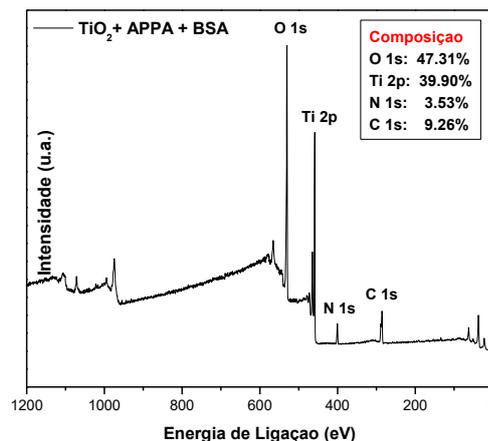


Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

6.5.7 Imobilização da BSA por APPA sobre Filme de TiO₂

Na Figura 52 é possível observar o espectro *survey* da amostra de TiO₂ após o procedimento de funcionalização com APPA, seguido do processo de funcionalização com a proteína BSA, descrito nas sessões 5.4.1.3. e 5.4.2., respectivamente. A composição está de acordo com os principais componentes do APPA e da BSA (C, N e O) e com os componentes do óxido (Ti e O). A contribuição da porcentagem de nitrogênio foi maior do que a porcentagem apresentada pela funcionalização direta da proteína sob a superfície do óxido. Entretanto, esse aumento não foi tão considerável quanto o apresentado pelo grupo TiO₂ + APTMS + BSA.

Figura 52 – Espectro *survey* da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com APPA e BSA



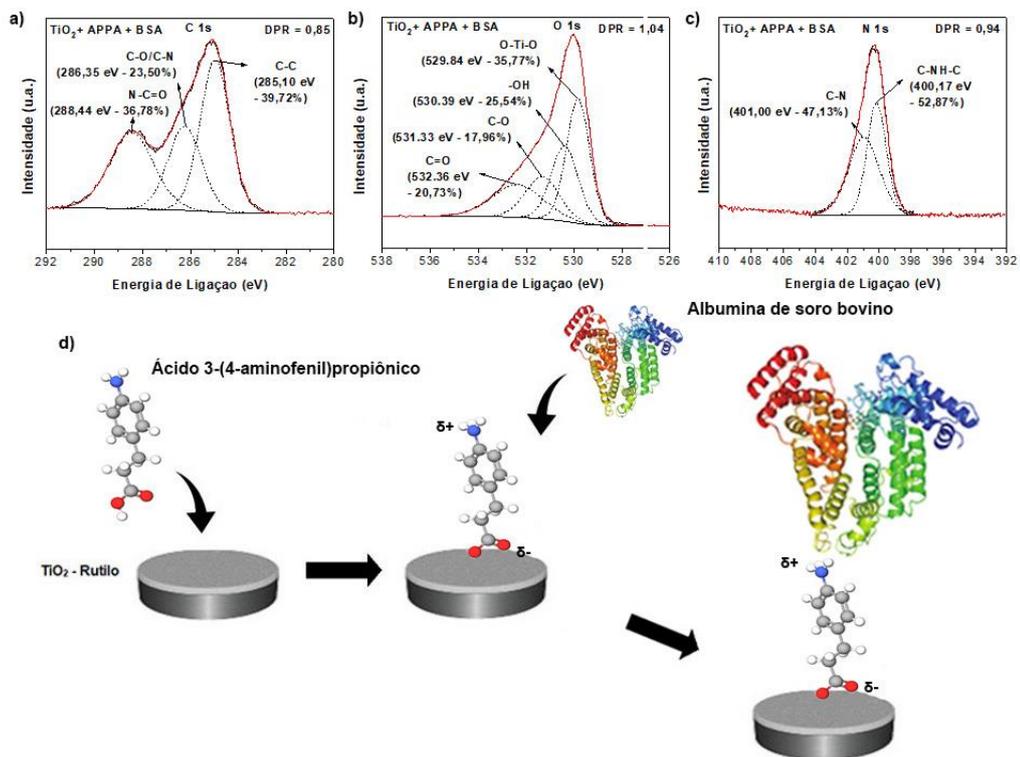
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Como as moléculas de BSA são muito maiores que as moléculas de APPA e a composição dos elementos de ambas são muito semelhantes, os espectros de alta resolução apresentam dados, em sua grande maioria, referentes às ligações químicas das moléculas de BSA e da superfície do filme de TiO₂. Nota-se, portanto, uma grande semelhança nesses espectros, quando comparados com os do grupo TiO₂ + BSA.

No espectro de alta resolução C 1s (Figura 53a) é possível observar três contribuições, uma em 285,10 eV referente à ligação C-C, outra em 286,35 eV referente à ligação C-O/C-N e outra em 288,44 eV referente à ligação N-C=O. Através do espectro de alta resolução O 1s

(Figura 53b), é possível observar a presença de quatro contribuições, sendo uma em 532,36 eV referente a ligação C=O, em 531,33 eV referente a ligação C-O, uma contribuição O-Ti-O em 529,84 eV e outra referente às hidroxilas terminais (530,39 eV) presentes na superfície do óxido. No espectro de alta resolução N 1s (Figura 53c) é possível observar duas contribuições, sendo uma referente a ligação C-N (401,55 eV) e a outra referente ao grupo amina (399,84 eV). Embora as moléculas de APPA estejam fisicamente adsorvidas (eletrostaticamente) à superfície do TiO₂ através do grupo carboxila (sessão 6.5.4), os espectros de alta resolução não apresentam uma ligação explícita entre a cadeia polipeptídica da BSA e o grupo terminal do APPA. Entretanto, o processo de lavagem após cada processo de imersão do substrato em solução de APPA e, posteriormente, BSA garante que as moléculas não ligadas fossem removidas. Portanto, é possível que as moléculas de BSA estejam química ou fisicamente adsorvidas ao grupo amina da molécula de APPA, seja através dos grupos carboxi terminais ou até mesmo pelas cadeias laterais.

Figura 53. a) Espectro de alta resolução C 1s, b) espectro de alta resolução O 1s, c) espectro de alta resolução N 1s da amostra de TiO₂ após processo de funcionalização com APPA e, posteriormente, BSA e d) possível interação entre as moléculas de APPA, BSA e a superfície de TiO₂, baseado nos espectros de alta resolução.



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

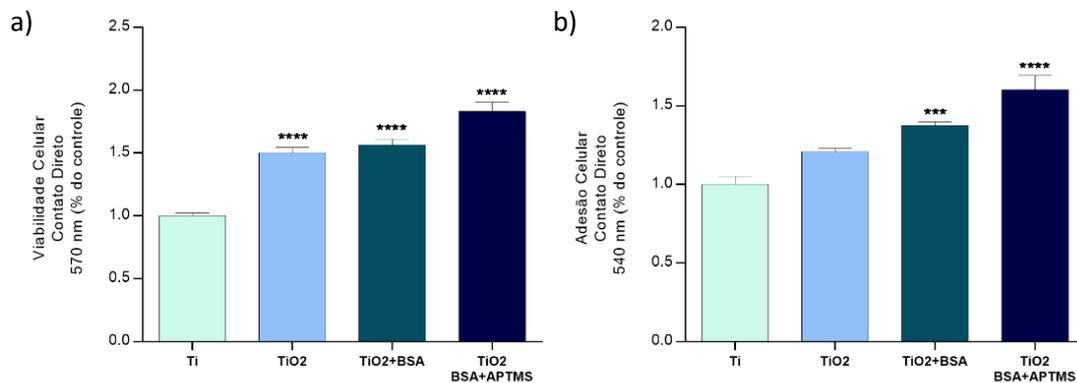
6.6 Testes Biológicos

Posteriormente à caracterização, foram realizados ensaios biológicos para a avaliação da resposta celular em contato direto com os materiais estudados no presente trabalho. Como definido, os grupos utilizados para os testes biológicos foram: Ti, TiO₂, TiO₂+BSA e TiO₂+APTMS+BSA. Apenas a molécula espaçadora APTMS foi utilizada, uma vez que, segundo os resultados obtidos, esta apresentou melhor interação com a superfície hidroxilada de TiO₂.

Para o tempo de 3 horas, foram realizados ensaios referentes à adesão e viabilidade celular, por MTT e Cristal Violeta. Além disso, a expressão dos genes relacionados à adesão (Src, Fak, Cofilina, Integrina α 1 e Integrina β 1) também foram analisados. Após 72 horas de contato direto, a expressão dos genes relacionados ao início da diferenciação osteoblástica (Runx 2, Osterix, ALP, Osteocalcina e BSP) foram analisados. As análises de expressão gênica para adesão e diferenciação osteoblástica foram realizadas por meio da técnica de qPCR. Os resultados apresentados nessa seção foram majoritariamente expressos em gráficos cujos valores exibidos pelo eixo y são relativos ao grupo de controle, que, nesse trabalho, foi utilizado o grupo Ti. Em cada gráfico pode haver a presença de asteriscos acima da barra de erro. Esses asteriscos indicam o quão significativa foi a variação do resultado de determinado grupo em relação ao Ti, quanto maior o número de asteriscos, maior a significância dessa variação.

Na Figura 54 estão dispostos os resultados para os ensaios de viabilidade e adesão celular realizados por MTT e Cristal Violeta, respectivamente. Através dos resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular (Figura 54a) é possível observar uma atividade mitocondrial dos pré-osteoblastos significativamente maior para todos os grupos, em especial o grupo TiO₂+APTMS+BSA. Complementarmente, o ensaio de adesão celular (Figura 54b) apresentou um número maior de células viáveis para o grupo TiO₂, além de valores significativamente maiores para o grupo TiO₂+BSA e, principalmente, para TiO₂+APTMS+BSA. Os resultados de ambos os ensaios apresentam coerência entre si e corroboram com os apresentados na literatura sobre o aumento da biocompatibilidade do Ti quando sua superfície é modificada pelo crescimento do filme de TiO₂ (LÓPEZ-HUERTA et al., 2014; SANGEETHA et al., 2013). Além disso, sugerem maior biocompatibilidade da superfície de TiO₂ na presença de BSA e, em especial, quando imobilizada na presença da molécula espaçadora APTMS.

Figura 54 – Resultados referentes aos ensaios de a) viabilidade celular por MTT e b) adesão celular por Cristal Violeta após contato direto por 3 horas



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Na Figura 55 estão dispostos os gráficos dos genes relacionados à adesão celular. A partir dos resultados, é possível observar valores significativamente maiores na expressão dos genes para o grupo TiO₂+APTMS+BSA, corroborando com os resultados obtidos no teste de adesão celular (Figura 54b). Os demais grupos também apresentaram, de maneira geral, maior expressão dos genes em relação ao grupo controle (Ti), sugerindo que as modificações de superfície realizadas apresentaram uma melhor interação inicial com as células pré-osteoblásticas. O processo de adesão celular é, dentre outros processos, regulado basicamente por mecanismos que modulam a atividade de integrinas, que são proteínas receptoras transmembrana heterodiméricas (subunidade α e β) pertencentes ao grupo de moléculas de adesão celular (CAMs). Elas desempenham o papel de intermediadoras na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas ou da matriz celular por meio da adesão célula-a-célula através de interações com outras proteínas de membrana. Além da função de adesão, essas proteínas são também reconhecidas como moléculas de sinalização capazes realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica. As integrinas podem levar à ativação direta das quinases de adesão focal (Fak), ocasionando a integração com outras proteínas e promovendo uma cascata de sinalização celular. Outras proteínas importantes no processo de adesão são a Src e a Cofilina (HUTTENLOCHER, HORWITZ, 2011; GIANCOTTI, RUOSLAHTI, 1999). Dessa maneira, a investigação da expressão destes genes

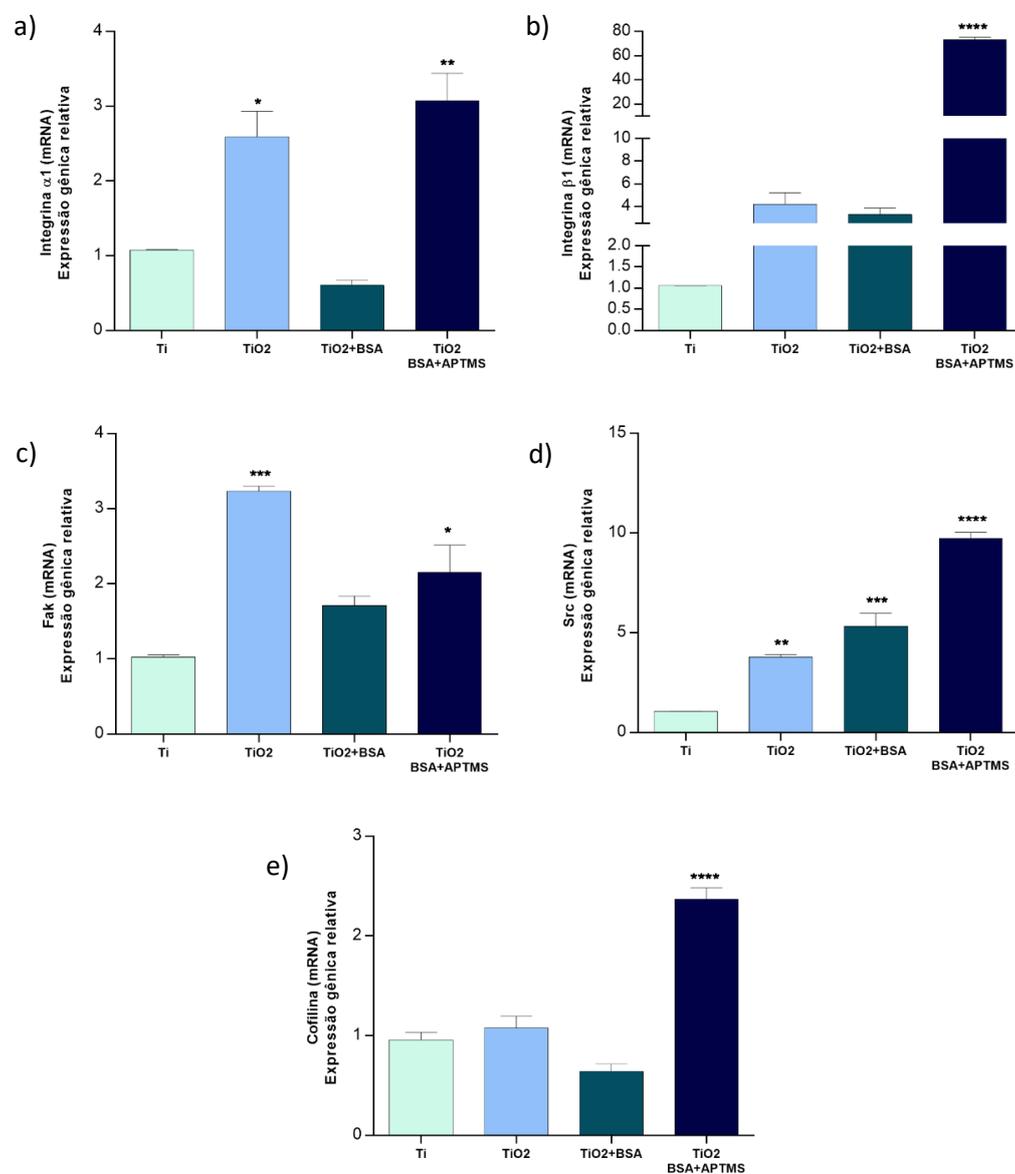
é de grande importância na avaliação da adesão celular, complementar à realizada por Cristal Violeta.

Na Figura 56 estão dispostos os gráficos dos genes relacionados ao início da diferenciação osteoblástica. De maneira geral, todos os grupos apresentaram valores significativamente menores de expressão destes genes, quando comparados ao grupo controle (Ti), exceto o gene Runx 2 que apresentou maior expressão para o grupo TiO₂ (Figura 55a). Isso sugere que, apesar da menor biocompatibilidade, o tempo de diferenciação na superfície do Ti pode ser menor que nas demais superfícies, uma vez que, para o mesmo intervalo de tempo (72 horas) e menor número de células aderidas (Figura 54b), a quantidade de genes expressos foi significativamente maior. Apesar disso, todos os grupos apresentaram expressão dos genes referentes a diferenciação osteoblástica e também é possível notar que a imobilização da albumina na presença do APTMS desempenha uma melhor bioatividade referente a esse processo. Dos genes estudados, o Runx 2 é o principal gene de comutação osteogênica para diferenciação osteoblástica (BEDI; ZANELLO; YAN, 2009). Nesse processo, o Osterix (Otx) também é necessário para a linhagem dos osteoblastos (NAKASHIMA et al., 2002; ZHANG et al., 2008). Desde os osteoprogenitores (células mesenquimais) até os osteoblastos, ocorre primeiramente um estágio proliferativo para posterior diferenciação. As células saem do processo de mitose, transitam para expressar genes como fosfatase alcalina (Alp), sialoproteína óssea (Bsp) e colágeno tipo I (Colla), quando começam a produzir e maturar matriz extracelular osteogênica. Finalmente, elas expressam genes envolvidos na mineralização da matriz extracelular, como osteocalcina (Otc) e osteopontina (Opn). Este processo altamente regulado de expressão gênica e diferenciação celular é governado pela expressão e atividade de diferentes fatores de transcrição (Figura 57), que são proteínas que controlam a taxa de transcrição de informação genética do DNA para o RNA mensageiro, por meio de ligação a uma sequência específica de DNA. Esses fatores não agem sozinhos, mas interagem entre si para integrar diversos sinais e ajustar a expressão gênica (ZHANG, 2010). De um modo geral, todos os grupos apresentaram a expressão dos genes referentes a diferenciação osteoblástica.

De maneira complementar à análise de expressão gênica no que se refere ao estágio inicial da diferenciação osteoblásticas, as atividades da MMP2 e MMP9 foram investigadas por meio da técnica de zimografia nos tempos de 3 e 72 horas. As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes que processam e degradam várias proteínas extracelulares em pH fisiológico. Por serem capazes de degradar componentes proteicos da matriz extracelular (MEC), elas participam de uma variedade de processos fisiológicos, como angiogênese,

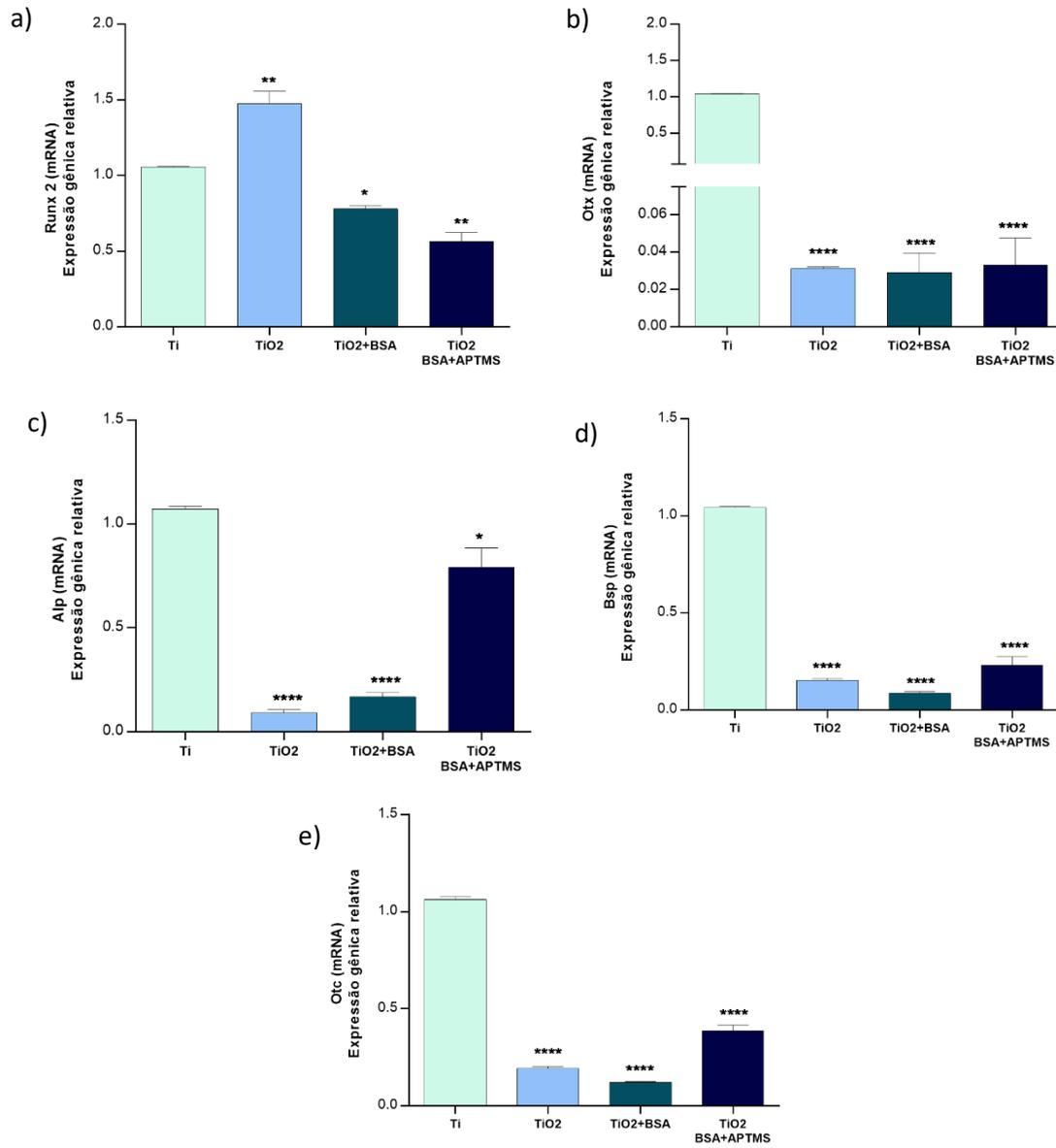
reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas (LI et al., 2000; VANHOUTTE et al., 2006; KUPAI et al., 2010). Desta forma, Mizunami e colaboradores mostraram que a MMP2 e MMP9 estão envolvidas no processo diferenciação osteoblástica, sugerindo suas participações na formação e maturação da matriz extracelular.

Figura 55 – Resultados referentes a expressão dos genes relacionados à adesão celular, são eles a) Integrina $\alpha 1$, b) Integrina $\beta 1$, c) Fak, d) Src e e) Cofilina



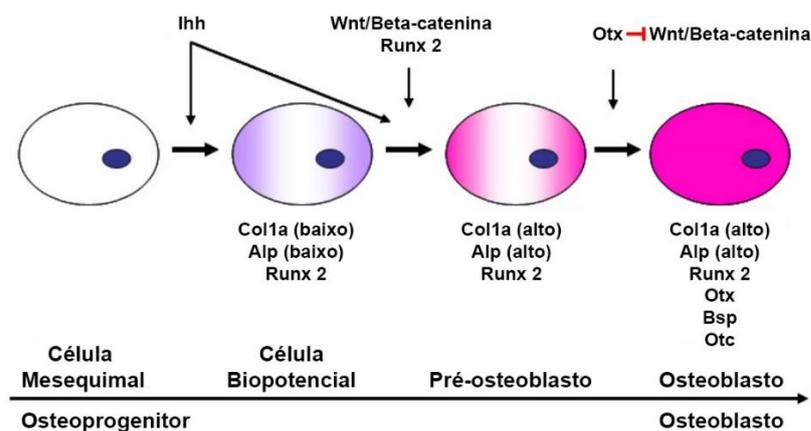
Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 56 – Resultados referentes a expressão dos genes relacionados ao início da diferenciação osteoblástica, são eles a) Runx 2, b) Osterix (Otx), c) Fosfatase alcalina (Alp), d) Sialoproteína óssea (Bsp) e e) Osteocalcina (Otc).



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

Figura 57 – Modelo proposto de regulação coordenada da diferenciação e proliferação de osteoblastos durante a formação óssea pela sinalização da Otx e Wnt/Beta-catenina. Ihh é o iniciador da ossificação endocondral. Os progenitores biopotenciais que expressam Runx 2 podem se diferenciar em osteoblastos ou condrócitos. Em seguida, as células se diferenciam em pré-osteoblastos, onde o Runx 2 desempenha um papel essencial. No próximo passo, os pré-osteoblastos diferenciam-se em osteoblastos maduros, num processo em que o Otx desempenha um papel crítico. A sinalização de Wnt/ β -catenina tem um papel essencial na diferenciação de osteoblastos e na proliferação de osteoblastos. A inibição da atividade de sinalização Wnt/ β -catenina pela Otx constitui um possível mecanismo para a proliferação de osteoblastos

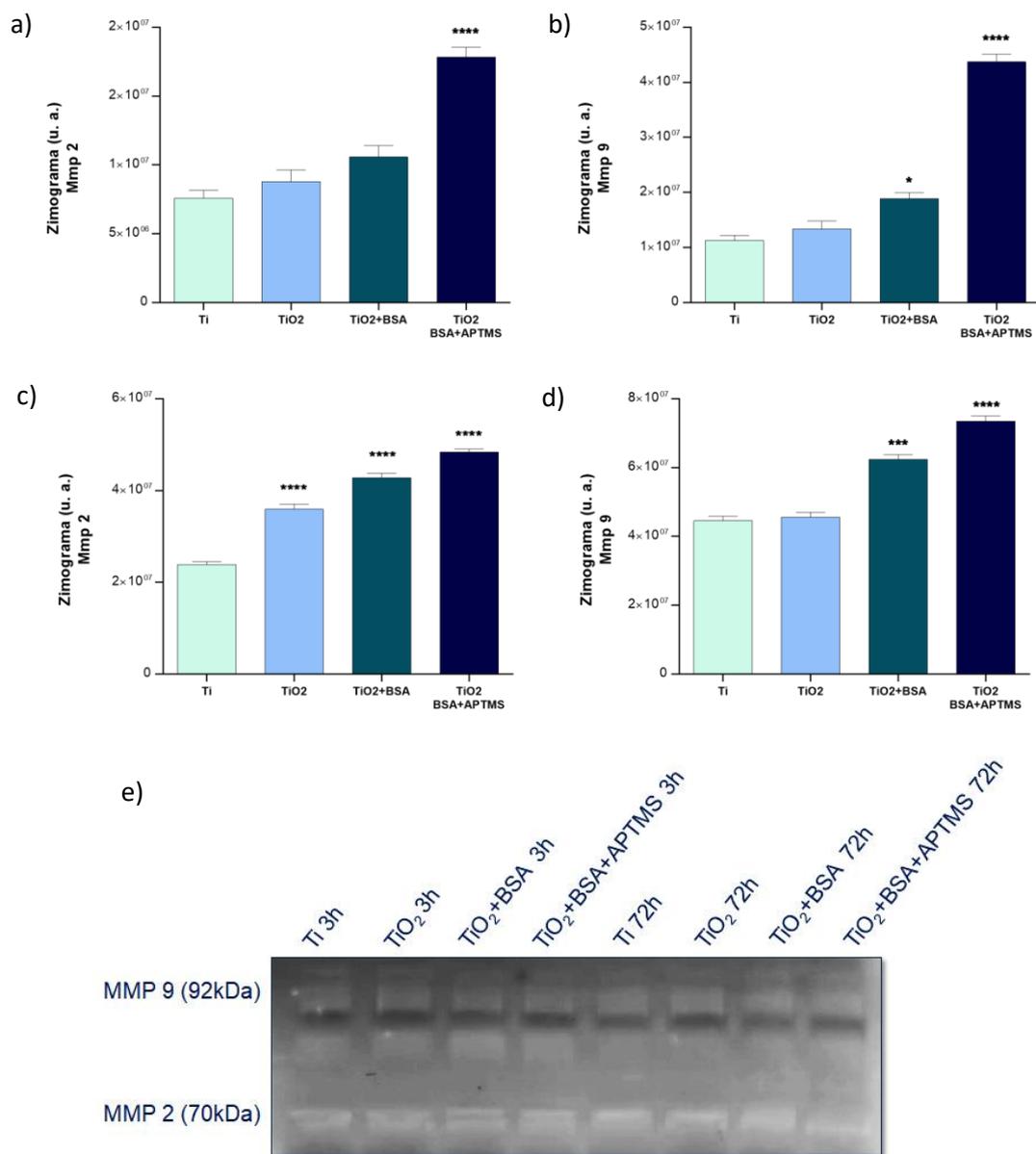


Fonte: adaptado de ZHANG, 2010.

Na Figura 58a-d é possível observar os zimogramas da MMP2 e MMP9 referentes aos grupos estudados, para os tempos de 3 e 72 horas. Além disso, as bandas de degradação do gel pelas enzimas também estão dispostas pela Figura 58e. De acordo com esses resultados, observa-se quantidades relativas significativamente maiores das duas enzimas para o grupo $\text{TiO}_2 + \text{BSA}$ e, especialmente, para $\text{TiO}_2 + \text{APTMS} + \text{BSA}$. Além disso, é possível notar um aumento na presença da MMP2 e MMP9 após 72 horas. Dessa forma, tais resultados corroboram com o envolvimento das mesmas durante o processo de diferenciação osteoblástica, mesmo que em seu estágio inicial. Sabe-se que a matriz extracelular é necessária para várias funções celulares, como adesão, migração, proliferação e diferenciação. Ainda mais, o processo de remodelamento da matriz extracelular (*turnover*) está atrelado ao remodelamento ósseo através da atividade balanceada das MMPs e seus inibidores teciduais, TIMPs e Reck (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; KRANE, INADA, 2008; ZAMBUZZI et al., 2008). É importante lembrar que tais grupos que apresentaram maiores quantidades

dessas enzimas também foram os mesmos grupos que apresentaram melhores resultados de viabilidade e adesão celular. Logo, esse número maior da MMP2 e MMP9 para tais grupos pode estar relacionado com o maior número de células na superfície dos mesmos.

Figura 58 – Resultados referentes a atividade enzimática das MMPs por zimografia, são elas a) MMP2 após 3 horas, b) MMP9 após 3 horas, c) MMP2 após 72 horas, d) MMP9 após 72 horas e e) bandas de degradação pelas MMP2 e MMP9



Fonte: Produzida pelo autor, 2019.

7 CONCLUSÕES

Os filmes de TiO₂ na fase rutilo (monofásico) foram obtidos com sucesso através de ajustes nos parâmetros de deposição. Também foi possível diminuir drasticamente o ângulo de contato da superfície destes filmes através do processo de hidroxilação física, obtendo-se, portanto, superfícies com alta molhabilidade.

Além da análise química, os resultados obtidos por XPS permitiram a análise conformacional das moléculas bifuncionais sobre as superfícies hidroxiladas de TiO₂. Dessa forma, observou-se que, para a molécula MPA, a adesão ocorreu preferencialmente pelo grupo tiol, para a molécula APTMS ocorreu pelo grupo silano e para a molécula APPA os resultados sugerem uma interação do tipo eletrostática pelo grupo carboxila. Dentre as moléculas bifuncionais estudadas, a molécula de APTMS e de APPA apresentaram melhor interação com a superfície de dióxido de titânio na concentração de 3 mM e 2 mM, respectivamente, tendo todos os seus átomos constituintes detectados no espectro *survey*. Embora os resultados obtidos a partir do XPS não evidenciam por onde ocorreu a adesão das moléculas de albumina, há fortes indícios que elas tenham se ligado, tanto à superfície hidroxilada do TiO₂, quanto ao grupo terminal amina das moléculas de APPA e APTMS, uma vez que em todos os processos de imersão foram seguidos de lavagens para remoção das moléculas não ligadas. Comparando os espectros *survey* dos grupos, foi possível dizer que o APTMS aparentou maior eficácia no processo de imobilização da BSA, visto que as contribuições do nitrogênio e carbono foram maiores no grupo com a presença do APTMS atuando como espaçador. O desempenho biológico dos grupos estudados também foi satisfatório, em especial para o grupo TiO₂+APTMS+BSA, com valores de viabilidade, adesão e expressão de genes referentes à adesão significativamente maiores que os apresentados pela superfície de titânio apenas lixada. Além disso, tais resultados também foram maiores quando comparados ao grupo TiO₂+BSA, sugerindo que a imobilização da proteína de albumina pela molécula de APTMS promove uma melhor interação com as células pré-osteoblásticas. Dessa forma, tais resultados corroboram com a hipótese apresentada no presente trabalho. Os resultados de expressão gênica referentes ao início da diferenciação osteoblástica sugerem que, embora os grupos com a superfície modificada apresentem, de maneira geral, maior biocompatibilidade, o tempo de diferenciação das células possa ser maior. Essa hipótese se baseia no menor número de genes expressos em todos os grupos, quando comparados com o titânio. Entretanto, de modo geral, todos os grupos apresentaram expressão dos genes relacionados à essa etapa, além de um aumento na

quantidade relativa das enzimas MMP2 e MMP9 após 72 horas, que estão envolvidas no processo de remodelamento de matrix extracelular e diferenciação osteoblástica. Portanto, o tratamento dessas superfícies com a proteína BSA, especialmente imobilizada pela molécula de APTMS, torna a superfície do biomaterial mais adequada ao ambiente biológicos, apresentando resultados satisfatórios.

Parte dos resultados obtidos nesse trabalho foram divulgados na forma artigo científico pela revista *Materials Chemistry and Physics*, cujo título foi “*3-Mercaptopropionic Acid functionalization of Titanium Dioxide Thin Films*”. Além disso, parte dos resultados também foram divulgados no 2018 MRS *Spring Meeting & Exhibit* (Phoenix, AZ) em forma de painel, intitulado “*3-Mercaptopropionic Acid Functionalization of Anatase and Rutile Titanium Dioxide Thin Films*”.

REFERÊNCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, T.; PAIVA, K. B.; ZAMBUZZI, W. F.; CESTARI, T. M.; LARA, V. S.; SOGAYAR, M. C.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J. M. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 2, p. 201-208, 2008.

ADVINCULA, M.; FAN, X.; LEMONS, J.; ADVINCULA, R. Surface modification of surface sol-gel derived titanium oxide films by self-assembled monolayers (SAMs) and non-specific protein adsorption studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, p. 29-43, 2005.

AMEEN A.; SHORT, R.; DOUGLAS, C.; JOHNS, R.; BALLETT, B. A critical investigation of some of the procedures employed in the surgical use of titanium. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 7, p. 195-199, 1996.

ANBAZHAGAN, E. et al. Divalent ion encapsulated nano titania on Ti metal as a bioactive surface with enhanced protein adsorption. **Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces**, v. 143, p. 213–223, 2016.

ATAMAN, E. et al. Adsorption of L-cysteine on rutile TiO₂(110). **Surface Science**, v. 605, n. 1–2, p. 179–186, 2011.

BEDI, R. S.; ZANELLO, L. P.; YAN, Y. Osteoconductive and Osteoinductive Properties of Zeolite MFI Coatings on Titanium Alloys. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 24, p. 3856–3861, 2009.

BERGMANN, C.P.; STUMPF, A. Dental Ceramics - Microstructure, Properties and Degradation. **Springer - Verlag Berlin Heidelberg**, v. 1, cap. 2, 2013.

BEZERRA, F.; FERREIRA, M. R.; FONTES, G. N.; DA COSTA FERNANDES, C. J.; ANDIA, D. C.; CRUZ, N. C.; DA SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 8, p. 1888-1898, 2017.

BINYU YU, K. M. L. Q. G. M. L. Y. J. Synthesis of Ag–TiO₂ composite nano thin film for antimicrobial application. **Nanotechnology**, v. 22, p. 1-9, 2011.

BIRKHOLZ, M. **Thin Film Analysis by X-Ray Scattering**. WILEY-VCH, 2006.

BRAYBROOK, J. H. **Biocompatibility Assessment of Medical Devices and Materials**.

Chichester: John Wiley, 1997.

CACCIAFESTA, P. et al. Human Plasma Fibrinogen Adsorption on Ultraflat Titanium Oxide Surfaces Studied with Atomic Force Microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 21, p. 8167–8175, 2000.

CALLOW, J. A. et al. The influence of surface energy on the wetting behaviour of the spore adhesive of the marine alga *Ulva linza* (synonym *Enteromorpha linza*). **Journal of The Royal Society Interface**, v. 2, n. 4, p. 319–325, 2005.

CARACELLI, I. **Cristalografia Física**. Disciplina do curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais. Universidade Estadual Paulista. www.Ignez.com. Acessado em novembro de 2008.

CHAPMAN, B. **Glow Discharge Processes: Sputtering and Plasma Etching**. New York: Wiley-Interscience. 1 st edition, 1980.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. P. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 272-288, 2012.

CHEN, S.; GUO, Y.; LIU, R.; WU, S.; FANG, J.; HUANG, B.; LI, Z.; CHEN, Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 58-69, 2018.

CHEN, H. S.; HUANG, S. H.; PERNG, T. P. Highly transparent hard bio-coating synthesized by low temperature sol-gel process. **Surface & Coatings Technology**, v. 233, p. 140-146, 2013.

CISNEROS, J.I. Optical characterization of dielectric and semiconductor thin films by use of transmission data. **Applied Optics**, v. 37, p. 5262, 1998.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray Diffraction**. Addison-Wesley Publishing Company Inc, second edition, 2001.

DA COSTA FERNANDES, C. J.; DO NASCIMENTO, A. S.; DA SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F. Fibroblast contributes for osteoblastic phenotype in a MAPK and sonic hedgehog signaling-independent manner. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 436, n. 1-2, p. 111-117, 2017.

D'ELIA, N. L. et al. Albumin-mediated deposition of bone-like apatite onto nano-sized surfaces: Effect of surface reactivity and interfacial hydration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 494, p. 345–354, 2017.

DEL POZO, J. L. ; PATEL, R. Infection Associated with Prosthetic Joints. **New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 787-795, 2009.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2016.

FIETZ, S. et al. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 266-271, 2008.

FLEMING, G. J. et al. The adsorption and reactions of the amino acid proline on rutile TiO₂(110) surfaces. **Surface Science**, v. 602, n. 12, p. 2029–2038, 2008.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos. **Química nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.

GAPSKI, R.; MARTINEZ, E. F. Behavior of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells Cultured on Titanium and Zirconia Surfaces: An In Vitro Study. **Implant Dentistry**, v. 26, n. 3, p. 373-377, 2017.

GEORGI, A.; GRINNEL, F.; GROTH, T. Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganisation of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, p. 385–391, 1996.

GHAJAR, C. M. et al. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 18, n. 3, p. 251-278, 2008.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

HALLAB, N.; BUNDY, K.; O'CONNOR, K.; MOSES, R. L.; JACOBS, J. J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. **Tissue Engineering**, v. 71, p. 55-71, 2001.

HANAWA, T. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 41, p. 263-272, 2011.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HASHIMOTO, K.; IRIE, H.; FUJISHIMA, A. TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 44, p. 8269-8285, 2005.

HEALY K, E.; DUCHEYNE, P. Hydration and preferential molecular adsorption on titanium in vitro. **Biomaterials**, v. 13, p. 553-561, 1992.

HEIMANN, R. B. Materials science of crystalline bioceramics: a review of basic properties and applications. **Chiang Mai University Journal (CMU Journal)**, v. 1, p. 23 – 46, 2002.

HOLLANDER, A. P.; HATTON, P. V. **Biopolymer methods in tissue engineering**. 2 ed. Totowa: Humana Press Inc., 2004.

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, p. 581-603, 2013.

HÖHN, S. et al. Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 73, p. 798-807, 2017.

INZANA, J. A. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. **Biomaterials**, v. 81, p. 58-71, 2016.

KAKUKA, Y.; NOSAKA, A.Y.; NOSAKA, Y. Difference in TiO₂ photocatalytic mechanism between rutile and anatase studied by the detection of active oxygen and surface species in water. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, 2015.

KELLY, P. J.; ARNELL, R. D. Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. **Vacuum**, v. 56, p. 159-72, 2000.

KILLIAN, M. S. **Organic Modification of TiO₂ and other Metal Oxides with SAMs and Proteins - a Surface Analytical Investigation**. 2013. 233 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Nürnberg, 2013.

KRANE, S. M.; INADA, M. Matrix metalloproteinases and bone. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 7-18, 2008.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.

KUSANDO, E.; KINBARA, A. Time-dependent O₂ mass balance change and target surface oxidation during mode transition in Ti-O₂ reactive sputtering. **Journal of Applied Physics**, v. 87, p. 2015-2019, 2000.

LA ROCCA, G. et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British Journal of Cancer**, v. 90, n.7, p.1414-1421, 2004.

LAW, K. Y.; ZHAO, H. **Surface Wetting: Characterization, Contact Angle and Fundamentals**. Springer, 2016.

LEFEBVRE, V.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1094, n. 1, p. 8-18, 1991.

LEONI, N. **Becker's Spine Review**, 2018. Disponível em: <<http://www.beckersspine.com/ortho-a-spine-review/current-issue.html>>. Acesso em: Mar. 2018.

LI, Y. Y.; McTIERNAN, C. F.; FELDMAN, A. M. Interplay of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 2, p. 214-224, 2000.

- LI, N. et al. Nanocomposite scaffold with enhanced stability by hydrogen bonds between collagen, polyvinyl pyrrolidone and titanium dioxide. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 140, p. 287–296, 2016.
- LINKHART, T. A.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Growth Factors for Bone Growth and Repair: IGF, TGF β and BMP. *Bone*, 19(1), 1996. 1S-12S.
- LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface nano-functionalization of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 70, n. 3–6, p. 275–302, 2010.
- LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- LÓPEZ-HUERTA, F. et al. Biocompatibility and Surface Properties of TiO₂ Thin Films Deposited by DC Magnetron Sputtering. **Materials**, v. 7, n. 6, p. 4105–4117, 2014.
- LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
- MAITZ, M. F. et al. Bio-responsive polymer hydrogels homeostatically regulate blood coagulation. **Nat Commun**, v. 19, 2013.
- MANDLER, D.; TURK, I. Applications of Self-Assembled Monolayers in Electroanalytical Chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1996.
- MARTIN, P. J. Ion-based methods for optical thin film deposition. **Journal of Materials Science**, v. 21, p. 1-25, 1986.
- MARTINS, M. C.; RATNER, B. D.; BARBOSA, M. A. Protein adsorption on mixtures of hydroxyl and methyl terminated alkanethiols self-assembled monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 67, p. 158-71, 2003.
- MCPHERSON, M. J.; MØLLER, S. G. **PCR (THE BASICS)**. New York, Taylor & Francis Group, 2nd ed., 2006.
- MENG, L.; ANDRITSCHKY, M.; DOS SANTOS, M. P. The effect of substrate temperature on the properties of dc reactive magnetron sputtered titanium oxide films. **Thin Solid Films**, v. 223, p. 242-247, 1993.
- MITAL, G. S.; MANOJ, T. A review of TiO₂ nanoparticles. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, p. 1639-1657, 2011.

- MIZUTANI, A.; SUGIYAMA, I.; KUNO, E.; MATSUNAGA, S.; TSUKAGOSHI, N. Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2043–2049, 2001.
- MO, S.; CHING, W. Y. Electronic and optical properties of three phases of titanium dioxide: Rutile, anatase, and brookite. **Physical Review B**, v. 51, p. 23-32, 1995.
- MORAES, C. S. et al. **Série em Biologia Celular e Molecular - Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1 ed, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MRÁZ, S.; SCHNEIDER, J. M. Structure evolution of magnetron sputtered TiO₂ thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 109, 2011.
- NAKAMURA, M. et al. Hydrophilic properties of hydro-oxygenated TiO_x films prepared by plasma enhanced chemical vapor deposition. **Surface and Coatings Technology**, v. 169-170, p. 699-702, 2003.
- NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R.; DE CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, p. 17-29, 2002.
- OCHSENBEIN, A. et al. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 1506-1517, 2008.
- OSHIDA, Y. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials, Second Edition**. Elsevier, 2012.
- PADDOCK, S. W. Confocal Microscopy: Methods and Protocols. **Humana press**, v. 122, 1999.
- PAGE-McCAW, A. et al. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 221-233, 2007.

- PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials** - An introduction, Third Edition. New York: Springer Science + Business Media, 2007.
- PARK, M. S.; KANG, M. The preparation of the anatase and rutile forms of Ag–TiO₂ and hydrogen production from methanol/water decomposition. **Materials Letters**, v. 62, p. 183-187, 2008.
- PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Methods for the Modification and Characterization of Oxide Surfaces. **Interface Science**, v. 5, n. 2–3, p. 103–117, 1997.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, Aplicações E Mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.
- PISKOUNOVA, S. et al. In Vitro Characterization of Bioactive Titanium Dioxide/Hydroxyapatite Surfaces Functionalized with BMP-2. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 91, n. 2, p. 780-787, 2009.
- PLUMB, J. A. **Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay**. Springer Protocols, 2004.
- POINERN, G. E. J.; BRUNDAVANAM, S.; FAWCETT, D. Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potential as a biodegradable orthopaedic implant. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 218-240, 2012.
- PUJARI, S. P. et al. Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 25, p. 6322–6356, 2014.
- QU, Q. et al. Chemically Binding Carboxylic Acids onto TiO₂ Nanoparticles with Adjustable Coverage by Solvothermal Strategy. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9539–9546, 2010.
- RATNER, B. D. **Biomaterials Science** – An Introduction to Materials in Medicine; Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J.E., eds; Elsevier: Oxford, 2013.
- RISS, T. L. et. al. **Assay Guidance Manual**. Cell Viability Assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.
- ROOMI, M. W. et al. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. **Oncology Reports**, v. 28, n. 3, p. 768-776, 2012.

RUARDY, T. G.; SCHAKENRAAD, J. M.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J.; Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, p.1415–1423, 1995.

RUSSELL, A. The Rev. William Gregor (1761-1817), Discoverer of Titanium. **Mineralogical Magazine**, v. 30, p. 617-624, 1955.

RYU, D. Y. et al. A generalized approach to the modification of solid surfaces. **Science**, v. 308, n. 5719, p. 236–239, 2005.

SAFONOV, V. et al. Modification of implant material surface properties by means of oxide nano-structured coatings deposition. Applied Surface Science, Selected manuscripts arising from the **18th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams (SMMIB-2013)**, v. 310, p. 174–179, 2014.

SANGEETHA, S. et al. Biocompatibility studies on TiO₂ coated Ti surface. 2013 International Conference on Advanced Nanomaterials and Emerging Engineering Technologies (ICANMEET). Anais... **In: 2013 INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED NANOMATERIALS AND EMERGING ENGINEERING TECHNOLOGIES (ICANMEET)**, 2013.

SILVA-BERMUDEZ, P.; MUHL, S.; RODIL, S. E. A comparative study of fibrinogen adsorption onto metal oxide thin films. **Applied Surface Science**, v. 282, p. 351–362, 2013.

SILVA-BERMUDEZ, P.; RODIL, S. E. An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. **Surface & Coatings Technology**, v. 233, p. 147-158, 2013.

SIMONSEN, M. E.; LI, Z.; SØGAARD, E. G. Influence of the OH groups on the photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of microwave assisted sol–gel TiO₂ film. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 8054-8062, 2009.

SIN, M.-C. et al. An intuitive thermal-induced surface zwitterionization for versatile, well-controlled haemocompatible organic and inorganic materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 54–64, 2015.

SJÖSTRÖM, T. et al. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices. **Nanomedicine**, v. 8, p. 89-104, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of Instrumental Analysis. Belmont, CA. **Thomson Brooks/Cole**. v. 6, p. 169–173, 2007.

SKORB, E. V.; ANDREEVA, D. V. Surface Nanoarchitecture for BioApplications: Self-Regulating Intelligent Interfaces. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 36, p. 4483–4506, 2013.

SMITH, D.L. **Thin Film Deposition: Principles and Practice**, McGraw-Hill, Boston, MA, 1995.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

SONG, Y.-Y.; HILDEBRAND, H.; SCHMUKI, P. Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO₂. **Surface Science**, v. 604, n. 3–4, p. 346–353, 2010.

SUMITA, M.; HANAWA, T.; TEOH, S. H. Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials—review. **Materials Science and Engineering**, v. 24, p. 753-760, 2004.

TIDWELL, C. D. et al. Static Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry and X-Ray Photoelectron Spectroscopy Characterization of Adsorbed Albumin and Fibronectin Films. **Surface and Interface Analysis**, v. 31, p. 724-733, 2001.

TONIATO, R. G. **Efeitos de tratamentos térmicos em filmes nanocristalinos de tio₂ preparados por sputtering**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Bauru. 2013.

TRINO, L. D. **Desenvolvimento e otimização de materiais nanocristalinos para células solares sensibilizadas**. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Bauru. 2014.

TRINO, L. D. et al. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 81, p. 26–38, 2018.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.

URIST, M. R. Bone: Formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893–899, 1965.

VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nature Methods**, v. 10, n. 3, p. 211-220, 2013.

VANHOUTTE, D. et al. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 604-613, 2006.

WANG, Y. et al. Research of protein adsorption on the different surface topography of the zinc oxide. **Surface and Interface Analysis**, v. 47, n. 2, p. 245–252, 2015.

WASA, K.; KITABATAKE, M.; ADACHI, H. **Thin Films Materials Technology: Sputtering of Compound Materials**. Springer, 2004.

WATTS, J. F.; WOLSTENHOLME, J. **An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES**. Wiley, 2003.

WEBB, K.; HLADY, V.; TRESKO, P. A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblasts attachment, spreading, and cytoskeletal organization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 241, p. 422– 430, 1998.

WEI, C. H., et al. Analysis of Surface Property of TiO₂ Thin Film Prepared by Sputtering. **Tamkang Journal of Science and Engineering**, v. 10, p. 177-181, 2007.

WILLIAMS, D.F. **Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool University Press, 1999.

WILLIAMS, L. M.; HESS, D. W. Structural properties of titanium dioxide films deposited in an rf glow discharge. **Journal of Vacuum Science & Technology A**, v. 1, p. 1810-1819, 1983.

WILSON, C. J. et al. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1–2, p. 1–18, 2005.

WILSON, J. N.; DOWLER, R. M.; IDRIS, H. Adsorption and reaction of glycine on the rutile TiO₂(011) single crystal surface. **Surface Science**, v. 605, n. 1–2, p. 206–213, 2011.

WON, D. J. et al. Effects of thermally induced anatase-to-rutile phase transition in MOCVD-grown TiO₂ films on structural and optical properties. **Applied Physics A**, v. 73, p. 595-600, 2001.

YANG, C. et al. Effects of depositing temperatures on structure and optical properties of TiO₂ film deposited by ion beam assisted electron beam evaporation. **Applied Surface Science**, v. 254, p. 2685-2689, 2008.

YOUNG, T. An essay on the cohesion of fluids. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 95, p. 65–87, 1805.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, p. 143-150, 2008.

ZHANG, C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 37, p. 1-7, 2010.

ZHANG, C.; CHO, K.; HUANG, Y.; LYONS, J. P.; ZHOU, X.; SINHA, K.; MCCREA, P. D.; DE CROMBRUGGHE, B. Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, p. 6936-6941, 2008.

ZORBA, V.; CHEN, X.; MAO, S. S. Superhydrophilic TiO₂ surface without photocatalytic activation. **Applied Physics Letters**, v. 96, p. 1-3, 2010.